

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. M. Hannig

**Vergleichende Untersuchung des säureprotektiven
Potentials einer innerhalb von
zwei, sechs, zwölf und 24 Stunden in situ gebildeten
Pellikel**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2008

vorgelegt von: Björn Echterhoff
geb. am: 13.10.1979 in Saarbrücken

1. Tag der Promotion:
2. Dekan:
3. Berichterstatter:

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
	Summary	3
2	Einleitung	4
2.1	Pellikel.....	4
2.1.1	Bildung, Zusammensetzung und Struktur der Pellikel.....	4
2.1.2	Funktionen und Auswirkungen der Pellikel.....	7
2.2	Erosion	8
2.2.1	Grundlagen	8
2.2.2	Ätiologie der Erosion	9
2.3	Fragestellung	11
3	Material und Methodik.....	13
3.1	Grundlagen für die Gewinnung der in situ gebildeten Pellikel.....	13
3.1.1	Herstellung, Reinigung und Aufbewahrung der Prüfkörper	13
3.1.2	Herstellung der Trageschienen.....	14
3.1.3	Fixierung der Prüfkörper an den Trageschienen	15
3.2	Gewinnung der In-situ-Pellikel	16
3.2.1	Probanden.....	16
3.2.2	Expositionszeiten	17
3.3	Künstliche Erosion der pellikelbedeckten Prüfkörper	17
3.4	Bestimmung des protektiven Potentials der Pellikel.....	19
3.4.1	Messung der säureinduzierten Calciumfreisetzung aus dem Zahnschmelz mittels AAS	19
3.4.2	Bestimmung des erosionsbedingten Mikrohärteverlustes der Prüfkörperoberfläche.....	21
3.4.3	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der erodierten Prüfkörperoberfläche.....	23
3.4.4	Transmissionselektronenmikroskopische Analyse der residualen Pellikelstrukturen	24
3.4.5	Statistische Auswertung der quantitativen Messmethoden	25

4	Ergebnisse	27
4.1	Quantitative Untersuchung des säureprotektiven Potentials der Pellikel.....	27
4.1.1	Messung der säureinduzierten Calciumfreisetzung aus der Schmelz- oberfläche	27
4.1.2	Bestimmung des erosionsbedingten Mikrohärteverlustes der Schmelz- oberfläche	30
4.2	Qualitative Untersuchung des säureprotektiven Potentials der Pellikel.....	33
4.2.1	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der erodierten Schmelzoberfläche	33
4.2.2	Transmissionselektronenmikroskopische Analyse der Pellikel	38
5	Diskussion	40
5.1	Diskussion von Material und Methodik	40
5.1.1	Studiendesign und Fragestellung	40
5.1.2	Art, Herstellung und Bearbeitung der Prüfkörper	41
5.1.3	Pellikelgewinnung	43
5.1.4	Probandenselektion	44
5.1.5	Künstliche Erosion der Prüfkörper.....	45
5.1.6	Mess- und Analysemethoden	47
5.2	Diskussion der Ergebnisse	49
5.2.1	Säureinduzierte Calciumfreisetzung aus der Schmelzoberfläche	49
5.2.2	Säureinduzierter Mikrohärteverlust der Schmelzoberfläche.....	50
5.2.3	Säureinduzierte strukturelle Veränderungen des Zahnschmelzes (REM-Analyse)	52
5.2.4	Säureinduzierte strukturelle Veränderungen der Pellikel (TEM-Analyse)	53
5.3	Schlussfolgerungen und klinischer Bezug	54
6	Literaturverzeichnis.....	56
7	Danksagung.....	71
8	Lebenslauf.....	72

1 Zusammenfassung

Auf sämtlichen Festkörperoberflächen, die dem Mundhöhlenmilieu exponiert werden, etabliert sich innerhalb kürzester Zeit ein Proteinfilm aus adsorbierten Speichel-Biopolymeren. Diese so genannte Pellikel besitzt unter anderem ein protektives Potential gegenüber Säureattacken auf die Zahnhartsubstanz. Trotz zahlreicher In-vitro- und In-vivo- Untersuchungen gibt es keinen wissenschaftlichen Konsens über die Zusammenhänge zwischen der Bildungszeit der Pellikel und dem Ausmass ihres säureprotektiven Charakters. Es ist unklar, ob die zeitabhängige morphologische und biochemische Reifung der Pellikel mit ihrem säureprotektiven Potential korreliert. Die vorliegende Studie soll zusätzliche Informationen liefern, ob sich das säureprotektive Potential einer innerhalb von zwei, sechs, zwölf und 24 Stunden in situ gebildeten Pellikel unterscheidet. Die experimentelle Pellikelbildung erfolgte auf standardisiert oberflächenbearbeiteten Prüfkörpern aus bovinem Zahnschmelz. Diese wurden von sechs Probanden an herausnehmbaren Trageschienen für die jeweiligen Zeiträume auf der bukkalen und palatinalen Seite des Oberkieferseitenzahnbereiches inkorporiert. Nach Ablauf der Pellikelbildungszeit erfolgte eine einminütige künstliche Erosion der pellikelbedeckten Prüfkörper mit 0,1% und 1%iger Zitronensäurelösung unter kontinuierlicher Agitation. Die quantitative Auswirkung der Pellikelbildungszeit auf das protektive Potential wurde einerseits anhand von Mikrohärtedifferenzmessungen vor und nach der Säureerosion sowie andererseits durch Bestimmung der infolge der Säureeinwirkung erodierten Calciummenge mittels Flammen-Atomabsorptionsspektrophotometrie evaluiert. Zusätzlich erfolgte eine qualitative raster- und transmissionselektronenmikroskopische Analyse der Schmelzoberfläche und der residualen Pellikelultrastruktur. Während die qualitativen Untersuchungen die Interpretation von Unterschieden in der Bildungszeit und der intraoralen Lokalisation zuließen, konnten anhand der quantitativen Ergebnisse keine signifikanten Zusammenhänge ($p < 0,05$) zwischen den Parametern Bildungszeit, Bildungsort und Säureprotektion festgestellt werden. Das Ausmaß der Erosion durch die beiden verwendeten Zitronensäurelösungen unterschied sich jedoch signifikant durch einen höheren Mikrohärteverlust und durch stärkere Calciumfreisetzung in Abhängigkeit von der Säurekonzentration. Es kann erstmals konstatiert werden, dass in Anbetracht der gewählten Versuchsbedingungen kein Unterschied innerhalb des Zeitraumes von zwei bis 24 Stunden hinsichtlich der säureprotektiven Eigenschaften der Pellikel existiert. Eine Pellikelschicht nach zweistündiger Bildungszeit scheint den durch sie bedeckten Zahnschmelz demnach ebenso suffizient vor erosiven Säureangriffen zu schützen wie eine 24

Stunden alte Pellikel. Allerdings kann die in situ gebildete Pellikel die Erosion der Zahnschmelzoberfläche durch Zitronensäure nicht verhindern. Es werden die Resultate jüngerer Studien unterstützt, die der Pellikelmaturation im Hinblick auf die Säureprotektion eine eher untergeordnete Rolle beimessen.

1 Summary

Comparative investigation of the protective potential of a 2-, 6-, 12-, and 24-hour in-situ pellicle against enamel erosion

All solid substrata exposed to the oral cavity are very rapidly covered by a film-like layer of salivary origin. This so-called acquired pellicle is the result of selective adsorption of salivary biopolymers. The pellicle contains a certain protective potential against the attack of acid solutions during erosive demineralisation. The time-dependent biochemical and micromorphological maturation of the pellicle is well analysed from various in vitro and in vivo studies. However, the actual relation between the time of pellicle formation and the amount of its protective properties is not completely understood. The purpose of this present study was to compare the protective effect of a 2-, 6-, 12- and 24-hour old in situ formed pellicle. Bovine enamel slabs with standardised polished surfaces were attached to the buccal and lingual aspect of the upper first molars in six volunteers using intraoral removable splints. After the particular pellicle formation time, the slabs were artificially eroded in 0,1% and 1% citric acid under continuous agitation for the duration of 1 minute. The amount of protection was recorded by microhardness loss, compared before and after the acid erosion, and measurement of calcium release by flame atomic absorption spectrophotometry. In addition, the eroded enamel surfaces and the residual pellicles were qualitatively analysed by scanning and transmission electron microscopy. The two quantitative approaches did not present any statistically significant correlations ($p < 0,05$) between pellicle formation period, intraoral localisation and the protective potential of the pellicle. However, citric acid of higher concentration showed significantly higher surface hardness loss and calcium release. Both qualitative electron microscopic analyses delivered representative results showing a weak correlation between pellicle formation time and its protective properties. The present results strongly support the contemporary view, that time-dependent pellicle maturation seems to be of minor importance concerning the protective properties of the pellicle. It could be shown that even a 2-hour in situ pellicle seems to protect the underlying enamel surface as efficiently as a 24-hour pellicle. However, the acquired pellicle is not able to inhibit enamel erosion. As the process of pellicle maturation tended to be overrated in the past, the actual results should be considered in oral hygiene recommendations.

2 Einleitung

2.1 *Pellikel*

2.1.1 **Bildung, Zusammensetzung und Struktur der Pellikel**

An den Phasengrenzen zwischen festen und flüssigen Systemen kommt es unter geeigneten Bedingungen durch spezifische Adhäsionsphänomene zur Ausbildung von Biofilmen, was mit einer Ansiedelung von Mikroorganismen einhergeht. Als Beispiele für das ubiquitäre Vorhandensein von Biofilmen seien Trinkwasserversorgungssysteme genannt, deren Innenvolumina nach einiger Zeit von einer dünnen, film- oder schleimartigen Schicht überzogen werden können (Szewzyk und Szewzyk, 2003). Eine besondere Relevanz des Phänomens Biofilm ergibt sich im Bereich der Humanmedizin (Donlan, 2001), beispielsweise bei der bakteriellen Besiedelung von Kathetern (Passerini et al., 1992), Kontaktlinsen (Elder et al., 1995) oder künstlichen Herzklappen (Padera, 2006). Auch die Entstehung der beiden bedeutsamsten zahnmedizinischen Erkrankungen, nämlich der Karies und der Parodontitis, bedingt die Existenz eines pathogenen Biofilmes auf der Zahn- oder Implantatoberfläche (Lange et al., 2004; Newman und van Winkelhoff, 2001; Hellwig et al., 2003). Diese zunächst hochspezifische bakterielle Kolonisation setzt allerdings das Vorhandensein einer geeigneten und modifizierenden „Unterlage“ voraus.

Auf sämtlichen Festkörperoberflächen, die dem Mundhöhlenmilieu exponiert werden (Hannig, 1998), etabliert sich aus dem Speichel innerhalb kürzester Zeit eine filmartige Bedeckung aus selektiv adsorbierten Biopolymeren, die als Basis für die weitere Biofilmbildung dient. Diese zunächst bakterienfreie Schicht wird als Pellikel (engl. *acquired pellicle*, von lat. *pellucula dentis*; Dawes et al., 1963) bezeichnet. Frühere Arbeiten aus dem deutschsprachigen Raum verwendeten auch den Terminus des *erworbenen Schmelzoberhäutchens* (Schüle, 1961 und 1964), welcher allerdings irreführend ist. Vielmehr wurde mittlerweile konstatiert, dass nicht nur auf der Schmelzoberfläche, sondern auf sämtlichen organischen und anorganischen Oberflächen im oralen Milieu pellikelähnliche Strukturen zu finden sind (Hannig, 1994a und 1994b). Selbst die bakterielle Plaque an sich konnte von einer pellikelähnlichen Schicht be-

deckt vorgefunden werden (Tinanoff et al., 1976). Erste Anzeichen für eine Pellikelbildung konnten bereits nach wenigen Sekunden nachgewiesen werden (Hannig, 1999).

Als zugrunde liegende Adhäsionsmechanismen kommen zahlreiche elektrophysikalische Bindungsvarianten in Frage. Die beteiligten Makromoleküle sind amphiphil und verfügen somit über polare und apolare Gruppen sowie charakteristische funktionelle Seitenketten. Alleine aufgrund dieser Eigenschaft tendieren sie zur Konzentration und Akkumulation an der Phasengrenze. Da es im Bereich der Zahnoberfläche im feuchten Speichelmilieu zu Ladungsverschiebungen kommt (Schiffner, 1997), gehen die Calciumionen und Phosphatgruppen des Schmelzes elektrostatische Bindungen zu den polaren Gruppen der Speichelproteine sowie weiterer Makromoleküle ein. Als weitere, scheinbar untergeordnete Adhäsionsphänomene wurden Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Interaktionen, van der Waals-Kräfte sowie Konformationsänderungen der Proteine beschrieben (Hannig, 1994a).

Die Pellikel setzt sich hauptsächlich aus Proteinen, Lipiden und Kohlenhydraten zusammen (Hannig, 1994a).

Biochemische Untersuchungen zeigten, dass die Mehrzahl der isolierten Eiweiße aus Phospho- sowie sauren prolinreichen Proteinen gebildet wird (Lendenmann et al., 2000). Auch sulfatierte Glykoproteine und hochmolekulare Speichelmuzine konnten detektiert werden. Weiterhin gelang die Identifikation von unterschiedlichen immobilisierten Enzymen und Immunglobulinen, wie beispielsweise IgA, IgG, IgM, Albumin (Lendenmann et al. 2000), α -Amylase (Deimling et al, 2004) und Lysozym (Hannig C et al., 2005). Dabei liegt die durchschnittliche Molekülmasse der an der Pellikelformation beteiligten Proteine unter einem Wert von 67.000 (Eggen und Rölla, 1983 und 1982). Nach zwei Stunden der Pellikelformation scheint sich ein Gleichgewicht zwischen Proteinad- und desorption einzustellen. Sönju und Rölla (1973) konnten in vivo nach 90 Minuten keine signifikanten Änderungen des Aminosäuregehaltes erkennen, während Skjorland et al. (1995) die molekulare Pellikelbildung an sich bereits nach 45 Minuten für beendet halten. Bemerkenswert ist neben dem Vorhandensein bakterieller Komponenten, wie der Glykosyltransferase (Frentzen, 1982) in der Pellikel, die Tatsache, dass die an der Pellikelbildung beteiligten Enzyme nach wie vor in aktiver Form vorliegen (Scheie et al., 1987; Hannig C et al., 2006). Durch das Vorhandensein aktiver Enzyme wird die gezielte Ausbildung eines pathogenen Biofilmes entscheidend beeinflusst (Kho et al., 2005).

Der Anteil an Lipiden innerhalb der Pellikel liegt im Trockenzustand bei circa 20 Gewichtsprozent (Slomiany et al., 1990 und 1986), wobei Glykolipide, freie Fettsäuren, Triglyceride,

Cholesterin und weitere lipidhaltige Moleküle analysiert worden sind. Hinsichtlich des individuellen Lipidgehaltes und dessen Zusammensetzung kommt es im Gegensatz zum Proteingehalt in Abhängigkeit vom individuellen Kariesrisiko zu starken interindividuellen Schwankungen (Slomiany et al., 1990 und 1986).

Die Hauptbestandteile aus der Molekülgruppe der Kohlenhydrate sind Glukose, Fruktose, Galaktose, Mannose und diverse Sialinsäuren, wobei letztere eine besondere Bedeutung bei der bakteriellen Adhärenz zu haben scheinen (Hannig, 1994a). Der vergleichsweise hohe Gehalt von Glukose mit 65% aller Kohlenhydrate in der Pellikel wird zurückgeführt auf das Vorhandensein von extrazellulären Polysacchariden bakteriellen Ursprungs und die Anwesenheit zusammengesetzter Moleküle wie Glykolipiden.

Während frühere Untersuchungen eher von einer einheitlich amorphen Pellikelstruktur ausgingen (Armstrong und Hayward, 1968), haben neuere Analysen unter Einbeziehung der Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie gezeigt, dass die Pellikel durchaus komplex zusammengesetzt ist (Hannig, 1999 und 1989).

Einer mit ungefähr 10-20nm relativ dünnen und homogenen Basalschicht aus initial adsorbierten Proteinen ist je nach intraoralem Bildungsort eine äussere Schicht mit größerer ultrastruktureller Variationsbreite aufgelagert. Die heterogenen Auflagerungen sind als granulär und globulär sowie vakuolenartig durchsetzt beschrieben worden (Schübach et al., 1996; Hannig, 1989). Transmissionselektronenmikroskopische Analysen zeigten weiterhin, dass die Pellikeladhärenz nicht nur auf die Zahnschmelzoberfläche beschränkt ist, sondern die Schmelzoberfläche auch filamentös penetrieren kann (Hannig, 1989; Tinanoff et al., 1976; Meckel, 1965). Dieses Phänomen wird als *subsurface pellicle* bezeichnet und ist vornehmlich an approximalen Zahnflächen anzutreffen.

Die Messung der Pellikeldicke wird in zahlreichen Untersuchungen kontrovers bewertet, so dass Schichtdicken von wenigen Nanometern bis hin zu mehreren Mikrometern beschrieben wurden. Hannig (1999) mass im transmissionselektronenmikroskopischen Vergleich der In-situ-Pellikel Werte von 10-20nm nach einer Minute, 200-300nm nach 30 Minuten, 200-500nm nach 60 Minuten, 200-700nm nach zwei Stunden, 500-1000nm nach sechs Stunden bis hin zu 1000-1300nm nach 24 Stunden für bukkal im Oberkieferseitenzahnbereich gebildete Pellikel. Für palatinal im Oberkieferseitenzahnbereich in situ gebildete Pellikelschichten wurden Werte von 30-50nm nach 60 Minuten, 20-80nm nach zwei Stunden, 100nm nach sechs Stunden und 200nm nach 24 Stunden beschrieben.

Es zeigte sich, dass die Ultrastruktur der Pellikel je nach intraoraler Bildungsstätte variiert, so dass lokaldisponierende Faktoren wie die spezifische Speichelkomposition aus den jeweiligen Drüsen oder mechanische Irritationen wie Zungen- und Wangenmobilität eine Rolle zu spielen scheinen.

2.1.2 Funktionen und Auswirkungen der Pellikel

Der Pellikel werden verschiedene physiologische Funktionen zugeschrieben, die vornehmlich dem Schutz der Zahnoberfläche vor schädlichen Einflüssen dienen sollen.

Einerseits reduziert sie im Sinne eines Lubrikants Abrasions- und Attritionsphänomene zum einen zwischen antagonisierenden Zahnoberflächen sowie zum anderen zwischen der Zahnoberfläche und der oralen Mukosa durch das Zustandekommen einer „Schmierwirkung“. Die Anwesenheit der Pellikel reduziert die Friktion zwischen zwei Zahnhartsubstanzflächen um den Faktor 20 (Berg et al., 2003). Der zumindest teilweise Verlust dieses lubrifizierenden Charakters lässt sich zum Beispiel nach dem Verzehr saurer Lebensmittel wie Zitronensaft als reversibles Gefühl der matten und „pelzigen“ Zahnoberfläche erleben.

Andererseits fungiert die Pellikel nach dem Prinzip einer semipermeablen Membran (Zahradnik, 1976) und ist somit in der Lage, Diffusions- und Ionenaustauschprozesse zwischen der von ihr bedeckten Zahnhartsubstanz und dem sie umgebenden Speichelmilieu zu beeinflussen. Von besonderer Bedeutung ist diese Modulation bei De- und Remineralisationsabläufen im Rahmen von erosiver Einwirkung von Säuren und Chelatoren auf die Zahnhartsubstanz. Die Löslichkeit des Zahnschmelzes wird durch eine Hemmung der Diffusion von Calcium- und Phosphationen sowie der sauren Noxe selbst herabgesetzt. Balz (1999) kommt allerdings zu dem Schluss, dass der Hauptmechanismus für die Säureprotektion weniger in der Semi-permeabilität, sondern vielmehr in dem säurebedingten Auflösungsverhalten der Pellikel zu liegen scheint. In Abhängig von Säurestärke und Einwirkzeit kommt es teilweise bis zum vollständigen Verlust der Pellikel.

Auch die Remineralisation unterliegt der Modulation durch die Pellikelbedeckung, so dass einer übermäßigen Anlagerung von Calciumionen und somit klinisch einer überschüssenden Zahnsteinbildung vorgebeugt wird (Hannig und Joiner, 2006; Hannig, 1994a).

Die Pellikel ist mit ihrem Gehalt an antimikrobiellen und pufferähnlichen Speichelkomponenten wie IgA, Lactoferrin, Lysozym, Carboanhydrase I und II mit einer immunologischen Barriere zu vergleichen (Deimling et al., 2007).

Als unerwünschte Funktion der Pellikel wird die Unterstützung der bakteriellen Besiedelung der Zahnoberfläche angesehen (Hannig und Hannig, 2007; Hannig und Joiner, 2006; Koo et al, 2006; Sharma et al, 2005; Newman und van Winkelhoff, 2001; Lie, 1975), für die die Pellikel eine Reihe spezifischer Rezeptoren zur Verfügung stellt. Die Anwesenheit der Pellikel stellt die initiale Phase der Plaquebildung dar (Müller, 2001). Die bakterielle Kolonisation und Proliferation setzt eine irreversible Adhäsion der Bakterien voraus. Indem die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Zahnschmelzoberfläche verändert werden, wird die bakterielle Adhäsion beeinflusst. Während einerseits die oben beschriebenen Bindungsmechanismen die Anbindung der Pellikel an die Zahnoberfläche gewährleisten, dienen spezielle Moleküle als Rezeptoren für die bakterielle Adhäsion an die Pellikel. Kopec und Bowen (1995) zeigten in einer speziesübergreifenden Vergleichsstudie zwischen Mensch und Ratte auf, dass die bakterielle Adhäsion auf der Grundlage humaner und tierischer Pellikel prinzipiell vergleichbar abläuft.

Eine weitere unerwünschte Eigenschaft ist die Tendenz der Pellikel, durch Einlagerung exogener Farbstoffe oder denaturierender Agenzien wie Chlorhexidin eine Verfärbung von Zahnoberflächen zu bewirken (Hannig und Joiner, 2006; Joiner et al., 2006; Lee und Powers, 2006)

2.2 Erosion

2.2.1 Grundlagen

Als Erosion wird die chronische oberflächliche Destruktion der Zahnhartsubstanz bezeichnet, die in Folge einer chemischen Reaktion ohne primäre bakterielle Beteiligung erfolgt. Die Einwirkung saurer Noxen führt in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren wie beispielsweise der Säurestärke, Einwirkdauer und -intervalle und physiologischer Protektion, zu einer übermäßigen Demineralisation des Kristallgefüges und damit zur Zerstörung der Zahnhartsubstanz. Als sogenannter kritischer pH-Wert wird die Marke von 5,5 angesehen (Jenkins, 1963), unterhalb derer die Demineralisation im Vergleich zur Remineralisation überwiegt.

Das Krankheitsbild der Erosion zählt neben den kariösen Veränderungen zu den Hauptursachen für den pathologischen Verlust von Zahnhartsubstanz und wird in westlichen Industrienationen mit einer Prävalenz von bis zu 25 Prozent beziffert (Putz und Attin, 2002). Klinisch

tritt zunächst ein nichtverfärbter, seichter und schüsselförmiger Oberflächenverlust im Bereich des Zahnschmelzes zutage, wobei es bei progredienter Exposition zur vollständigen Perforation des Schmelzmantels kommen kann. In der Regel werden Erosionen vom Patienten erst bei Erreichen des Dentinkerns in Form von thermischen Hypersensitivitäten registriert (Zero und Lussi, 2005). Während eine therapeutisch-restaurative Intervention erst beim Vorliegen fortgeschrittener Erosionen mit Exposition des Dentins angezeigt ist, sind bereits bei als initial erkannten Defekten individuelle Ernährungs- und Mundhygieneinstruktionen des Patienten sowie eine Empfehlung zur topischen Fluoridgabe erforderlich (Hove et al., 2007; Wiegand und Attin, 2006; Zero und Lussi, 2005).

Erosionen treten selten isoliert auf und gehören zu einer Trias, bestehend aus Abrasion, Attrition und Erosion (Lussi und Hellwig, 2006), die mit dem gebrauchsbedingten Verlust von Zahnhartsubstanz (*engl. tooth wear*, Knevel und van der Woord, 2007; Addy und Shellis, 2006) in Verbindung gebracht wird. Nur in den seltensten Fällen ist eine der drei Ursachen alleine für den progredienten Verlust von Zahnhartsubstanz verantwortlich. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle wirken mehrere dieser Faktoren im Sinne eines negativen Synergismus. Besonders gravierend ist in diesem Zusammenhang die verstärkte abrasive Wirkung des Zähneputzens auf zuvor durch Säureeinwirkung „erweichten“ Zahnschmelz (Addy und Shellis, 2006; Eisenburger et al., 2003; Hooper et al., 2003; Attin et al., 1997). Selbst abrasive Berührungen der Zahnoberfläche durch Schleimhautbewegungen von Zunge und Wange haben auf derart erweichten Zahnschmelz eine schädigende Wirkung (Gregg et al., 2004)

2.2.2 Ätiologie der Erosion

Hinsichtlich der Ätiologie erosiver Erscheinungen wird zwischen endogenen und exogenen Faktoren unterschieden, wobei diese zusätzlich durch diverse Wirtsfaktoren beeinflusst werden können (Wiegand und Attin, 2006).

Endogen oder intrinsisch bedingte Erosionen werden definitionsgemäss durch vom Organismus selbst produzierte Säure verursacht (Zero und Lussi, 2005; Scheutzel, 1996). Der chronische Reflux von Magensäure, die mit einem relativ niedrigen pH-Wert von 1 bis 1,5 ein sehr hohes erosives Potential aufweist, kann mannigfaltige internistische sowie psychologische Ursachen haben. Als zugrunde liegende Allgemeinerkrankungen seien stellvertretend gastrointestinale Erkrankungen (Cheung et al., 2005), Alkoholabusus, unerwünschte Arznei-

mittelwirkungen sowie Essstörungen wie Anorexia nervosa oder Bulimie genannt. Aber auch Erkrankungen, die mit Xerostomie einhergehen, wie Speicheldrüsendysfunktionen, Sjögren-Syndrom, Diabetes mellitus, können durch Verminderung der körpereigenen Protektion Erosionen begünstigen (Young et al., 2001).

Endogen verursachte Erosionen lassen sich charakteristischerweise überwiegend an oral zugewandten Zahnflächen des Oberkiefers diagnostizieren. Es zeigte sich eine überdurchschnittliche Häufung dieses Krankheitsbildes bei weiblichen Patienten.

Exogen oder extrinsisch bedingte Erosionen werden mit nicht-körpereigenen Säuren assoziiert. Hierzu zählen solche durch direkte Medikamentenwirkungen, Umwelteinflüsse und die individuelle Ernährungsweise. Zu den am weitesten verbreiteten Medikamenten, die Erosionen auslösen können, zählt die Acetylsalicylsäure (z.B. Aspirin®; Hannig und Albers, 1993) sowie Vitamin C-Präparate (Ascorbinsäure; Meurmann und Murtooma, 1986). Umwelteinflüsse wie beispielsweise berufliche Exposition bei Fabrikarbeitern mit Säuredämpfen (Malcolm und Paul, 1961), Weinverkostern (Cheung et al., 2005; Chikte et al., 2005) oder Wettkampfschwimmern in chlorversetztem Wasser (Centerwall et al., 1986) wurden ebenfalls beschrieben. Den größten Anteil exogener Erosionsfaktoren machen jedoch saure Nahrungsmittel aus. Besonders im Zuge des gesteigerten Ernährungsbewusstseins greifen viele Patienten auf saure (Citrus-)Früchte und deren Saftgetränke (West et al., 1998) zurück. Ganss et al. (1999) warnen vor einem erhöhten Risiko für erosive Zahnschäden bei Patienten, die sich überwiegend von Rohkost ernähren. Linkosalo und Markkanen (1985) untersuchten Patienten mit lactovegetarischen Ernährungsgewohnheiten und stellten erhöhte Prävalenzen für erosive Schädigungen des Zahnschmelzes fest.

Viele dieser Patienten praktizieren darüber hinaus typischerweise eine überdurchschnittliche Mundhygiene (Lussi et al., 2004) mit teilweise exzessivem Einsatz der Zahnbürste und leisten der Entstehung erosiver Krankheitsbilder damit Vorschub (Eisenburger et al., 2003).

Weiterhin verfügen viele „Lifestyle“-Erfrischungsgetränke wie Cola-Mixturen, Limonaden oder Sportlergetränke über kritische pH-Werte (Hooper et al., 2005, Lippert et al., 2004, Lussi et al., 2004, Finke et al., 2002).

Hinzu kommt die Tatsache, dass seitens der Lebensmittelindustrie viele Nahrungsmittel mit erosiven Zusatzstoffen, und in besonderem Ausmass mit Zitronensäure, konserviert und gesäuert werden (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2004).

Für die Bewertung des erosiven Potentials einer Noxe ist jedoch nicht alleine der pH-Wert von Bedeutung. Vielmehr müssen weitere chemische (pK-Wert/titrierbare Azidität, Kom-

plexbildungsfähigkeit, Gehalt an Calcium/Phosphat/Fluoride) ebenso wie individuelle Faktoren (Häufigkeit der Exposition, protektive Kapazität des Organismus, anatomische Besonderheiten) berücksichtigt werden (Featherstone und Lussi, 2006; Hara et al., 2006a; Zero und Lussi, 2005; Lussi et al., 2004; Hughes et al., 2000). Es liegt mit der dentalen Erosion also ein multifaktorielles Erkrankungsbild vor.

2.3 Fragestellung

Primäre Zielsetzung der vorliegenden Untersuchung war es, den Einfluss der Bildungszeit auf die protektiven Fähigkeiten der Pellikel zu evaluieren. Es sollte untersucht werden, inwiefern sich in situ gebildete Pellikelschichten der Bildungszeiträume von zwei, sechs, zwölf und 24 Stunden hinsichtlich der Säureprotektion unterscheiden. Während die Kurzzeitperioden von drei bis 120 Minuten (Fiebiger, 2005; Hannig et al., 2004b und 2003; Amaechi et al., 1999) und die Langzeitperioden von bis zu sieben Tagen (Meurmann und Frank, 1991; Nieuw Amerongen et al., 1987; Zahradnik et al., 1978 und 1976) hinreichend untersucht wurden, galt der vergleichenden Betrachtung der Zeiträume zwischen zwei und 24 Stunden unter diesem Aspekt bislang eher untergeordnetes wissenschaftliches Interesse. Doch gerade diese Zeiträume sind im Hinblick auf Ernährungs- und Mundhygienegewohnheiten der Patienten von entscheidender Bedeutung bei der Entstehung und Prävention erosiver Krankheitsbilder.

Ferner ist die Kenntnis über eine eventuell notwendige Reifung der Pellikel für das Verständnis der komplexen Zusammenhänge der Säureprotektion von besonderem wissenschaftlichen Interesse, zumal in diesem Punkt eine Diskrepanz zwischen In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen zu bestehen scheint (Hannig und Joiner, 2006). Während basierend auf In-vitro-Ergebnissen eine längerfristige Reifung der Pellikel zum Erreichen einer suffizienten Säureschutzwirkung für notwendig erachtet wird (Featherstone et al., 1993; Nieuw Amerongen et al., 1987; Zahradnik et al., 1978 und 1976), lassen neuere In-vivo-Daten darauf schließen, dass eine ausreichende Protektion unter physiologischen Bedingungen bereits nach wesentlich kürzeren Bildungsintervallen erreicht wird (Fiebiger, 2005; Hannig et al., 2004).

Folgende spezielle Fragen sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden:

- Ergibt sich aus Modulierung der Parameter *Bildungszeit, Säurekonzentration und buko-palatinaler Probenpositionierung* eine signifikante Änderung des protektiven Potentials der Pellikel?
- Inwieweit vermögen die unterschiedlichen In-situ-Pellikelschichten den durch sie bedeckten Zahnschmelz vor erosiven Säureangriffen zu schützen?
- Welche ultrastrukturellen Veränderungen hinterlässt eine einminütige Säureeinwirkung am Zahnschmelz und an der residualen Pellikel?
- Welche Unterschiede bestehen hinsichtlich der zwei verwendeten Säurekonzentrationen?

3 Material und Methodik

3.1 Grundlagen für die Gewinnung der *in situ* gebildeten Pellikel

Als Substrat für die experimentelle In-situ-Pellikelbildung dienten Prüfkörper aus bovinem Zahnschmelz mit standardisiert bearbeiteter Oberfläche. Die Schmelzproben wurden, an herausnehmbaren Schienen befestigt, von sechs Probanden über vier verschiedene Zeiträume (zwei, sechs, zwölf und 24 Stunden) intraoral getragen und damit der physiologischen Pellikelbildung ausgesetzt. Das probandenbasierte Studiendesign wurde durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel geprüft und legitimiert.

3.1.1 Herstellung, Reinigung und Aufbewahrung der Prüfkörper

Als Probenmaterial dienten die permanenten Incisivi frisch geschlachteter Rinder mit einem Durchschnittsalter von zwei Jahren (Schlachthof Zweibrücken). Die Extraktion erfolgte schonungsvoll unter Vermeidung von Schmelzverletzungen. Nach mechanischer Reinigung wurden aus den Labialflächen mithilfe einer wassergekühlten, ultrafeinen Diamanttrennscheibe (Schleiftrennmaschine WOCO 50p, Conrad GmbH, D-38678 Clausthal) Zahnschmelzprüfkörper ($n = 432$) mit darunterliegendem Dentin (Größe bis ca. $5 \times 5 \times 3 \text{ mm}$) herausgetrennt. Zur Standardisierung der Prüfkörperoberfläche erfolgte eine Politur auf einem Naßschleifgerät (Gripo 2V, Metkon Instruments Ltd., Turkey) mit Silikonkarborundschleifpapier aufsteigenden Körnungsgrades (max. 4000) bei einer Umdrehungszahl von 300 min^{-1} unter kontinuierlicher Wasserkühlung (Abb. 1) Durch eine Kontrolle der Oberflächengüte mittels eines Auflichtmikroskopes wurde bei 12facher Vergrößerung sichergestellt, dass ausschließlich Prüfkörper ohne Verfärbungen oder Unregelmäßigkeiten in der sichtbaren Schmelzmatrix verwendet wurden.

Die für die Mikrohärtemessungen vorgesehenen Proben wurden mit der Unter- und den Seitenflächen in Epoxydharz (Epofix Kit, Struers, DK-2610 Rødovre) scheibenförmig eingebettet, um planparallel orientiert vermessen werden zu können. Es resultierte eine Scheibe mit einem Durchmesser von 8mm (Abb. 5). Als Einbettform diente die Innenkonfiguration der

Deckel von Eppendorf Reagiergefäßen (Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Eppendorf AG, D-22331 Hamburg).



Abb. 1: Politur der Zahnschmelzprüfkörper auf dem rotierenden Nassschleifgerät unter Wasserkühlung

Um eine initiale Bakterienfreiheit zu garantieren sowie die Proben gründlich zu reinigen, wurden sämtliche Prüfkörper zunächst für 30 Minuten in 70%iger Ethanollösung (Ethanol absolut reinst, Merck, D-64271 Darmstadt) desinfiziert und anschließend in 3%iger Natriumhypochloritlösung (August Hedinger, D-70327 Stuttgart) für 10 Minuten im Ultraschallbad (Sonorex RK 100 H, Bandelin, D-12207 Berlin) behandelt. Die Unter- und Seitenflächen der für die Ca^{2+} -Messungen vorgesehenen Proben wurden anschließend mit handelsüblichem Nagellack versiegelt. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass von der künstlichen Erosion lediglich die der Mundhöhle zugewandte Oberseite der Prüfkörper betroffen wurde. Nach vorsichtigem Abspülen mit destilliertem Wasser (Aqua B. Braun, B. Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen) wurden die Proben in selbigem bei einer Temperatur von $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu dem Zeitpunkt der intraoralen Exposition gelagert.

3.1.2 Herstellung der Trageschienen

Von sechs Probanden wurden nach Inspektion der Mundhöhle Alginatabformungen (Palgat Plus, 3M ESPE GmbH, D-82229 Seefeld) des Oberkiefers angefertigt. Nach Herstellung der Arbeitsmodelle aus Superhartgips wurden mittels eines Tiefziehgerätes (Erkopress ES 2004, Erkodent GmbH, D-72285 Pfalzgrafenweiler) Miniplastschienen aus thermoplastischer Folie

(DURAN 1,0x125mm, Scheu Dental GmbH, D-58642 Iserlohn) erarbeitet. Die Schienen umfassten die gesamte Zahnreihe des Oberkiefers und wurden im Seitenzahnggebiet bukkal und palatinal 0,5 cm über den Zahnfleischrand hinaus nach apikal extendiert. Die palatinale Schleimhaut blieb unbedeckt. Zur sicheren Befestigung der Prüfkörper dienten mehrere Retentionsbohrungen von 1,5mm Durchmesser im Bereich der ersten Molaren.

3.1.3 Fixierung der Prüfkörper an den Trageschienen

Mittels eines Abformsilikons (President Plus light body, Coltène-Whaledent, D-89129 Langenau) wurden unmittelbar vor der Inkorporation pro Trageschiene 18 Zahnschmelzprüfkörper in der Umgebung der oberen ersten Molaren auf der bukkalen und palatinalen Seite fixiert (Abb. 2 und 3). Die Prüfkörper wurden vollständig in die Silikonmasse eingebettet. Dabei blieb die der Mundhöhle zugewandte Schmelzoberfläche von Befestigungsmaterial unbedeckt. Eventuelle okklusale Interferenzen durch einen Überschuss an Silikonmasse wurden mit einem Skalpell beseitigt, um eine störungsfreie habituelle Interkuspitation zu gewährleisten.



Abb. 2: Fertig bestückte Prüfkörpertrageschiene unmittelbar vor der Inkorporation. Die Zahnschmelzprüfkörper sind in die Abformsilikonmasse eingebettet.

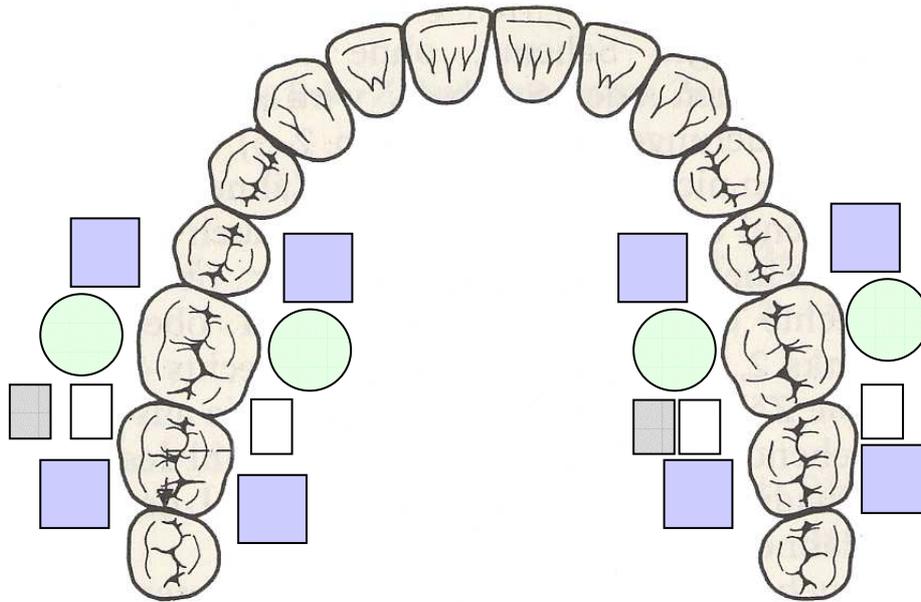
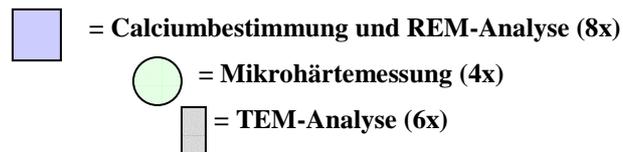


Abb. 3: Schematische Anordnung der 18 Prüfkörper auf der Trageschiene



(Abbildung des Zahnbogens modifiziert nach Lehmann und Hellwig (1998))

3.2 Gewinnung der In-situ-Pellikel

3.2.1 Probanden

Sechs Probanden (3 männlich, 3 weiblich, Alter 18-30 Jahre) wurden hinsichtlich ihrer oralen Gesundheit inspiziert, um unversorgte kariöse Läsionen sowie parodontale Erkrankungen auszuschließen. Die Erhebung einer allgemeinen und speziellen Anamnese ergab in keinem Fall Medikamenteneinnahmen oder Erkrankungen der Speicheldrüsen. Die Probanden wurden hinsichtlich des Studiendesigns und des Umganges mit den bestückten Trageschienen sowie der Reinigung der Prüfkörper instruiert. Ebenso waren sie gehalten, sich vor den Versuchsterminen in gewohnter Art und Weise zu ernähren, um Veränderungen der physiologischen Speichelzusammensetzung zu verhindern. Den Probanden wurden bei zwölf- und 24stündiger Pellikelbildungszeit eine handelsübliche Zahnbürste (Oral B 40, Gillette; D-61476 Kronberg),

1 Liter destilliertes Wasser sowie ein Becherglas zur kurzfristigen Lagerung der Schienen ausgehändigt.

3.2.2 Expositionszeiten

In der vorliegenden Studie wurden vier unterschiedliche Bildungszeiträume der Pellikel untersucht. Die intraoralen Expositionsintervalle gehorchten folgendem Schema:

Tab. 1: Aufstellung der detaillierten Expositionszeiten

Bildungszeit	Start	1. Pause	2. Pause	3. Pause	Ende
2 h	09:00 Uhr				11:00 Uhr
6 h	09:00 Uhr				15:00 Uhr
12 h	19:00 Uhr	23:00 Uhr	06:30 Uhr		07:40 Uhr
24 h	09:00 Uhr	15:00 Uhr	21:00 Uhr	07:00 Uhr	10:00 Uhr

Während der Tragezeiten der Schienen herrschte strikte Nahrungskarenz. Ebenso war den Probanden die Aufnahme von Getränken untersagt. Die Tragepausen bei zwölf- und 24stündiger Bildungszeit dauerten jeweils 20 Minuten. Während dieser Zeit durften die Probanden essen und trinken, mussten danach jedoch die Zähne putzen und den Mund anschließend gründlich mit Wasser ausspülen. Die bestückten Trageschienen lagerten währenddessen in destilliertem Wasser. Um eine übermäßige Bakterienadhärenz zu vermeiden, wurden die Prüfkörper in den Pausen vorsichtig mit einer handelsüblichen Zahnbürste und destilliertem Wasser bei Raumtemperatur ohne Zugabe von Zahnpasta gereinigt. Die Probanden wurden im Vorfeld kalibriert, jeden Prüfkörper mit fünf abstreifenden Bewegungen von apikal nach okklusal und einem Auflagedruck von 50 g zu säubern

3.3 Künstliche Erosion der pellikelbedeckten Prüfkörper

Nach Ablauf der jeweiligen Bildungszeit wurden die Trageschienen entgegengenommen und anhaftende, nicht adsorbierte Speichelreste mit destilliertem Wasser ab gespült. Die Prüfkörper

wurden mit einer zahnärztlichen Pinzette vorsichtig aus dem Abformsilikon entnommen, ohne die zwischenzeitlich pellicelbedeckte Schmelzoberfläche zu touchieren.

Um erosive Angriffe auf die Zahnhartsubstanz zu simulieren, wurden die Prüfkörper in Zitronensäure (Zitronensäure zur Synthese, Merck-Schuchard, D-85662 Hohenbrunn), nach *IUPAC* 3-Carboxy-3-hydroxypentan-1,5-disäure, exponiert. Tab. 2 zeigt die pH-Werte der beiden verwendeten Zitronensäurekonzentrationen (pH-Wert-Bestimmung bei Raumtemperatur mit pH-Meter CG834P, Schott, D-55112 Mainz):

Tab. 2: Konzentrationen und pH-Werte der verwendeten Zitronensäurelösungen

Konzentration ($c_{\text{säure}}$)	pH-Wert
0,1 % (0,0047 mol/l)	2,63
1,0 % (0,047 mol/l)	2,09

Die Prüfkörper wurden in 3ml Rollrandgläsern für eine Minute in jeweils 1 ml der jeweiligen Zitronensäurekonzentration unter Agitation (600 min^{-1} , Vortex-Genie 2, Scientific Industries, USA) erodiert und anschliessend sofort mit reichlich destilliertem Wasser abgespült, um die Erosion zum Stillstand zu bringen.

Die Positionierung der Prüfkörper auf den Trageschienen ermöglichte es, Prüfkörper jeweils jeder Lokalisation (bukkal, palatinal) mit jeder Säurekonzentration (0,1%, 1%) zu erodieren.

Jeweils eine bukkal und palatinal positionierte Probe der für die TEM-Analyse vorgesehenen Prüfkörper blieb im Sinne einer Kontrollprobe unerodiert, um später die nicht durch Säureeinwirkung modifizierte Pellicelstruktur vergleichend beurteilen zu können.

Die Zitronensäurevolumina, in der die Erosion der für die Ca^{2+} -Messungen vorgesehenen Prüfkörper erfolgte, wurden unmittelbar im Anschluss an die künstliche Erosion in nummerierte Eppendorf-Reagiergefäße aus Kunststoff umgefüllt. Diese Massnahme eliminierte eine potentielle Verfälschung der Messergebnisse, die durch Diffusion von Calcium-Ionen aus der Wand der Glasgefäße heraus auftreten könnte.

3.4 Bestimmung des protektiven Potentials der Pellikel

Das protektive Potential der Pellikel sowie das Ausmaß der erosiven Veränderungen am Zahnschmelz wurden anhand von zwei quantitativen und zwei qualitativen Methoden evaluiert:

- Messung der säureinduzierten Calciumfreisetzung aus dem Zahnschmelz mittels AAS
- Bestimmung des Mikrohärteverlustes der Prüfkörperoberfläche infolge der Erosion
- rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der erodierten Prüfkörperoberfläche
- transmissionselektronenmikroskopische Analyse der residualen Pellikelstrukturen

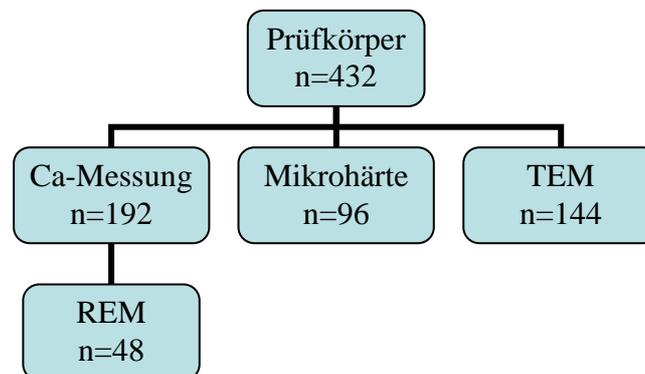


Abb. 4: Methodische Zuordnung der Zahnschmelzprüfkörper

REM=Rasterelektronenmikroskopie

TEM=Transmissionselektronenmikroskopie

3.4.1 Messung der säureinduzierten Calciumfreisetzung aus dem Zahnschmelz mittels AAS

Durch die Einwirkung von Säuren gehen im Zuge der Demineralisierung Calciumionen in verstärktem Maße aus der Schmelzmatrix heraus in Lösung. Die quantitative Bestimmung dieser Calcium-Mengen in dem definierten, zur künstlichen Erosion verwendeten Zitronensäurevolumen (1 ml) erlaubt Rückschlüsse auf das protektive Potential der Pellikel sowie auf die Erosivität der Säure. Hierfür fand das Verfahren der Flammen-

Atomabsorptionsspektrophotometrie (Flammen-AAS) Verwendung. Die AAS beruht im Wesentlichen auf dem Prinzip der Flammenfärbung. Die zu untersuchenden wässrigen Lösungen, im Falle der vorliegenden Studie eine Verdünnung der zur Erosion der Prüfkörper verwendeten Zitronensäurelösungen von 1 ml, werden durch die Flamme eines Lachgas-Acetylen-Gemisches (Flammentemperatur ca. 2800 °C) hindurch zerstäubt und damit atomisiert. Diese Atomisierungseinheit liegt im Strahlengang einer Lichtquelle, die spezifisches Licht bestimmter Wellenlänge emittiert (im Falle der vorliegenden Studie: $\lambda = 422,7$ nm für Ca^{2+} -Ionen). Während der Passage des Lichtstrahles durch die Atomwolke der Flamme wird dieser geschwächt und diese Schwächung mit einer Detektoreinheit gemessen.

Der Vergleich zwischen dem Ausmass der Lichtschwächung und der ungeschwächten Lichtpassage durch die Atomwolke einer „Blindprobe“ (im Falle der vorliegenden Studie Zitronensäure ohne Anwesenheit von Calcium-Ionen) lässt Rückschlüsse auf die Konzentration des jeweiligen Elementes zu. Bei der Berechnung der gesuchten Ionenkonzentration gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$E_{\lambda} = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = c \cdot \epsilon_{\lambda} \cdot l$$

(E_{λ} : Extinktion; I: Intensität des transmittierten Lichtes; I_0 : Intensität des einfallenden Lichtes; **c: Konzentration der absorbierenden Substanz**; ϵ_{λ} : Extinktionskoeffizient; l: Weglänge des Lichtes)

Bei der relativ hohen Flammentemperatur von 2800°C sind Ionisationsinterferenzen nicht auszuschliessen. Durch die Zugabe eines Ionenpuffers in Form von Lanthanchlorid konnten diese vermieden werden (Schinkel, 1984).

Da die vorliegenden Zitronensäurevolumina von jeweils 1ml für die Bestimmung nicht ausreichten, wurden die Säureproben nach dem in Tab. 3 genannten Schema verdünnt:

Tab. 3: Verdünnungsschema der Säureproben für die Calcium-Analyse im Flammen-AAS

Säurekonzentration	Probenvolumen, entnommen von 1 ml	Zugabe von Lanthanchlorid	Auffüllen mit Aqua dest. bis
0,1 %	0,8 ml	1,0 ml	20 ml
1 %	0,5 ml	1,0 ml	50 ml

Nach der Kalibrierung des Spektrophotometers (Unicam Solar 969, Unicam, D-63069 Offenbach) mit einer Blindprobe (2 ml Zitronensäure 0,1% bzw. 0,5 ml Zitronensäure 1% + 1 ml

Lanthanchlorid, aufgefüllt mit Aqua dest. bis 50ml) und sechs Calciumlösungen aufsteigender Konzentration (0,5 - 1,0 - 2,0 - 3,0 - 4,0 und 5,0 mg/l), wurde die Ca-Konzentration jeder der verdünnten Probelösungen gemessen und von der angeschlossenen Recheneinheit automatisch in der Einheit mg/l angezeigt.

Die Messung der der Mundhöhle exponierten Fläche der Schmelzproben in mm² erfolgte mithilfe eines computergestützten photooptischen Messsystems (analySIS, Soft Imaging Systems GmbH, D-48149 Münster).

Anhand der nun ermittelten Größen konnte der gesuchte Quotient µg/mm² („erodierte Calcium-Masse pro mm² Probenoberfläche“) mithilfe folgender Formeln errechnet werden:

$$0,1 \% \text{ ige Zitronensäure: } \frac{\text{Ca - Konzentration(mg / l)} \cdot 0,02l}{\text{Fläche(mm}^2\text{)}} \cdot \frac{1ml}{0,8ml} \cdot 10^3 = x_{0,1\%}(\mu\text{g/mm}^2)$$

$$1 \% \text{ ige Zitronensäure: } \frac{\text{Ca - Konzentration(mg / l)} \cdot 0,05l}{\text{Fläche(mm}^2\text{)}} \cdot \frac{1ml}{0,5ml} \cdot 10^3 = x_{1\%}(\mu\text{g/mm}^2).$$

3.4.2 Bestimmung des erosionsbedingten Mikrohärteverlustes der Prüfkörperoberfläche

Im Zuge der Demineralisierung des Zahnschmelzes kommt es zu Aberrationen der Oberfläche in Form von Gefügauflockerungen und Mikro-Defekten. Diese Veränderungen lassen sich mit dem Differenzwert (ΔHV) der Oberflächenhärte vor und nach der Säureeinwirkung quantifizieren.

Die Werkstoffeigenschaft „Härte“ bezeichnet definitionsgemäss den Widerstand, den ein Körper gegen ein mechanisches Eindringen zu leisten vermag (Eichner und Kappert, 2000). Zur Messung der klassischen Mikrohärte nach Vickers (DIN EN ISO 6507, 2006) wird die Materialprobe mit einem genormten Indentationskörper in Form einer vierflächigen Diamantpyramide mit einem Öffnungswinkel von 136° über einen bekannten Zeitraum mit bekannter Kraft belastet. Die daraus resultierende Impression in der Probenoberfläche gibt klassischerweise mit ihrem Durchmesser die Eindringtiefe der Diamantpyramide und damit das Ausmass der „Härte“ an.

Für die vorliegende Studie kam das Universalhärtemessgerät Fisherscope H100 (Helmut Fischer GmbH, 71069 Sindelfingen) zur Anwendung, das aus Gründen der besseren Reprodu-

zierbarkeit von der oben definierten Messmethode nach Vickers abweicht und den als „Härte“ definierten Eindringwiderstand des Diamantkörpers in direkter Weise misst. Messfehler bei der Bestimmung der Impressionsdiagonalen konnten also vermieden werden.

Die Prüfkörper für die Mikrohärtmessungen wurden scheibenförmig in Epoxydharz eingebettet (Scheibendurchmesser 8 mm) und für die Messungen mittels eines zahntechnischen Parallelometers (VG-3, Degussa GmbH, D-63403 Hanau) planparallel auf gläsernen Objektträgern befestigt (Abb. 5). Mit dieser Massnahme sollte sichergestellt werden, dass der Indentationskörper stets in einem Winkel von 90° auf die Prüfkörperoberfläche auftreffen konnte (Deutsches Institut für Normung e.V., 1996). Als Fixiermasse diente das hochfeste Bissregistratmaterial auf Silikonbasis Futar D (Kettenbach GmbH, D-35709 Eschenburg). Die auf diese Weise vorbereiteten Prüfkörper wurden jeweils vor der intraoralen Exposition und nach der erosiven Säureeinwirkung einer Mikrohärtmessung an vier Messpunkten unterzogen. Hierfür wurde die Prüfkörperoberfläche in Quadranten eingeteilt und pro Quadrant eine Messung an einer randomisierten Stelle durchgeführt. Das vollautomatische Universalhärtemessgerät erhöhte nach dem Absenken der Diamantpyramide bis zur Probenoberfläche die Aufbrinkraft gleichmässig von null auf 981 mN innerhalb von 30 Sekunden, um diese maximale Prüfkraft für zehn Sekunden beizubehalten („Kriechen“). Die Kraftreduzierung von 981 mN auf null mN erfolgte wiederum innerhalb von 30 Sekunden. Anhand von „Härtevergleichsplatten“, mit denen das Gerät von Seiten des Herstellers auf verschiedene Härtegrade kalibriert wurde, ermittelte die angeschlossene Recheneinheit automatisch die vorliegende Mikrohärt in Vickers-Einheiten (HV) und errechnete den Mittelwert aus den vier Messwerten pro Prüfkörper.



Abb. 5: In Epoxydharz scheibenförmig eingebetteter und planparallel auf Objektträger fixierter Zahnschmelzprüfkörper

3.4.3 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der erodierten Prüfkörperoberfläche

Von den insgesamt 192 Prüfkörpern, die zur Messung der Calciumfreisetzung verwendet wurden (Abb. 4), erfolgte eine randomisierte Auswahl von 48 Proben, wobei die verschiedenen Bildungszeiten, Probanden und Lokalisationen berücksichtigt wurden. Diese Proben wurden der rasterelektronenmikroskopischen Analyse der Schmelzoberfläche zugeführt. Dazu wurden eventuell vorhandene organische Ablagerungen auf der Probenoberfläche mit 3%igem Natriumhypochlorit im Ultraschallbad für 15 Minuten entfernt und die Proben anschließend mit destilliertem Wasser gesäubert. Nach vollständiger Lufttrocknung wurden die Proben mit einem leitfähigen Spezialkleber (Leit-C, Neubauer, D-48031 Münster) auf Probentellern aus Aluminium (Specimen Stubs, Agar Scientific Ltd., UK-Essex) fixiert und in einer Sputter-Vorrichtung (Quorum Technologies Auto/Manual High Resolution Sputter Coater, UK-East Sussex) mit einer ultradünnen Goldschicht bedampft.



Abb. 6: Auf Probentellern fixierte und goldbedampfte („besputterte“) Prüfkörper

Die Untersuchung erfolgte bei verschiedenen Vergrößerungen (bis 25.000fach) mithilfe eines Rasterelektronenmikroskopes (XL 30 ESEM FEG, FEI Company, Niederlande). Hierfür wurden die Proben zur besseren Überschaubarkeit in Quadranten eingeteilt und jeder Quadrant auf charakteristische Veränderungen im Schmelzgefüge untersucht. Bemerkenswerte und/oder repräsentative Bereiche wurden digitalfotografisch dokumentiert.

3.4.4 Transmissionselektronenmikroskopische Analyse der residualen Pellikelstrukturen

Die frisch erodierten Prüfkörper sowie die unerodierten Kontrollproben wurden für den Zeitraum von zwei Stunden fixiert (pro Probe je 1 ml 1%iges Glutaraldehyd und Paraformaldehyd in Phosphatpuffer nach Sörensen) und danach mehrmals mit reinem Phosphatpuffer gespült. Nach einer weiteren Fixierung mit 2%igem Osmiumtetroxid (Chempur, D-76204 Karlsruhe) wurden die Proben mit verschiedenen Ethanollösungen aufsteigender Konzentration (50% → 70% → 90% → 100%) entwässert und anschliessend mit reinem Propylenoxid (Serva GmbH, D-69115 Heidelberg) bedeckt. Diese Maßnahme stellte die vollständige Penetration und Durchtränkung der Pellikel mit den nachfolgenden Aralditgemischen sicher. Die Proben wurden nun mit drei Aralditgemischen (Araldite Cy 212, Serva GmbH, D-69115 Heidelberg) zunehmender Konzentration für jeweils 24 Stunden versetzt und im abschliessenden Gemisch für 48 Stunden im Brutschrank bei einer Temperatur von 65 °C in speziellen Einbettformen einpolymerisiert. Nachdem die dem Dentin zugewandte Unterseite der eingebetteten Proben mit Nassschleifpapier reduziert wurde, bis lediglich eine dünne Schmelzschicht mit darüberliegender Pellikel übrig blieb, wurde der restliche Zahnschmelz mit Salzsäure (0,1 mol/l, Merck, D-64271 Darmstadt) entkalkt und durch Aralditkunststoff ersetzt („Gegenbettung“). Nach dem Zurechtrimmen der Aralditblöcke auf dem Nassschleifgerät wurden mit einem Ultramikrotom (Ultracut E, Reichert, D-Benzheim) und einer diamantenen Klinge (MT 45°, Microstar Technologies, Huntsville, USA) Ultradünnschnitte von 50 nm angefertigt (Abb. 7). Diese Dünnschnitte wurden auf mit Pioloform (Plano W. Plannet GmbH, D-35578 Wetzlar) beschichtete Kupfernetze (B 801001189, Provac GmbH, D-65375 Oestrich-Winkel) aufgezogen und abschliessend mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert (Mollenhauer, 1988). Jede der insgesamt 144 TEM-Proben wurde mit sämtlichen Ultradünnschnitten unter dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM 109, Carl Zeiss AG, 73447 Oberkochen) bei bis zu 30.000facher Vergrößerung auf Struktur und Unregelmässigkeiten der Pellikel untersucht, wobei die Pellikel jedes Schnittes in ihrer kompletten Länge „abgefahren“ wurde. Bemerkenswerte und repräsentative Bereiche wurden fotografisch dokumentiert.



Abb. 7: In das Ultramikrotom eingespannte TEM-Probe während der Ultradünnschnittprozedur

3.4.5 Statistische Auswertung der quantitativen Messmethoden

Im Rahmen der statistischen Auswertung der beiden quantitativen Methoden wurde mit den Parametern „freigesetzte Menge an Calcium in $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ Probenoberfläche“ und „Abnahme der Mikrohärtigkeit der erodierten Schmelzoberfläche in HV“ operiert. Die Einzelergebnisse sämtlicher Messungen pro Probe wurden als Differenz der Mittelwerte vor bzw. nach Säureeinwirkung zusammengefasst. Die Aufbereitung der statistischen Ergebnisse umfasste die Bildung

- der minimalen und maximalen Einzelwerte,
- des Mittelwertes,
- der Standardabweichung sowie
- des Standardfehlers der Mittelwerte.

Die Sammlung sowie deskriptive Darstellung der Messergebnisse erfolgte mithilfe der Microsoft Excel 2004 für Mac Software.

Die gepoolten Datensätze wurden mithilfe einer statistischen Software (SAS/STAT, SAS Institute Inc, USA) analysiert und mittels ANOVA (analysis of variance) auf Signifikanz unter-

sucht. Von einer statistisch signifikanten Beobachtung wurde ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\leq 5\%$ ausgegangen (Signifikanzniveau $p < 0,05$).

4 Ergebnisse

4.1 Quantitative Untersuchung des säureprotektiven Potentials der Pellikel

4.1.1 Messung der säureinduzierten Calciumfreisetzung aus der Schmelzoberfläche

Die photooptische Flächenmessung der Prüfkörper für die Ca^{2+} -Messungen ergab einen Mittelwert von $25,38 \text{ mm}^2$ bei einer Standardabweichung von $5,12 \text{ mm}^2$ ($n = 187$).

Nach einminütiger Säureeinwirkung waren ausnahmslos in jeder Zitronensäureprobe Ca^{2+} -Ionen unterschiedlicher Konzentration zu finden (Tab. 4).

Tab. 4: Aus den Rinderzahnschmelzprüfkörpern freigesetzte Ca-Mengen in $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ (Mittelwerte und Standardabweichungen) nach einminütiger Erosion mit 0,1% und 1% Zitronensäure, Pellikelbildungszeiträume von 2, 6, 12 und 24 Stunden bei jeweils bukkaler und palatinaler Probenpositionierung

	$c_{\text{säure}} = 0,1\% \text{ (pH=2,63)}$		$c_{\text{säure}} = 1\% \text{ (pH=2,09)}$	
	bukkal	palatinal	Bukkal	palatinal
2 h	$0,453 \pm 0,154$	$0,590 \pm 0,126$	$1,890 \pm 0,444$	$1,854 \pm 0,660$
6 h	$0,431 \pm 0,198$	$0,562 \pm 0,190$	$2,168 \pm 0,872$	$2,544 \pm 0,866$
12 h	$0,193 \pm 0,093$	$0,367 \pm 0,116$	$1,275 \pm 0,442$	$1,464 \pm 0,469$
24 h	$0,201 \pm 0,196$	$0,372 \pm 0,199$	$1,012 \pm 0,606$	$1,750 \pm 0,962$

Die statistische Auswertung der Messungen mittels ANOVA ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den Parametern Bildungszeit und Ca^{2+} -Freisetzung oder Lokalisation und Ca^{2+} -Freisetzung ($p < 0,05$).

Im Hinblick auf die beiden verwendeten Zitronensäurelösungen wird die erhöhte Erosivität der 1%igen Lösung durch eine signifikant erhöhte Ca^{2+} -Freisetzung in allen vier Bildungszeiträumen der Pellikel deutlich.

Die nach oraler Positionierung (bukkal/palatinal) sowie Konzentration der verwendeten Zitronensäurelösung (0,1%/1%) sortierten Messergebnisse sind in Abb. 8 bis 11 grafisch veranschaulicht.

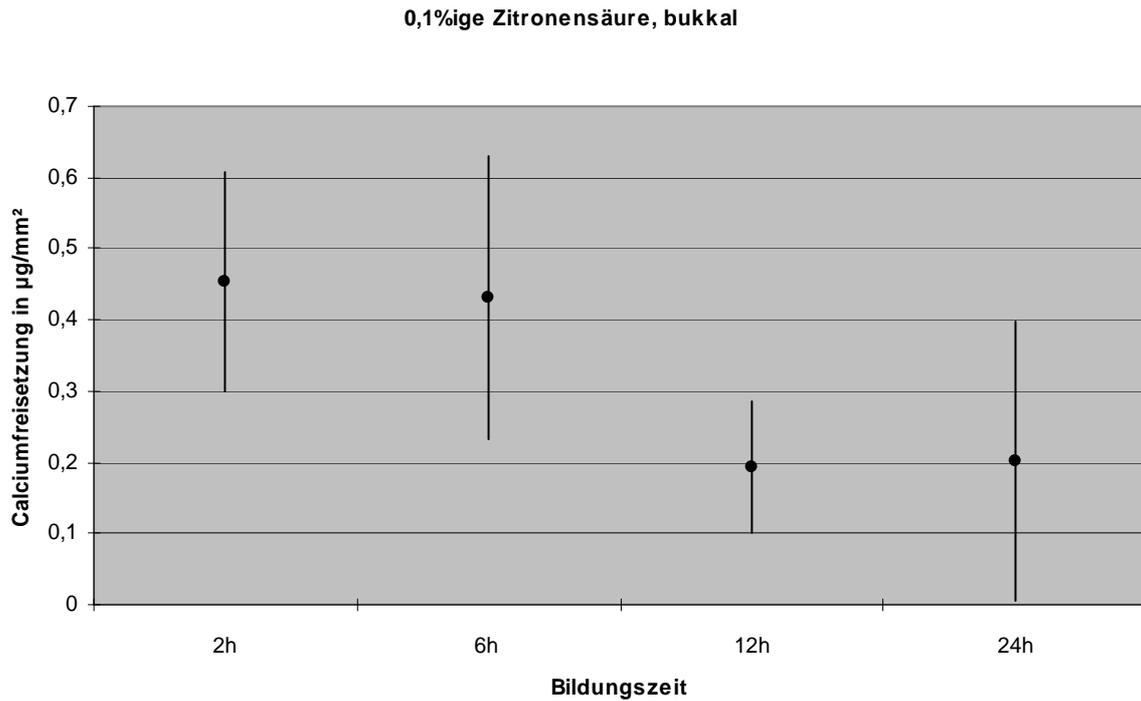


Abb. 8: Freigesetzte Calciummenge in Abhängigkeit von der Pellikelbildungszeit nach einminütiger Erosion mit 0,1%iger Zitronensäure, bukkale Probenposition, Mittelwerte und Standardabweichungen

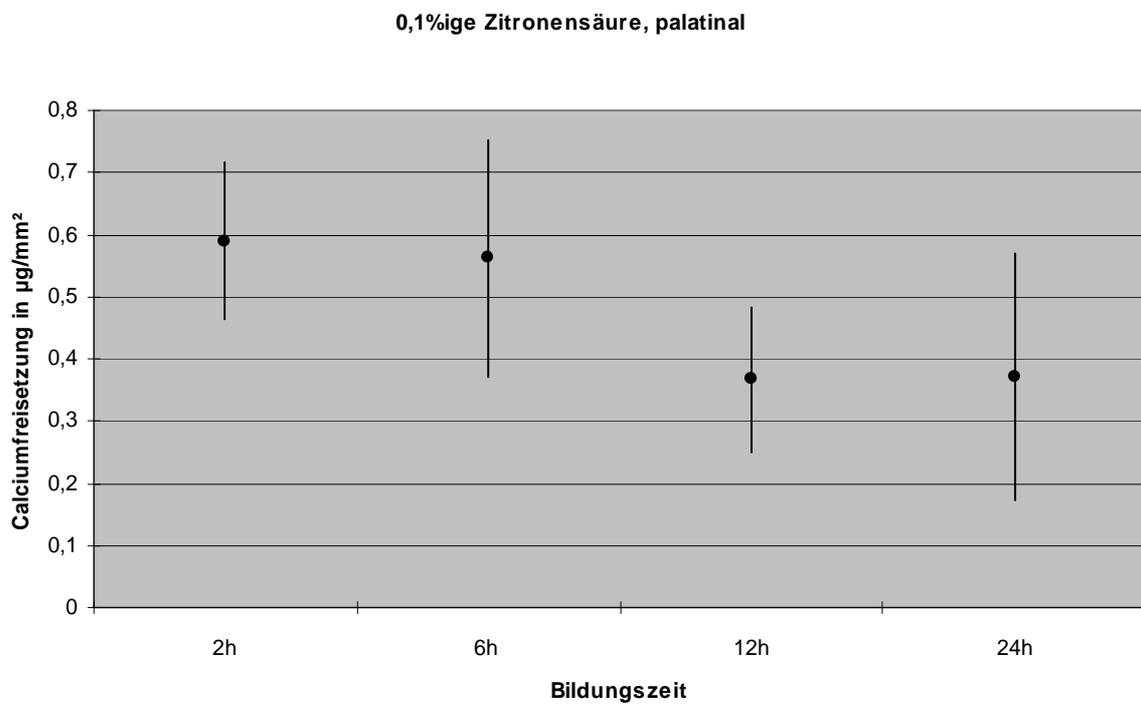


Abb. 9: Freigesetzte Calciummenge in Abhängigkeit von der Pellikelbildungszeit nach einminütiger Erosion mit 0,1%iger Zitronensäure, palatinale Probenposition, Mittelwerte und Standardabweichungen

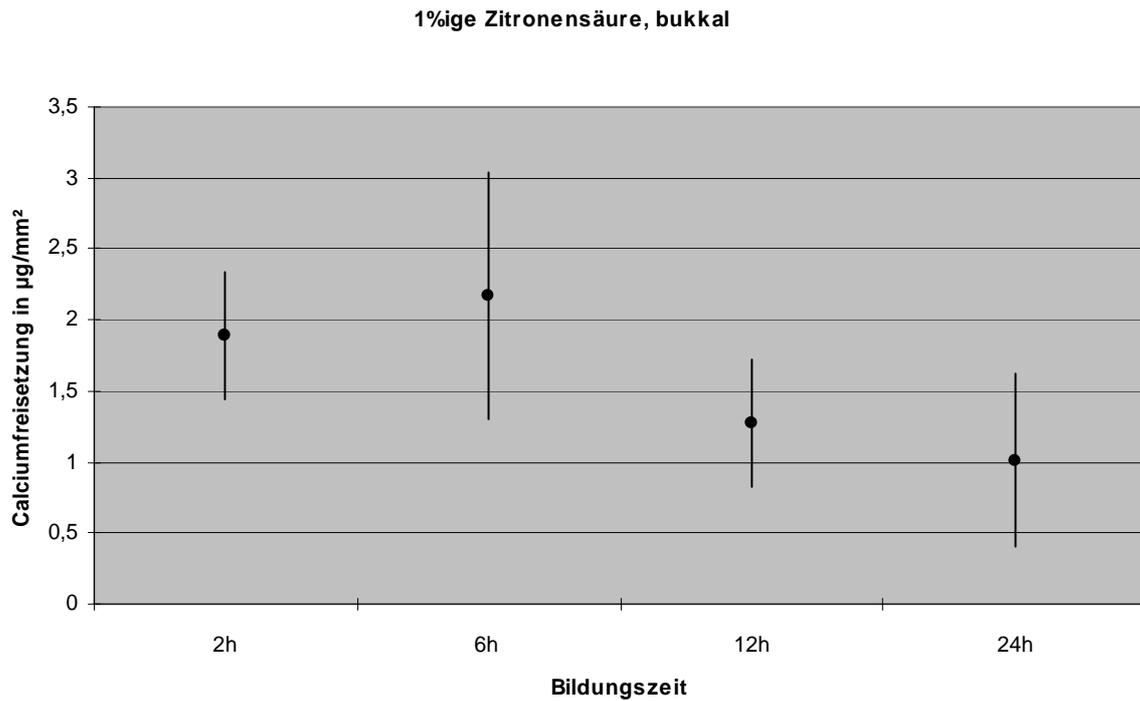


Abb. 10: Freigesetzte Calciummenge in Abhängigkeit von der Pellikelbildungszeit nach einminütiger Erosion mit 1%iger Zitronensäure, bukkale Probenposition, Mittelwerte und Standardabweichungen

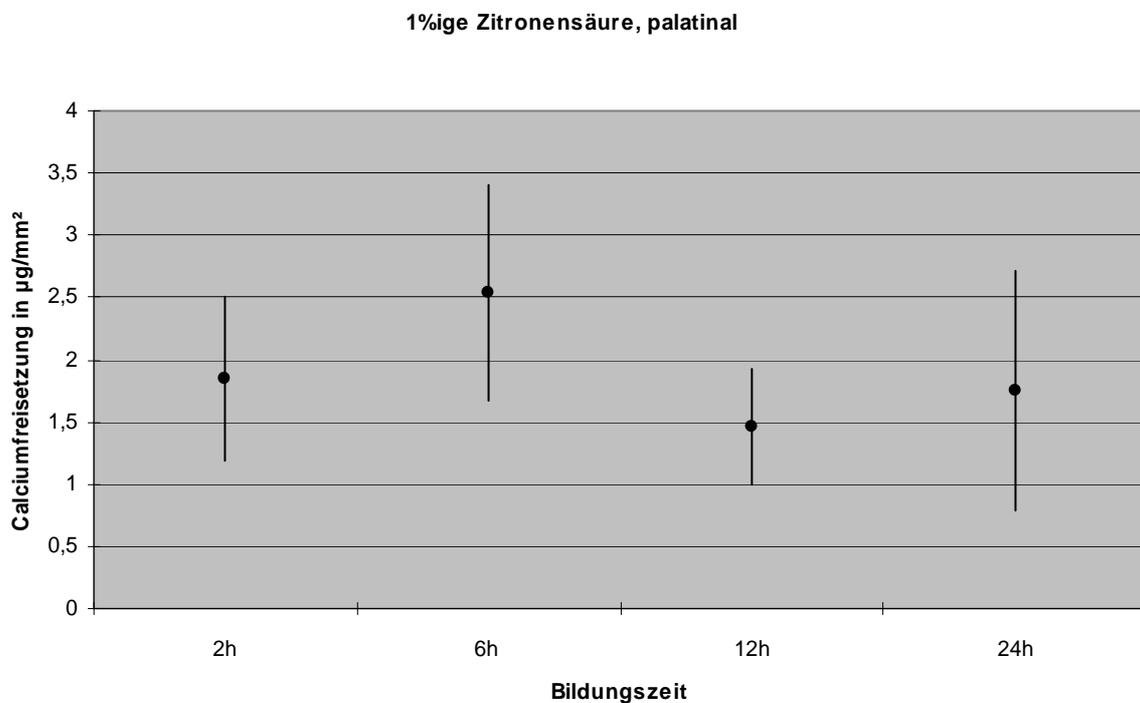


Abb. 11: Freigesetzte Calciummenge in Abhängigkeit von der Pellikelbildungszeit nach einminütiger Erosion mit 1%iger Zitronensäure, palatinale Probenposition, Mittelwerte und Standardabweichungen

4.1.2 Bestimmung des erosionsbedingten Mikrohärteverlustes der Schmelzoberfläche

Die Ausgangshärte HV_0 der nicht pellikelbedeckten und nicht erodierten Rinderzahnschmelzproben ($n = 96$) betrug im Mittelwert 371,2 HV bei einer Standardabweichung von 41,7 HV. Infolge der Säureeinwirkung konnte bei nahezu jeder Messung eine Abnahme der oberflächlichen Mikrohärte im Sinne einer „Aufweichung“ registriert werden.

Die statistische Auswertung der Mikrohärte-Differenzmessungen ergab allerdings keine signifikanten Zusammenhänge ($p < 0,05$) der Parameter Bildungszeit und Mikrohärteverlust oder Lokalisation und Mikrohärteverlust.

Die unterschiedliche Erosivität der beiden Zitronensäurelösungen wurde durch einen signifikant erhöhten Verlust an oberflächlicher Mikrohärte nach der Einwirkung von 1%iger im Vergleich zu 0,1%iger Zitronensäurelösung nachgewiesen.

Insbesondere die Erosion mit der schwächeren Zitronensäurelösung ($c = 0,1\%$) nach längerer Pellikelbildungszeit (zwölf bzw. 24 Stunden, bukkale Probenposition) führte im Endeffekt zu keinem übermässigen Mikrohärteverlust, so dass vereinzelt sogar Mikrohärteunterschiede im negativen Bereich ermittelt werden konnten.

Die Ergebnisse der Mikrohärte-Differenzmessungen sind in Form von Mittelwert und Standardabweichung in Tabelle 5 aufgetragen und in Abb. 12 bis 15 grafisch zusammengefasst.

Tab. 5: Mikrohärteunterschiede in Vickers-Einheiten (HV) nach Mikrohärtebestimmung jeweils vor und nach der einminütigen Erosion mit 0,1% und 1% Zitronensäure (Mittelwerte und Standardabweichungen), Pellikelbildungszeiträume von 2, 6, 12 und 24 Stunden bei jeweils bukkaler und palatinaler Probenpositionierung

	$c_{\text{säure}} = 0,1\% \text{ (pH=2,63)}$		$c_{\text{säure}} = 1\% \text{ (pH=2,09)}$	
	bukkal	palatinal	bukkal	palatinal
2 h	40,12 ± 38,60	30,82 ± 38,71	76,70 ± 28,05	62,43 ± 27,52
6 h	51,72 ± 42,30	45,54 ± 31,17	111,11 ± 14,90	99,69 ± 26,21
12 h	1,78 ± 40,74	18,73 ± 21,66	39,44 ± 27,37	46,80 ± 41,47
24 h	-1,97 ± 25,49	35,61 ± 38,84	69,89 ± 58,36	58,17 ± 44,31



Abb. 12: Mikrohärteverlust (Vickers-Einheiten, HV) in Abhängigkeit von der Pellikelbildungszeit nach einminütiger Erosion mit 0,1%iger Zitronensäure, bukkale Probenposition, Mittelwerte und Standardabweichungen

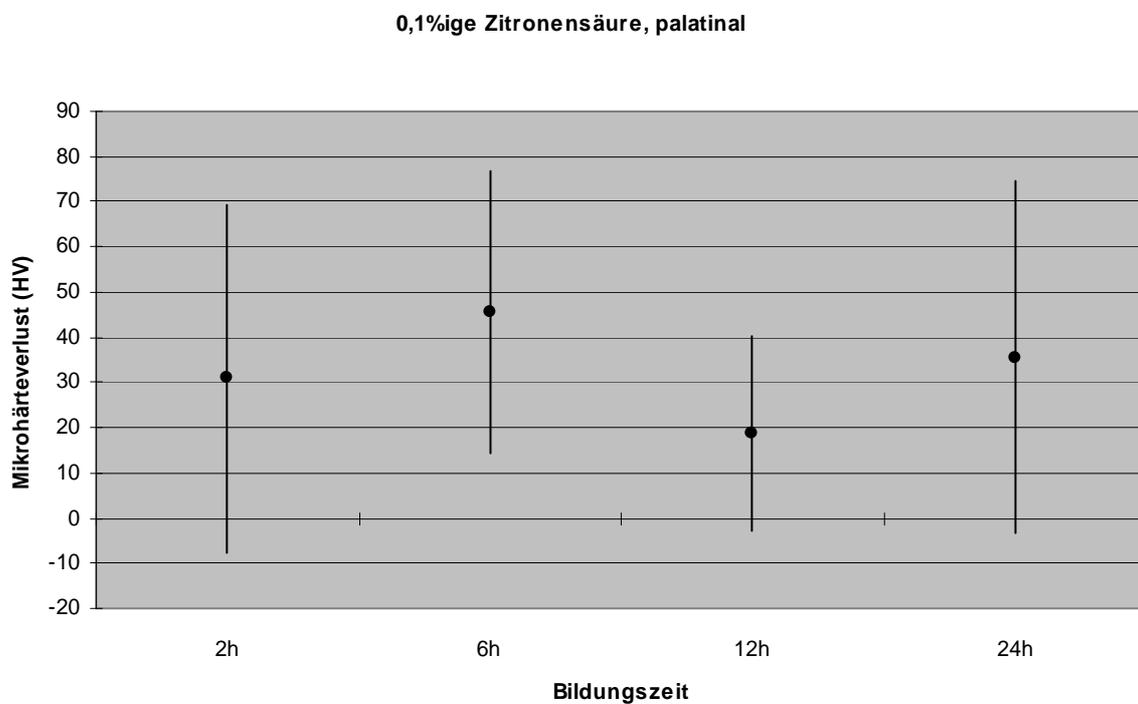


Abb. 13: Mikrohärteverlust (Vickers-Einheiten, HV) in Abhängigkeit von der Pellikelbildungszeit nach einminütiger Erosion mit 0,1%iger Zitronensäure, palatinale Probenposition, Mittelwerte und Standardabweichungen

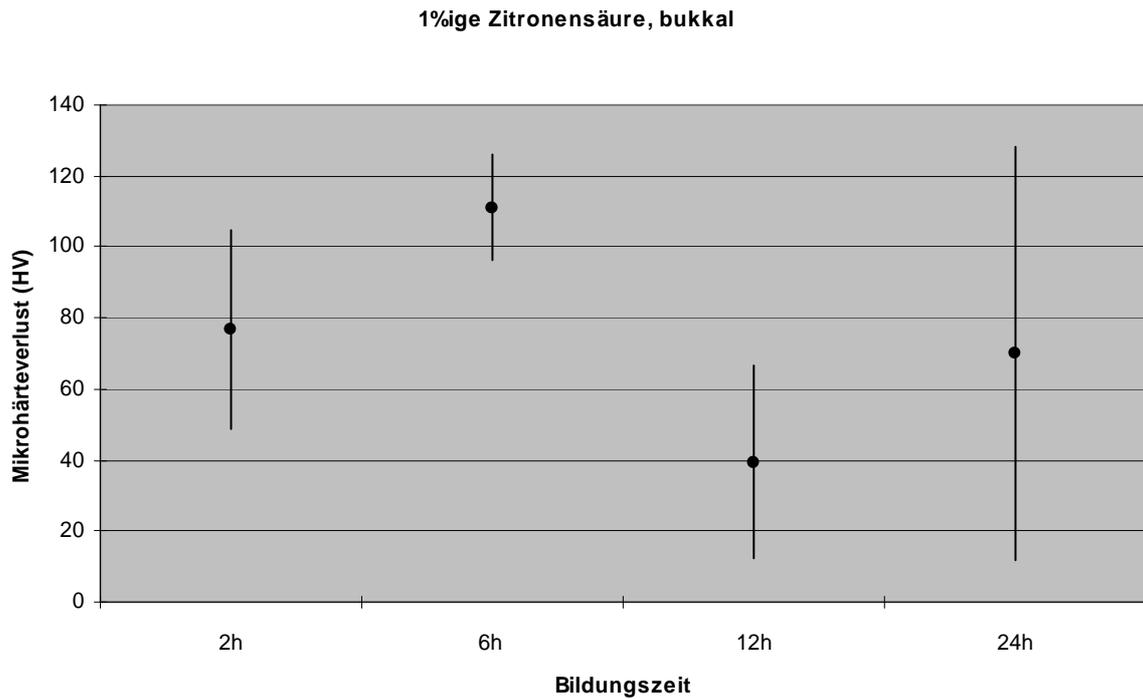


Abb. 14: Mikrohärteverlust (Vickers-Einheiten, HV) in Abhängigkeit von der Pellikelbildungszeit nach einminütiger Erosion mit 1%iger Zitronensäure, bukkale Probenposition, Mittelwerte und Standardabweichungen

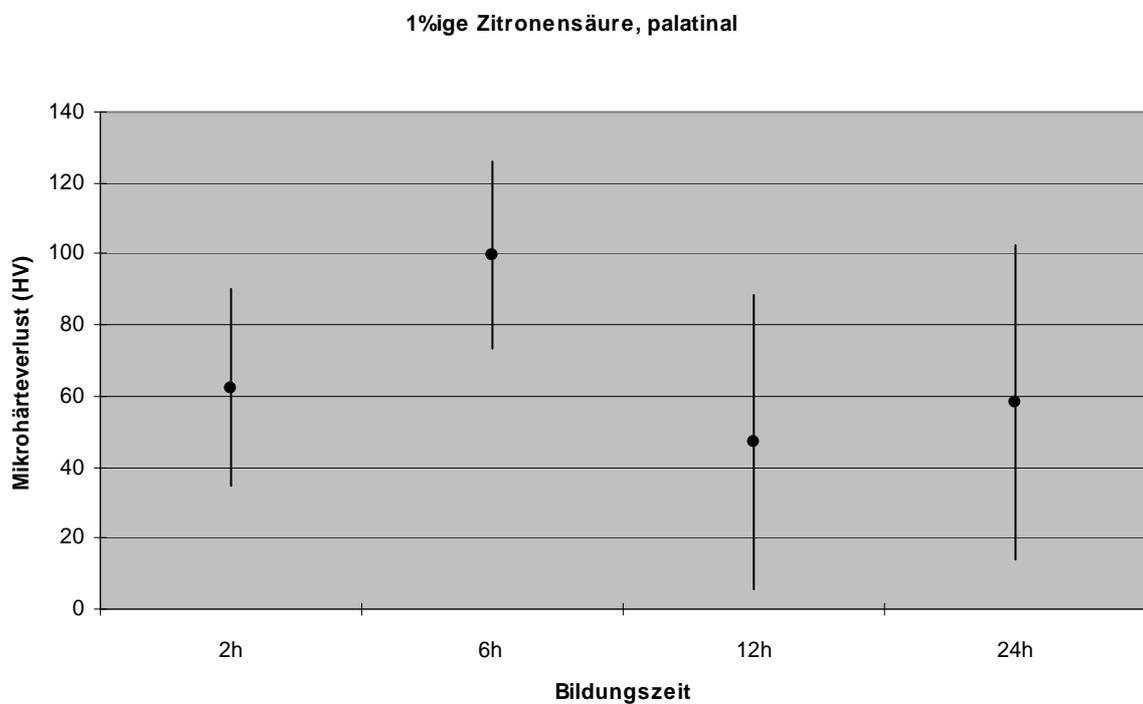


Abb. 15: Mikrohärteverlust (Vickers-Einheiten, HV) in Abhängigkeit von der Pellikelbildungszeit nach einminütiger Erosion mit 1%iger Zitronensäure, palatinale Probenposition, Mittelwerte und Standardabweichungen

4.2 Qualitative Untersuchung des säureprotektiven Potentials der Pellikel

4.2.1 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der erodierten Schmelzoberfläche

Bei einzelnen Prüfkörpern konnte der erosive Effekt der Säureeinwirkung bereits makroskopisch anhand einer vergrößerten und dadurch „frostig-opak“ erscheinenden Schmelzoberfläche, vergleichbar mit dem klinischen Bild nach Anwendung der Säureätzttechnik (Buonocore, 1955), beobachtet werden.

Die nichterodierte, standardisiert polierte Oberfläche einer Zahnschmelzprobe erscheint im REM als eine homogene, weitestgehend glatte Ebene ohne erkennbare Ultrastruktur. Bei Vergrößerungen ab $\times 1.000$ bis $\times 5.000$ sind Polierspuren in Gestalt von bahnenförmigen „Mikrokratzern“ zu erkennen. Die Oberfläche sämtlicher Prüfkörper erfuhr infolge der Säureexposition eine erosive Veränderung unterschiedlichen Ausmasses (Abb. 16).

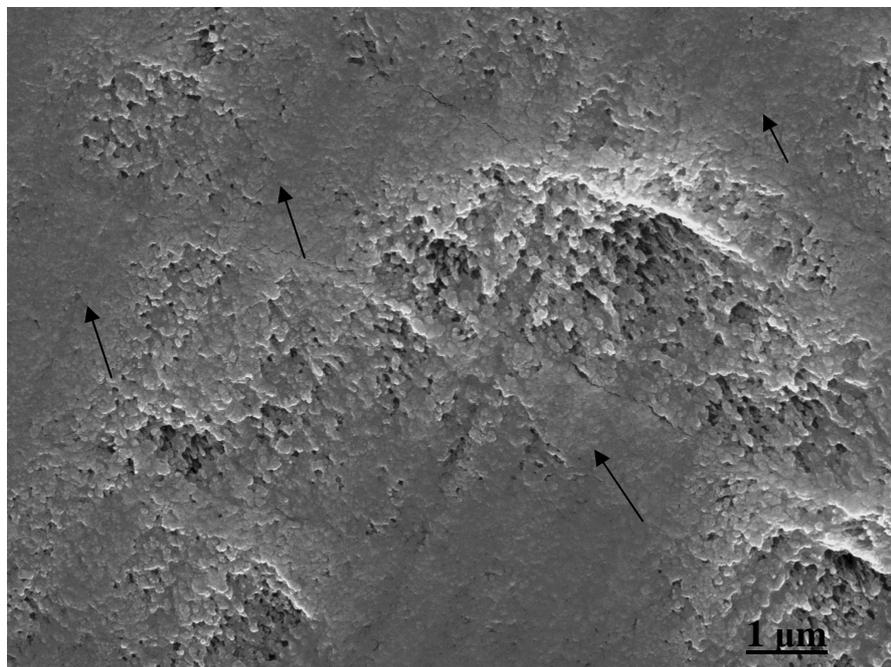


Abb. 16: Beginnende erosive Zerstörung der polierten Rinderzahnschmelzoberfläche mit gerade noch erkennbaren Polierspuren (Pfeile). Pellikelbildungszeit 24 Stunden, bukkale Probenposition, nach einmütiger Erosion mit 0,1%iger Zitronensäure und Entfernung der residualen Pellikelstrukturen, Vergrößerung $\times 5.000$

Im Gegensatz zu den beiden quantitativen Methoden, bei denen keine signifikanten Korrelationen zwischen der Pellikelbildungszeit und dem protektiven Potential der Pellikel nachgewiesen werden konnten, lassen qualitative Untersuchungen naturgemäss mehr Freiraum für Interpretationen. Bei der vergleichenden Auswertung der REM-Aufnahmen waren jedoch teilweise massive intra- und interindividuelle Unterschiede im Erosionsverhalten auffällig, was die objektive Beschreibung erschwerte. Von signifikanten Unterschieden des Erosionsmusters zwischen bukkal und palatinal getragenen Prüfkörpern kann nicht ausgegangen werden. Die folgenden qualitativen Darstellungen beziehen sich auf den Versuch, vornehmlich die markantesten Eindrücke zusammenzufassen.

Mit verkürzter Bildungszeit ließ sich beim Überblick über sämtliche Aufnahmen eine abgestufte progrediente Oberflächendegradation im REM beobachten. Diese reicht vom beginnenden, stellenweisen Verlust der glattpolierten Schmelzoberfläche bis hin zur kompletten, aus der adhäsiven Zahnheilkunde bekannten, Freilegung der honigwabenförmigen Prismenstruktur. Diese ausgeprägten Erosionen waren hauptsächlich nach Erosion der Prüfkörper von kurzer Bildungszeit mit 1%iger Säure auszumachen. Generell auffällig war die leicht erhöhte Tendenz des bovinen Zahnschmelzes, auf Erosion mit 1%iger Zitronensäurelösung mit einer stärkeren Degradation der Oberfläche zu reagieren als auf Erosion mit 0,1%iger Zitronensäurelösung.

Verglichen mit der bukkalen Positionierung liess sich an den palatinal fixierten Prüfkörpern eher eine leicht erhöhte Oberflächenerosion infolge der Säureeinwirkung konstatieren.

Die zentralen Prismenanteile unterlagen mit teilweise kompletter Auflösung einem ausgeprägteren Substanzverlust als die interprismatischen Räume, die jedoch auch bei einzelnen Proben Erosionen zeigten. Daraus resultierte bei stärkerer Ausprägung der Erosion ein typisch honigwabenartiges Ätzmuster. Bei höherer Vergrößerung (x20.000) gelang die detaillierte Darstellung einzelner Kristallite. Während bei einem oberflächlichen Verlust der Schmelzoberfläche die Schmelzkristallite lediglich eine Abrundung erfuhren, kam es bei größeren Oberflächendefekten zur Freilegung der einzelnen Kristallite, die dann stäbchenförmig emporragten (Abb.17).

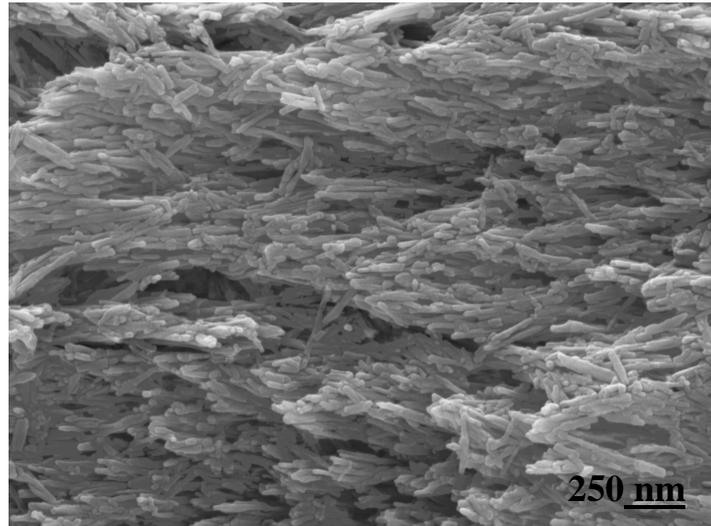


Abb. 17: Darstellung des säureerodierten Rinderzahnschmelzes auf Kristallitebene (Pellikelbildungszeit 6 Stunden, bukkale Probenposition, nach einminütiger Erosion mit 1%iger Zitronensäure und Entfernung der residualen Pellikelstrukturen). Die einzelnen Schmelzkristallite imponieren stäbchenförmig. Vergrößerung x20.000

Die vergleichenden Bildtafeln (Abb. 18 und 19) zeigen die repräsentative Dokumentation der strukturellen Veränderungen der Prüfkörperoberflächen nach Säureerosion. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die 5.000fache Vergrößerung gewählt. Innerhalb der jeweiligen Säurekonzentration sind die Aufnahmen sortiert nach intraoraler Positionierung und Bildungszeit.

Abb. 18 (nächste Seite): REM-Aufnahmen der erodierten Prüfkörperoberflächen (Pellikelbildungszeiten 2, 6, 12 und 24 Stunden bei bukkaler und palatinaler Probenposition) nach einminütiger Erosion mit 0,1%iger Zitronensäurelösung und anschließender Entfernung der residualen Pellikelstrukturen, 5.000fache Vergrößerung.

Abb. 19 (übernächste Seite): REM-Aufnahmen der erodierten Prüfkörperoberflächen (Pellikelbildungszeiten 2, 6, 12 und 24 Stunden bei bukkaler und palatinaler Probenposition) nach einminütiger Erosion mit 1%iger Zitronensäurelösung und anschließender Entfernung der residualen Pellikelstrukturen, 5.000fache Vergrößerung.

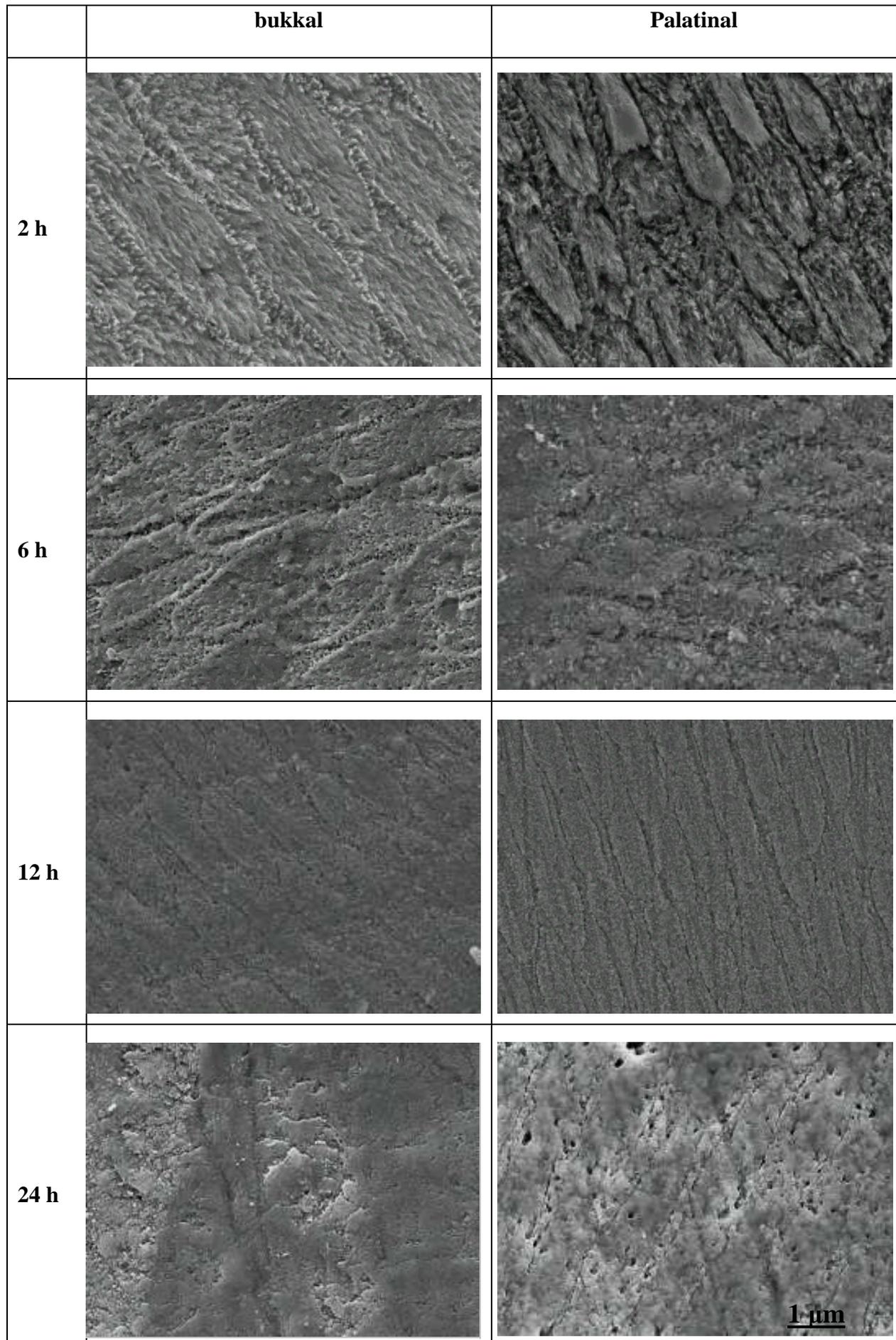


Abb. 18 (Legende siehe S. 35)

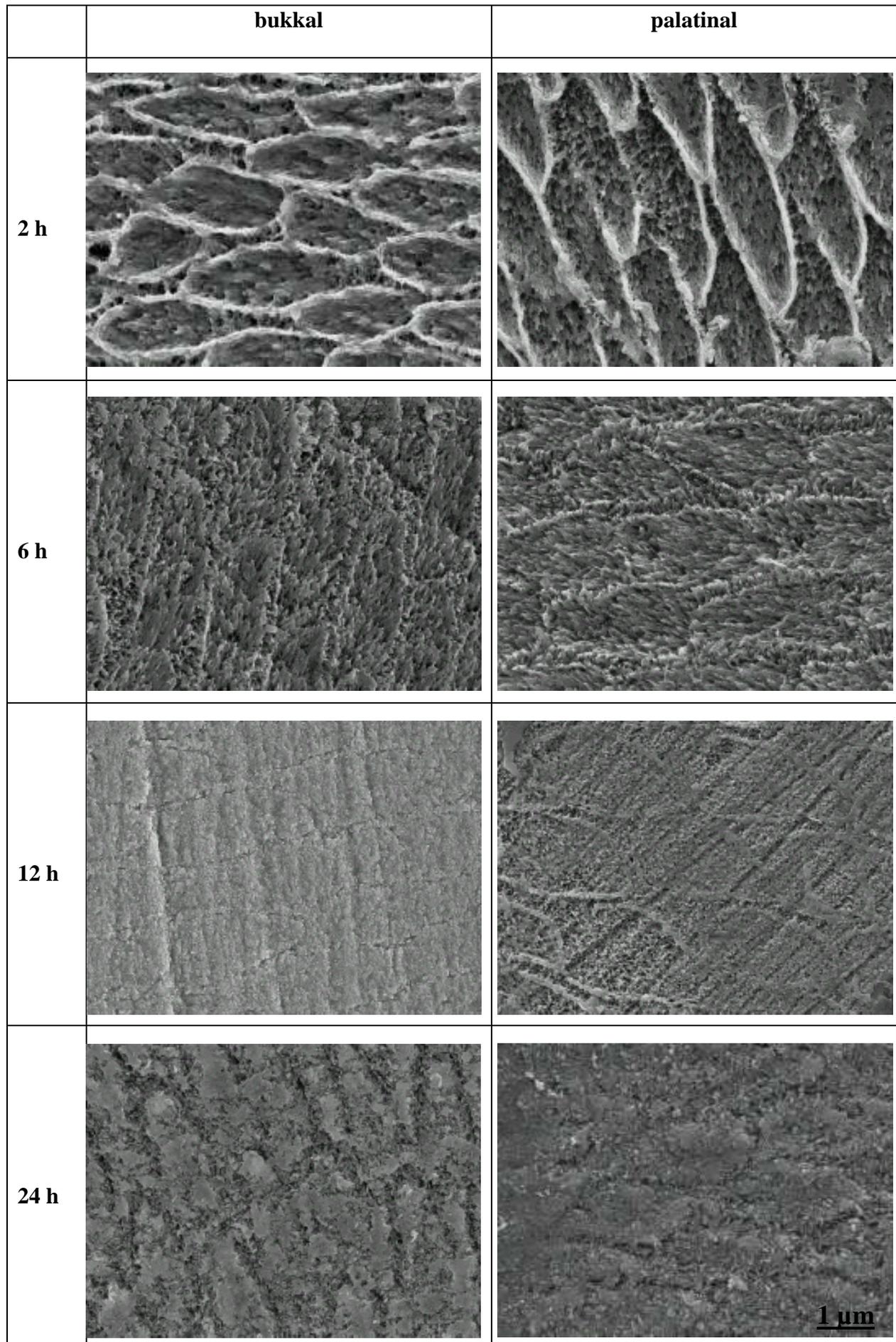


Abb. 19 (Legende siehe S. 35)

4.2.2 Transmissionselektronenmikroskopische Analyse der Pellikel

Alle unerodierten Kontrollproben waren nach der intraoralen Exposition von unterschiedlicher Dauer mit einer für den jeweiligen Bildungszeitraum charakteristischen Pellikelschicht bedeckt. Es gelang die klare Abgrenzung einer elektronendichten Basalschicht von der zuvor entkalkten und durch Einbettkunststoff substituierten Zahnschmelzoberfläche. Die Dicke dieser elektronendichten Basalschicht rangierte zwischen 10 und 20 nm.

Die bukkal positionierten Kontrollproben tendierten im Gegensatz zu den palatinal befestigten Kontrollproben in allen vier Bildungszeiträumen wesentlich eher zur Ausbildung einer heterogen erscheinenden Schicht, bestehend aus granulären und globulären Auflagerungen. In Abhängig vom Bildungszeitraum veränderte sich die Dicke dieser Auflagerungsschicht und bestimmte damit massgeblich die Gesamtdicke der Pellikel.

Auf palatinalen Prüfkörpern waren ähnliche, jedoch weitaus dünnere Auflagerungen erst nach deutlich längerer Bildungszeit zu beobachten. Die Dicke der nicht erosiv behandelten bukkalen Kontrollpellikel variierte im Mittel von 200nm bei zweistündiger Bildungszeit bis zu 600 nm bei einer Bildungszeit von 24 Stunden (Abb. 20).

Im Vergleich zu den unerodierten Kontrollproben ließ sich deutlich die säurebedingte Alteration der Pellikel erkennen. Diese wurde zum einen durch die Reduktion bzw. den Verlust der granulären und globulären Auflagerungen deutlich. Aus der Erosion mit 0,1%er Zitronensäure resultierte nach einer Bildungszeit von zwei Stunden ein teilweise massiver Verlust der granulären und globulären Auflagerungen. Im weiteren Verlauf der Erosion lässt die Beschaffenheit der Basalschicht Rückschlüsse auf den Zerstörungsgrad der Pellikel zu: so blieb die Basalschicht nach Erosion mit 0,1%er Zitronensäurelösung überwiegend durchgehend erhalten. Bei zweistündiger Bildungszeit waren sehr selten leichte Kontinuitätsunterbrechungen der Basalschicht erkennbar.

Die Erosion der pellikelbedeckten Schmelzproben aller vier Bildungszeiträume mit 1,0%iger Zitronensäurelösung hinterliess grundsätzlich eine stark zerstörte Pellikel mit vollständig verloren gegangenen granulären Auflagerungen und einer Basalschicht mit größtenteils unterbrochener Kontinuität. Da die Pellikel als solche nicht mehr zu erkennen war, wurde auf die Abbildung der fotografischen Dokumentation dieser Untersuchungsreihe verzichtet.

Abb. 20 (nächste Seite): Transmissionselektronenmikroskopische Gegenüberstellung von nicht erodierten Kontrollproben und erodierten Proben nach einminütiger Zitronensäureexposition (Pellikelbildungszeit 2, 6, 12 und 24 Stunden bei bukkaler und palatinaler Probenposition). Vergrößerung x30.000.

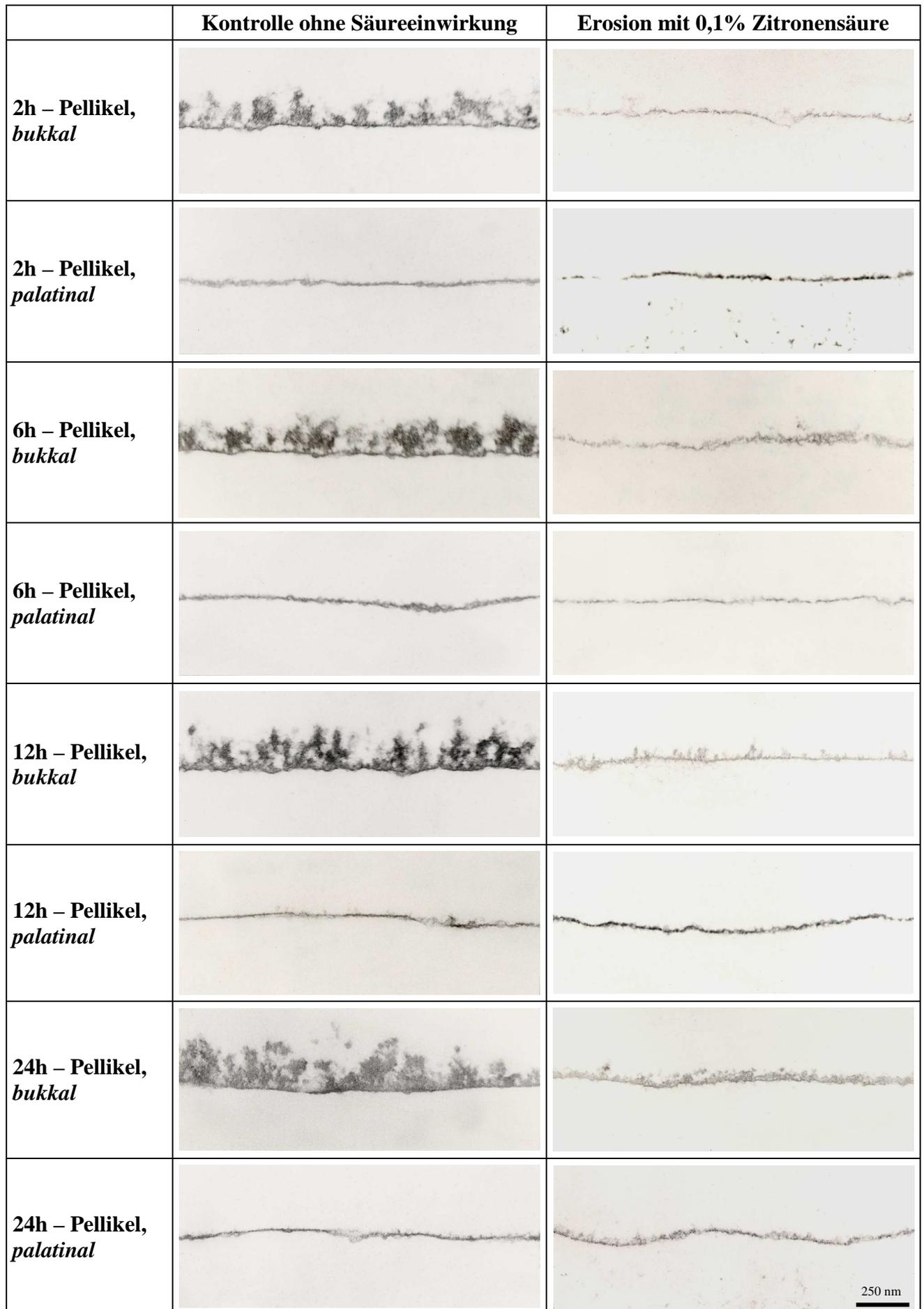


Abb. 20 (Legende siehe S. 38)

5 Diskussion

5.1 Diskussion von Material und Methodik

5.1.1 Studiendesign und Fragestellung

Der Pellikel als bedeckendem Proteinfilm werden in der Literatur mit großer Übereinstimmung protektive Eigenschaften zugesprochen, wobei sich die Mehrzahl der Autoren einig ist, dass neben der lubrikativen (Berg et al., 2003; Lendenmann et al., 2000) auch eine säureprotektive Funktion vorhanden ist (Hannig und Hannig, 2007; Addy und Shellis, 2006; Hannig und Joiner, 2006; Hara et al., 2006; Wetton et al., 2006; Wiegand und Attin, 2006; Cheung et al., 2005; Hannig et al., 2004b und 2003; Nekrashevych et al., 2004; Nekrashevych und Stösser, 2003; Hannig, 2002; Hannig und Balz, 2001; Lendenmann et al., 2000; Amaechi et al., 1999; Maupomé et al., 1999; Meurmann und Frank, 1991).

Die Existenz der Pellikel auf der Schmelzoberfläche führt nach allgemeiner Auffassung zu einer verringerten Löslichkeit von Calciumionen (Hove et al., 2007; Hannig et al., 2004 und 2003; Nekrashevych und Stösser, 2003) und zu einem reduziertem Verlust der oberflächlichen Mikrohärtigkeit (Hannig et al., 2004; Nekrashevych und Stösser, 2003; Maupomé et al., 1999) nach Säureeinwirkung. Die Frage, inwiefern Maturationsvorgänge der Pellikel dabei eine Rolle spielen, wird allerdings nach wie vor kontrovers bewertet.

Zahlreiche, überwiegend ältere In-vitro-Studien gelangten zu der Überzeugung, dass lediglich eine tagelang gereifte Pellikel einen ausreichend Säureschutz bereitstellen könne (Featherstone et al., 1993; Nieuw Amerongen et al., 1987; Zahradnik et al., 1978 und 1976).

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss unterschiedlicher Bildungsintervalle der Pellikel auf deren protektives Potential zu evaluieren. Dabei sollten klinisch und alltäglich relevante Zeiträume (zwei, sechs, zwölf, 24 Stunden) miteinander verglichen werden.

Das Verhalten des nicht pellikelbedeckten Zahnschmelzes im Rahmen der Säureeinwirkung konnte im Einklang mit zahlreichen anderweitigen Studien (Hannig et al., 2003, Nekrashevych und Stösser, 2003; Nekrashevych et al., 2004; Fiebiger, 2005; Maupomé et al., 1999) als hinreichend bekannt vorausgesetzt werden. Auf eine Darstellung des nicht pellikelbedeckten

Schmelzes im Raster- und Transmissionselektronenmikroskop wurde aus diesem Grund ebenso verzichtet wie auf die quantitative Beschreibung der erosiven Effekte ohne schützende Pellikelbedeckung. Aufgrund der sekundenschnellen Pellikelbildung (Hannig, 1999) ist eine pellikelfreie Zahnoberfläche unter klinisch-praktischen Bedingungen nämlich nicht existent.

5.1.2 Art, Herstellung und Bearbeitung der Prüfkörper

Die Verwendung bovinen Zahnschmelzes hat gegenüber Humanmaterial verschiedene Vorteile. Die nahezu unbegrenzte Verfügbarkeit von unversehrter, nicht kariös veränderter und aufgrund der homogenen Ernährung der Tiere gleichmässig mineralisierter und fluoridierter Zahnhartsubstanz führt nach entsprechender Oberflächenbearbeitung zu einer relativ homogenen Gruppe von Prüfkörpern. Ausserdem lassen die voluminöseren Abmessungen der bovinen Inzisivi die Gewinnung einer größeren Anzahl von Prüfkörpern pro Zahn zu, um interindividuelle Qualitätsunterschiede gering zu halten.

Für Prüfkörper aus Humanzahnschmelz kämen aus oben genannten Gründen lediglich retinierte oder aus kieferorthopädischen Gründen extrahierte Zähne in Betracht, die allerdings große intra- und interindividuelle Unterschiede in der kristallinen Schmelzzusammensetzung und im Fluoridgehalt aufweisen können.

Die Vergleichbarkeit zwischen Menschen- und Rinderzahnschmelz hinsichtlich physikalischer (Mikrohärte, Dichte, Wärmekapazität), biologischer (struktureller Aufbau), mechanischer (Biegefestigkeit) und chemischer (Löslichkeit, Zusammensetzung) Eigenschaften wurde bereits als für wissenschaftliche Studienzwecke kompatibel eingestuft (Esser et al., 1998; Nakamichi et al., 1983).

Hinsichtlich der Kompatibilität in Verbindung mit erosiven Angriffen stellten Featherstone und Mellberg (1981) bei Versuchen zur initialen Kariesentstehung jedoch fest, dass Rinderzahnschmelz in Kontakt mit Milchsäure im Vergleich zu humanem Schmelz eine um den Faktor drei erhöhte Erosionsempfindlichkeit besitzt.

Obwohl Hannig et al. (2004a) aufzeigen, dass die Oberflächenenergie des Substrates von entscheidender Bedeutung für die Pellikelformation ist, konnten bei der Literaturschau keine validen Vergleichsdaten zwischen der Oberflächenenergie von bovinem und humanem Zahnschmelz gefunden werden.

Die Selektion der Prüfkörper erfolgte unter auflichtmikroskopischer Kontrolle, weil nachgewiesen werden konnte, dass die morphologische Beschaffenheit der Schmelzoberfläche Einfluss auf das Adsorptionsverhalten der Pellikel haben kann. Die Art der Oberflächenbearbeitung scheint ausserdem Auswirkung auf das Erosionsverhalten des Zahnschmelzes zu haben. Ganss et al. (2000) zeigten, dass eine polierte Zahnschmelzoberfläche anfälliger für erosive Destruktion zu sein scheint als eine unpolierte Kontrollprobe. Auch Rytomaa et al. (1988) kommen zu analogen Schlussfolgerungen und erklären dies mit der erhöhten Fähigkeit polierten Hydroxylapatits, in Lösung zu gehen.

Die Oberflächenbearbeitung jeder Schmelzprobe mittels immer feiner werdender Polierscheiben unter Wasserkühlung diente der Homogenisierung und Egalisierung, um eine gleichmässige Pellikelbildung zu gewährleisten. Ausserdem ist auch bei der natürlichen Dentition von einer „physiologischen Politur“ durch Abrasions- und Attritionsprozesse auszugehen. Bei einer maximalen Körnungszahl des finalen Schleifpapiers von 4000, was einer Rautiefe von 5µm entspricht, kann in Übereinstimmung mit der gängigen Literatur von einer ausreichend glatten Oberfläche ausgegangen werden; (Fiebiger, 2005; Nekrashevych et al., 2004; Nekrashevych und Stösser, 2003; Hannig, 1999).

Die Größe der Prüfkörper wurde im Hinblick auf die vorgesehene Messmethodik gewählt: während für die transmissionselektronenmikroskopische Analyse der Pellikel und die Messung des Mikrohärteverlustes keine speziellen Anforderungen an die Abmessungen der Prüfkörper gestellt wurden, verlangte die Bestimmung der freigesetzten Calcium-Ionen mittels Flammen-AAS möglichst gleichgroße Oberflächen, um bei der Berechnung des gesuchten Erosionsquotienten „µg Calcium/mm² Probenoberfläche“ Ungenauigkeiten zu minimieren. Es hat sich gezeigt, dass Probenabmessungen von 5x5mm reproduzierbare Ergebnisse bei einfacher Handhabung zulassen (Fiebiger, 2005; Nekrashevych und Stösser, 2003)

Die Versiegelung der Prüfkörperunter- und Seitenflächen mittels handelsüblichen Nagellacks stellte sicher, dass ausschliesslich die der Mundhöhle zugewandte Oberseite der Prüfkörper in Kontakt mit der Zitronensäure trat. Diese Methodik hat sich in bereits früheren Studien als praktikabel erwiesen (Fiebiger, 2005; Meurmann und Frank, 1991; Amaechi et al., 1999).

5.1.3 Pellikelgewinnung

Das Phänomen der physiologischen Pellikelbildung beruht auf einer selektiven Adsorption von Speichelproteinen an Festkörperoberflächen innerhalb der Mundhöhle (Lendenmann et al., 2000). Zur experimentellen Gewinnung der Pellikelschicht besteht prinzipiell die Möglichkeit der Speichalexposition *in vitro* oder *in situ*. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die experimentelle Biofilmbildung *in vitro* in ihren Prinzipien zwar simuliert werden kann, in ihrer gesamten Komplexität jedoch nicht reproduzierbar ist. Hinsichtlich des Unterschiedes zwischen *in vivo* und *in vitro* gebildeter Pellikel beschrieben Yao et al. (2002) ein erhöhtes Mass an enzymatisch verändertem Proteingehalt unter *In-vitro*-Bedingungen. Yin et al. (2006) konnten anhand von Adsorptionsversuchen zusammenfassen, dass spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle bei der *In-vivo*-Pellikelformation haben dürften. Bei einem Vergleich der protektiven Eigenschaften von innerhalb von 18 Stunden *in vitro* und *in situ* gebildeten Pellikeln stellten Kautsky und Featherstone (1993) fest, dass die *in vitro* gebildete Pellikel im Gegensatz zur *in situ* gebildeten Pellikel keine Schutzwirkung auf den Zahnschmelz ausübte.

Die komplexen Vorgänge der Pellikelmaturation scheinen also *in vitro* nicht vollständig simulierbar zu sein. Eine Ursache dafür könnte in der Reinigung und Aufbereitung der gepoolten Speichelproben liegen (Lendenmann et al., 2000). Vor allem die zentrifugensierte Aufbereitung der gesammelten Speichelproben reduziert das protektive Potential der *In-vitro*-Pellikel um bis zu 70%, vermutlich durch Separation der Speichelmuzine (Nieuw Amerongen et al., 1987). Maupomé et al. (1999) bescheinigten dem gereinigten Speichel bei Mikrohärtedifferenzmessungen nach *In-vitro*-Pellikelbildung und anschliessender Säureerosion ein geringeres protektives Potential als dem unbehandeltem Speichel.

Die Prüfkörper wurden in der vorliegenden Studie an herausnehmbaren Trageschienen befestigt (Hannig, 1998; Tinanoff et al., 1976). Die genannte Methode vereint verschiedene Vorteile. Diese bestehen aus der frei wählbaren, reversiblen, nicht invasiven und schnellen Befestigung der Schmelzprüfkörper in der humanen Mundhöhle. Ebenso können die Prüfkörper bei längeren Trageperioden, beispielsweise für die Nahrungsaufnahme, aus dem Mund entnommen werden, ohne die pellikelbedeckte Oberfläche zu touchieren. Die Gestaltung der Schienen erfolgte ohne Bedeckung der Gaumenschleimhaut, um die Sekretion der palatinalen Speicheldrüsen nicht zu behindern. Ein eventueller Kritikpunkt ist die systemimmanente, teilweise Abdeckung der Sulci gingivales, um ausreichende Retention für die bis zu 5x5mm messenden Prüfkörper zu erhalten. Der in gewissem Ausmass an der Pellikelbildung beteiligte Sulcusflu-

id (Hannig und Joiner, 2006) hatte also möglicherweise keinen direkten Zugang zu den Schmelzprüfkörpern auf der Aussenseite der Schiene.

Mit zunehmender oraler Verweildauer der Prüfkörper steigt die Tendenz zur mikrobiellen Besiedelung. Erste bakterielle Einschlüsse wurden ab einem Zeitraum von 4 Stunden beschrieben (Lie, 1975). Um eine übermäßige mikrobielle Besiedelung der Pellikel zu verhindern, erfolgte in den zwölf- und 24-stündigen Versuchsreihen eine definierte Reinigung der Prüfkörperoberflächen mittels einer handelsüblichen Zahnbürste ohne Zusatz von Zahnpasta. Die Verwendung von Zahnpasten war untersagt, um einen übermäßigen Abrieb der Pellikel durch Putzkörper zu verhindern (Hannig und Joiner, 2006; Hannig und Bößmann, 1988). Bei der Verwendung von Mundspüllösungen oder Zahnpasten hätte zusätzlich eine chemische Modifikation der Pellikelstrukturen und Pellikeleigenschaften durch Tenside, Fluoride oder sonstige Inhaltsstoffe nicht ausgeschlossen werden können (Joiner et al., 2006; Vitkov et al., 2005; Hannig, 1998).

Hinsichtlich einer möglichen Destruktion der Pellikel konnte Hannig (2002) anhand einer 6-Stunden-Pellikel und standardisiertem Gebrauch der Zahnbürste nachweisen, dass die Schicht granulärer und globulärer Auflagerungen teilweise einer erheblichen Reduzierung unterliegt. Die Basalschicht jedoch blieb in ihrer Kontinuität erhalten.

Die absolute Nahrungskarenz während der Expositionszeiten liegt in der Tatsache begründet, dass zahlreiche Nahrungsmittel und Nahrungsbestandteile eine Veränderung der Pellikelzusammensetzung (Vacca Smith und Bowen, 2000b; Rykke und Sönju, 1991) und damit auch des protektiven Potentials bewirken können (Echterhoff et al., 2004). Vacca Smith und Bowen (2000a) beobachteten nach dem Verzehr von Milch und Milchprodukten großflächige, mizellenförmige Einschlüsse in der Pellikelultrastruktur sowie eine signifikant reduzierte Glykosyltransferaseaktivität innerhalb der Pellikel. Die modifizierende Wirkung von Schwarztee und Rotwein auf die Pellikelbildung wurde von Joiner et al. (2006 und 2003) beschrieben.

5.1.4 Probandenselektion

Die Probandenanzahl von sechs Individuen gewährleistete eine ausreichend große Anzahl von Einzelmessungen, wobei mit steigender Probandenanzahl der Einfluss interindividueller Unterschiede abnimmt. Siqueira et al. (2007b) konnten zumindest anhand der Proteinkomposition der In-vivo-Pellikel keine bemerkenswerten interindividuellen Differenzen feststellen. Al-

lerdings ist in der Studie von Siqueira et al. die geringe Probandenanzahl von nur drei zu berücksichtigen.

Hannig et al. (2005) beobachteten bei Untersuchungen bezüglich der Lysozymaktivität innerhalb der In-situ-Pellikel große inter- und intraindividuelle Unterschiede. Demgegenüber konnte Lindh (2002) bei In-vitro-Untersuchungen zur Proteinadsorption keine interindividuellen Unterschiede nachweisen.

Die Erhebung einer allgemeinen und speziellen Anamnese sollte sicherstellen, dass die Speichelqualität nicht durch Erkrankungen, Medikamenteneinnahmen oder sonstige Unregelmäßigkeiten beeinflusst wurde. Hannig et al. (2006) konnten beispielsweise zeigen, dass aufgrund eines Tumorleidens im Kopf- und Halsbereich bestrahlte Patienten neben der absoluten Xerostomie auch eine relative Verminderung der Speichelproteine mit niedrigem Molekulargewicht aufweisen.

Die individuelle Zusammensetzung des Speichels aus den verschiedenen Speicheldrüsen hängt neben der genetischen Disposition von den Ernährungsgewohnheiten des Individuums (Linkosalo et al., 1985) ab und ist darüber hinaus einem zirkadianen Rhythmus unterworfen (Jenkins, 1978). Aus diesem Grund waren die Probanden angehalten, sich vor, während und nach dem Expositionszeitraum in gewohnter Weise zu ernähren. Eine schwankende Pellikelqualität („Hungerpellikel“) sollte weitmöglichst ausgeschlossen werden. Rykke und Sönju (1991) stellten in diesem Zusammenhang fest, dass sich die chemische Zusammensetzung einer Pellikel, die innerhalb von 24 Stunden unter Fastenbedingungen gewonnen wurde, nicht von einer Pellikel nach zweistündiger Bildungszeit bei normaler Ernährung unterscheidet.

5.1.5 Künstliche Erosion der Prüfkörper

Die zur Erosion der pellikelbedeckten Prüfkörper verwendete Zitronensäure kommt nicht nur in vielen natürlichen Nahrungsmitteln (z.B. Obst, Säfte) vor, sondern wird seitens der Industrie als Lebensmittelzusatzstoff E330 in großem Ausmass zum Säuern von Genuss- und Nahrungsmitteln sowie zu deren Konservierung verwendet. So betrug das Volumen des europäischen Zitronensäuremarktes im Jahre 1996 knapp 303.000 Tonnen, von denen rund 60% auf das Marktsegment der Lebensmittel entfielen (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2004).

Das gesteigerte Gesundheitsbewusstsein vieler Patienten führt zu einer erhöhten Nachfrage nach Fruchtsäften, stark gesäuerten Erfrischungs- und Sportlergetränken (Lussi et al., 2007).

Die zwei in der vorliegenden Studie verwendeten Konzentrationen und damit pH-Werte der Zitronensäurelösungen spiegeln repräsentativ die pH-Werte vieler zeitgenössischer Erfrischungs- oder Modegetränke wider (Lussi et al., 2007 und 1995; Grando et al., 1996; Grobler et al., 1989).

Die künstliche Erosion über den Zeitraum von einer Minute wird durchschnittlichen Ernährungsgewohnheiten gerecht. Diese Erosionsdauer fand mittlerweile in zahlreichen Studien Verwendung (Fiebiger, 2005; Hannig et al., 2004 und 2003; Nekrashevych und Stösser, 2003). Im Vergleich hierzu muss bei Studienergebnissen mit längerer Erosionszeit (Meurmann und Frank, 1999; Wetton et al., 2006) von stärkeren kumulativen Effekten ausgegangen werden. Die Erosion der Prüfkörper erfolgte unter kontinuierlicher Agitation, um die Spüleffekte innerhalb der Mundhöhle, beispielsweise beim Trinkvorgang, zu simulieren. Maupome et al. (1999) konnten zeigen, dass statische experimentelle Erosionsbäder einen vergleichsweise hohen Anstieg der Erosivität bewirken. Auch Shellis et al. (2005) kommen zu der Feststellung, dass das erosive Potential eines sauren Agens durch gesteigerte Fließrate nicht verstärkt wird. Andererseits beschreiben Eisenburger und Addy (2003), dass die Erosionstiefe in der Zahnschmelzstruktur mit steigender Agitationsdynamik, beispielsweise beim forcieren Trinken durch einen Strohhalm, zunimmt. Hughes et al. (2000) fanden bei einem experimentellen In-vitro-Vergleich zwischen verschiedenen in der Lebensmittelindustrie verwendeten Säuren keine signifikanten Unterschiede in der jeweilig spezifischen Erosivität. Vielmehr sei die Kombination aus pH-Wert, Säurekonzentration und Calciumgehalt der Säurelösung von entscheidenderer Bedeutung. Beim vergleichenden Überblick über die Literatur muss allerdings beachtet werden, dass die erosiven Effekte im Rahmen von In-vitro-Studien ein um den Faktor zehn erhöhtes Potential zu besitzen scheinen (Hughes et al., 1999).

Da die künstliche Erosion unter Laborbedingungen erfolgte, blieben sonstige physiologische Protektionsmechanismen (Lussi et al., 2007) wie Bereitstellung von Calcium- und Phosphationen, Pufferkapazität, Fließrate des Speichels und Säureverdünnung unberücksichtigt. Da bei der sogenannten Speichel-Clearance große inter- (Bashir et al., 1995) und intraindividuelle (Widodo et al., 2005) Unterschiede anzutreffen sind, wurde auf die Simulation derartiger Prozesse verzichtet.

5.1.6 Mess- und Analysemethoden

Zur suffizienten Untersuchung der erosiven Auswirkungen fordert Grenby (1996) die Kombination unterschiedlicher Messmethodiken. In der vorliegenden Studie kamen deshalb zwei quantitative (Mikrohärte- und Calciumfreisetzungsmessungen) und zwei qualitative (TEM- und REM-Analyse) Verfahren zum synergistischen Einsatz.

Die durchschnittliche oberflächliche Mikrohärte (Maupomé et al., 1999; Esser et al., 1998) von Rinderzahnschmelz (221-356 HV) ist mit der von Humanzahnschmelz vergleichbar (169-340 HV). Die Schwankungsbreite der gemessenen Werte spricht allerdings für das Vorhandensein von gewissen inter- und intraindividuellen Unterschieden in der Mikrohärte. Ein weiterer Grund für die heterogenen Ergebnisse mag in der methodischen Schwierigkeit liegen, den Indentationskörper präzise im rechten Winkel auf die Oberfläche des Zahnschmelzes aufzutreffen zu lassen (Deutsches Institut für Normung e.V., 2006). In diesem Zusammenhang muss diskutiert werden, ob die Zahnschmelzoberfläche durch eine Politur der Prüfkörper eventuell im ungünstigen Winkel angeschliffen werden könnte.

Im Zuge der erosiven Demineralisierung kommt es zu einer Abnahme der oberflächlichen Mikrohärte des Zahnschmelzes (Nekrashevych, 2001; Maupomé et al., 1999). Diese Gefügeflockerung führt zu einer messtechnisch erfassbaren „Erweichung“ der Oberfläche. Als Messmethodik bietet sich das Verfahren nach Vickers (Deutsches Institut für Normung e.V., 1996; Oliver und Pharr, 1992) an, da es sich bei Zahnschmelz zum einen um ein relativ hartes und zugleich homogen aufgebautes Material handelt. Wenige andere Studien operieren mit dem Verfahren nach Knoop, einer Sonderform der Vickers-Härteprüfung, das auf der Verwendung eines anderen Indentationskörpers beruht. Die Methode nach Vickers besitzt den Vorteil der leichteren Ablesbarkeit des Pyramideneindrucks aufgrund der isometrischen Diagonalen (Nekrashevych, 2001). Eine direkte Vergleichbarkeit zwischen Messergebnissen nach Vickers und Knoop ist nach Blumenauer (1989) aufgrund der beiden unterschiedlichen Pyramidengeometrien nicht unmittelbar möglich und kann lediglich orientierend erfolgen. Um die Messung der Mikrohärte nicht durch lokale Schmelzimperfectionen zu verfälschen, wurden pro Messdurchgang vier Härtemessungen, nach Quadranten aufgeteilt, durchgeführt und anschließend der Mittelwert gebildet. Bei der Interpretation der Messergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die Rauigkeit der zu prüfenden Oberfläche Einfluss auf die Messunsicherheit des Verfahrens hat (Deutsches Institut für Normung e.V., 1996). Da nach Auswertung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von unterschiedlichen Oberflä-

chenrauigkeiten vor und nach der Säureerosion ausgegangen werden muss, sollte diese Tatsache in die endgültige Bewertung der Ergebnisse mit einbezogen werden.

Rinderzahnschmelz enthält durchschnittlich ungefähr 31,8% Calcium und ist im Vergleich mit Humanzahnschmelz (34,9%) in ähnlichem Ausmass calcifiziert (Esser et al., 1998). Im Rahmen erosiver Angriffe gehen aus der Zahnschmelzoberfläche vermehrt Calciumionen in Lösung. Dieser Vorgang wird als Demineralisation bezeichnet (Hellwig et al., 2003). Durch Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes (Zeeck et al., 2000) lässt sich der Gehalt an erodierten Calcium-Ionen in der Säurelösung spektrophotometrisch bestimmen, wobei selbst der Nachweis kleinster Mengen gelingt. Die analytische Konzentrationsbestimmung der durch die Säureeinwirkung freigesetzten Calciumionen mittels Flammen-AAS hat sich mehrfach in Studien bewährt (Hove et al., 2007; Hannig et al., 2004 und 2003; Nekrashevych und Stösser, 2003) und reproduzierbare Ergebnisse geliefert. Schinkel (1984) bestätigt für das Verfahren eine präzise Nachweisbarkeit verschiedenster Ionentypen. Weiterhin empfiehlt er bei der Verdünnung der Messlösungen die Zugabe von Lanthanchlorid im Sinne eines Ionenpuffers, um Ionisationsinterferenzen aufgrund der extrem hohen Flammentemperatur zu eliminieren. Um eine Verfälschung der Messergebnisse zu verhindern, wurden die einzelnen Zitronensäurevolumina unmittelbar nach der künstlichen Erosion in Kunststoffbehälter umgefüllt. Auf diese Weise wurde eine säurebedingte Dissolution von Calciumionen aus den Wänden der Glasgefäße heraus verhindert.

Die Pellikel ist im Rasterelektronenmikroskop zwar grundsätzlich darstellbar (Meurmann und Frank, 1991; Lie, 1977), jedoch sind aufgrund der erforderlichen Proben-trocknung Schrumpfungartefakte nicht auszuschliessen. Zudem erlaubt die Betrachtung im REM lediglich Aussagen über die flächenmässige Ausbreitung der Pellikel. Eine eindeutige Darstellung der Pellikelultrastruktur im REM gelingt nach Nekrashevych (2001) demzufolge nicht, sodass in der vorliegenden Studie lediglich die unterschiedlichen Auswirkungen der Zitronensäure auf die Mikromorphologie der Zahnschmelzoberfläche analysiert wurden. Die nach der Erosion noch anhaftenden residualen Pellikelstrukturen wurden chemisch und ultraschallaktiviert entfernt, um eine mechanische Beschädigung der freigelegten fragilen Prismenstrukturen zu verhindern (Eisenburger et al., 2004). Die chemische Entfernung organischer Reste mittels NaOCl wurde erstmals von Meurmann und Frank (1991) erwähnt. Hannig M et al. (2005) beschrieben eine vollständige Eliminierung der elektronendichten basalen Pellikelschicht mittels kombinierter NaOCl- und Ultraschallbehandlung, wie sie auch in der vorliegenden Studie zur restlosen

Entfernung der Pellikel angewendet wurde. So waren sämtliche begutachtete Prüfkörper frei von organischen Ablagerungen, was eine lückenlose Dokumentation der Schmelzoberfläche gewährleistete.

Die Analyse der Pellikel unter Zuhilfenahme der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM; Heinrich, 1994) gilt als Methode der Wahl um deren ultrastrukturelle Vielfalt zu erfassen (Hannig, 1998; Nyvad und Fejerskov, 1987; Berthold, 1979; Lie, 1977). Die Anfertigung von Ultradünnschnitten erlaubt die Analyse von sehr vielen Pellikelabschnitten in ihrem gesamten schichtweisen Aufbau. Da jeder dritte TEM-Prüfkörper im Sinne einer Kontrollprobe unero- diert blieb, konnten zusätzlich zu den erosiven Auswirkungen auf die Pellikel auch die ultra- strukturellen Charakteristika der jeweiligen Bildungszeiten und die Auswirkungen der Prüf- körperreinigung mittels Zahnbürste dokumentiert werden. Durch die unmittelbar an die intra- orale Exposition und teilweise künstliche Erosion erfolgte Fixierung, schrittweise Trocknung und Tränkung mit Aralditkunststoff konnten Schrumpfungsartefakte auf ein Minimum redu- ziert werden. Da die basal liegenden Zahnschmelzanteile nach dem Einbetten der Prüfkörper von retrograd entkalkt wurden, ist die Analyse auf die Pellikelschicht an sich beschränkt. Eine Darstellung der mikromorphologischen Veränderungen der Zahnschmelzoberfläche gestattet die TEM nicht, so dass eine synergistische qualitative Ergänzung mittels REM erforderlich war.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Säureinduzierte Calciumfreisetzung aus der Schmelzoberfläche

Zwischen den untersuchten Pellikelbildungszeiträumen und der Menge an erodierten Calci- um-Ionen konnten keinerlei signifikante Zusammenhänge ($p < 0,05$) nachgewiesen werden. Auch Hannig et al. (2003) fanden bei identischen Pellikelbildungszeiten keine signifikanten Korrelationen zwischen den unterschiedlichen Bildungszeiträumen und dem Ausmass der Calciumfreisetzung, bestätigten aber bereits der Pellikel nach zweistündiger Bildungszeit eine suffiziente Schutzwirkung gegenüber der einminütigen Erosion mit 1%iger Zitronensäure.

Auch bei Kurzzeitpellikeln von drei bis 120 Minuten wiesen Hannig et al. (2004) keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Bildungszeit und der Säureprotektion nach. Ferner erbrachte die Untersuchung der bukkopalatinalen Positionierung keine Unterschiede im Protektionsverhalten der Pellikelschichten, was auch in den vorliegenden Studienergebnissen nachvollzogen werden konnte. Diese Beobachtung steht in Einklang mit den Ergebnissen von Fiebiger (2005), wonach sich die Resultate der Calciumfreisetzungsmessungen von bukkal und palatinal positionierten Prüfkörpern nicht signifikant unterschieden.

Eine signifikant erhöhte Calciumfreisetzung nach Erosion mit 1%iger Zitronensäurelösung konnte im Vergleich mit 0,1%iger Säurelösung festgestellt werden, was unter analogen Versuchsbedingungen von Echterhoff et al. (2004) bereits gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse decken sich allerdings nicht mit den Resultaten einer In-vitro-Studie von Nekrashevych und Stösser (2003), die keine signifikanten Unterschiede in der Calciumfreisetzung hinsichtlich der Säurekonzentration nachweisen konnten.

Nekrashevych (2001) fand überraschenderweise identische Calciumkonzentrationen nach der Erosion von in vitro pellicelbedecktem und pellicelfreiem Rinderzahnschmelz. Der Autor führt diese Beobachtung darauf zurück, dass die in der Zitronensäure vorgefundenen Calciummengen nicht ausschliesslich aus dem Zahnschmelz stammen, sondern zumindest teilweise in der Pellicel kumuliert sein könnten.

5.2.2 Säureinduzierter Mikrohärteverlust der Schmelzoberfläche

Die durchschnittliche Vickers-Ausgangshärte der Rinderzahnschmelzproben liegt mit 371,2 HV (SD=41,7) in Bereichen, die auch von anderen Studien beschrieben wurden (Nekrashevych und Stösser, 2003; Nekrashevych, 2001; Maupomé et al., 1999). Die Vergleichbarkeit sowohl der Substrate als auch der Messmethodiken scheint demnach gewährleistet zu sein. Es muss allerdings bei der Übertragung der Ergebnisse auf klinische Aspekte berücksichtigt werden, dass die durchschnittliche Vickers-Härte von Rinderzahnschmelz ungefähr 30 % über der von humanem Zahnschmelz liegt (Esser et al., 1998).

Nach der statistischen Auswertung sämtlicher Einzelmessungen konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der Pellicelbildungszeit und dem protektiven Potential nachgewiesen werden, obwohl die Betrachtung der grafischen Ergebnisdarstellung zunächst einen tendenziellen bildungszeitabhängigen Rückgang des Mikrohärteverlustes erahnen liess.

Die relativ hohen Standardabweichungen der Messergebnisse sprechen für die Sensibilität der Messungen. Gerade bei langer Bildungszeit und schwacher Säurekonzentration war letztendlich kein statistischer Mikrohärteverlust mehr nachzuweisen, was die sogar teilweise schwach negativen Messwerte erklärt.

Ebenfalls keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der Bildungszeit und dem Mikrohärteverlust nach Säureeinwirkung konnten Hannig et al. (2004) sowie Fiebiger (2005) detektieren.

Maupomé et al. (1999) kommen im Rahmen von In-vitro-Untersuchungen zusätzlich zu der Schlussfolgerung, dass weniger die Pellikelbildungszeit, sondern vielmehr die Art und Weise der erosiven Attacken und deren Frequenz für das Ausmass des Mikrohärteverlustes entscheidend sind. Sie stellten bei Erosionsversuchen mit einem erosiven Cola-Getränk fest, dass statische Erosionsbäder und gesteigerte Erosionsfrequenz einen synergistischen Effekt zu haben scheinen und die Pellikelbildungszeit eine eher untergeordnete Rolle spielt.

In einer weiteren In-situ-Studie (Hara et al., 2006) wurde eine signifikante Reduktion des säureinduzierten Mikrohärteverlustes lediglich im Intervall zwischen null und zehn Minuten registriert, während die längeren Bildungsperioden wie in der vorliegenden Untersuchung keine signifikanten Zusammenhänge mit dem Ausmass der Säureprotektion erkennen liessen.

In der vorliegenden Studie zeigte die intraorale bucco-palatinale Positionierung ebenso keinen statistisch nachweisbaren Effekt auf die Säureprotektion der Pellikel. Zu analogen Ergebnissen kommt Fiebiger (2005), der ebenfalls keine regionalen Zusammenhänge aufzeigen konnte. Allerdings lässt sich klinisch häufig beobachten, dass zumindest die palatinalen Anteile der Frontzähne des Oberkiefers anfälliger für erosive Zerstörung zu sein scheinen. Dieser auf den ersten Blick widersprüchliche Sachverhalt kann durch zusätzliche posterosive Abrasionsphänomene durch die Zunge erklärt werden (Gregg et al., 2004), die den initial erweichten Schmelzmantel zusätzlich mechanisch beansprucht. Auch Eisenburger et al. (2004) kommen zu der Auffassung, dass erosiv vorbehandelter Zahnschmelz zu fragil ist, um physiologischen Reibungskräften in vivo zu widerstehen. Attin et al. (1997) fanden bei Vickers-Mikrohärtemessungen an 60 bovinen Schmelzprüfkörpern eine überproportionale Anfälligkeit für Abrasionen bei erosionsbedingt reduzierter Mikrohärtigkeit der Prüfkörper. Young und Khan (2002) machen regionalspezifische Unterschiede in der Speichelkomposition für die klinische Variationsbreite der erosiven Erscheinungsbilder verantwortlich.

5.2.3 Säureinduzierte strukturelle Veränderungen des Zahnschmelzes (REM-Analyse)

Die Betrachtung der erodierten Schmelzprüfkörper im REM ergab in jedem Fall eine oberflächliche Alteration unterschiedlichen Ausmasses. Das Vorhandensein einer Pellikelschicht konnte die erosive Wirkung der einminütigen Einwirkung von Zitronensäure demzufolge zwar reduzieren, jedoch nicht vollständig inhibieren. Diese Beobachtung findet großen Konsens in der Literatur (Hara et al., 2006; Cheung et al., 2005; Fiebiger, 2005; Hannig et al., 2004 und 2003; Nekrashevych et al., 2004; Nekrachevych und Stösser, 2003; Hannig und Balz, 2001; Amaechi et al., 1999; Balz, 1999; Meurmann und Frank, 1991).

Die rasterelektronenmikroskopische Analyse der erodierten Zahnschmelzoberflächen fand in zahlreichen Studien Verwendung, so dass eine gute Vergleichbarkeit gewährleistet ist. Das Ausmass der erosiven Schädigung ist vergleichbar mit den Beobachtungen von Meurmann und Frank (1991). Sie beobachteten die Auswirkungen einer zweistündigen Erosion eines sauren Colagetränkes auf mit sieben Tage alter In-vitro-Pellikel bedeckten Rinderzahnschmelzprüfkörpern. Die Demineralisation schien bevorzugt im Bereich der Prismenscheiden stattzufinden. Nekrashevych und Stösser (2003) untersuchten den protektiven Effekt einer 24 Stunden alten In-vitro-Pellikel. Nach einminütiger Erosion mit 0,1%iger Zitronensäurelösung konnten, analog zu den in der vorliegenden Studie gewonnenen Ergebnissen, nur schwach ausgeprägte erosive Alterationen der Oberfläche detektiert werden. Sie konnten ebenfalls bei vielen Proben noch die Polierspuren der Oberflächenbearbeitung nachvollziehen. Es muss in diesem Zusammenhang allerdings berücksichtigt werden, dass von Nekrashevych und Stösser (2003) keine Entfernung der residualen Pellikel vor der Goldbedampfung durchgeführt wurde.

In einer Pilotstudie untersuchten Cheung et al. (2005) das protektive Potential einer drei Tage alten in vivo Pellikel auf humanen Zahnschmelz mittels REM. Als erosive Agentien dienten Weisswein und Salzsäure (0,06M) über Inkubationszeiträume von 600 und 1500 Minuten. Selbst bei diesen extrem kumulierten erosiven Effekten auf die pellikelbedeckten Prüfkörper konnten im Vergleich zu pellikelbefreiten Prüfkörpern deutlich signifikante Reduktionen der Oberflächenzerstörung nachgewiesen werden.

5.2.4 Säureinduzierte strukturelle Veränderungen der Pellikel (TEM-Analyse)

Hannig (1999) gelang erstmals eine transmissionselektronenmikroskopische Dokumentation der bildungszeitabhängigen morphologischen „Reifung“ der Pellikel, die mit der initialen Bildung einer elektronendichten Basalschicht einerseits und einer heterogenen Schicht granulär-globulärer Auflagerungen andererseits eine scheinbar zweistufige Pellikelformation darstellt. Diese morphologischen Besonderheiten konnten zweifelsfrei auch in der vorliegenden Studie nachvollzogen werden. Die Hypothese der zweiphasigen Pellikelbildung wird durch die Ergebnisse biochemischer Analysen unterstützt (Skjörland et al., 1995). Auch die Dickenunterschiede der Pellikel in Abhängigkeit von lokaldisponierenden Faktoren wie regionale Speichelzusammensetzung oder der Einfluss abrasiver physiologischer Krafteinwirkung durch mukosale Oberflächen waren eindeutig nachzuweisen.

Infolge der Säureeinwirkung konnten Hannig und Balz (2001) erstmals eine kontinuierliche Auflösung der Pellikel feststellen.

Besonders der Basalschicht werden im Hinblick auf die säureprotektiven Eigenschaften eine übergeordnete Rolle zugesprochen (Hannig, 2002). Zu analoger Schlussfolgerung kommt Fiebiger (2005). Auch die vorliegenden Studienergebnisse sprechen für eine besondere Bedeutung der Basalschicht, weil diese zumindest nach Einwirkung von 0,1%iger Zitronensäure noch detektiert werden konnte. Lediglich die Erosion mit der höheren Zitronensäurekonzentration von 1% hinterliess eine vollständig entfernte oder zumindest massiv beschädigte Basalschicht mit häufigen Kontinuitätsunterbrechungen. Analog zu den Befunden der vorliegenden Studie stellte Fiebiger (2005) einen vollständigen Verlust der Pellikel nach Erosion mit 1%iger Zitronensäure fest, wobei die Bildungszeit und Lokalisation der Prüfkörper keine Rolle spielten. Hannig und Balz (2001) konnten hingegen nach fünfminütiger Erosion mit 1%iger Zitronensäure unter statischen Bedingungen noch residuale Strukturen einer 24-Stunden-Pellikel im TEM auffinden.

Die kontinuierliche Auflösung der Pellikel wird als Hauptfaktor für die säureprotektiven Effekte auf die Schmelzoberfläche angesehen (Balz, 1999), während ältere Hypothesen eher die semipermeablen Eigenschaften der Pellikel als Diffusionsbarriere als Erklärung heranzogen (Zahradnik et al., 1976). Auch Nekrashevych et al. (2004) bescheinigen der Pellikelschicht nach rasterelektronenmikroskopischen Analysen eine gewisse Resistenz gegen erosive Einflüsse, die jedoch limitiert wird durch Säurekonzentration und Säureeinwirkzeit.

Weiterhin konnte mit den aktuellen Untersuchungsergebnissen erneut gezeigt werden, dass die alleinige Anwendung einer handelsüblichen Zahnbürste keine vollständige Entfernung der

Pellikelschicht bewirken kann. Zu ähnlichen Schlussfolgerungen gelangt Hannig (2002). So waren auf sämtlichen Ultradünnschnitten der nicht erodierten Kontrollproben der beiden längeren Bildungszeiträume die charakteristischen Auflagerungen nachweisbar. Die von Hannig (1999) protokollierten Werte von bis zu 1,2µm nach 24 Stunden Bildungszeit auf bukkaler Seite wurden aufgrund der notwendigen Reinigung allerdings nicht vorgefunden. Beim Transfer auf klinisch-praktische Überlegungen muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Prüfkörper ohne Zugabe von Zahnpasta (Hannig und Bößmann, 1988) und mit reduzierter Intensität gereinigt wurden.

5.3 Schlussfolgerungen und klinischer Bezug

Ausgehend von den qualitativen Untersuchungsergebnissen vermag die in situ gebildete Pellikel Säureangriffe auf die Zahnschmelzoberfläche in gewissem Umfang zu inhibieren. Die beginnende mikromorphologische Zerstörung der Schmelzoberfläche konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen jedoch nicht vollständig verhindert werden. Dies belegen die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in eindeutiger Weise. Die Pellikel sämtlicher untersuchter Bildungszeiträume kann demzufolge also keinen umfassenden Schutz der Schmelzoberfläche vor Säureangriffen gewährleisten.

Unter den gewählten experimentellen Bedingungen unterscheiden sich die säureprotektiven Eigenschaften der zwei, sechs, zwölf und 24 Stunden alten In-situ-Pellikel nicht signifikant. Zu diesem Ergebnis kommen sowohl die Bestimmung der durch die Erosion freigesetzten Calciumionen als auch die Differenzmessungen der oberflächlichen Mikrohärtigkeit vor und nach Säureexposition.

Es kann demzufolge konstatiert werden, dass eine 2-Stunden-Pellikel den Zahnschmelz vor einminütiger Erosion mit 0,1%iger und 1%iger Zitronensäure ebenso suffizient zu schützen vermag wie eine über 24 Stunden gebildete Pellikelschicht.

Die intraorale Positionierung hatte in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls keinen messbaren Einfluss auf das säureprotektive Potential der Pellikel. Obwohl transmissionselektronenmikroskopisch ein deutlicher ultrastruktureller Unterschied zwischen bukkaler und palatinaler Pellikel festgestellt wurde, konnten dementsprechende Unterschiede in den quantitativen Messungen zur Säureprotektion nicht nachgewiesen werden. Die im TEM vornehmlich bei den bukkalen Kontrollproben zu beobachtende sekundäre Schicht granulärer und globulärer Auflagerungen scheint sich also auf die säureprotektive Potenz der Pellikel geringfügiger aus-

zuwirken als die elektronendichte Basalschicht, die erst bei massiven erosiven Attacken von der Zahnschmelzoberfläche abgelöst wurde.

Anders als es frühere In-vitro-Ergebnisse vermuten liessen, scheinen Maturationsprozesse der Pellikel im Hinblick auf deren säureprotektives Potential in der Tat eine stark untergeordnete Rolle zu spielen. Damit befindet sich die vorliegende Untersuchung in Konformität mit mehreren aktuellen In-situ-Studien (Fiebiger, 2005; Hannig et al., 2004 und 2003; Hannig und Balz, 2001).

In Anbetracht der Tatsache, dass die Bedeutung der Pellikelbildungszeit in der Vergangenheit tendenziell überbewertet wurde, sollten diese Erkenntnisse weiterhin Einzug in prophylaktische Überlegungen zum Schutz des Zahnschmelzes vor erosiven Angriffen halten.

6 Literaturverzeichnis

1. Addy M, Shellis RP (2006) Interaction between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. *Monogr Oral Sci* 20:17-31
2. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM, Milosevic A (1999) Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. *J Dent Res* 78:1821-1828
3. Armstrong WG, Hayward AF (1968) Acquired organic integuments of human enamel. A comparison of analytical studies with optical, phase-contrast and electron microscope examinations. *Caries Res* 2:294-305
4. Attin T, Koidl U, Buchalla W, Schaller HG, Kielbassa AM, Hellwig E (1997) Correlation of microhardness and wear in differently eroded bovine dental enamel. *Arch Oral Biol* 42:243-250
5. Balz M (1999) Elektronenmikroskopische Untersuchung zur säureprotektiven Wirkung der In-vivo-Pellicel. Zahnmed. Diss., Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
6. Bashir E, Ekberg O, Lagerlöf F (1995) Salivary clearance of citric acid after an oral rinse. *J Dent* 23:209-212
7. Berg IC, Rutland MW, Arnebrant T (2003) Lubricating properties of the initial salivary pellicle – an AFM study. *Biofouling* 19:365-369
8. Berthold P (1979) Formation of salivary coating and dental plaque on two different supporting materials. *J Periodontol* 50:397-405
9. Blumenauer H (1989) Werkstoffprüfung. VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig

10. Bundesinstitut für Risikobewertung (2004) Hohe Gehalte an Zitronensäure in Süßwaren und Getränken erhöhen das Risiko für Zahnschäden – Aktualisierte Stellungnahme Nr. 006/2005
11. Buonocore MG (1955) A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res* 34:849
12. Centerwall BS, Armstrong CW, Funkhouser LS, Elzay RP (1986) Erosion of dental enamel among swimmers at a gas-chlorinated swimming pool. *Am J Epidemiol* 123:641-647
13. Cheung A, Zid Z, Hunt D, McIntyre J (2005) The potential for dental plaque to protect against erosion using an in vivo-in vitro model – a pilot study. *Aust Dent J* 50:228-234
14. Chikte UM, Naidoo S, Kolze TJ, Grobler SR (2005) Patterns of tooth surface loss among winemakers. *SADJ* 60:370-374
15. Dawes C, Jenkins GN, Tonge CH (1963) The nomenclature of the integuments of the enamel surface of teeth. *Br Dent J* 115:65-68
16. Deimling D, Breschi L, Hoth-Hannig W, Ruggeri A, Hannig C, Nekrashevych Y, Prati C, Hannig M (2004) Electron microscopic detection of salivary alpha-amylase in the pellicle formed in situ. *Eur J Oral Sci* 112:503-509
17. Deimling D, Hannig C, Hoth-Hannig W, Schmitz P, Schulte-Mönting J, Hannig M (2007) Non-destructive visualisation of protective proteins in the in situ pellicle. *Clin Oral Investig* 11:211-216
18. Deutsches Institut für Normung e.V. (1996) Universalhärteprüfung Teil 1: Prüfverfahren. DIN 50359-1
19. Deutsches Institut für Normung e.V. (2006) Metallische Werkstoffe – Härteprüfung nach Vickers – Teil 1: Prüfverfahren. EN ISO 6507-1:2005

20. Donlan RM (2001) Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis* 7:277-281
21. Echterhoff B, Nekrashevych Y, Hannig M (2004) Einfluss unterschiedlicher Nahrungsmittel auf das protektive Potential einer in situ gebildeten Pellicel. 18. DGZMK/BZÄK/Dentsply Förderpreis, Stuttgart, 02.10.2004
22. Eggen KH, Rölla G (1982) Gel infiltration, ion exchange chromatography and chemical analysis of macromolecules in acquired enamel pellicle (2-hour-pellicle). *Scand J Dent Res* 90:182-188
23. Eggen KH, Rölla G (1983) Further studies on the composition of the acquired enamel pellicle. *Scand J Dent Res* 91:439-446
24. Eichner K, Kappert HF (2000) Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung, Band 1 Grundlagen und ihre Verarbeitung. Thieme, Stuttgart New York
25. Eisenburger M, Addy M (2001) Evaluation of pH and erosion time on demineralisation. *Clin Oral Investig* 5:108-111
26. Eisenburger M, Addy M (2003) Influence of liquid temperature and flow rate on enamel erosion and surface softening. *J Oral Rehabil* 30:1076-1080
27. Eisenburger M, Shellis RP, Addy M (2003) Comparative study of wear of enamel induced by alternating and simultaneous combinations of abrasion and erosion in vitro. *Caries Res* 37:450-455
28. Eisenburger M, Shellis RP, Addy M (2004) Scanning electron microscopy of softened enamel. *Caries Res* 38:67-74
29. Elder MJ, Stapleton F, Evans E, Dart JK (1995) Biofilm-related infections in ophthalmology. *Eye* 9:102-109

30. Esser M, Tinschert J, Marx R (1998) Materialkennwerte der Zahnhartsubstanz des Rindes im Vergleich zur humanen Zahnhartsubstanz. *Dtsch Zahnärztl Z* 53:713-717
31. Featherstone JD, Mellberg JR (1981) Relative rates of progress of articial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. *Caries Res* 15:109-114
32. Featherstone JD, Behrmann JM, Bell JE (1993) Effect of whole saliva components on enamel demineralization in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:357-362
33. Featherstone JD, Lussi A (2006) Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci* 20:66-76
34. Fiebiger M (2005) Untersuchung zur säureprotektiven Wirkung der in situ gebildeten Kurzzeit-Pellikel. *Zahnmed. Diss., Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br.*
35. Finke M, Parker DM, Jandt KD (2002) Influence of soft drinks on the thickness and morphology of the in situ acquired pellicle layer on enamel. *J Colloid Interface Sci* 251:263-70
36. Frentzen M (1982) Über die immunologische Struktur des Zahnoberhäutchens unter besonderer Berücksichtigung von Umwandlungsprozessen bei bakterieller Besiedelung. *Dtsch Zahnärztl Z* 37:381-383
37. Ganss C, Klimek J, Schwarz N (2000) A comparative profilometric in vitro study of the susceptibility of polished and natural human enamel and dentine surfaces to erosive demineralization. *Arch Oral Biol* 45:897-902
38. Ganss C, Schlechtriemen M, Klimek J (1999) Dental erosions in subjects living on a raw food diet. *Caries Res* 33:74-80
39. Grando LJ, Tames DR, Cardoso AC, Gabilan NH (1996) In vitro study of enamel erosion caused by soft drinks and lemon juice in deciduous teeth analysed by stereomicroscopy and scanning electron microscopy. *Caries Res* 30:373-378

40. Gregg T, Mace S, West NX, Addy M (2004) A study in vitro of the abrasive effect of the tongue on enamel and dentine softened by acid erosion. *Caries Res* 38:557-560
41. Grenby TH (1996) Methods of assessing erosion and erosive potential. *Eur J Oral Sci* 104:207-214
42. Grobler TH, Senekal PJC, Kotzé TJ (1989) The degree of enamel erosion by five different kinds of fruit. *Clin Prev Dent* 11:23-28
43. Hannig C, Hoch J, Becker K, Hannig M, Attin T (2005) Lysozyme activity in the initially formed in situ pellicle. *Arch Oral Biol* 50:821-828
44. Hannig C, Wasser M, Becker K, Hannig M, Huber K, Attin T (2006) Influence of different restorative materials on lysozyme and amylase activity of the salivary pellicle in situ. *J Biomed Mater Res A* 78:755-761
45. Hannig M, Bößmann K (1988) Die Abriebfestigkeit des exogenen Zahnoberhäutchens bei der Zahnreinigung mit Zahnbürste und Zahnpaste. *Oralprophylaxe* 10:3-10
46. Hannig M (1989) Pellicula dentis (I) Ultrastrukturelle Vielfalt als Ausdruck komplexer Bildung und Reifung. *Quintessenz* 40:1319-1327
47. Hannig M, Albers HK (1993) Die erosive Wirkung von Acetylsalicylsäure an Zahnschmelz und Dentin in vivo. *Dtsch Zahnärztl Z* 48:289-302
48. Hannig M (1994a) Bildung, Funktion und Bedeutung der Pellikel. I. Biochemische, bakteriologische und strukturelle Aspekte. *Oralprophylaxe* 16:39-46,
49. Hannig M (1994b) Bildung, Funktion und Bedeutung der Pellikel. II. Auswirkung zahnärztlicher Maßnahmen und dentaler Materialien auf die Pellikelbildung. *Oralprophylaxe* 16: 102-105

50. Hannig M (1998) Elektronenmikroskopische Untersuchung der initialen Bioadhäsionsprozesse an Festkörperoberflächen in der Mundhöhle; eine klinisch-experimentelle Studie. Quintessenz, Berlin
51. Hannig M (1999) Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Invest* 3:88-95
52. Hannig M, Balz M (2001) Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. *Caries Res* 35:142-148
53. Hannig M (2002) The protective nature of the salivary pellicle. *International Dental Journal* 52:417-423
54. Hannig M, Hess NJ, Hoth-Hannig W, De Vrese M (2003) Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralisation – an in situ pilot study. *Clin Oral Investig* 7:158-161
55. Hannig M, Döbert A, Stigler R, Müller U, Prokhorova SA (2004a) Initial salivary pellicle formation on solid substrates studied by AFM. *J Nanosci Nanotechnol* 4:532-538
56. Hannig M, Fiebiger M, Güntzer M, Döbert A, Zimehl R, Nekrashevych Y (2004b) Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. *Arch Oral Biol* 49:903-910
57. Hannig M, Khanafer AK, Hoth-Hannig W, Al-Marrawi F, Acil Y (2005) Transmission electron microscopy comparison of methods for collecting in situ formed enamel pellicle. *Clin Oral Investig* 9:30-37
58. Hannig M, Dounis E, Henning T, Apitz N, Stösser L (2006) Does irradiation affect the protein composition of the saliva? *Clin Oral Investig* 10:61-65
59. Hannig M, Joiner A (2006) The Structure, Function and Properties of the Acquired Pellicle. In: Duckworth RM (ed) *The Teeth and Their Environment*. Monogr Oral Sci, Karger, Basel, pp 29-64

60. Hannig M, Hannig C (2007) Der initiale orale Biofilm – pathogen oder protektiv? *Oralprophylaxe & Kinderzahnheilkunde* 29: 73-82
61. Hara AT, Lussi A, Zero DT (2006a) Biological Factors. *Monogr Oral Sci* 20:88-99
62. Hara AT, Ando M, Gonzalez-Cabezas C, Cury JA, Serra MC, Zero DT (2006b) Protective Effect of the Dental Pellicle against Erosive Challenges in situ. *J Dent Res* 85:612-616
63. Heinrich UR (1994) Die Renaissance der Elektronenmikroskopie – Transmissions-Elektronenmikroskop mit Energiefilter für biologische Proben. *Biologie in unserer Zeit* 2:91-95
64. Hellwig E, Klimek J, Attin T (2003) Einführung in die Zahnerhaltung. Urban&Fischer, München Jena
65. Hooper S, West NX, Pickles MJ, Joiner A, Newcombe RG, Addy M (2003) Investigation of erosion and abrasion on enamel and dentine: a model in situ using toothpastes of different abrasivity. *J Clin Periodontol* 30:802-808
66. Hooper SM, Hughes JA, Newcombe FRG, Addy M, West NX (2005) A methodology for testing the erosive potential of sport drinks. *J Dent* 33:343-348
67. Hove LH, Young A, Tveit AB (2007) An in vitro study on the effect of TiF(4) treatment against erosion by hydrochloric acid on pellicle-covered enamel. *Caries Res* 41:80-84
68. Hughes JA, West NX, Parker DM, Newcombe RG, Addy M (1999) Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink in vitro and in situ. *J Dent* 27:285-289

69. Hughes JA, West NX, Parker DM, van den Braak MH, Addy M (2000) Effects of pH and concentration of citric, malic and lactic acids on enamel, in vitro. *J Dent* 28:147-152
70. Jenkins GN (1963) Theories on the mode of action of fluoride in reducing dental decay. *J Dent Res* 42:444-452
71. Jenkins GN (1978) *The physiology and biochemistry of the mouth*, Kapitel 4: Saliva. Blackwell Scientific Publ., Oxford
72. Joiner A, Muller D, Elofsson UM, Malmsten M, Arnerbrant T (2003) Adsorption from black tea and red wine onto in vitro salivary pellicles studied by ellipsometry. *Eur J Oral Sci* 111:417-422
73. Joiner A, Elofsson UM, Arnebrant T (2006) Adsorption of chlorhexidine and black tea onto in vitro salivary pellicles, as studied by ellipsometry. *Eur J Oral Sci* 114:337-342
74. Kautsky MB, Featherstone JDB (1993) Effects of salivary components on dissolution rates of carbonated apatites. *Caries Res* 27:373-377
75. Kho HS, Vacca Smith AM, Koo H, Scott-Anne K, Bowen WH (2005) Interactions of *Streptococcus mutans* glucosyltransferase B with lysozyme in solution and on the surface of hydroxyapatite. *Caries Res* 39:411-416
76. Knevel RJ, van der Woord JE (2007) Tooth Wear. *Int J Dent Hyg* 5:195-196
77. Koo H, Nino de Guzman P, Schobel BD, Vacca Smith AV, Bowen WH (2006) Influence of cranberry juice on glucan-mediated processes involved in *Streptococcus mutans* biofilm development. *Caries Res* 40:20-27
78. Kopec LK, Bowen WH (1995) Adherence of microorganisms to rat salivary pellicles. *Caries Res* 29:507-512

79. Lange K, Herold M, Scheideler L, Geis-Gerstorfer J, Wendel HP, Gauglitz G (2004) Investigation of initial pellicle formation on modified titanium dioxide (TiO₂) surfaces by reflectometric interference spectroscopy (RIFS) in a model system. *Dent Mater* 20:814-822
80. Lee YK, Powers JM (2006) Influence of salivary organic substances on the discoloration of esthetic dental materials - a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 76:397-402
81. Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG (2000) Saliva and Dental Pellicle – A Review. *Adv Dent Res* 14:22-28
82. Lehmann KM, Hellwig E (1998) Einführung in die restaurative Zahnheilkunde. Urban&Schwarzenberg, München Wien Baltimore
83. Lie T (1975) Pellicle formation on hydroxyapatite splints attached to the human dentition: morphologic confirmation of the concept of adsorption. *Arch Oral Biol* 20:739-742
84. Lie T (1977) Scanning and transmission electron study of pellicle morphogenesis. *Scand J Dent Res* 85:217-231
85. Lindh L (2002) On the adsorption behaviour of saliva and purified salivary proteins at solid/liquid interfaces. *Swed Dent J Suppl* 152:1-57
86. Linkosalo E, Markkanen H (1985) Dental erosions in relation to lactovegetarian diet. *Scand J Dent Res* 93:436-441
87. Linkosalo E, Markkanen H, Syrjänen S (1985) Effects of a lacto-ovo-vegetarian diet on the free amino acid composition of wax-stimulated whole human saliva. *J Nutr* 115:588-592
88. Lussi A, Jaeggi T, Jaeggi-Schärer S (1995) Prediction of the erosive potential of some beverages. *Caries Res* 29:349-354

89. Lussi A, Jaeggi T, Zero D (2004) The Role of Diet in the Aetiology of Dental Erosion. *Caries Res* 38:34-44
90. Lussi A, Hellwig E (2006) Risk assesment and preventive measures. *Monogr Oral Sci* 20:190-199
91. Lussi A, Schaffner M, Jaeggi T (2007) Erosionen: Befund, Diagnose, Risikofaktoren, Prävention. *Zahnärztl Mitt* 3:38-46
92. Malcolm D, Paul E (1961) Erosion of the teeth due to sulphuric acid in the battery industry. *Br J Ind Med* 18:63-69
93. Maupomé G, Aguilar-Avila M, Medrano-Ugalde H, Borges-Yáñez A (1999) In vitro quantitative microhardness assessment of enamel with early salivary pellicles after exposure to an eroding cola drink. *Caries Res* 33:140-147
94. Meckel AH (1965) The formation and properties of organic films on teeth. *Arch Oral Biol* 10:585-597
95. Meurmann JH, Frank RM (1991) Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res* 25:1-6
96. Meurmann JH, Murtomaa H (1986) Effect of effervescent vitamin C preparations on bovine teeth and on some clinical and salivary parameters in man. *Scand J Dent Res* 94:491-499
97. Mollenhauer HH, Crang RFE, Klamparens KL (eds) (1988) Artifacts caused by dehydration and epoxy embedding in TEM. *Biological Electron Microscopy*. Plenum Press NY, London
98. Müller HP (2001) *Parodontologie*. Thieme, Stuttgart New York

99. Nakamichi J, Iwaku M, Fusayana T (1983) Bovine Teeth as Possible Substitutes in the Adhesion Test. *J Dent Res* 62:1076
100. Nekrashevych Y (2001) Quantitative analytische und mikromorphologische Bewertung der Erosion des Zahnschmelzes und der protektiven Wirkung der Pellicle. Eine In-vitro-Studie. Zahnmed. Diss., Friedrich-Schiller-Universität Jena
101. Nekrashevych Y, Stösser L (2003) Protective Influence of Experimentally Formed Salivary Pellicle on Enamel Erosion. *Caries Research* 37:225-231
102. Nekrashevych Y, Hannig M, Stösser L (2004) Assessment of Enamel Erosion and Protective Effect of Salivary Pellicle by Surface Roughness Analysis and Scanning Electron Microscopy. *Oral Health Prev Dent* 2:5-11
103. Newman MG, van Winkelhoff AJ (2001) Antibiotic and Antimicrobial Use in Dental Practice. Quintessence, Chicago Berlin London Tokyo Paris Barcelona Sao Paulo Moscow Prague Warsaw
104. Nieuw Amerongen AV, Oderkerk CH, Driessen AA (1987) Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. *Caries Res* 21:297-309
105. Nyvad B, Fejerskov O (1987) Transmission electron microscopy of early microbial colonization of human dental enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 95:297-307
106. Oliver WC, Pharr GM (1992) An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J Mater Res* 7:1564-1583
107. Padera RF (2006) Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm. *Cardiovasc Pathol* 15:2645-270

108. Passerini L, Lam K, Costerton JW, King EG (1992) Biofilms on indwelling vascular catheters. *Crit Care Med* 20:665-673
109. Putz B, Attin T (2002) Die Prävalenz von Erosionen. *Dtsch Zahnärztl Z* 57:637-643
110. Rytomaa I, Meurmann JH, Koskinen J, Laakso T, Gharazi L, Turunen R (1988) In vitro erosion of bovine enamel caused by acidic drinks and other foodstuffs. *Scand J Dent Res* 96:324-333
111. Rykke M, Sönju T (1991) Amino acid composition of acquired enamel pellicle collected in vivo after 2 hours and after 24 hours. *Scand J Dent Res* 99:463-469
112. Scheie AA, Eggen KH, Röllä G (1987) Glycosyltransferase activity in human in vivo formed enamel pellicle and in whole saliva. *Scand J Dent Res* 95:212-215
113. Scheutzel P (1996) Etiology of dental erosion – intrinsic factors. *Eur J Oral Sci* 104:178-190
114. Schiffner U (1997) Der Einfluß von Speichelproteinen auf die Demineralisation von Zahnschmelz – Untersuchungen in einer künstlichen Mundhöhle. Hanser, München Wien
115. Schinkel H (1984) Bestimmung von Calcium, Magnesium, Strontium, Kalium, Natrium, Lithium, Eisen, Mangan, Chrom, Nickel, Kupfer, Cobalt, Zink und Cadmium. *Fresenius Z Anal Chem* 317:10-26
116. Schüle H (1961) Chemische Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften des Schmelzoberhäutchens. *Arch Oral Biol* 4:40-49
117. Schüle H (1964) Histochemische und papierchromatographische Untersuchungen über die Kohlenhydratkomponente des Schmelzoberhäutchens. *Adv Fluor Res Dent Caries Prev* 2:155-165

118. Schüpbach P, Nesser JR, Golliard M, Rouvet M, Guggenheim B (1996) Incorporation of caseinoglycomacropeptide and caseinophosphopeptide into the salivary pellicle inhibits adherence of mutans streptococci. *J Dent Res* 75:1779-1788
119. Sharma PK, Gibcus MJ, van der Mei HC, Busscher HJ (2005) Microbubble-induced detachment of coadhering oral bacteria from salivary pellicles. *Eur J Oral Sci* 113:326-332
120. Shellis RP, Finke M, Eisenburger M, Parker DM, Addy M (2005) Relationship between enamel erosion and liquid flow rate. *Eur J Oral Sci* 113:232-238
121. Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG (2007b) Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. *J Proteome Res* 6:2152-2160
122. Skjorland KK, Rykke M, Sonju T (1995) Rate of pellicle formation in vivo. *Acta Odontol Scand* 53:358-362
123. Slomiany BL, Murty VL, Zdebska E, Slomiany A, Gwozdziński K, Mandel ID (1986) Tooth surface-pellicle lipids and their role in the protection of dental enamel against lactic-acid diffusion in man. *Arch Oral Biol* 31:187-191
124. Slomiany BL, Murty VL, Mandel ID, Sengupta S, Slomiany A (1990) Effect of lipids on the lactic acid retardation capacity of tooth enamel and cementum pellicles formed in vitro from saliva of caries-resistant and caries-susceptible human adults. *Arch Oral Biol* 35:175-180
125. Sönju T, Rölla G (1973) Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. Rate of formation and amino acid analysis. *Caries Res* 7:30-38
126. Szewzyk U, Szewzyk R (2003) Biofilme – die etwas andere Lebensweise. *Biospektrum* 9:253-255

127. Tinanoff N, Glick PL, Weber DF (1976) Ultrastructure of organic films on the enamel surface. *Caries Res* 10:19-32
128. Vacca Smith AM, Bowen WH (2000a) The effects of milk and kappa-casein on salivary pellicle formed on hydroxyapatite discs in situ. *Caries Res* 34:88-93
129. Vacca Smith AM, Bowen WH (2000b) In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Arch Oral Biol* 45:277-291
130. Vitkov L, Hermann A, Krautgartner WD, Hermann M, Fuchs K, Klappacher M, Hannig M (2005) Chlorhexidine-induced ultrastructural alterations in oral biofilm. *Microsc Res Tech* 68:85-89
131. West NX, Maxwell A, Hughes JA, Parker DM, Newcombe RG, Addy M (1998) A method to measure clinical erosion: the effect of orange juice consumption on erosion of enamel. *J Dent* 26:329-335
132. Wetton S, Hughes J, West N, Addy M (2006) Exposure time of enamel and dentine to saliva for protection against erosion: a study in vitro. *Caries Res* 40: 213-217
133. Widobo G, Wilson R, Bartlett D (2005) Oral clearance of an acidic drink in patients with erosive tooth wear compared with that in control subjects. *Int J Prosthodont* 18:323-327
134. Wiegand A, Attin T (2006) Dentale Erosion – präventive und therapeutische Empfehlungen für Risikopatienten. *Quintessenz* 57:1157-1164
135. Yao Y, Grogan J, Zehnder M, Lendenmann U, Nam B, Wu Z, Costello CE, Oppenheim FG (2001) Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. *Arch Oral Biol* 46:293-303
136. Yin A, Margolis HC, Yao Y, Grogan J, Oppenheim FG (2006) Multi-component adsorption model for pellicle formation: the influence of salivary proteins and non-

- salivary phosphoproteins on the binding of histain 5 onto hydroxyapatite. Arch Oral Biol 51:102-110
137. Young W, Khan F, Brand R, Savage N, Razek AA, Huang Q (2001) Syndromes with salivary dysfunction predispose to tooth wear: case reports of congenital dysfunction of major salivary glands, Prader-Willi, congenital rubella, and Sjogren's syndromes. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 92:38-48
138. Young W, Khan F (2002) Sites of dental erosion are saliva-dependent. J Oral Rehabil 29:35-43
139. Zahradnik RT, Moreno EC, Burke EJ (1976) Effect of salivary pellicle on enamel sub-surface demineralization in vitro. J Dent Res 55:664-670
140. Zahradnik RT, Propas D, Moreno EC (1978) Effect of salivary pellicle formation time on in vitro attachment and demineralization by Streptococcus mutans. J Dent Res 57:1036-1042
141. Zeeck A, Eick S, Krone B, Schröder K (2000) Chemie für Mediziner. Urban&Fischer, München Jena
142. Zero DT, Lussi A (2005) Erosion - chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. Int Dent J 55:285-290

7 Danksagung

Aus Datenschutzgründen wird diese Seite nicht dargestellt.

8 Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen wird diese Seite nicht dargestellt.