

Aus der Abteilung Präventive Zahnmedizin, Parodontologie und Kariologie  
(komm. Leiter: Prof. Dr. med. dent. M. Hülsmann)  
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Einfluss der *In-situ*-Pellikel auf die erosive Kalzium-Freisetzung  
aus Zahnschmelz**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Nico Andreas Häusler

aus

Wolfenbüttel

Göttingen 2011

**Dekan:** Prof. Dr. med. C. Frömmel

**I.     Berichterstatter:** Prof. Dr. med. dent. M. Hülsmann

**II.    Berichterstatter/in:**

**III.   Berichterstatter/in:**

**Tag der mündlichen Prüfung:** 17.01.2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	<b>2</b>
2.1	Definition, Ätiologie und Prävalenz von Erosionen.....	2
2.2	Prophylaxe von Erosionen.....	6
2.3	Methoden zur Untersuchung erosiver Effekte.....	11
2.4	Aufbau und Zusammensetzung der Pellikel.....	14
2.5	Funktion der Pellikel .....	18
2.6	Ziele der Studie.....	21
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
3.1	Versuchsplanung .....	23
3.2	Geräte und Instrumente .....	25
3.3	Sonstiges Verbrauchsmaterial .....	25
3.4	Chemikalien und Reagenzien .....	25
3.5	Schmelz-Proben.....	25
3.6	Säuren .....	26
3.7	Grundprinzip des photometrischen Kalzium-Nachweises .....	27
3.8	Eingesetzte Inkubationsvolumina und Testvolumina.....	28
3.9	Bestimmung der erodierten Kalzium-Konzentration .....	29
3.10	Berechnung des kumulativen erosiven Kalzium-Abtrages .....	29
3.11	Berechnung des Kalzium-Abtrages pro Minute .....	32
3.12	Probanden .....	32
3.13	Herstellung der Probenträger.....	33
3.14	Bildung der <i>In-situ</i> -Pellikel .....	33

3.15	Statistische Auswertung .....	34
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
4.1	Kinetik der Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure unterschiedlicher Konzentration ohne <i>In-situ</i> -Pellikel .....	35
4.2	Ergebnisse der Pilot-Versuche: Kalzium-Freisetzung aus der Pellikel, aus dem Silikon-Befestigungsmaterial und aus voll-versiegelten Schmelzproben .....	37
4.3	Kinetik der Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure unterschiedlicher Konzentration mit <i>In-situ</i> -Pellikel .....	38
4.4	Einfluss des oralen Expositionsortes auf die protektiven Eigenschaften der <i>In-situ</i> - Pellikel.....	40
4.5	Vergleich der Kalzium-Freisetzung aus pellikelfreien und pellikelbedeckten Schmelzproben unter dem Einfluss von Salzsäure unterschiedlicher Konzentration ..	42
4.5.1	Vergleich der Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure zwischen pellikelfreien Schmelzproben und pellikelbedeckten Schmelzproben bei pH 2,0 .....	42
4.5.2	Vergleich der Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure zwischen pellikelfreien Schmelzproben und pellikelbedeckten Schmelzproben bei pH 2,3 .....	44
4.5.3	Vergleich der Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure zwischen pellikelfreien Schmelzproben und pellikelbedeckten Schmelzproben bei pH 2,6 .....	45
4.6	Kalzium-Freisetzung pro Minute aus pellikelfreien und pellikelbedeckten Schmelzproben unter dem Einfluss von Salzsäure unterschiedlicher Konzentration .	47
4.7	Kumulative Kalzium-Freisetzung aus Schmelz: Statistische Auswertung ausgewählter Säureexpositionszeiten .....	52
4.7.1	Statistische Auswertung der kumulativen Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure bei einer Säureexpositionszeit von 15 Sekunden .....	53

4.7.2	Statistische Auswertung der kumulativen Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure bei einer Säureexpositionszeit von 60 Sekunden .....	55
4.7.3	Statistische Auswertung der kumulativen Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure bei einer Säureexpositionszeit von 120 Sekunden .....	58
4.7.4	Statistische Auswertung der kumulativen Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure bei einer Säureexpositionszeit von 300 Sekunden .....	61
4.8	Kinetik der Kalzium-Freisetzung aus Schmelz und Dentin unter dem Einfluss von Salzsäure mit pH 2,3 aus pellicelfreien und pellicelbedeckten Proben .....	62
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>Datenanhang .....</b>	<b>94</b>
8.1	Liste der Geräte und Instrumente .....	94
8.2	Liste des sonstigen Verbrauchsmaterials.....	94
8.3	Liste der Chemikalien und Reagenzien.....	95
8.4	Abb. 21 - 33, Tab. 7 - 18 .....	96

# 1 Einleitung

Der Zahnhartsubstanzverlust durch Einwirkung von Säuren ohne die Beteiligung kariogener Mikroorganismen wird als Erosion bezeichnet (Eccles 1979). Erosionen werden ausgelöst durch die Einwirkung exogener (in Lebensmitteln, Getränken oder Medikamenten) oder endogener Säuren (Magensäure) auf den Schmelz oder das Dentin (Meurman und Ten Cate 1996). Epidemiologische Studien zeigen eine zunehmende Prävalenz dentaler Erosionen innerhalb aller Bevölkerungsschichten und Altersgruppen (Jaeggi und Lussi 2006). Daher gewinnt die Erforschung und Prophylaxe von Erosionen zunehmend an Bedeutung. Der Speichel bietet durch seinen hohen Gehalt an Kalzium und Phosphat bzw. durch seine Spül-, Puffer- und Verdünnungsfunktion einen natürlichen Schutz gegenüber Säureangriffen (Dawes 2008). Darüber hinaus bildet er die Pellikel aus, die sich innerhalb von Sekunden auf allen oral exponierten Oberflächen durch Adsorption von Speichelproteinen formiert (Hannig M und Joiner 2006). Die Pellikel bietet einen gewissen anti-erosiven Schutz, der in vielen *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien nachgewiesen wurde und mit Zunahme der Pellikelbildungszeit effektiver wird (Zahradnik et al. 1976, Hannig M und Balz 1999, Nekrashevych und Stösser 2003, Wetton et al. 2007, Hannig C et al. 2009a). Auch eine gewisse Abhängigkeit des anti-erosiven Schutzes vom oralen Expositionsort konnte nachgewiesen werden (Amaechi et al. 1999, Hannig M und Balz 2001). In vielen Pellikel-Studien wurden sehr lange Pellikelbildungs- und Säureinkubationszeiten untersucht, die jedoch für die Simulation der *In-situ*-Bedingungen wenig relevant sind. Hannig M et al. (2003) und Hannig C et al. (2009a) konnten zeigen, dass die Pellikel bereits in den ersten Minuten des Säurekontakts ausgedünnt und somit der protektive Effekt schnell reduziert wird. Eine fortlaufende Erosionsuntersuchung zur Erfassung der Kinetik initialer erosiver Effekte in Anwesenheit einer Pellikel wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Daher war das Ziel der vorliegenden Untersuchung, den anti-erosiven Effekt der *In-situ*-Pellikel mit einer Bildungszeit von 3, 30 und 120 min innerhalb der ersten Sekunden bis Minuten des Säurekontaktes zu evaluieren. Ferner wurde auch der Einfluss des oralen Expositionsortes auf die protektiven Eigenschaften der Pellikel untersucht. Mit einem hochsensitiven Verfahren wurde die Kalzium-Freisetzung aus pellikelbedeckten bovinen Schmelzproben bei Inkubation mit Salzsäure unterschiedlicher Konzentration *in vitro* bestimmt. Die pH-Werte wurden dabei konstant gehalten, um einen standardisierten Vergleich der unterschiedlichen Säurekonzentrationen zu gewährleisten.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Definition, Ätiologie und Prävalenz von Erosionen

Die dentale Erosion ist ein irreversibler Verlust von Zahnhartsubstanz, die durch chemische Prozesse ohne Beteiligung von Mikroorganismen ausgelöst wird (Eccles 1979, Imfeld 1996). Für die Entstehung von Erosionen sind Säuren der hauptsächliche ätiologische Faktor, die durch ihren niedrigen pH-Wert zu einer Entmineralisierung und Destruktion der Zahnhartsubstanzen führen (Lussi et al. 2004). Nach Meurman und Ten Cate (1996) beträgt der kritische pH-Wert 5,5, bei dessen Unterschreiten erosive Defekte an Zahnschmelz auftreten. Bei Karies wird die Absenkung des pH-Wertes indirekt durch Bakterien und ihre Stoffwechselprodukte in der Plaque hervorgerufen; demgegenüber kommt es bei Erosionen ausschließlich durch direkte Säureeinwirkung zur Schädigung der Zahnhartsubstanz. Mikroorganismen sind nicht beteiligt (Hickel 1989).

Erosionen gehören neben der Attrition und Abrasion zu den altersbedingten physiologischen Abnutzungsprozessen der Zahnhartsubstanzen. Durch die Entmineralisierung tritt eine signifikante Reduktion der Oberflächenhärte der Zahnhartsubstanz ein (Lussi et al. 1995, Maupomé et al. 1998). Bei entsprechend langer Einwirkzeit der sauren Noxen resultiert ein klinisch sichtbarer Defekt an der Zahnhartsubstanz. In einzelnen Fällen kommt es zu einem vollständigen Verlust der Zahnmorphologie und einer progredienten Reduktion der Kronenhöhe (Lussi et al. 2006).

Es wird zwischen extrinsischen und intrinsischen Ursachen für dentale Erosionen unterschieden (Zero 1996). Säureeinwirkungen, ausgelöst u.a. durch Ernährung, Medikamenteneinnahme, Umwelt, Beruf und Lebensstil, zählen zu den extrinsischen Ursachen (Zero 1996). Intrinsische Ursachen sind z.B. chronisches Erbrechen und Störungen der gastro-ösophagealen Funktion. Durch den Kontakt der Magensäure mit den Zähnen kommt es zu erosiven Veränderungen der Zahnhartsubstanz (Järvinen et al. 1988, Järvinen et al. 1991).

Bereits sehr frühe Studien konnten zeigen, dass Erosionen extrinsischer Ursache durch häufigen Konsum säurehaltiger Lebensmittel sowie saurer Getränke hervorgerufen werden (Bieri et al. 1946, Stafne und Lovestedt 1947, Eccles und Jenkins WG 1974). Die erosiven Defekte werden durch Säuren aus Fruchtsaftgetränken, Früchten, essighaltigen Lebensmitteln

und sauren Süßigkeiten hervorgerufen. Nach Zero (1996) ist die Ernährung in modernen, westlichen Gesellschaften als wichtigster Faktor für die Entstehung von Erosionen anzusehen. Die Arten der Säuren in Lebensmitteln und Getränken sind vielfältig. In Früchten und Gemüse kommen Zitronen- und Maleinsäure am häufigsten vor (West et al. 2001). In Erfrischungsgetränken, wie z.B. Softdrinks, werden vornehmlich Phosphor- und Zitronensäure nachgewiesen (West et al. 2000, West et al. 2001). Oxalsäure ist Bestandteil von Rhabarber, Weinsäure von Wein und Weintrauben. Maleinsäure kommt in Äpfeln und Apfelgetränken, Pflaumen sowie Pfirsichen vor (Wiktorsson et al. 1997, West et al. 2000).

Oft liegt der pH-Wert von säurehaltigen Getränken und Nahrungsmitteln deutlich unter 5 (West et al. 2000). Viele Getränke zeigen pH-Werte zwischen 2 und 3 (Lussi et al. 2002, Lussi et al. 2004).

Verschiedene Studien fanden heraus, dass die regelmäßige Aufnahme von Getränken oder Lebensmitteln mit niedrigem pH-Wert ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung von Erosionen darstellt. Järvinen et al. (1991) konnten zeigen, dass ein generelles Erosionsrisiko besteht, wenn Zitrusfrüchte mehr als zweimal pro Tag verzehrt oder Softdrinks täglich getrunken werden.

Auch der häufige Konsum von Wein führt zu einem erhöhten Erosionsrisiko. Rees und Griffiths (2002) untersuchten diverse Weißweine hinsichtlich ihres Erosionspotentials. Die Weine zeigten einen pH-Wert von 3,0 bis 4,0 und die meisten waren mindestens so erosiv wie Orangensaft (pH 3,7). Darüber hinaus konnten Lupi-Pegurier et al. (2003) in einer Untersuchung von Rotweinen zeigen, dass bereits nach 120 s Expositionszeit signifikante erosive Effekte an den Zähnen auftreten.

Meurman et al. (1987) und Rytömaa et al. (1988) haben nachgewiesen, dass von sauren Milchprodukten keine erosive Wirkung ausgeht. Milchprodukte wie Joghurt (pH-Wert von 4,2 bis 4,3) oder Buttermilch (pH-Wert 4,3 bis 4,4) sind zwar säurehaltig, rufen jedoch wegen ihres hohen Gehaltes an Kalzium und Phosphat keine Erosionen hervor.

Überdies sind saure Medikamente ein ätiologischer Faktor für die Entstehung von Erosionen. Neves et al. (2010) untersuchten 23 verschiedene Arzneimittel, wie Antihistaminika, Antitussiva oder Bronchodilatoren. Sie stellten fest, dass viele dieser Medikamente einen niedrigen pH-Wert aufweisen und somit ein erosives Potential besitzen.

Ferner können Vitamin-C-Präparate ursächlich für Erosionen sein. Alle Vitamin-C-Präparate sind potentiell erosiv, wenn sie in Kontakt mit den Zähnen kommen (Meurman und Murtomaa 1986). Ungepufferte Präparate mit Acetylsalicylsäure (z.B. Aspirin®), die gekaut

oder in Wasser gelöst eingenommen werden, rufen ebenfalls Erosionen hervor (Rogalla et al. 1992).

Sogar Mundhygieneprodukte können Erosionen verursachen. Pontefract et al. (2001) untersuchten Mundspülungen mit einem niedrigen pH-Wert in einer *In-situ*- und *In-vitro*-Studie auf ihre Erosivität und stellten fest, dass sie bei Langzeitanwendung erosive Zahnhartsubstanzverluste hervorrufen können.

Ein weiteres extrinsisches Risiko stellt die häufige Benutzung schlecht gewarteter Badeanlagen und Schwimmbäder dar. Ein zu hoher Chloreinsatz zur Keimreduktion verursacht einen niedrigen pH-Wert des Wassers. Regelmäßige Benutzer dieser Schwimmanlagen sind anfällig für die Ausbildung generalisierter Erosionen (Centerwall et al. 1986).

Erosionen können aber auch durch berufsbedingte Säureexposition hervorgerufen werden. Durch säurehaltige Dämpfe, wie z.B. in der Herstellung von Batterien oder in der Phosphat-Industrie, können Entmineralisierungen an den Zähnen auftreten (Tuominen M und Tuominen R 1991, Amin et al. 2001, Arowojolu 2001, Suyama et al. 2010).

Erosionen mit intrinsischer Ursache werden durch Magensäure ausgelöst (Bartlett 2006). Dabei gelangt Magensäure entweder durch Erbrechen oder Regurgitation (unwillkürliches Aufstoßen von Magensäure) in die Mundhöhle. Ursächlich hierfür sind oftmals psychogene Essstörungen wie Bulimie oder Anorexia nervosa (Järvinen et al. 1991), gastro-ösophagealer Reflux (GORD, gastro-oesophageal reflux disease) (Järvinen et al. 1988) oder chronischer Alkoholabusus (Smith BG und Robb 1989).

Magensäure weist einen pH-Wert von 1 bis 1,5 auf, der wesentlich niedriger ist als der kritische pH-Wert für Schmelz von 5,5, wie er von Meurman und Ten Cate (1996) angegeben wurde. Im Gegensatz zu sauren Getränken oder Nahrungsmitteln ist der pH-Wert von Magensaft niedriger und die Menge an titrierbarer Säure höher, so dass das Ausmaß dentaler Erosionen oftmals wesentlich größer ist (Bartlett 2006).

In einer Studie von Willershausen et al. (1990) wurden 52 Patienten mit Anorexia nervosa oder Bulimie untersucht. Sie zeigten gegenüber Kontrollgruppen mit normalem Essverhalten signifikant häufiger Schmelzerosionen. Dynesen et al. (2008) konnten nachweisen, dass bei Patienten mit Bulimie die Speichelfließrate auf Grund von Medikamenteneinnahmen reduziert war und sie signifikant häufiger an dentalen Erosionen litten als Kontrollprobanden. Eine Studie von Rytömaa et al. (1998) zeigte ebenfalls, dass die Erosionsinzidenz bei Patienten mit Bulimie im Gegensatz zu Kontrollgruppen gesunder Patienten höher ist.

Die Beziehungen zwischen erosiven Zahnhartsubstanzverlusten und gastro-ösophagealem Reflux wurde in vielen Studien an Erwachsenen und Kindern untersucht (Bartlett 2006, Alfaro et al. 2008, Pace et al. 2008). Järvinen et al. (1988) untersuchten Patienten mit GORD und diagnostizierten eine Verbindung zwischen GORD und der Entwicklung dentaler Erosionen. In einer Studie von Moazzez et al. (2004) wurden Patienten mit GORD untersucht; die Prävalenz von Erosionen bei an GORD erkrankten Patienten war höher als bei gesunden Kontrollgruppen. Die erkrankten Patienten zeigten signifikant häufiger palatinale, aber auch generalisierte Erosionen. Auch eine neuere Studie von Holbrook et al. (2009) dokumentierte die Assoziation zwischen dentalen Erosionen und GORD. Allerdings entstehen Reflux-assoziierte Erosionen erst, wenn der Reflux der Magensäure häufig auftritt und lange besteht (Järvinen et al. 1988). Mildere Formen dieser Erkrankung führen nicht zu Erosionen (Meurman et al. 1994).

Chronischer Alkoholabusus stellt ebenfalls einen ätiologischen Faktor für die Entstehung dentaler Erosionen dar. Regelmäßiger Alkoholkonsum kann in einer Gastritis und chronischem ösophagealem Reflux mit häufigem Erbrechen resultieren (Gottfried et al. 1978). In einer Studie von Robb und Smith (1990) wurden 37 Patienten untersucht, die an chronischem Alkoholabusus litten. Diese zeigten signifikant häufiger Zahnhartsubstanzschäden als Kontrollgruppen gleichen Alters oder Geschlechts. Die erosiv bedingten Zahnhartsubstanzveränderungen betrafen zu 40 % die Palatinalflächen der oberen Inzisivi, was auf häufiges Erbrechen zurückzuführen war.

In einer weiteren Studie diagnostizierten Dukic et al. (2010) bei 70 alkoholkranken Patienten signifikant häufiger Erosionen als bei gesunden Kontrollgruppen.

Studien zur Prävalenz dentaler Erosionen sind nur schwer vergleichbar, da Methoden und Ergebnisse epidemiologischer Studien stark voneinander abweichen. Gründe hierfür sind unterschiedliche Indizes zur Bewertung der erosiven Zahnschäden, inhomogene Testgruppen oder nicht vergleichbare geographische Lokalisationen. Ferner unterscheiden einige Studien nicht zwischen Abrasion, Attrition oder Erosion (Jaeggi und Lussi 2006).

In einer der ersten Prävalenzstudien zu Erosionen untersuchten Sognaes et al. (1972) 10.000 extrahierte Zähne. 18 % der Zähne zeigten Erosionen, untere Inzisivi waren am häufigsten betroffen. Eine Differenzierung nach Altersklassen bzw. Erosion, Attrition und Abrasion erfolgte nicht.

Bartlett et al. (1998) führten eine Studie zur Prävalenz von Erosionen bei 210 Kindern im Alter von 11 bis 14 Jahren durch. 57 % der Kinder wiesen Schmelzerosionen an mehr als zehn Zähnen auf, jedoch war eine Dentinbeteiligung nur selten. Am häufigsten waren die

oberen Inzisivi betroffen. Geschlechtsspezifische Unterschiede wurden in dieser Studie nicht beobachtet.

In einer weiteren Studie aus Großbritannien untersuchten Dugmore und Rock (2003) 1753 12-jährige Kinder auf Erosionen. Zwei Jahre später wurden 1308 dieser Kinder erneut untersucht. Im Alter von 12 Jahren wurden bei 56,3 % der Fälle Erosionen diagnostiziert, nach 2 weiteren Jahren bei 64,1 %. Bei 12,3 % der Kinder, die im Alter von 12 Jahren keine Erosionen aufwiesen, entwickelten sich Erosionen in den folgenden zwei Jahren. Neue oder weiter progrediente Erosionen wurden nach zwei Jahren bei 27 % der Kinder festgestellt. Mädchen zeigten signifikant weniger Erosionen als Jungen.

In einer neueren Studie belegten Hasselkvist et al. (2010) an 609 Kindern und Jugendlichen, dass Erosionen häufiger bei männlichen Testpersonen anzutreffen sind und Erosionen deutlich mit dem Konsum von Softdrinks assoziiert sind.

In der Schweiz wurden 391 randomisiert selektierte Personen zweier Altersgruppen (26-30 Jahre und 46-50 Jahre) untersucht (Lussi et al. 1991). Die Okklusalfächen der Zähne waren am häufigsten von Erosionen betroffen. Die jüngeren Probanden hatten in 29 % der Fälle, die älteren in 42,6 % erosive Defekte mit Dentinbeteiligung an mindestens einem oder mehreren Zähnen. Vestibuläre Erosionen wurden bei 7,7 % der jüngeren und 13,2 % der älteren Testpersonen diagnostiziert. Linguale Erosionen traten bei 3,6 % der jüngeren und 6 % der älteren Personen auf.

Alle Studien zur Prävalenz dentaler Erosionen zeigen, dass Erosionen eine allgegenwärtige Erscheinung sind, Milch- sowie permanente Zähne betreffen und die Prävalenz besonders bei jüngeren Personen ansteigt. Daher werden in Zukunft erosionspräventive Maßnahmen eine wichtige Komponente der Oralprophylaxe sein (Jaeggi und Lussi 2006).

## 2.2 Prophylaxe von Erosionen

Zur frühzeitigen Erfassung und Quantifizierung erosiver Zahnhartsubstanzschäden existieren keine diagnostischen Hilfsmittel, so dass die Diagnose ausschließlich durch das klinische Erscheinungsbild erfolgt. Zur Vermeidung der Entstehung oder der Progression von Erosionen muss das Vorliegen möglicher ätiologischer Faktoren evaluiert werden, um Erosionen kausal behandeln zu können (Serra et al. 2009). Ziel ist es, die Ursachen der erosiven Zahnschäden zu erfassen und zu beseitigen. Lussi und Hellwig (2006) empfehlen die

Anfertigung eines mehrtägigen Ernährungsprotokolls, um wichtige Hinweise auf erosive Quellen in der Nahrung, die Häufigkeit der Nahrungsaufnahme, mögliche erosive Zwischenmahlzeiten und die Art und Dauer der Säureexposition zu erhalten.

Risikopatienten für Erosionen konsumieren oftmals mehr als vier säurehaltige Getränke oder Genussmittel pro Tag, essen signifikant häufiger Obst und Gemüse oder zeigen erosionsfördernde Trinkmethoden, wie zum Beispiel das lange Verweilen des Getränkes im Mund vor dem Schluckvorgang (O'Sullivan und Curzon 2000). Da ein völliger Verzicht auf säurehaltige Nahrungsmittel nicht zu realisieren ist, muss der Risikopatient im Sinne einer Steuerung des Säurekonsums beraten werden. Die Häufigkeit der Aufnahme säurehaltiger Produkte sollte reduziert und die Verweildauer der Säuren im Mund verringert werden (Lussi und Hellwig 2006). Johansson et al. (2004) untersuchten den Einfluss verschiedener Trinkmethoden auf die Ausbildung erosiver Zahnhartsubstanzdefekte und fanden heraus, dass das intraorale Halten des sauren Getränkes vor dem Schlucken ein sehr hohes Risiko für die Ausbildung von Erosionen darstellt. Ein zügiges Trinken oder die Verwendung eines Trinkhalms zur Verringerung des Säurekontaktes mit der Dentition ist daher empfehlenswert. Ferner wird empfohlen potentiell erosive Mahlzeiten mit kalziumreichen Nahrungsmitteln (Milch, Käse oder Joghurt) zu beenden, um durch die Kalzium-Ionen eine Remineralisation zuvor demineralisierter Zahnhartsubstanz zu fördern (Gedalia et al. 1991). Zur Steigerung der Speichelfließrate und somit Pufferung und Verdünnung der Säuren nach dem Essen kann weiterhin das Kauen eines zuckerfreien Kaugummis indiziert sein (Lussi et al. 2004). Ein weiterer Vorteil des Kaugummikauens nach den Mahlzeiten besteht in der Reduktion des postprandialen ösophagealen Refluxes, was insbesondere bei GORD-assoziierten Erosionen (gastro-ösophagealer Reflux) zur Anwendung kommen kann (von Schönfeld et al. 1997, Smoak und Koufman 2001). Das Vorliegen intrinsischer ätiologischer Faktoren wie Essstörungen, gastro-ösophagealer Reflux oder chronischer Alkoholabusus erfordern die Verwendung von Antacida, allgemein-medizinische Behandlung, psychologische Therapie oder sogar chirurgische Eingriffe, um die psychosomatischen oder organischen Ursachen der Erosionen zu beseitigen (Lussi und Hellwig 2006, Magalhaes et al. 2009c).

Das erosive Potential von Getränken und Nahrungsmitteln kann durch ihre chemische Modifikation reduziert werden. Werden ausreichend Kalzium- und Phosphat-Ionen einem erosiven Agens zugesetzt, wird es chemisch übersättigt und erodiert nicht den Zahnschmelz (Barbour et al. 2005, Lussi 2009). Larsen und Nyvad (1999) fanden heraus, dass Orangensaft (pH 4,0) keine erosiven Zahnhartsubstanzschäden verursacht, wenn er mit 40 mmol/l Kalzium

und 30 mmol/l Phosphat versetzt wurde. Ein Orangensaft ohne Kalzium- und Phosphat-Zusätze wirkte hingegen erosiv. Attin et al. (2003) untersuchten den erosiven Effekt von Zitronensäure (1,0 %, pH 2,21) mit Mineral-Additiven. Es konnte ein signifikanter Erosionsschutz durch Zugabe einer Mischung von Kalzium, Phosphat und Fluorid nachgewiesen werden, während ein Zusatz ausschließlich von Fluorid keinen signifikanten Schutz vor Erosion gewährte. Hingegen konnten Larsen und Richards (2002) in einer *In-vitro*-Studie zeigen, dass ein Fluorid-Zusatz das erosive Potential von Soft-Drinks um 28 % reduzieren kann, wenn der pH-Wert der Getränke nicht geringer als 3 ist. Bei Getränken mit einem pH-Wert unter 3,0 konnte trotz hoher Fluoridgegaben (bis 20 ppm) kein erosionsprotektiver Effekt beobachtet werden.

Ein weiterer Ansatz zur Reduktion der Erosivität saurer Getränke ist der Zusatz von Metall-Ionen. Kato et al. (2007) versetzten Soft-Drinks mit Eisen-Ionen (Eisensulfat) und stellten einen signifikanten Erosionsschutz im Vergleich zu unbehandelten Soft-Drinks fest.

Einen ähnlichen erosions-inhibitorischen Effekt von Eisen-Ionen konnten Bueno et al. (2010) in einer *In-vitro*-Studie feststellen. Sie applizierten Eisen-Gel (10 mmol/l) für 1 min auf bovine Schmelzproben und inkubierten sie anschließend 10 min in einem sauren Soft-Drink (Coca-Cola). Das Eisen-Gel reduzierte signifikant den Verlust der Oberflächenhärte im Vergleich zu unbehandelten Kontrollproben. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass im Rahmen der Produktmodifikation durch Zusätze von Kalzium, Phosphat, Fluorid oder Metall-Ionen der Geschmack der Lebensmittel negativ beeinflusst werden kann oder toxikologische Nebeneffekte auftreten können (Magalhaes et al. 2009c).

Zur Erosionsprävention oder wenn eine Säureexposition der Zähne nicht verhindert werden kann (z.B. bei intrinsischen Ursachen), ist die Applikation von erosionsprotektiven oder remineralisationsfördernden Substanzen indiziert.

Viele Studien konnten den Erosionsschutz von Fluoridverbindungen in Mundspüllösungen, Gelen, Zahnpasten oder Lacken belegen (Attin et al. 1997, Ganss et al. 2004, Lagerweij et al. 2006). Durch Reduktion der Hydroxylapatitlöslichkeit sowie durch Förderung der Remineralisation zeigen Fluoride anti-erosive Eigenschaften (Shellis und Duckworth 1994, Ekstrand und Oliveby 1999). Oral applizierte Fluoride bilden eine stabile Kalzium-Fluorid-Schicht auf Zahnoberflächen aus, deren Schutzfunktion durch Absenkung des pH-Wertes und Erhöhung der Fluorid-Konzentration zusätzlich intensiviert werden kann (Øgaard 2001). Ganss et al. (2004) konnten in einer *In-situ*-Studie zeigen, dass die regelmäßige orale Anwendung von fluoridhaltigen Zahnpasten und Mundspüllösungen die Ausbildung und das Fortschreiten von Erosionen in Schmelz und Dentin signifikant verringert. Neben den

bekannten Fluoridverbindungen, wie z.B. Amin-, Zinn- und Natriumfluorid, gewähren auch Titan-Tetrafluoride erosions-inhibitorische Effekte, wie neuere Studien belegen können (Magalhaes et al. 2009a, Wiegand et al. 2010). Diese Substanzen sollten jedoch nur von zahnmedizinischem Fachpersonal und nicht von den Patienten selbst appliziert werden, da sie einen sehr niedrigen pH-Wert von 1-2 aufweisen (Magalhaes et al. 2009c).

Weiterhin können auch Zinnverbindungen in Kombination mit Fluoriden zur Erosionsprophylaxe verwendet werden. Ganss et al. (2010) verglichen das erosionsprotektive Potential einer Natrium-Fluorid-Spülung (NaF) mit einer Mundspüllösung, die eine Kombination aus Zinn und Fluoriden enthielt. Während die NaF-Spülung die Erosion an Schmelz um 19 % und an Dentin um 23 % reduzierte, zeigte die Spülung mit einer Zinn-Fluorid-Kombination an Schmelz eine Erosionsreduktion um 67 % und an Dentin um 47 %. Die reinen Fluorid-Verbindungen überlegene anti-erosive Eigenschaft von Zinn-Fluorid-Kombinationen an Schmelz wurde in einer Studie von Schlüter et al. (2010) bestätigt. Allerdings konnten sie in Dentin keine Zunahme der Säureresistenz im Vergleich zu Mundspüllösungen nachweisen, die kein Zinn enthielten.

In den letzten Jahren wurde auch der anti-erosive Effekt von kalziumhaltigen Produkten erforscht. Nanokomplexe aus amorphem Kalzium-Phosphat (ACP) mit Casein-Phosphopeptiden (CPP), z.B. in Tooth Mousse (GC Tokio, Japan), sollen die Remineralisation von erodiertem Zahnschmelz fördern und die Ausbildung der schützenden Kalzium-Fluorid-Deckschicht begünstigen (Hannig M und Hannig C 2010). Lennon et al. (2006) untersuchten mit der Profilometrie Produkte mit CPP-ACP sowie Substanzen mit Natrium- und Aminfluorid hinsichtlich ihrer anti-erosiven Eigenschaften. Sie stellten fest, dass der Erosionsschutz von CPP-ACP begrenzt und wesentlich geringer ist als der von fluoridhaltigen Produkten. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt eine Studie von Wegehaupt und Attin (2010). Sie untersuchten mit der Oberflächenprofilometrie den Zahnhartsubstanzverlust boviner Schmelzproben in einer Abrasions-/Erosions-Versuchsanordnung in Anwesenheit von Fluorid-Gelen unterschiedlicher Zusammensetzung oder CCP-ACP. Die tägliche Applikation von Fluorid-Gelen reduzierte signifikant den Verlust an Zahnhartsubstanz durch Erosion und Abrasion, während die Anwendung von CCP-ACP eine wesentlich geringere Effizienz zeigte. Vongsawan et al. (2010) konnten hingegen beweisen, dass eine Paste mit CCP-ACP die Remineralisation von erodierten Zahnhartsubstanzen signifikant erhöht. Cai et al. (2007) versetzten zuckerfreie Kaugummis mit CCP-ACP und untersuchten ihren Einfluss auf die Remineralisation zuvor demineralisierter Schmelzproben *in situ*. Sie fanden heraus, dass CPP-

ACP-haltige Kaugummis im Vergleich zu CCP-ACP-freien Kaugummis die Remineralisation erodierter Schmelzproben signifikant steigern. Wird CCP-ACP mit Fluoriden ergänzt, steigert dieses noch zusätzlich die Effektivität des Remineralisationsprozesses, wie eine Studie von Reynolds et al. (2008) zeigen konnte.

Eine weitere Substanz aus der Nanotechnologie zur Remineralisation erodierter Zahnhartsubstanzen sind Nanopartikel aus Kalziumkarbonat-Apatit (Hannig M und Hannig C 2010). Die Größe dieser biomimetischen Nanopartikel entspricht der Größe der natürlichen im Schmelz bzw. Dentin vorhandenen Apatit-Kristalle von 100 bzw. 20 nm. Roveri et al. (2009) verglichen den Effekt von Fluoriden und Kalziumkarbonat-Apatit-Partikeln auf demineralisierte Zahnhartsubstanz *in vitro*. Fluorid bewirkte eine Oberflächenveränderung der natürlichen Apatit-Kristalle und eine damit verbundene erhöhte Widerstandskraft gegen erosive Säureangriffe. Die biomimetischen Kalziumkarbonat-Partikel hingegen führten durch Einlagerung in die erosiv veränderte Zahnhartsubstanzoberfläche zu einer Remineralisation und damit zu neuen Apatit-Kristallen.

Der Speichel ist ein wichtiger biologischer Faktor in der Prävention dentaler Erosionen (Lussi und Hellwig 2006). Speichel bietet durch seinen hohen Gehalt an Kalzium und Phosphat ein Remineralisations-Reservoir für die Zahnhartsubstanzen, besitzt Puffer-, Spül- und Verdünnungsfunktion gegenüber Säureangriffen in der Mundhöhle und bildet die Pellikel, die als dünner Biofilm einen gewissen Schutz vor erosiven Substanzen gewährt (Dawes 2008). In vielen Studien wurde der anti-erosive Effekt der Pellikel untersucht und nachgewiesen (siehe Kapitel 2.5). Dabei konnte eine tendenzielle Zunahme des anti-erosiven Potentials in Abhängigkeit von der Pellikelbildungszeit beobachtet werden (Hannig M und Balz 2001, Hannig M et al. 2004b). Risikopatienten für Erosionen sollten daher direkt nach Prozessen, die die Pellikel von der Zahnoberfläche entfernen oder sie ausdünnen (Zähneputzen, professionelle Zahnreinigung oder Bleaching), keine säurehaltigen Lebensmittel konsumieren (Lussi und Hellwig 2006), um die Neu-Etablierung der erosionsprotektiven Pellikel zu unterstützen.

Ein weiterer interessanter Ansatz ist die gezielte Modifikation der Pellikel, um ihren Erosionsschutz zu erhöhen. In einer *In-vitro*-Studie untersuchten Hemingway et al. (2010) den Einfluss von Proteinen (Casein und Ei-Ovalbumin), die verschiedenen Säuren und Soft-Drinks zugesetzt wurden. Als Zusatz in bestimmten Säuren und Getränken reduzierten die Proteine in Anwesenheit einer Pellikel signifikant den erosiven Zahnhartsubstanzverlust. Die Verfasser stellten daher die Hypothese auf, dass Casein und zu einem geringeren Maße

Ovalbumin potenzielle erosions-reduzierende Additive in Soft-Drinks sein können, die den anti-erosiven Charakter der Pellikel beeinflussen.

Weitere erosions-inhibitorische Substanzen sind Polyphenole, die hemmend auf Matrixmetalloproteinasen (MMP) wirken. MMP sind im Dentin und Speichel lokalisierte Enzyme und bewirken eine Degradation der im Dentin vorhandenen organischen Matrix. Diese Eigenschaft der MMP steht im Zusammenhang mit der Progression erosiver Substanzverluste in Dentin (Magalhaes et al. 2009b). Durch eine enzymatische Hemmung der MMP durch Polyphenole kann eine Verlangsamung der Erosionsprogression herbeigeführt werden. Kato et al. (2009) konnten in einer *In-situ*-Studie zeigen, dass polyphenol-haltiger Grüner Tee den Zahnhartsubstanzverlust in einer Abrasions-/Erosions-Versuchsanordnung signifikant reduzieren konnte. Neben Grünem Tee konnten Magalhaes et al. (2009b) auch für den MMP-Hemmer Chlorhexidin eine erosions-hemmende Wirkung in Dentin nachweisen. Kato et al. (2010) verglichen die Wirkung von Natrium-Fluorid, Chlorhexidin und dem MMP-Hemmer EGCG (epigallocatechin gallate) auf die Progression von Erosionen in Dentin *in situ*. Intraoral getragene bovine Dentin-Proben wurden mit NaF, Chlorhexidin oder EGCG behandelt und nachfolgend mit einem sauren Medium (Coca-Cola) erodiert. Mit der Profilometrie wurde der Verlust der Oberflächenhärte evaluiert. EGCG und Chlorhexidin verringerten signifikant den Verlust der Oberflächenhärte im Vergleich zu Placebo-Substanzen und waren in dem anti-erosiven Potential sogar Natrium-Fluorid-Verbindungen überlegen.

### 2.3 Methoden zur Untersuchung erosiver Effekte

Für die Untersuchung erosiver Effekte auf Schmelz und Dentin wurde eine Vielzahl von Methoden angewendet. Geeignet sind bildgebende Verfahren, wie zum Beispiel elektronenmikroskopische Aufnahmen (Eisenburger et al. 2004), chemische Verfahren wie die photometrische Bestimmung in Lösung gegangener Kalzium-Ionen (Hannig C et al. 2005a) und die Atomabsorptionsspektroskopie (Wiegand et al. 2008a) oder physikalische Verfahren wie Mikrohärtbestimmung (Lupi-Pegurier 2003) oder Oberflächenprofilometrie (Ganss et al. 2009).

Mit der Mikrohärtebestimmung wird die Härte der Zahnoberfläche gemessen. Der erosive Prozess führt zu einer Demineralisation der Zahnhartsubstanz, die ein Erweichen der Oberfläche bewirkt. Eine Diamantspitze mit definierter geometrischer Dimension und Eindringkraft hinterlässt je nach Oberflächenbeschaffenheit der zu messenden Schmelzproben eine Vertiefung. Das Ausmaß dieser Vertiefung wird mit einem Mikroskop bestimmt und durch mathematische Formeln der Substanzverlust durch die säurebedingte Oberflächenerweichung berechnet. Der Vorteil der Mikrohärtebestimmung liegt in der einfachen und kostengünstigen Anwendung (Barbour und Rees 2004). Allerdings ist diese Methode nicht sehr sensitiv, da initiale erosive Zahnhartsubstanzverluste nicht erfasst werden können (Hannig C et al. 2008a). Ein weiterer Nachteil der Mikrohärtebestimmung ist die Tatsache, dass nur planparallel beschliffene Proben untersucht werden können, eine Untersuchung von nativen Zahnhartsubstanzoberflächen ist nicht möglich (Attin et al. 2005a). Ferner ist als Nachteil anzusehen, dass in Lösung gegangene Zahnhartsubstanzschichten nicht erfasst werden, da nur die Oberfläche der Proben untersucht wird. Diesen Nachteil weisen auch die lichtinduzierte Fluoreszenzmessung und die transversale Mikroradiographie auf (Barbour und Rees 2004, Attin et al. 2005a).

Bei der Oberflächenprofilometrie wird der Prüfkörper mit einem mechanischen Sensor oder Lasersensor abgetastet und so der erosive Zahnhartsubstanzverlust gegenüber nicht erodierten Referenzflächen bestimmt. Voraussetzungen sind genau reproduzierbare Referenzpunkte während des Messvorganges und planparallel beschliffene Proben (Azzopardi et al. 2000). Eine Untersuchung von nativen Oberflächen ist daher auch mit dieser Methode nicht möglich (Attin 2006). Weitere Nachteile sind die hohen Standardabweichungen in den profilometrischen Messungen und die Tatsache, dass erst erosive Effekte quantifiziert werden können, die nach 1 bis 2 min Säureinkubation eintreten (Hannig C et al. 2008). Eine Erfassung initialer erosiver Effekte ist daher nicht möglich.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen dienen der qualitativen Untersuchung erosiv bedingter Oberflächenveränderungen (Attin 2006). Als Vorteil dieser Methode ist anzusehen, dass sowohl polierte als auch unbehandelte Prüfkörper untersucht werden können und sie auch erfolgreich anwendbar ist zur Evaluation der anti-erosiven Eigenschaften der Pellikel (Meurmann und Frank 1991, Hannig M und Balz 2001). Nachteilig sind die aufwändige Probenvorbereitung, die sehr zeitintensive Versuchsdurchführung und die sehr teure technische Ausrüstung (Shellis und Hallsworth 1987, Eisenburger et al. 2004). Mit dieser Methode ist zwar eine Differenzierung und Objektivierung von initialen erosiven Effekten möglich, eine Quantifizierung der erosiven Kurzzeiteffekte ist jedoch nicht evaluierbar

(Hannig M und Balz 1999, Barbour und Rees 2004, Hannig C et al. 2005a). Dieses gilt auch für die Rasterkraft-Mikroskopie (atomic force microscopy) (Hannig M et al. 2004a).

Die konfokale Laserscan-Mikroskopie (CLSM) bietet die Möglichkeit, hochauflösende dreidimensionale Bilder erosiv veränderter Zahnhartsubstanz-Oberflächen anzufertigen. Ebenso ist eine Visualisierung von unter der Oberfläche lokalisierten Strukturveränderungen möglich (Attin 2006). Als Vorteil kann die Verwendung von polierten, aber auch unpolierten oder sogar feuchten Proben angesehen werden. Da die konfokale Laserscan-Mikroskopie die erosions-induzierten Strukturveränderungen nur qualitativ erfassen kann, sollte sie mit anderen Untersuchungsmethoden kombiniert werden.

Eine Bestimmung des erosiven Zahnhartsubstanzabtrags ist durch einen quantitativen Nachweis in Lösung gegangener Kalzium-Ionen möglich, da Schmelz zu annähernd 100 % aus Kalzium und Phosphat in einem Verhältnis von 1,7:1 besteht (Elliot 1997). Zur chemischen Erfassung durch Erosion gelöster Kalzium-Ionen werden der photometrische Kalzium-Nachweis (siehe auch Kapitel 5), kalziumsensitive Elektroden (Nekrashevych und Stösser 2003) und die Atomabsorptionsspektroskopie (Finke et al. 2000, Hannig M et al. 2003, Wiegand et al. 2008a) verwendet. Diese Methoden weisen eine sehr hohe Sensitivität auf und es ist möglich, in Lösung gegangene Zahnhartsubstanzschichten zu analysieren.

Mit dem photometrischen Kalzium-Nachweis lassen sich bereits 400 pmol Kalzium-Ionen in einer Testlösung von 1 bis 20 µl nachweisen (Hannig C et al. 2005a). Das entspricht etwa der Menge an Kalzium, die nach 5 s Inkubationszeit im sauren Medium in Lösung geht (Hannig C et al. 2008a). Weiterhin ist diese Methode geeignet für die Erfassung der Erosions-Kinetik, da durch die geringe Testvolumen-Entnahme aus dem Inkubationsmedium fortlaufende Messungen durchgeführt werden können (Hannig C et al. 2005a, Hannig C et al. 2008a). Weitere Vorteile der photometrischen Kalzium-Messung sind die einfache und schnelle Versuchsdurchführung und die unkomplizierte Probenpräparation. Ferner können auch unbehandelte, native Schmelzproben für die Messung verwendet werden, ein Abschleifen und Polieren der Proben-Oberfläche ist nicht zwingend erforderlich (Attin 2006). Da jedoch die colorimetrische Messung der Kalzium-Konzentration immer *in vitro* erfolgen muss, können die erosionsbedingten Oberflächenveränderungen der Schmelzoberflächen niemals in einer *In-situ*-Versuchsanordnung quantifiziert werden.

Kalziumsensitive Elektroden benötigen einen spezifischen pH-Wert, um optimal arbeiten zu können. Ferner bilden einige Säuren Komplexe mit Kalzium aus, was eine korrekte Kalzium-Messung unmöglich macht (Attin 2006). Zudem ist diese Methode sehr zeitintensiv. Für die Atomabsorptionsspektroskopie werden aufwändig präparierte Testlösungen benötigt und die

Methode ist sehr zeit- und kostenaufwendig (Hannig M et al. 2004a, Attin 2006). Bei beiden Messmethoden ist als Nachteil anzusehen, dass sehr große Messvolumina von mehr als 100 µl erforderlich sind, um korrekte Messungen durchzuführen (Attin et al. 2005a). Ein großer Vorteil ist auch bei diesen beiden Techniken die Erfassung der Erosionskinetik, die mit anderen Methoden nicht zu realisieren ist (Barbour und Rees 2004).

## 2.4 Aufbau und Zusammensetzung der Pellikel

Der Begriff „Pellikel“ wurde erstmals von Dawes et al. (1963) zur Beschreibung der häutchenähnlichen Schicht verwendet, die sich auf Zahnoberflächen direkt nach Durchbruch durch die Gingiva bildet. Auch auf allen übrigen oral exponierten Oberflächen bildet sich innerhalb von Sekunden durch Adsorption von Speichelproteinen ein Proteinfilm (Hannig M und Joiner 2006). Grund für diese Adsorption sind elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Kalzium- und Phosphat-Ionen der Schmelzoberfläche und korrespondierenden Teilladungen der Proteine. Bennick et al. (1979) konnten nachweisen, dass bestimmte Speichelproteine die Fähigkeit besitzen, an Kalzium-Ionen der Schmelz-Hydroxidapatitkristalle zu binden. Für die Protein-Adsorption an die Schmelzoberfläche sind jedoch nicht nur elektrostatische Kräfte, sondern auch van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen verantwortlich (Hannig M und Joiner 2006, Hannig C und Hannig M 2009).

Allerdings binden nicht alle Speichelproteine an die Schmelzoberfläche. Die Bildung der Pellikel ist ein selektiver Prozess, da nicht alle im Speichel vorhandenen Bestandteile in die Pellikel inkorporiert werden (Hay 1967, Yao et al. 2003). Die ersten Proteine, die während der Pellikelbildung an die Schmelzoberfläche binden, sind Phosphoproteine, die eine hohe Affinität zu Hydroxylapatit aufweisen, zum Beispiel Prolin-reiche Proteine (Bennick et al. 1979, Bennick et al. 1983). Weitere wichtige Phosphoproteine, die an der initialen Bildung der Pellikel beteiligt sind, sind Statherine und Histatine (Hay 1973). Um weitere Komponenten der *In-vitro*- und *In-situ*-Pellikel zu detektieren, wurden zahlreiche Studien durchgeführt. Dabei kamen Verfahren wie die Aminosäure-Analyse und histochemische, chromatographische, elektrophoretische, immunologische und optische Methoden zum Einsatz (Mayhall 1977, Carlén et al. 1998, Schüpbach et al. 2001, Yao et al. 2001, Yao et al.

2003, Li et al. 2004c, Vitorino et al. 2004, Deimling et al. 2007, Siqueira et al. 2009, Siqueira et al. 2010).

Li et al. (2004b) immunisierten Mäuse mit *In-vivo*-Pellikeln und analysierten die Serum-Immunantworten. Mit dieser poly-klonalen Antikörper-Methode wurden die Proteine Albumin, Amylase, carbonische Anhydrase II, sIgA, IgG, IgM, Laktoferrin, Prolin-reiche Proteine, Statherin, Histatin und muköses Glykoprotein in der Pellikel nachgewiesen. Weitere Studien konnten belegen, dass darüber hinaus auch Muzin, Cystatine, Lysozym, Lactoferrin, Carboanhydrase und Glykosyltransferase Bestandteile der frühen *In-vivo*-Pellikel sind (Vacca Smith und Bowen 2000, Li et al. 2004c, Hannig C et al. 2005b).

Vacca und Bowen (2000) untersuchten die Zusammensetzung der *In-situ*-Pellikel mit einer Pellikelbildungszeit von 30 s bzw. 1, 5, 10 und 20 min auf Hydroxylapatit-Scheiben unter Verwendung der Ninhydrin-Analyse und Western-Blot-Methode. Zu jedem Zeitpunkt fanden sie ähnliche Protein-Mengen auf den Hydroxylapatit-Scheiben. Die Menge der Enzyme Amylase und Lysozym blieb ab einer Pellikelbildungszeit von 5 min konstant. Die Aktivität des Enzyms Fruktosyltransferase nahm bis zu einem Zeitpunkt von 1 min zu und sank hiernach ab, während die Aktivität des Enzyms Glykosyltransferase mit der Pellikelbildungszeit kontinuierlich zunahm (Vacca und Bowen 2000).

Untersuchungen von Hannig C et al. (2004, 2008b, 2009b, 2009c) ergaben, dass die Enzyme Amylase, Peroxidase, Lysozym, Transaminase und alkalische Phosphatase nicht nur Strukturproteine der initialen Pellikel sind, sondern auch enzymatische Aktivitäten aufweisen und daher relevant für die biologische Funktion und den Reifungsprozess der Pellikel sind. Das Enzym Amylase war bereits in der 3-min-Pellikel aktiv, wobei die Enzymaktivität intra- und interindividuelle Unterschiede zeigte (Hannig C et al. 2004). Die Enzyme Transaminase, Peroxidase und Lysozym waren ebenfalls bereits in der 3-min-Pellikel vorhanden. In einer weiteren Studie von Hannig C et al. (2008d) wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie das bakterielle Enzym Glykosyltransferase in der Pellikel nachgewiesen. Dieses Enzym ist ein wichtiger Virulenzfaktor des Bakteriums *Streptokokkus mutans* und war bereits in der 30-min-Pellikel enzymatisch aktiv.

Ein weiterer Bestandteil der Pellikel sind Kohlenhydrate. Sønju et al. (1974) fanden heraus, dass Glukose das am häufigsten vorkommende Kohlenhydrat in der Pellikel ist. Gründe für den relativ hohen Glukose-Gehalt der Pellikel sind das Vorhandensein von Glykoproteinen (Mayhall und Butler 1976), durch bakterielle Glykosyltransferasen in die Pellikel inkorporierte Glukose-Moleküle oder Glykolipide, die Hauptbestandteile der in der Pellikel vorhandenen Lipid-Fraktion sind (Hannig M und Joiner 2006). Ferner liegen in der Pellikel

die Kohlenhydrate Galactose, Mannose, Fukose und Glukosamin vor (Sønju 1975, Mayhall und Butler 1976).

Neben Kohlenhydraten sind Lipide ein wesentlicher Bestandteil der Pellikel. Bis zu 22 % des Trockengewichtes der Pellikel bestehen aus Lipiden (Slomiany et al. 1986). Die wichtigsten Lipid-Arten sind neutrale Lipide (Triglyceride und Cholesterol), Phospholipide und Glykolipide (Hannig M und Joiner 2006).

Die Adsorption der Speichelproteine an die Zahnoberflächen ist kein gleichmäßiger Prozess. In einer Studie von Skjørland et al. (1995) wurde die Rate der Pellikelbildung *in situ* innerhalb eines Zeitraumes von 2,5 min bis 10 Stunden untersucht. Es wurde herausgefunden, dass die Pellikel eine initiale Dicke in einem Zeitraum von 2 bis 3 min erreichte und bis zu einer Pellikelbildungszeit von 30 min keine Zunahme der Pellikeldicke festzustellen war. Nach einer Pellikelbildungszeit von 30 min nahm die Pellikel um das Dreifache der initialen Dicke zu und blieb daraufhin bis zum Ende des Versuchszeitraumes von 10 Stunden konstant. Die Pellikelbildung verläuft somit in zwei Phasen (Skjørland et al. 1995).

Die initiale Pellikel ist in TEM-Aufnahmen 10 bis 20 nm dick und besteht aus einer elektronendichten, fein-granulären Schicht mit homogener Struktur. Diese Basal-Schicht weist keinen Unterschied hinsichtlich des oralen Expositionsortes auf (Hannig M 1999).

Die zweite Phase der Pellikelbildung ist durch eine langsame Dickenzunahme der Pellikel gekennzeichnet. Das Wachstum dieser zweiten Schicht ist nicht durch die Adsorption einzelner Proteine gekennzeichnet, sondern von Biopolymeren (Hannig M und Joiner 2006). Diese Protein-Aggregate besitzen ein hydrophobes Inneres und eine negativ geladene Hülle und werden daher Micell-ähnliche Strukturen genannt (Rykke et al. 1995). Vitkov et al. (2004) stellten in TEM-Aufnahmen fest, dass sich auf mit Speichel benetzten festen Flächen bereits nach 10 s so genannte supramolekulare Pellikel-Vorläufer adsorbieren. Mit Zunahme der Pellikelbildungszeit formiert sich durch Fusion dieser Pellikel-Vorläufer eine strukturierte Proteinschicht (Vitkov et al. 2004).

Für die Vernetzung dieser Protein-Aggregate sind im Wesentlichen Protein-Protein-Wechselwirkungen zuständig. Eine wichtige Funktion erfüllen hierbei die Pellikel-Enzyme Transglutaminase und alkalische Phosphatase, die essentiell für die intrinsische Reifung der Pellikel sind. Diese Prozesse sind nach Hannig C et al. (2008c) bedeutsamer für den Reifungsprozess der Pellikel als die extrinsische Maturation durch Speichelproteasen.

Abhängig von lokal verfügbaren Biopolymeren hinsichtlich des oralen Expositionsortes und mechanischen Einflüssen, wie zum Beispiel Scherkäften der Zunge (Amaechi et al. 1999a,

Amaechi et al. 2003), erreicht die Pellikel bukkal nach 2 Stunden eine Dicke von 200 bis 700 nm, nach 24 Stunden eine Dicke von 1000 bis 1300 nm (Hannig M 1999). Die reifere bukkale Pellikel weist eine komplexe Ultrastruktur mit dichten granulären und globulären Bereichen auf. Die Dicke der palatinalen Pellikel beträgt nach 2 Stunden 20 bis 80 nm, nach 24 Stunden 100-200 nm und zeigt in TEM-Aufnahmen eine homogene granuläre Struktur (Hannig M 1999). In einer weiteren Studie von Amaechi et al. (1999) wurde mit der konfokalen Laserscan-Mikroskopie (CLSM) festgestellt, dass sich die Pellikeldicken an verschiedenen intraoralen Flächen signifikant voneinander unterscheiden. Nach einer Pellikelbildungszeit von 1 Stunde betrug die Pellikeldicke 0,3 µm an den palatinalen Flächen der oberen Inzisivi, beziehungsweise 1,06 µm an den lingualen Flächen der unteren Molaren. Diese Differenzen sind Folge einer unterschiedlichen Benetzung der Zahnflächen mit Speichel, der Abrasionswirkung der keratinisierten Zungenoberfläche (Amaechi et al. 1999b) und eines lokal unterschiedlichen Angebotes an Biopolymeren (Carlén et al. 1998).

Die initiale Pellikel wurde, im Gegensatz zur mikrobiell besiedelten dentalen Plaque, lange Zeit als bakterienfreier Biofilm angesehen (Dawes et al. 1963, Lendenmann et al. 2000, Hannig M und Joiner A 2006). Li et al. (2004a) untersuchten *in vivo* gebildete Pellikel mit einer Bildungszeit von 0, 2, 4 und 6 Stunden. Durch ein DNA-DNA-Hybridisationsverfahren konnten sie in den frühen Phasen der Bioadhäsion vornehmlich Actinomyceten-Arten, später zunehmend auch Streptokokken-Arten nachweisen. Durch konfokale Laserscan-Mikroskopie (CLSM) konnte gezeigt werden, dass *A. naeslundii* hauptsächlich in den inneren Schichten des oralen Biofilms mit einer Bildungszeit von 6 Stunden lokalisiert ist und sich somit direkt auf der Pellikel ansiedelt (Dige et al. 2009).

Unter Verwendung der Fluoreszenz-Mikroskopie mit einer 4',6-diamidino-2-Phenylindol-Färbung (DAPI) und der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) konnten Hannig C et al. (2007b) belegen, dass bereits nach einer Pellikelbildungszeit von 3 min randomisiert verteilte Bakterien in der Pellikel vorhanden sind. Für die Bakterien-Adhäsion sind wichtige Pellikelbestandteile wie Amylase und Prolin-reiche Proteine zuständig, die spezifische Aminosäure-Sequenzen als Rezeptoren für die Interaktion mit Bakterien besitzen (Douglas 1994, Scannapieco 1994, Hannig C und Hannig M 2009).

## 2.5 Funktion der Pellikel

Die Pellikel ist nicht nur ein strukturelles Phänomen, sondern hat innerhalb der Mundhöhle auch funktionelle Bedeutung. Eine wichtige Funktion der Pellikel ist die Ausbildung eines Gleitfilmes zwischen der Zahnhartsubstanz und den angrenzenden Hart- und Weichgeweben. So erleichtert die Pellikel als Lubrikant das Sprechen, den Schluckakt, aber auch den Kauvorgang (Aguirre A et al. 1989). Für den Gleiteffekt der Pellikel sind Glykoproteine wie Muzin (Tabak et al. 1982, Tabak 1995) oder Statherin verantwortlich (Douglas et al. 1991, Ramasubbu et al. 1993). Unter Verwendung der kolloidalen Rasterkraft-Mikroskopie (colloidal probe atomic force microscopy) zeigten Berg et al. (2003), dass die Anwesenheit der Speichelpellikel den Friktionskoeffizienten zwischen Zahnhartsubstanzen um den Faktor 20 verringert. Hahn Berg et al. (2004) untersuchten mit der gleichen Methode die Lubrikations-Effekte von Prolin-reichen Proteinen, bovinem Muzin und humanem Statherin. Es konnte gezeigt werden, dass Prolin-reiche Proteine der Pellikel eine höhere Lubrikation verleihen als bovines Muzin oder Statherine.

Überdies agiert die Pellikel als semipermeable Membran, die den De- und Remineralisationsprozess der Zahnhartsubstanz beeinflusst und anti-erosive Eigenschaften aufweist (Hannig M und Joiner 2006). Zahlreiche Studien wurden *in vitro* oder *in situ* durchgeführt, um den anti-erosiven Charakter der Pellikel gegenüber Säureangriffen zu untersuchen.

In einer Studie von Zahradnik et al. (1976) wurde die Diffusion von Wasser und verschiedenen Anionen durch eine Hydroxylapatit-Membran in Anwesenheit einer *In-vitro*-Pellikel untersucht. Bedeckte eine Pellikel diese Hydroxylapatit-Membran, so reduzierte sich die Diffusionsrate der Anionen durch die Membran um bis zu 50 %, die Diffusion von Wasser wurde hingegen nur geringfügig beeinflusst. Diese Ergebnisse zeigten den semipermeablen Charakter der Pellikel.

Der Nachteil vieler Erosionsstudien in Anwesenheit einer Pellikel besteht darin, dass sehr lange Pellikelbildungs- und Säureinkubationszeiten gewählt wurden. Diese Tatsache reduziert die klinische Relevanz dieser Studien, da *in situ* diese Bedingungen nur sehr selten erfüllt sind.

Nekrashevych und Stösser (2003) untersuchten die anti-erosiven Eigenschaften der *In-vitro*-Pellikel nach einer Bildungszeit von 24 Stunden mit Hilfe von Mikrohärte-Messung, Messung der Oberflächen-Rauhigkeit, Elektronenmikroskopie und Kalzium-Freisetzung. Der Schutz der

*In-vitro*-Pellikel hing von der Säurekonzentration und der Dauer der Säureinkubation ab. Bei geringer Säurekonzentration bot die Pellikel effektiven anti-erosiven Schutz vor kurzzeitigen Angriffen durch organische Säuren. Überraschenderweise wurde kein signifikanter Unterschied in der Kalzium-Freisetzung aus pellikelbedeckten und pellikelfreien Proben festgestellt.

In einer weiteren *In-vitro*-Studie untersuchten Wetton et al. (2007) den anti-erosiven Effekt einer Pellikel nach einer Pellikelbildungszeit von 2 Stunden von unterschiedlichen Probanden. Die in dieser Studie angewandte Profilometrie zeigte, dass die Pellikel von verschiedenen Probanden unterschiedlich ausgeprägte anti-erosive Potentiale hatte. Wetton et al. (2006) inkubierten Schmelz- und Dentinproben 10 min mit Zitronensäure (pH 3,2) in Anwesenheit einer Pellikel mit Bildungszeiten von 2 min bis 4 Stunden und bestimmten den Hartsubstanzverlust der Proben durch Profilometrie. Die Schmelz-Pellikel bot erst ab einer Bildungszeit von einer Stunde signifikanten Schutz vor Erosionen, die Dentin-Pellikel überraschenderweise bereits nach 2 min.

Jedoch bietet die Pellikel keinen vollständigen Schutz vor Erosionen durch Säuren. Meurman und Frank (1991) inkubierten in einer *In-vitro*-Studie bovine pellikelbedeckte Schmelzproben 120 min in einem Cola-Getränk (pH 2,6) und untersuchten die säurebedingten Oberflächenalterationen im Elektronenmikroskop. Auch eine *In-vitro*-Pellikel mit einer Bildungszeit von sieben Tagen bot keinen vollständigen Schutz vor Säureangriffen. Sie reduzierte lediglich das Ausmaß der Erosion.

*In situ* durchgeführte Studien belegen ebenfalls den partiellen anti-erosiven Schutz der Pellikel gegenüber Säureangriffen. So konnten Hannig M und Balz (1999) nachweisen, dass die *In situ*-Pellikel Zahnschmelz zu einem gewissen Umfang vor Angriffen durch Zitronensäure schützen kann. Sie zeigten, dass eine Pellikel mit einer Bildungszeit von 24 Stunden keinen größeren Erosionsschutz bietet als eine Pellikel mit einer Bildungszeit von 7 Tagen. Ferner wurde in dieser Studie festgestellt, dass im Verlauf des Säureangriffs die Pellikel teilweise aufgelöst wird, jedoch verblieben auch noch nach 5 min Säureeinwirkung Pellikel-Residuen auf der Schmelzoberfläche. Dieser partielle Säurewiderstand der Pellikel wurde in weiteren Studien bestätigt. Hannig C et al. (2009a) untersuchten ultrastrukturelle Veränderungen der *In-situ*-Pellikel unter dem Einfluss von säurehaltigen Getränken. In elektronenmikroskopischen Bildern zeigte sich eine Destruktion der Pellikel durch die Säureeinwirkung. Allerdings verblieb nach dem Säurekontakt eine kontinuierliche basale Pellikel bzw. Pellikel-Überreste auf der Schmelzoberfläche. In den Erosionslakunen unterhalb dieser Basal-Pellikel wurde organisches Material nachgewiesen, das aus Pellikel-ähnlichen

Protein-Aggregaten bestand. In einer weiteren Studie bewiesen Hannig C et al. (2007a), dass eine 120-min-Pellikel auch nach einer Säureinkubation von 5 min nicht vollständig aufgelöst wird. Die Pellikel-Residuen hatten eine elektronendichte granuläre Struktur und eine Dicke von 100-300 nm.

In einer anderen Studie von Hannig M et al. (2003) wurden mit der Atomabsorptions-Spektroskopie und elektronenmikroskopischen Aufnahmen die anti-erosiven Effekte der *In-situ*-Pellikel mit den Bildungszeiten von 2, 6, 12 und 24 Stunden erforscht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Erosionsschutz zwischen den verschiedenen Pellikelbildungszeiten festgestellt werden. Bereits die 2-Stunden-Pellikel schützte Schmelz zu einem gewissen Grad vor säurebedingter Demineralisation. Der Maturationsprozess der Pellikel besitzt folglich *in situ* nicht so großen Einfluss auf die protektiven Eigenschaften, wie *in vitro* (Hannig M et al. 2003).

In einer weiteren Studie wurde nachgewiesen, dass bereits eine *In-situ*-Pellikel mit einer Bildungszeit von 3 min einen anti-erosiven Schutzeffekt gegenüber Angriffen durch Zitronensäure bietet (Hannig M et al. 2004b). Dieser protektive Effekt unterschied sich nicht signifikant von dem einer Pellikel mit einer Bildungszeit von einer bzw. zwei Stunden.

Aus Untersuchungen von Amaechi et al. (1999b) geht hervor, dass die Pellikel-Dicke an verschiedenen Orten innerhalb der Mundhöhle variiert. Sie stellten die These auf, dass diese unterschiedliche Dicke der Pellikel ein wichtiger Faktor für den lokalisations-abhängigen Schutzeffekt der Pellikel sei. In einer Studie von Hannig M und Balz (2001) wurde demgegenüber belegt, dass die Abhängigkeit des erosiven Schutzes der Pellikel vom Pellikelbildungsort gering ist. Für den anti-erosiven Schutz ist nicht so sehr die dickere globuläre Schicht zuständig, sondern vielmehr die elektronendichte, dünne basale Schicht (Hannig M und Balz, 2001). Dieses Ergebnis wird bestätigt durch eine *In-situ*-Studie von Hannig C et al. (2009a), die ebenfalls der Basal-Schicht eine wichtigere anti-erosive Bedeutung zuschreibt als der äußeren globulären Pellikel-Schicht.

Nur wenige Studien untersuchten den protektiven Effekt der Pellikel auf Dentin. Wetton et al. (2006) belegten in einer *In-vitro*-Studie, dass die Dentin-Pellikel bereits nach einer Bildungszeit von 2 min Dentin vor Säureangriffen durch Zitronensäure (pH 3,2) mit einer Einwirkzeit von 10 min schützen kann. Allerdings gewährte die Dentin-Pellikel weniger Schutz als die Pellikel, die sich auf Schmelzproben etablierte. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt eine Studie von Wiegand et al. (2008a). Mit der Atomabsorptions-Spektroskopie wurden die anti-erosiven Eigenschaften der 2-Stunden-Pellikel auf Schmelz und Dentin untersucht. Salzsäure, Zitronensäure und Phosphorsäure mit pH 2,6 wurden als saure Medien

verwendet. Alle pellikelbedeckten Schmelz- und Dentin-Proben wiesen signifikant weniger Kalzium-Verluste auf als pellikelfreie Kontroll-Proben. Allerdings wurden die Schmelz-Proben effektiver durch die Pellikel vor Erosion geschützt als die Dentin-Proben. Ein Unterschied im Erosionsschutz zwischen den verschiedenen Säuren wurde nicht festgestellt.

Hannig C et al. (2007a) stellten in einer *Ex-vivo-/In vitro-Studie* fest, dass eine Dentin-Pelikel mit einer Bildungszeit von 2 Stunden Dentin vor einem Säureangriff durch Salzsäure (pH 2,3) nur begrenzt schützen kann. Einen vollständigen Schutz vor Säureangriffen bot die Dentin-Pelikel auch in dieser Studie nicht.

Demgegenüber konnten Hara et al. (2006) keinen Schutz der Pellikel vor Dentin-Erosion nachweisen. Sie erforschten mit der Oberflächenhärte-Messung und der Mikroradiographie die anti-erosiven Effekte der Dentin-Pelikel mit einer Bildungszeit von 2 Stunden. Als saures Medium wurde Orangensaft (pH 3,8) mit einer Inkubationszeit von 10, 20 und 30 min gewählt. Die Dentin-Pelikel zeigte bei diesen sehr langen Inkubationszeiten keinen signifikanten Schutz vor dem Säureangriff.

## 2.6 Ziele der Studie

Zahlreiche Studien wurden durchgeführt, um den anti-erosiven Effekt der Pellikel zu untersuchen (Zahradnik et al. 1976, Hannig M und Balz 1999, Nekrashevych und Stösser 2003, Wetton et al. 2007, Wiegand et al. 2008a, Hannig C et al. 2009a). In vielen Pellikel-Studien wurden sehr lange Pellikelbildungs- und Säureinkubationszeiten gewählt, deren Relevanz für die Simulation der *In-situ*-Bedingungen jedoch gering ist. Nur wenige Informationen liegen darüber vor, wie viel Kalzium in den ersten Sekunden des erosiven Säurekontaktes aus pellikelbedecktem Schmelz gelöst wird. Ferner wurde eine fortlaufende Erosionsuntersuchung zur Erfassung der Kinetik initialer erosiver Effekte in Anwesenheit einer Pellikel in der Literatur noch nicht beschrieben.

Ziel dieser Studie war es daher, den anti-erosiven Effekt der *In-situ*-Pellikel mit einer Bildungszeit von 3, 30 und 120 min innerhalb der ersten Sekunden bis Minuten des Säurekontaktes zu bestimmen. Außerdem wurde der Einfluss des oralen Expositionsortes auf die anti-erosiven Eigenschaften der Pellikel evaluiert. Mit einem hochsensitiven Verfahren (Arsenazo-III-Methode) wurde die Kalzium-Freisetzung aus pellikelbedeckten bovinen Schmelzproben bei Inkubation mit Salzsäure unterschiedlicher Konzentration *in vitro*

bestimmt. Die pH-Werte von 2,0, 2,3 und 2,6 wurden dabei konstant gehalten, um einen standardisierten Vergleich der unterschiedlichen Säurekonzentrationen zu gewährleisten.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Versuchsplanung

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die erosiven Effekte von Salzsäure verschiedener pH-Werte auf bovine Schmelzproben unter Berücksichtigung der protektiven Eigenschaften der *In-situ*-Pellikel zu untersuchen. Hierzu wurden standardisierte bovine Schmelzproben in Kunststoffschienen montiert, die von 6 Probanden für unterschiedliche Zeit im Munde getragen wurden. Die Schmelzproben befanden sich sowohl bukkal als auch palatinal. So konnte berücksichtigt werden, dass sich die Pellikeldicke an unterschiedlichen Bildungsorten innerhalb der Mundhöhle voneinander unterscheidet. Daraus resultieren möglicherweise unterschiedliche protektive Eigenschaften gegenüber Säureangriffen. Die Schienen wurden von den Probanden für 3, 30 und 120 min getragen, um unterschiedliche Pellikelbildungszeiten zu simulieren. Nach Entfernung der Proben aus dem Mund wurden die pellikelbehafteten Proben *in vitro* mit der Säure inkubiert. Als Konzentration der Salzsäure wurden pH-Werte von 2,0; 2,3 und 2,6 gewählt. Die Quantifizierung der Erosion erfolgte über die photometrische Bestimmung der Kalzium-Freisetzung. Die Konzentration des in Lösung gegangenen Kalziums wurde über eine Farbreaktion mit Arsenazo III colorimetrisch bestimmt.

Durch die Wahl ausreichend großer Inkubationsvolumina sollte gewährleistet werden, dass ein Säureüberschuss, d.h. ein konstanter pH-Wert über den gesamten Messzeitraum vorliegt. Dazu war für die Säuren ein Inkubationsvolumen von 1000 µl erforderlich. Zur Kalzium-Bestimmung wurden nach  $t = 15\text{ s}, 30\text{ s}, 45\text{ s}, 60\text{ s}$  und 2, 3, 4, 5 min jeweils Testvolumina entnommen und in Mikrotiterplatten überführt; die Kalzium-Freisetzung wurde photometrisch bestimmt.

Zusätzlich wurden Schmelzproben der photometrischen Kalzium-Bestimmung zugeführt, die nicht von den Probanden im Munde getragen wurden. Diese pellikelfreien Proben dienten als Vergleichsgruppe und wurden ebenfalls mit Säuren der pH-Werte 2,0; 2,3 und 2,6 inkubiert. Das Grundprinzip des Versuchsaufbaus ist in Abb. 1 dargestellt.

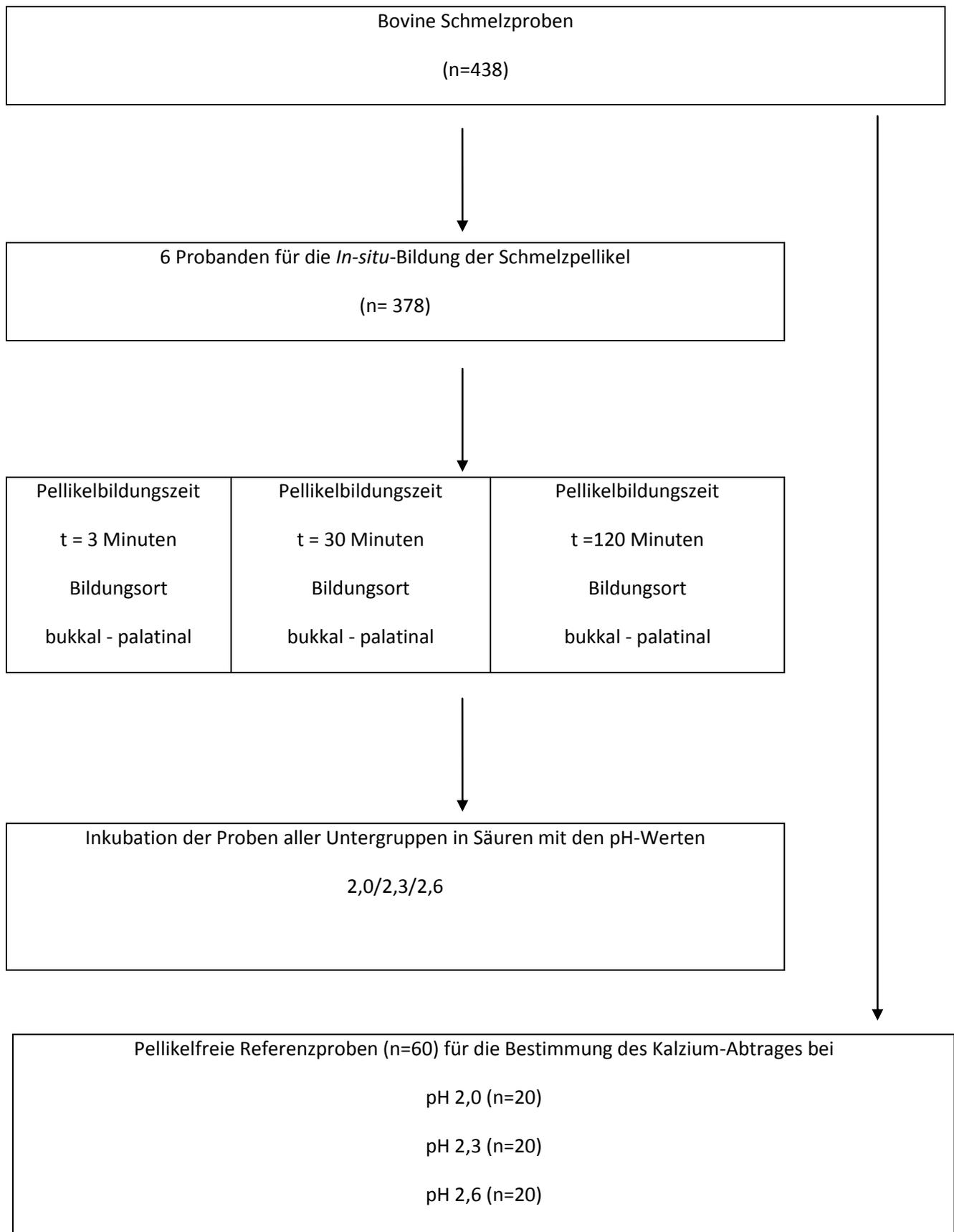


Abb. 1: Grundprinzip des Versuchsaufbaus

## 3.2 Geräte und Instrumente

Alle für die Durchführung der Untersuchungen notwendigen Geräte und Instrumente sind im Datenanhang aufgelistet (s. Kap. 8.1).

## 3.3 Sonstiges Verbrauchsmaterial

Eine Übersichtsliste über das sonstige Verbrauchsmaterial befindet sich im Datenanhang (s. Kap. 8.2).

## 3.4 Chemikalien und Reagenzien

Eine Übersichtsliste über die Chemikalien und Reagenzien ist ebenfalls im Datenanhang eingefügt. (s. Kap. 8.3).

## 3.5 Schmelz-Proben

Die bovinen Inzisivi stammten von zweijährigen Rindern aus einem Schlachthof in Paderborn, die negativ auf BSE getestet wurden. Bis zur weitergehenden Verwendung lagerten sie in einer Thymol-Lösung (1%). Mit einem in einer Standbohrmaschine eingespannten Trepanbohrer wurden aus der Fazialfläche zylindrische Schmelzproben (5 mm Durchmesser) gewonnen. Die Proben wurden unter Wasserkühlung herausgebohrt, um hitzebedingte Veränderungen der Schmelzstruktur zu verhindern. Anschließend erfolgte das Ausdünnen der Proben auf der Rückseite, indem die Dicke der Dentinschicht mit einem rotierenden Diamanten reduziert wurde.

An den Schmelzproben anhaftende Bohrrückstände wurden mit Leitungswasser abgespült.

Nach dem Herausbohren wurden die einzelnen Proben 10 min in einem Ultraschallbad mit Natriumhypochlorit mit einer Konzentration von 3 % gereinigt.

Die Proben wurden unter Aussparung der stirnseitigen Schmelzfläche (Aufkleben auf Tesafilm) mit einem Ätzel für 30 s beschickt. Nach Entfernung des Ätzel mit Wasserpray wurde der „Primer“ (Optibond Flasche 1) aufgebracht und nach 30 s mit ölfreier Luft verpustet. Abschließend wurde das „Bonding“ (Optibond Flasche 2) appliziert und für mindestens 30 s lichtpolymerisiert.

Weil sich in Vorversuchen herausgestellt hatte, dass eine einmalige Versiegelung keinen ausreichenden Schutz gegen erosive Effekte von Säuren bot, wurde die Applikation des „Bondings“ mit anschließender Licht-Polymerisation insgesamt dreimal durchgeführt.

Von den nicht versiegelten Schmelzflächen wurden in einem standardisierten Schleifvorgang mit Hilfe einer Schleifmaschine ca. 200 µm abgetragen. Das Beschleifen erfolgte unter Wasserkühlung zuerst mit Schleifpapier der Körnung 1200 und anschließend mit Schleifpapier der Körnung 4000. Das Ausmaß des Substanzabtrages wurde mit einem mechanischen Mikrometermessgerät kontrolliert (Digimatic Micrometer, Mitutoyo Corporation, Beijing, China).

Die Schmelzproben wurden nach dem Schleifvorgang mit einem Auflichtmikroskop auf Veränderungen in der Oberflächenstruktur untersucht. Proben, die nach dem Schleifvorgang noch strukturelle Abweichungen oder Entkalkungen zeigten, wurden verworfen.

Im Rahmen der Vorversuche durchgeführte Untersuchungen ergaben, dass auf der Schmelzoberfläche der noch nicht mit Säure behandelten Schmelzproben Kalziumrückstände anhafteten.

Es war nicht möglich, diese Rückstände durch Spülen in aqua-bidest oder durch vorsichtige mechanische Behandlungen zu entfernen. Daher wurden die Proben vor der Verwendung mit NaOCl 3% im Ultraschall-Bad gereinigt, anschließend mit Ethanol 70 % für 5 min desinfiziert und hiernach abgedampft. Bevor die Schmelzproben verwendet wurden, wurden sie für 24 Stunden in aqua-bidest gelagert, um eine Hydratisierung der Schmelzoberfläche zu gewährleisten.

### 3.6 Säuren

Es wurde das Erosionspotenzial von Salzsäure bei pH 2,0 (10 mmol/l); 2,3 (5 mmol/l) und 2,6 (2,5 mmol/l) untersucht. Die pH-Werte der Säuren wurden mit Hilfe eines pH-Meters durch Zugabe von aqua-bidest eingestellt.

Salzsäure (HCL) ist eine anorganische Säure mit einem pKs-Wert von -7 und liegt in wässriger Lösung vollständig dissoziiert vor. Ein Säureverbrauch führt zu einer direkten Erhöhung des pH-Wertes, weil keine weiteren Säuremoleküle dissoziieren können.

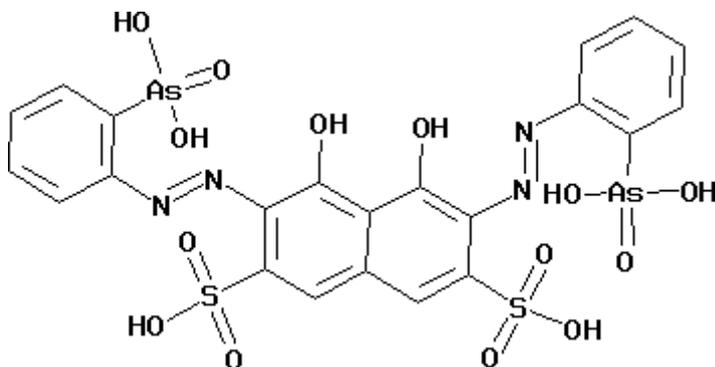
Um über den gesamten Messzeitraum von 5 min einen Säureüberschuss und damit einen konstanten pH-Wert zu gewährleisten, betrug das Inkubationsvolumen 1000 µl.

### 3.7 Grundprinzip des photometrischen Kalzium-Nachweises

Die Freisetzung von Kalzium wurde in einem photometrischen Verfahren mit einem Mikrotiterplattenphotometer bestimmt. Für die Kalzium-Bestimmung wurde die Methode von Smith und Bauer (1979) nach Modifikation von Attin et al. (2005a) verwendet. Diese Methode ist mit wenigen Ausnahmen für eine direkte Bestimmung der Kalziumfreisetzung in verschiedenen Säuren unterschiedlicher Konzentrationen anwendbar (Attin et al. 2005a, Hannig C et al. 2005a). In einer Studie von Hannig C et al. (2008a) konnte gezeigt werden, dass Salzsäure mit den ausgewählten pH-Werten von 2,0; 2,3 und 2,6 mit der colorimetrischen Methode eine hohe Sensibilität und Präzision gewährleistet.

Für einen Kalzium-Nachweis sind nur wenige Mikroliter der sauren Lösung nötig und bereits nach 5 s lassen sich sicher erodierte Kalzium-Ionen detektieren (Attin et al. 2005a, Hannig C et al. 2005a, Hannig et al. 2008a).

Es wurden Mikrotiterplatten mit 96 „wells“ (Flachboden, 300 µl Fassungsvermögen) benutzt. Zum Kalzium-Nachweis diente eine Arsenazo-III-Lösung als Indikator. Die Summenformel ist  $C_{22}H_{18}As_2N_4O_{14}S_2$ . Nachfolgend ist die Strukturformel von Arsenazo III (2,7-Bis(2- arsonophenylazo)-1,8-dihydroxynaphthalin-3,6-disulfonsäure) dargestellt.



Dieser Indikator bildet durch die Bindung an Kalzium Farbkomplexe aus, die photometrisch messbar sind. Mit zunehmender Kalzium-Konzentration nimmt die Konzentration der gebildeten Farbkomplexe zu. Durch photometrische Messungen der Absorption bei  $\lambda = 650$  nm lässt sich die Konzentration der Farbkomplexe zum Kalzium-Nachweis ermitteln. Die Absorption korreliert mit der Kalziumkonzentration.

Für den Kalzium-Nachweis wurden dem Testvolumen jeweils 100  $\mu$ l Kalzium-Indikator zugesetzt.

Die photometrischen Kalzium-Messungen wurden nach Zugabe des Kalzium-Indikators innerhalb einer halben Stunde durchgeführt. Die Signalstabilität des Kalzium-Indikators wird laut Herstellerangaben mit einer Stunde angegeben. Alle Messungen wurden bei einer Raumtemperatur von 22 °C durchgeführt.

### 3.8 Eingesetzte Inkubationsvolumina und Testvolumina

Um einen konstanten pH-Wert im Messzeitraum von 5 min zu gewährleisten, wurde in Vorversuchen ermittelt, welches Inkubationsvolumen nötig ist, damit kein Säureverbrauch stattfindet. Hierfür war für die Säuren ein Inkubationsvolumen von 1000  $\mu$ l erforderlich.

Die Schmelzproben wurden zusammen mit der jeweiligen Säure in Eppendorfgefäßen (2 ml Fassungsvermögen) inkubiert. Während der Messung wurde die Flüssigkeit in den Inkubationsgefäßen zwischen den Entnahmezeiten 15 s, 30 s, 45 s und 60 s mit der Pipettenspitze bewegt, um eine gute Durchmischung sicherzustellen. Die Pipettenspitze wurde in das Eppendorfgefäß eingebracht und der Pipettenstempel langsam und gleichmäßig im Sekundenrhythmus auf und ab bewegt. Hierfür wurde eine Pipette mit einem Hub-Volumen von 100  $\mu$ l verwendet. Zwischen den Entnahmezeiten 2, 3, 4 und 5 min wurden die Inkubationsgefäße manuell geschwenkt.

Um für die photometrischen Messungen optimale Konzentrationen an Kalzium zu erhalten, wurde ein spezifisches Testvolumen von 10  $\mu$ l verwendet. Um eine zeitgerechte Entnahme der spezifischen Testvolumina zu jedem Zeitpunkt der Messung zu gewährleisten, wurde zu jedem Messzeitpunkt ein Gesamt-Testvolumen von 100  $\mu$ l entnommen. Von diesem Gesamt-Testvolumen wurde anschließend das entsprechende spezifische Testvolumen für die Kalzium-Messung gewonnen. Bei möglichen Fehlmessungen durch das Photometer konnten

von dem Gesamt-Testvolumen von 100 µl weitere spezifische Testvolumina entnommen werden.

Um einem Säureverbrauch durch die Reduktion des Inkubationsvolumens vorzubeugen, wurden die entnommenen 100 µl Gesamt-Testvolumen sofort nach der Entnahme durch 100 µl frische Säure des jeweiligen pH-Wertes ersetzt.

### 3.9 Bestimmung der erodierten Kalzium-Konzentration

Die photometrisch ermittelte Extinktion bei der Kalzium-Messung konnte im Abgleich mit einer Kalzium-Eichkurve in die vorliegende Kalzium-Menge umgerechnet werden.

Die Kalzium-Eichkurve wurde mit Hilfe einer industriell hergestellten Stammlösung (Fluitest, Ca-A-III, Analyticon, Lichtenfels, Germany) erstellt. Für die Eichkurven wurde ausgehend von dieser Stammlösung zunächst eine Verdünnungsreihe mit 6 Verdünnungsschritten zu je 10 µl erstellt. Der erste Schritt entsprach der unverdünnten Stammlösung, in jedem weiteren Verdünnungsschritt wurde die Hälfte der vorherigen Konzentration eingesetzt. Die Verdünnungen wurden mit aqua-bidest durchgeführt. Zusätzlich wurde ein Nullwert in die Eichkurven mit aufgenommen. Dieser Nullwert entsprach reinem aqua-bidest. Der Verdünnungsreihe der Kalzium-Stammlösung und dem Nullwert wurde die jeweilige Menge Säure zugesetzt, die auch als Testvolumen eingesetzt wurde (10 µl).

### 3.10 Berechnung des kumulativen erosiven Kalzium-Abtrages

Durch Abgleich mit den Eichkurven konnten die photometrisch erfassten Extinktionen der Kalzium-Messung in die freigesetzten Mengen an Kalzium umgerechnet werden. Diese Berechnungen erfolgten mit Microsoft Excel. Da die Berechnung der erosiven Kalzium-Freisetzung z.T. sehr komplex war, gibt die folgende Aufstellung zunächst eine vereinfachte Übersicht über das Grundprinzip. Nachfolgend werden die Rechenschritte ausführlich erläutert.

*Berechnung des Abtrages von Salzsäure mit dem pH-Wert von 2,0; 2,3 und 2,6:*

- 1) Abgleich der Messdaten mit den Eichkurven (mmol Abtrag/l)
- 2) Berücksichtigung der Verdünnung vom Inkubationsvolumen durch Wiederauffüllen mit frischer Säure nach Entnahme des Testvolumens; Berechnung der pro Entnahmezeit neu hinzugekommenen Absolut-Abträge in mmol/l.
- 3) Berechnung des Absolutabtrages unter Berücksichtigung der Entnahmezeit (innerhalb der ersten Minute in Abständen von 15 s, danach Entnahme der Testvolumina in Abständen von 60 s).
- 4) Berechnung der Gesamt-Abträge von Kalzium unter Berücksichtigung der pro Entnahmezeit neu hinzugekommenen Absolut-Abträge in mmol/l und Umrechnung der Gesamt-Abträge von mmol/l in nmol/l.
- 5) Berechnung des Kalzium-Abtrages pro mm<sup>2</sup> Schmelzoberfläche.

*Rechenschritt 1:*

Die durch das Photometer gewonnenen Daten lagen in der Einheit mmol Ca/l vor.

*Rechenschritt 2:*

Da nach jeder Entnahme eines Gesamt-Testvolumens von 100 µl das Wiederauffüllen des Inkubationsvolumens mit gleicher Volumenmenge an frischer Säure berücksichtigt werden musste, wurde zunächst der pro Zeiteinheit neu hinzugekommene absolute Abtrag berechnet. Dazu wurde der im Inkubationsvolumen der vorigen Entnahmezeit enthaltene Abtrag vom jeweiligen Zeitabtrag subtrahiert. Dem Inkubationsvolumen wurden von 1000 µl zu jedem Entnahmezeitpunkt 100 µl Gesamt-Testvolumen entnommen. Daher wurde auch nur der Abtrag des zum nächsten Entnahmezeitpunkt verbleibenden ehemaligen Inkubationsvolumens (900 µl) subtrahiert.

Da 900 µl der 0,9fache Teil von 1000 µl ist, wurde der zu subtrahierende Abtrag des jeweils vorherigen Entnahmezeitpunkts mit 0,9 multipliziert. Es gilt daher  $x=0,9$ .

Abtrag (15 s) = Abtrag absolut (15 s) (keine Rechnung)

Abtrag (30 s) - Abtrag (15 s) • x = Abtrag absolut (30 s)

Abtrag (45 s) - Abtrag (30 s) • x = Abtrag absolut (45 s)

Abtrag (60 s) - Abtrag (45 s) • x = Abtrag absolut (60 s)

Abtrag (120 s) - Abtrag (60 s) • x = Abtrag absolut (120 s)

Abtrag (180 s) - Abtrag (120 s) • x = Abtrag absolut (180 s)

Abtrag (240 s) - Abtrag (180 s) • x = Abtrag absolut (240 s)

Abtrag (300 s) - Abtrag (240 s) • x = Abtrag absolut (300 s)

### *Rechenschritt 3:*

Um herauszufinden, welcher Kalzium-Abtrag pro Sekunde vorlag, wurde der Absolut-Abtrag durch die Zeit dividiert.

Für die Entnahmezeit bis 60 s galt:

Abtrag absolut (15 s bis 60 s) ÷ 15 = der pro Sekunde neu hinzukommende Kalzium-Abtrag in mmol/l

Für die Entnahmezeit 120 bis 300 s galt:

Abtrag absolut (120 s bis 300 s) ÷ 60 = der pro Sekunde neu hinzukommende Kalzium-Abtrag in mmol/l

### *Rechenschritt 4:*

Die für die einzelnen zu jedem Entnahmezeitpunkt neu hinzukommenden absoluten Abträge (Rechenschritt 2) wurden dann in die Gesamt-Abträge umgerechnet.

Abtrag absolut (15 s) = Abtrag gesamt (15 s) (keine Rechnung)

Abtrag absolut (30 s) + Abtrag gesamt (15 s) = Abtrag gesamt (30 s)

Abtrag absolut (45 s) + Abtrag gesamt (30 s) = Abtrag gesamt (45 s)

Abtrag absolut (60 s) + Abtrag gesamt (45 s) = Abtrag gesamt (60 s)

Abtrag absolut (120 s) + Abtrag gesamt (60 s) = Abtrag gesamt (120 s)

Abtrag absolut (180 s) + Abtrag gesamt (120 s) = Abtrag gesamt (180 s)

Abtrag absolut (240 s) + Abtrag gesamt (180 s) = Abtrag gesamt (240 s)

Abtrag absolut (300 s) + Abtrag gesamt (240 s) = Abtrag gesamt (300 s)

### *Rechenschritt 5:*

Um die Gesamt-Abträge auf die Schmelzprobenoberfläche von einem mm<sup>2</sup> (Probendurchmesser 5 mm = 20 mm<sup>2</sup> Fläche) zu beziehen, wurden sie durch 20 dividiert.

Abtrag gesamt (zur Entnahmezeit x) nmol gesamt/20mm<sup>2</sup> ÷ 20 = Abtrag gesamt (zur Entnahmezeit x) nmol/mm<sup>2</sup>

### 3.11 Berechnung des Kalzium-Abtrages pro Minute

Ergänzend zu der Berechnung der kumulativen Kalzium-Freisetzung wurde die Kalzium-Freisetzung pro Minute für jeden Messzeitraum bestimmt. Dabei wurde die Kalzium-Freisetzung pro Minute als Einzelsteigung der Geraden zu den verschiedenen Zeitintervallen errechnet.

Die Steigung wurde nach der folgenden mathematischen Formel bestimmt:

$$m = \frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

### 3.12 Probanden

Als Probanden wurden sechs Personen ausgewählt, davon fünf Männer und eine Frau. Alle Probanden waren in einem Alter von 23 bis 28 Jahren und allgemein-anamnestisch gesund.

Vor der Teilnahme an den Versuchen wurden die Probanden einer genauen zahnmedizinischen Untersuchung unterzogen, die bei allen Probanden keine Hinweise auf Gingivitis oder Karies ergab. Kein Proband litt an Erkrankungen der Speicheldrüsen. Die Probanden wurden über die Versuchsdurchführung aufgeklärt und nahmen freiwillig an der Studie teil. Das Studiendesign wurde von der Ethikkommission der Universität Göttingen überprüft und genehmigt (Antrag 16/6/05).

Zur Vorbereitung der Schienen wurde von jedem Probanden ein Abdruck des Oberkiefers mit einem konfektionierten Abdrucklöffel und Alginat als Abdruckmaterial genommen. Diese Abdrücke wurden mit handelsüblichen Alginat-Desinfektionslösungen gereinigt und mit herkömmlichem zahnmedizinischen Gips ausgegossen.

### 3.13 Herstellung der Probenträger

Als Träger für die Schmelzkörper dienten individuell angefertigte Kunststoffschienen. Diese Schienen bestanden aus 1,5 mm dicken Methacrylat-Folien, die im Tiefziehverfahren an die Oberkiefer-Dentition des Probanden angepasst wurden.

Für die Aufnahme der Prüfkörper wurden im Bereich der ersten Molaren sowie der beiden Prämolaren Befestigungskavitäten aus lichtpolymerisierbarem Kunststoff angebracht (Tetric ceram, Ivoclar Vivadent, Liechtenstein). Drei Befestigungskavitäten befanden sich vestibulär, drei palatinal.

Die Schmelzproben wurden in den Befestigungskavitäten mit einem Abdruckmaterial auf der Basis von Polyvinyl-Siloxan (President light body, Coltene, Schweiz) fixiert, so dass nur die unversiegelten Oberflächen der Proben der Mundhöhle ausgesetzt waren.

### 3.14 Bildung der *In-situ*-Pellikel

Die Probanden wurden angewiesen, sich an den Versuchstagen die Zähne mit Zahnbürste, jedoch ohne Zahnpasta zu reinigen. Hiernach folgte eine Getränke- und Nahrungsmittelkarenz von einer Stunde. Während des Tragens der Schienen durften die Probanden keine Nahrung zu sich nehmen oder säurehaltige Getränke konsumieren.

Die mit den Schmelzproben beschickten Schienen wurden eingesetzt und über die Zeitperiode der jeweiligen Pellikelbildungszeit (3, 30 und 120 min) getragen. Nach der Bildung der *In-situ*-Pellikel wurden die Schienen aus der Mundhöhle entnommen, die Schmelzkörper vorsichtig mit Hilfe anatomischer Pinzetten aus den Befestigungskavitäten entfernt und verbliebender Speichel mit destilliertem Wasser abgespült.

Hiernach wurden die Schmelzkörper in Kunststoffgefäßen (5 ml, PS-Röhrchen, Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland) zwischengelagert und innerhalb von 30 min der Säureinkubation zugeführt.

### 3.15 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 15.0. Die Signifikanz gefundener Unterschiede wurde mit ANOVA, gefolgt von der Scheffé-Prozedur, evaluiert ( $p < 0,05$ ).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Kinetik der Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure unterschiedlicher Konzentration ohne *In-situ*-Pellicel

Die Kinetik der mittleren Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure mit den drei pH-Werten von 2,0, 2,3 und 2,6 über den Zeitraum von 5 min ist in Abbildung 1 dargestellt. Eine Pellicelbildung fand auf diesen Schmelzproben nicht statt.

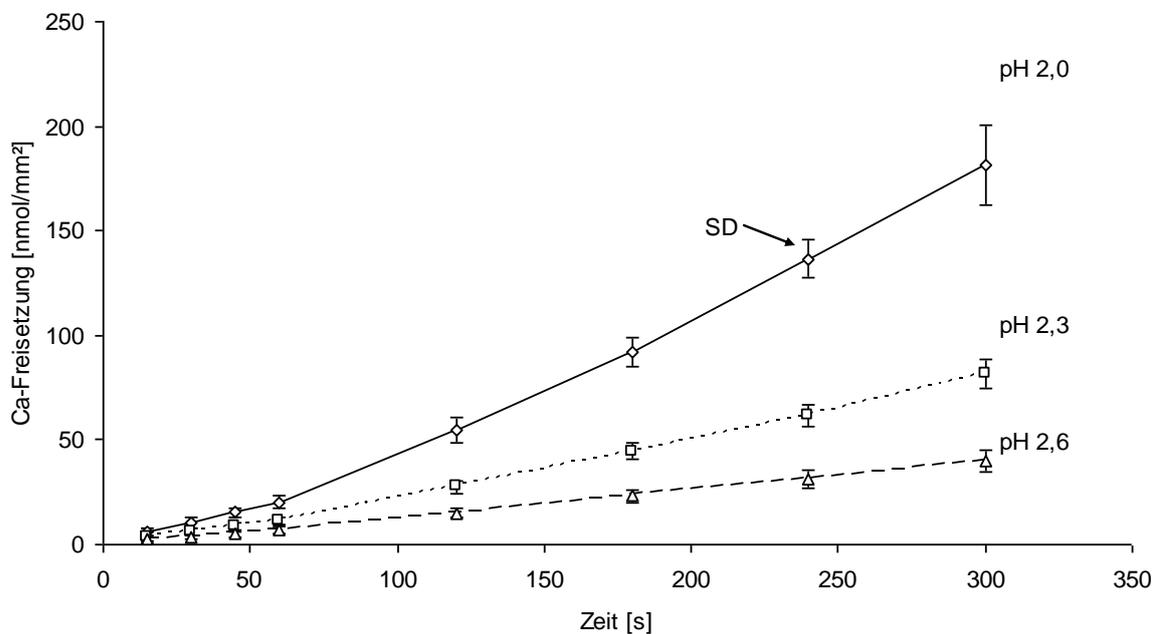


Abb. 1: Mittlere Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus Schmelz bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstanten pH-Werten von 2,0, 2,3 und 2,6. Probenanzahl  $n = 54$ . SD = Standardabweichung.

Salzsäure mit einem pH-Wert von 2,0 führte zu einer stärkeren Kalzium-Freisetzung aus den Schmelzproben als bei pH 2,3. Im Bereich von pH 2,3 wurde wiederum mehr Kalzium erodiert als bei pH 2,6. Es zeigte sich, dass die Kalzium-Freisetzung unter dem Einfluss von Salzsäure bei den pH-Werten 2,0/2,3/2,6 in zeitlicher Abhängigkeit nicht linear erfolgte. Allerdings erfolgte die Kalzium-Freisetzung in direkter Korrelation zum pH-Wert und deutlich zeitabhängig.

Aus der Abbildung 1 ist ersichtlich, dass die Steigung der einzelnen Geraden über den Messzeitraum von 5 min zunimmt. Die Steigung der Geraden wird in Kapitel 4.6 näher erläutert.

Für Salzsäure wurde geprüft, ob eine Abhängigkeit zwischen der kumulativen Kalzium-Freisetzung und der Protonenkonzentration der untersuchten pH-Werte bestand. Da der pH-Wert der negative dekadische Logarithmus der Protonenkonzentration ist, konnte der pH-Wert nach der Gleichung

$$pH = -\log_{10}(a_H)$$

in die entsprechende Protonenkonzentration umgerechnet werden.

Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, welche Protonenkonzentrationen bei den einzelnen pH-Werten vorlagen.

<b>pH-Werte und die entsprechende Protonenkonzentration [mol/l]</b>	
pH 2,0	0,01
pH 2,3	0,005
pH 2,6	0,0025

*Tab. 1: Protonenkonzentration [mol/l] der drei untersuchten pH-Werte 2,0/2,3/2,6.*

In Vorversuchen wurde sichergestellt, dass sich durch die Wahl eines ausreichenden Inkubationsvolumens kein Säureverbrauch innerhalb eines Messzeitraumes von 5 min einstellte und somit die pH-Werte bzw. die Protonenkonzentrationen konstant blieben.

Die untersuchten pH-Bereiche wurden so gewählt, dass bei pH 2,0 eine viermal stärkere Protonenkonzentration in wässriger Lösung vorlag als bei pH 2,6 und bei pH 2,3 eine zweimal stärkere als bei pH 2,6. Durch diese Überlegungen kann festgestellt werden, ob auch ein entsprechendes Vielfaches an Kalzium bei den verschiedenen pH-Werten aus den Schmelzproben herausgelöst wird. Hierzu wurde das relative Ausmaß der Gesamt-Kalzium-Freisetzung nach einem Messzeitraum von 15, 60, 120 und 300 s bei den verschiedenen pH-Werten ermittelt. Der Wert für die Gesamt-Kalzium-Freisetzung bei pH 2,6 wurde als Referenzwert = 1 angesetzt (Tab. 2).

<b>Relatives Ausmaß der Kalzium-Freisetzung (pH 2,6 = Referenzwert 1)</b>			
	<b>pH 2,0</b>	<b>pH 2,3</b>	<b>pH 2,6</b>
<b>15 [s]</b>	<b>3,0</b>	<b>1,90</b>	<b>1</b>
<b>60 [s]</b>	<b>3,23</b>	<b>1,84</b>	<b>1</b>
<b>120 [s]</b>	<b>3,64</b>	<b>1,82</b>	<b>1</b>
<b>300 [s]</b>	<b>4,53</b>	<b>2,05</b>	<b>1</b>

Tab. 2: *Relative Kalzium-Freisetzung von Salzsäure mit dem pH-Wert 2,0 und 2,3 bezogen auf die säurespezifische Kalzium-Freisetzung bei pH 2,6 (Referenzwert 1) bei Säureinkubation von 15, 60, 120 und 300 s mit konstantem pH-Wert.*

Es war entsprechend des Verhältnisses der Protonenkonzentration der untersuchten pH-Werte zu erwarten gewesen, dass bei pH 2,0 viermal so viel Kalzium pro nmol/mm<sup>2</sup> aus den Schmelzproben herausgelöst wird wie bei pH 2,6 und bei pH 2,3 zweimal mehr als bei pH 2,6. Wie aus Tabelle 2 zu entnehmen ist, spiegelte bei pH 2,3 die Kalzium-Freisetzung bei allen Säureeinwirkzeiten das Verhältnis der Protonenkonzentration nahezu gleichmäßig wider. Bei pH 2,0 wurde nach 5 min nicht eine 4,0mal höhere Kalzium-Freisetzung festgestellt, sondern eine 4,5fache. Bei einer Säureeinwirkzeit von 15 s führte Salzsäure mit pH 2,0 nur zu einer dreimal stärkeren Kalzium-Freisetzung aus den Schmelzproben.

Auch bei den pellicelbedeckten Schmelzproben fanden sich keine Abweichungen in dem Verhältnis der Kalzium-Freisetzung von der Protonenkonzentration.

#### 4.2 Ergebnisse der Pilot-Versuche: Kalzium-Freisetzung aus der Pellicel, aus dem Silikon-Befestigungsmaterial und aus voll-versiegelten Schmelzproben

Um den Kalzium-Gehalt der Pellicel zu evaluieren, wurden in Pilot-Versuchen *in situ* exponierte Titan-Prüfkörper nach der Entnahme aus dem Mund in Salzsäure inkubiert und die Kalzium-Freisetzung aus der Pellicel quantifiziert. Die potenziell freigesetzten Kalzium-Mengen blieben unterhalb der Nachweisgrenze des hochsensiblen Arsenazo-III-Assays. Somit

kann davon ausgegangen werden, dass die Pellikel als solche keine nennenswerten Kalzium-Mengen enthält. Ebenso wurde das Silikonmaterial überprüft, das zur Befestigung der Schmelzproben an der Schiene verwendet wurde. Auch hier ließ sich kein Kalzium nachweisen.

In Vorversuchen wurde weiterhin die Kalzium-Freisetzung aus dreimal zirkulär mit Optibond versiegelten Schmelzproben gemessen. Auch hier lag die potentielle Kalzium-Freisetzung unterhalb der Nachweisgrenze. Die dreifache Versiegelung der Schmelzproben unter Aussparung der stirnseitigen Schmelzfläche für die Versuchs-Proben gewährleistete also, dass nur aus der Schmelzoberfläche während des erosiven Säureangriffs Kalzium herausgelöst werden konnte.

#### 4.3 Kinetik der Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure unterschiedlicher Konzentration mit *In-situ*-Pellikel

Für den Vergleich der kumulativen Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure mit den pH-Werten 2,0; 2,3 und 2,6 mit *In-situ*-Pellikel wurden exemplarisch die Messwerte für die 3-min-Pellikel über den Messzeitraum von 5 min in Abbildung 2 dargestellt. Es fand eine Mittelwertbildung aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben statt. Die Kinetiken für die Pellikelbildungszeiten von 30 und 120 min wichen nur minimal von der Kinetik der 3-min-Pellikel ab. Die Kinetiken der Kalzium-Freisetzung für die Pellikelbildungszeiten von 30 und 120 min sind im Datenanhang dargestellt (s. Kap. 8.4, Abb. 21-22).

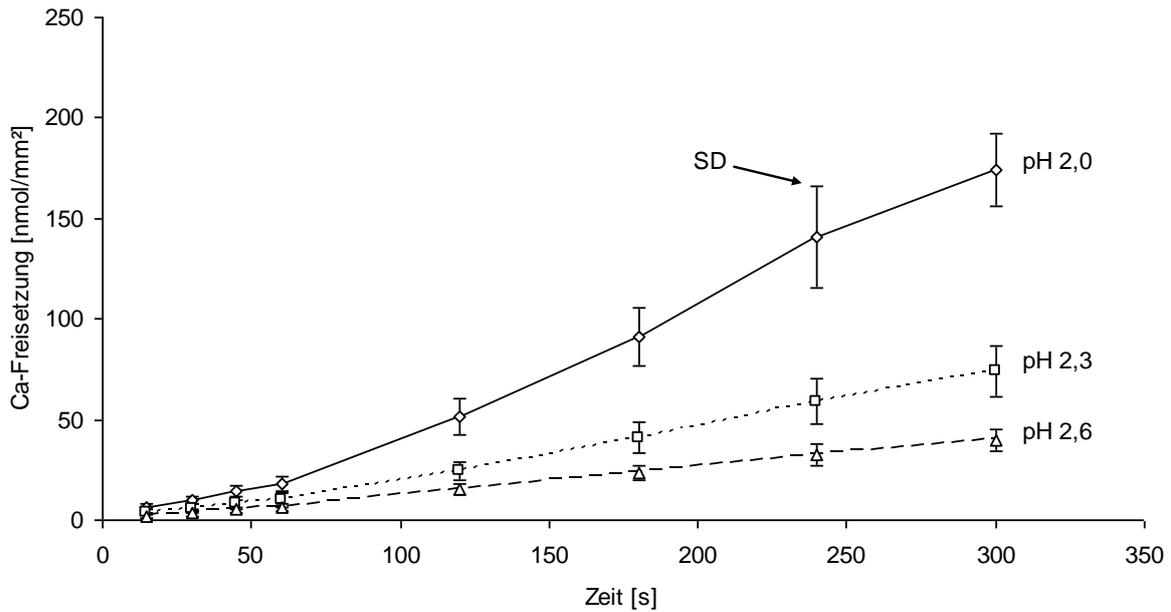


Abb. 2: Mittlere Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,0, 2,3 und 2,6 und einer Pellikelbildungszeit von 3 min. Probandenzahl 6, Probenanzahl  $n = 36$ . SD = Standardabweichung.

Salzsäure mit einem pH-Wert von 2,0 führte auch bei den pellikelbedeckten Schmelzproben zu einer stärkeren Kalzium-Freisetzung als bei pH 2,3. Im Bereich von pH 2,3 wurde mehr Kalzium erodiert als bei pH 2,6. Auch hier war die kumulative Kalzium-Freisetzung, wie bei den pellikelfreien Schmelzproben, abhängig vom jeweiligen pH-Wert und von der Einwirkzeit der Säure. Im Unterschied zu den pellikelfreien Schmelzproben (Abb. 1) ist in der Abbildung 2 jedoch eine Abnahme der Steigung der Geraden nach einer Säureeinwirkzeit von 4 min zu erkennen, insbesondere bei pH 2,0. Zum Messzeitpunkt  $t = 5$  min betrug die Differenz in der Kalzium-Freisetzung zwischen pellikelfreien Proben und den Proben mit einer 3-min-Pellikel bei pH 2,0 im Mittel 7 nmol/mm<sup>2</sup>. Für einen genauen Vergleich der Kalzium-Freisetzung unter dem Einfluss ohne Pellikel, bzw. mit Pellikel wird auf das Kapitel 4.5 verwiesen.

Das Verhältnis der Kalzium-Freisetzung zur Protonenkonzentration entsprach dem Verhältnis bei den pellikelfreien Kontrollproben.

#### 4.4 Einfluss des oralen Expositionsortes auf die protektiven Eigenschaften der *In-situ*-Pellikel

Im Rahmen der Untersuchungen wurden die Kinetiken der Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure unterschiedlicher Konzentration unter Berücksichtigung der Lokalisation der oral exponierten Schmelzproben verglichen. Dabei sollte festgestellt werden, ob sich die protektiven Eigenschaften der bukkalen *In-situ*-Pellikel von denen der palatinalen *In-situ*-Pellikel unterscheiden.

Die Kalzium-Freisetzung aus bukkal bzw. palatinal getragenen Schmelzproben unterschied sich in dieser Studie nicht oder nur geringfügig.

Die Kinetik der mittleren Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure mit dem pH-Wert von 2,0 über den Zeitraum von 5 min ist exemplarisch in Abbildung 3 dargestellt. Die Pellikelbildungszeit betrug 3 min, die Schmelzproben waren bukkal bzw. palatinal lokalisiert.

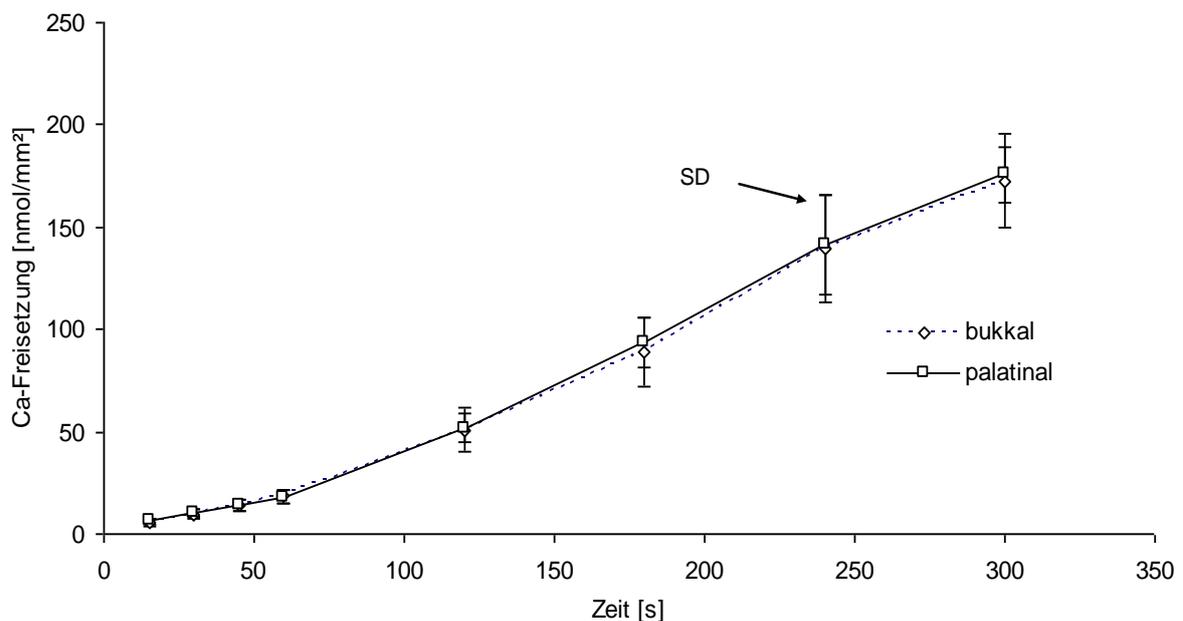


Abb. 3: Mittlere Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,0 und einer Pellikelbildungszeit von 3 min. Probandenzahl 6, Probenanzahl n = 36. SD = Standardabweichung.

Die Kinetik der Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure mit pH 2,0 zeigte bei einer Pellikelbildungszeit von 3 min keine Abhängigkeit von der Lokalisation

der Schmelzproben. Sowohl die Kinetiken als auch die Summe der kumulativen Kalzium-Freisetzungen glichen einander. Aus den bukkalen Schmelzproben wurde praktisch genauso viel Kalzium durch erosive Effekte herausgelöst wie aus den palatinalen Proben. Dieses Ergebnis liegt bei allen untersuchten pH-Werten und einer Pellikelbildungszeit von 3 min vor. Auch bei einem pH-Wert von 2,0 und einer Pellikelbildungszeit von 30 und 120 min war kein Unterschied der Werte von bukkalen und palatinalen Proben zu erkennen. Die Kinetiken für die pH-Werte 2,3 und 2,6 mit 3-min-Pellikel, sowie für den pH-Wert 2,0 mit 30- und 120-min-Pellikel sind im Datenanhang dargestellt (s. Kap. 8.4, Abb. 23-26).

Die Kinetik der mittleren Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure mit dem pH-Wert von 2,3 über den Zeitraum von 5 min ist exemplarisch in Abbildung 4 dargestellt. Die Pellikelbildungszeit betrug 120 min. In der Graphik sind die Werte der bukkal bzw. palatinal lokalisierten Schmelzproben aufgetragen.

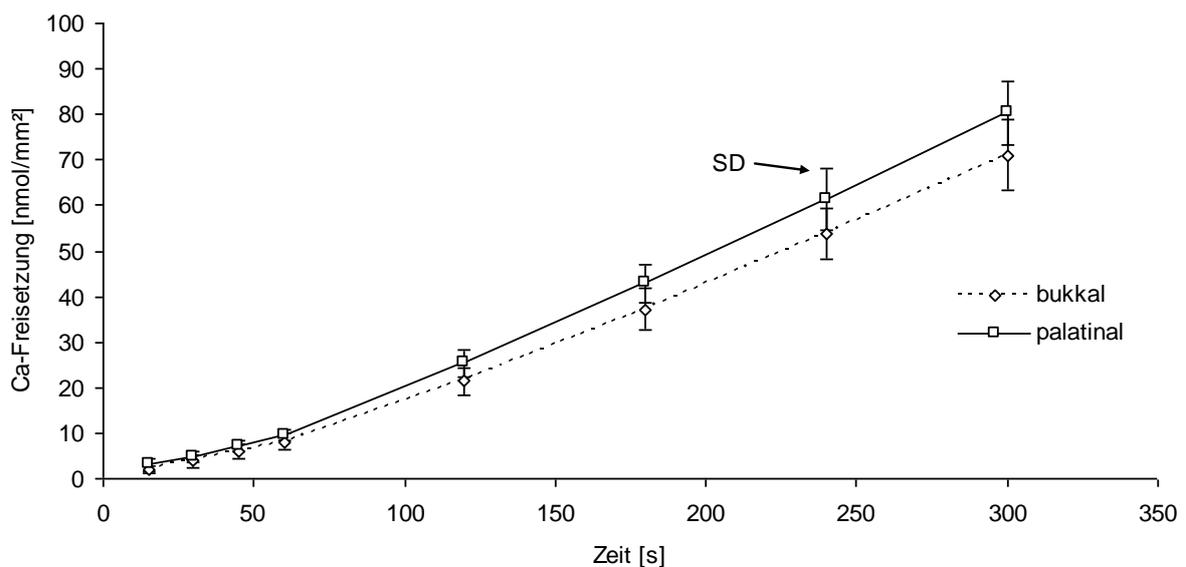


Abb. 4: Mittlere Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,3 und einer Pellikelbildungszeit von 120 min. Probandenzahl 6, Probenanzahl  $n = 36$ .  $SD = Standardabweichung$ .

Bei einem pH-Wert von Salzsäure von 2,3 und einer Pellikelbildungszeit von 120 min war ein tendenzieller Unterschied der kumulativen Kalzium-Freisetzung im Vergleich der bukkalen und palatinalen Schmelzproben zu erkennen.

Die Kinetiken der Kalzium-Freisetzung aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben sind ähnlich. Allerdings löste Salzsäure aus den bukkalen Schmelzproben über den gesamten

Messzeitraum von 5 min etwas weniger Kalzium heraus als aus den palatinalen Proben. Dabei wurden die Unterschiede in der Kalzium-Freisetzung mit zunehmender Messzeit immer größer. Zum Messzeitpunkt  $t = 5$  min wurde aus den bukkalen Schmelzproben im Durchschnitt  $9,2 \text{ nmol/mm}^2$  weniger Kalzium herausgelöst als aus den palatinal lokalisierten Proben.

Tendenzielle Unterschiede in dem Erosionsverhalten von bukkal oder palatinal lokalisierten Schmelzproben fanden sich auch bei pH 2,3 und einer Pellikelbildungszeit von 30 min und bei einem pH-Wert von 2,6 und einer Pellikelbildungszeit von 30 und 120 min. Stets wurde aus den bukkal lokalisierten Schmelzproben tendenziell weniger Kalzium erodiert als aus den Proben, die palatinal im Munde der Probanden lokalisiert waren (s. Kap. 8.4, Abb. 27-29).

#### 4.5 Vergleich der Kalzium-Freisetzung aus pellikelfreien und pellikelbedeckten Schmelzproben unter dem Einfluss von Salzsäure unterschiedlicher Konzentration

##### **4.5.1 Vergleich der Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure zwischen pellikelfreien Schmelzproben und pellikelbedeckten Schmelzproben bei pH 2,0**

Die mittlere kumulative Kalzium-Freisetzung aus pellikelfreien Schmelzproben im Vergleich zu pellikelbedeckten Schmelzproben über einen Inkubationszeitraum von 5 min ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Schmelzproben wurden in Salzsäure mit einem pH-Wert von 2,0 inkubiert. Die Bildungszeit der Pellikel betrug 3, 30 und 120 min. Dargestellt ist der Mittelwert aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben.

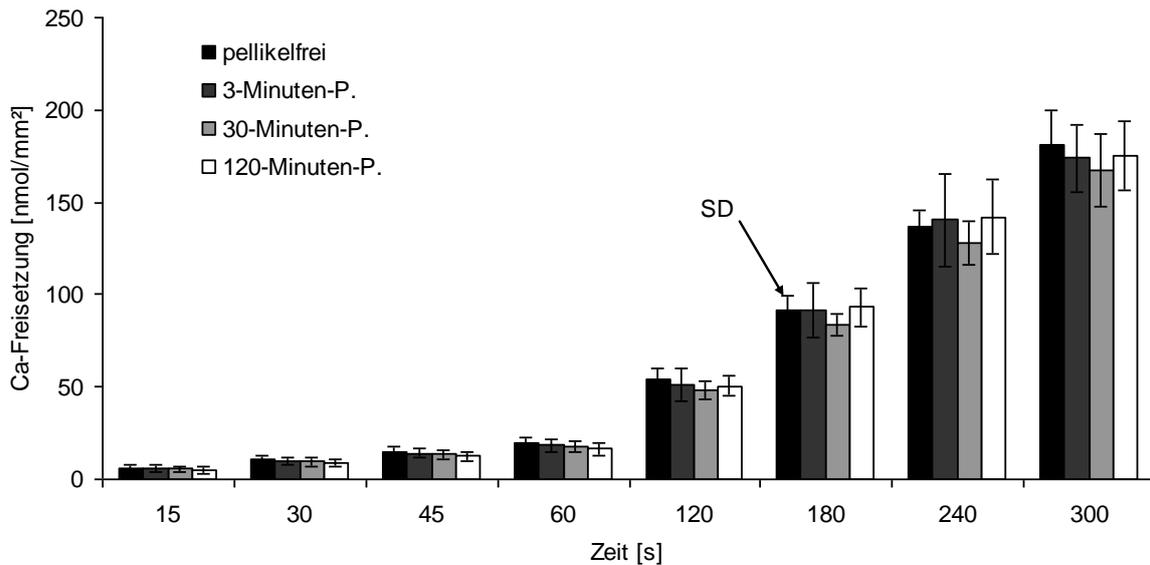


Abb. 5: Mittlere kumulative Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,0 und einer Pellikelbildungszeit von 3 min (dargestellt als dunkelgraue Säule), 30 min (dargestellt als hellgraue Säule) und 120 min (dargestellt als weiße Säule). Die Werte für die pellikelfreien Schmelzproben sind durch die schwarze Säule dargestellt. SD = Standardabweichung.

Zum initialen Messzeitpunkt  $t = 15$  s wurde bei pH 2,0 aus den pellikelfreien Schmelzproben etwa genau so viel Kalzium herausgelöst, wie aus den Schmelzproben nach einer Pellikelbildungszeit von 3 min (6,0 nmol/mm<sup>2</sup> bei pellikelfreien Proben, 5,9 nmol/mm<sup>2</sup> bei der 3-min-Pellikel). Bei einer Pellikelbildungszeit von 30 min wurden im Mittel 5,5 nmol/mm<sup>2</sup>, bei einer Pellikelbildungszeit von 120 min 5,2 nmol/mm<sup>2</sup> Kalzium initial herausgelöst.

Innerhalb des Messzeitraumes  $t = 15$  s bis  $t = 60$  s wurde aus den pellikelfreien Schmelzproben stets mehr Kalzium herausgelöst als aus den pellikelbedeckten Proben. Bei den pellikelbedeckten Proben wurde aus den Proben mit der 3-min-Pellikel stets mehr Kalzium erodiert als aus den Proben mit der 30-, bzw. 120-min-Pellikel. Aus den Proben mit der 120-min-Pellikel wurde innerhalb dieses Zeitraumes stets am wenigsten Kalzium durch erosive Effekte herausgelöst, wobei die Differenz zwischen den einzelnen Pellikelbildungszeiten über den Messzeitraum immer deutlicher wurde. Zum Messzeitpunkt  $t = 60$  s wurde aus den pellikelfreien Proben 20,1 nmol/mm<sup>2</sup>; aus den Proben mit der 3-min-Pellikel 18,3 nmol/mm<sup>2</sup>; aus den Proben mit der 30-min-Pellikel 17,6 nmol/mm<sup>2</sup> und aus den Proben mit der 120-min-Pellikel 16,4 nmol/mm<sup>2</sup> Kalzium erodiert.

Zum Zeitpunkt  $t = 120$  s war diese Regelmäßigkeit nicht mehr deutlich ausgeprägt. Jedoch wurde aus den pellikelbedeckten Schmelzproben (bis auf den Messzeitpunkt  $t = 240$  s) tendenziell immer etwas weniger Kalzium erodiert als aus den pellikelfreien. Wichtig ist, dass die pellikelbedeckten Proben nicht vollständig vor Säureangriffen geschützt wurden. In der initialen Phase des Messzeitraumes wurde aus den pellikelbedeckten Proben etwas weniger Kalzium erodiert als aus den pellikelfreien Proben. Allerdings waren die Unterschiede zwischen pellikelfreien und pellikelbedeckten Proben generell nur sehr gering ausgeprägt.

#### 4.5.2 Vergleich der Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure zwischen pellikelfreien Schmelzproben und pellikelbedeckten Schmelzproben bei pH 2,3

Die mittlere kumulative Kalzium-Freisetzung aus pellikelfreien Schmelzproben im Vergleich zu pellikelbedeckten Schmelzproben über einen Inkubationszeitraum von 5 min ist in Abbildung 6 dargestellt. Die Schmelzproben wurden in Salzsäure mit einem pH-Wert von 2,3 inkubiert. Die Bildungszeit der Pellikel betrug 3, 30 und 120 min. Dargestellt ist der Mittelwert bukkaler und palatinaler Schmelzproben.

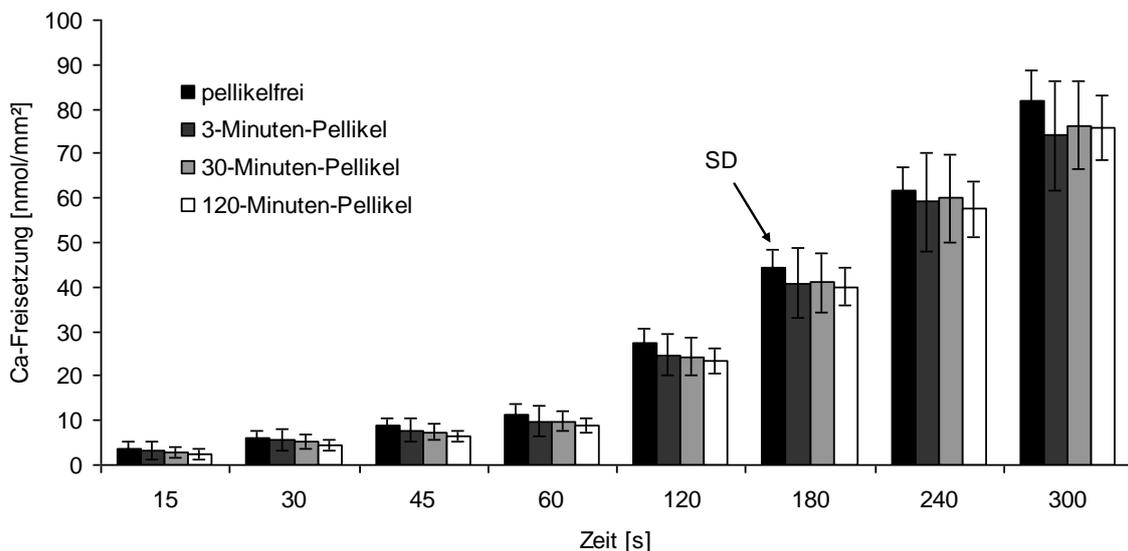


Abb. 6: Mittlere kumulative Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,3 und einer Pellikelbildungszeit von 3 min, 30 min und 120 min. SD = Standardabweichung.

Die Kalzium-Freisetzung aus pellikelfreien, bzw. pellikelbedeckten Schmelzproben bei pH 2,3 glich in ihrem Verlauf der Kalzium-Freisetzung bei pH 2,0. Auch bei einem pH-Wert von 2,3 wurde zum initialen Messzeitpunkt  $t = 15$  s aus den pellikelfreien Proben etwas mehr Kalzium erodiert ( $3,8 \text{ nmol/mm}^2$ ) als aus den Proben mit der 3-min-Pellikel ( $3,2 \text{ nmol/mm}^2$ ), der 30-min-Pellikel ( $2,9 \text{ nmol/mm}^2$ ) und der 120-min-Pellikel ( $2,6 \text{ nmol/mm}^2$ ). Die Differenz zwischen den verschiedenen Pellikelbildungszeiten wurde bis zum Messzeitpunkt  $t = 120$  s kontinuierlich größer. Stets wurde aus den pellikelfreien Proben etwas mehr Kalzium herausgelöst als aus den pellikelbedeckten Proben. Jedoch war dieser Effekt nur sehr schwach ausgeprägt. Eine deutlich reduzierte Kalzium-Freisetzung aus pellikelbedeckten Schmelzproben war nicht feststellbar.

Im Vergleich der drei Pellikelbildungszeiten untereinander zeigte sich, dass sich bis zum Messzeitpunkt  $t = 120$  s aus den Proben mit der 3-min-Pellikel stets am meisten Kalzium löste, aus den Proben mit der 120-min-Pellikel am wenigsten.

Ab dem Messzeitpunkt  $t = 180$  s bis  $t = 300$  s wurde aus den pellikelfreien Proben stets mehr Kalzium erodiert als aus den pellikelbedeckten Proben. Dabei wurde aus den Schmelzproben mit der 120-min-Pellikel tendenziell immer am wenigsten Kalzium freigesetzt. Die erosiven Kalzium-Freisetzungen aus den Schmelzproben mit der 3- und 30-min-Pellikel unterschieden sich ab  $t = 180$  s kaum voneinander.

#### **4.5.3 Vergleich der Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure zwischen pellikelfreien Schmelzproben und pellikelbedeckten Schmelzproben bei pH 2,6**

Die mittlere kumulative Kalzium-Freisetzung aus pellikelfreien Schmelzproben im Vergleich zu pellikelbedeckten Schmelzproben über einen Inkubationszeitraum von 5 min ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Schmelzproben wurden in Salzsäure mit einem pH-Wert von 2,6 inkubiert. Die Bildungszeit der Pellikel betrug 3, 30 und 120 min. Dargestellt ist der Mittelwert der bukkalen und palatinalen Schmelzproben.

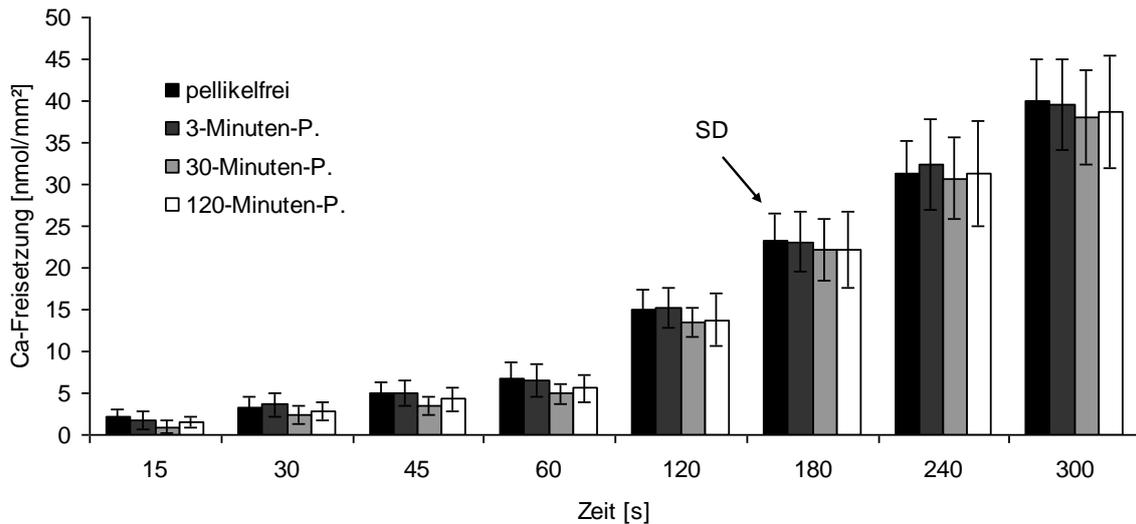


Abb. 7: Mittlere kumulative Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,6 und einer Pellikelbildungszeit von 3 min (dargestellt als dunkelgraue Säule), 30 min (dargestellt als hellgraue Säule) und 120 min (dargestellt als weiße Säule). Die Werte für die pellicelfreien Schmelzproben sind durch die schwarze Säule dargestellt. SD = Standardabweichung.

Bei Salzsäure von pH 2,6 wurde zum initialen Messzeitpunkt  $t = 15$  s aus den pellicelfreien Schmelzproben ( $2,2 \text{ nmol/mm}^2$ ) tendenziell etwas mehr Kalzium erodiert, als aus den Proben mit der 30- und 120-min-Pellikel ( $1,0 \text{ nmol/mm}^2$ , bzw.  $1,5 \text{ nmol/mm}^2$ ). Die Kalzium-Freisetzung aus den Proben mit der 3-min-Pellikel glich über den gesamten Messzeitraum von 300 s etwa der Kalzium-Freisetzung aus den pellicelfreien Proben. Die Kalzium-Freisetzung aus Proben mit der 30-min-Pellikel und aus Proben mit der 120-min-Pellikel waren über den gesamten Messzeitraum von 300 s geringer ausgeprägt als die Kalzium-Freisetzung aus pellicelfreien, bzw. aus Proben mit 3-min-Pellikel. Jedoch wurde aus Schmelzproben mit der 30-min-Pellikel praktisch genau so viel Kalzium erodiert wie aus Proben mit einer oralen Expositionszeit von 120 min. Ein ausgeprägter Unterschied zwischen einer Pellikelbildungszeit von 30 min und einer Pellikelbildungszeit von 120 min war bei Salzsäure von pH 2,6 nicht erkennbar. Auch bei Inkubation von Salzsäure mit pH 2,6 muss festgehalten werden, dass nur geringe Unterschiede zwischen pellicelfreien und pellicelbedeckten Proben bestanden. Ab einem Messzeitpunkt von  $t = 120$  s waren kaum noch Unterschiede in der Kalzium-Freisetzung zwischen den verschiedenen Pellikelbildungszeiten zu erkennen.

#### 4.6 Kalzium-Freisetzung pro Minute aus pellicelfreien und pellicelbedeckten Schmelzproben unter dem Einfluss von Salzsäure unterschiedlicher Konzentration

Die kumulative Kalzium-Freisetzung in Abhängigkeit der Einwirkdauer von Salzsäure zeigte innerhalb des Messzeitraums von 5 min sowohl bei pellicelfreien, als auch bei pellicelbedeckten Schmelzproben einen deutlichen Anstieg. Daher wurde die Kalzium-Freisetzung pro Minute als Steigung berechnet. Bei diesen Werten handelt es sich um die errechnete mittlere Kalzium-Freisetzung pro Minute als Steigung der Geraden zu den einzelnen Messzeitpunkten. In den Abbildungen 8, 9 und 10 ist die erosive Kalzium-Freisetzung pro Minute unter dem Einfluss von Salzsäure auf pellicelfreie und pellicelbedeckte Schmelzproben dargestellt. Salzsäure wurde in drei unterschiedlichen Konzentrationen (pH 2,0/2,3/2,6) untersucht. Für jede Säure-Konzentration wurde die erosive Wirkung auf pellicelfreie und pellicelbedeckte Schmelzproben evaluiert. Die unterschiedlichen Pellicelbildungszeiten betragen 3, 30 und 120 min.

Bei Betrachtung aller pH-Werte wurden gewisse Tendenzen beobachtet. Während der ersten 15 s war die Kalzium-Freisetzung pro Minute bei den pellicelfreien Schmelzproben stets höher als bei den pellicelbedeckten Prüfkörpern. Der initiale Schutzeffekt zum Zeitpunkt  $t = 15$  s war bei pH 2,6 am größten und bei pH 2,0 am geringsten ausgeprägt. Bei pH 2,0 und pH 2,3 war dieser leichte protektive Effekt der Pellicel auch abhängig von der jeweiligen Pellicelbildungszeit. Bei pH 2,6 schien die Pellicelbildungszeit ab  $t = 30$  s keinen direkten Einfluss auf die Schutzfunktion der Pellicel zu haben. Während der ersten 60 s war bei allen pH-Werten, insbesondere bei pH 2,0 und 2,3, die Kalzium-Freisetzung pro Minute deutlich geringer als nach 2 bis 5 min. Die Kalzium-Freisetzung pro Minute war also eindeutig zeitabhängig. Die Pellicel zeigte insbesondere in der initialen Phase der Säureinkubation protektive Effekte, die jedoch nach 1 bis 2 min Säureeinwirkzeit nachließen.

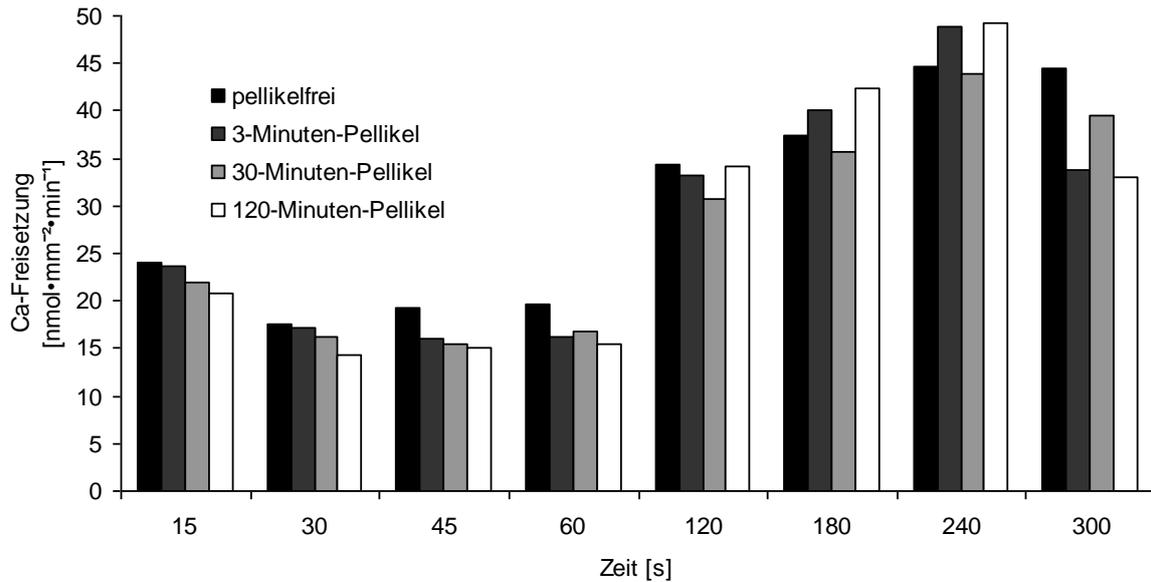


Abb. 8: *Mittlere Kalzium-Freisetzung pro Minute [ $\text{nmol}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ ] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,0 und einer Pellikelbildungszeit von 3 min (dargestellt als dunkelgraue Säule), 30 min (dargestellt als hellgraue Säule) und 120 min (dargestellt als weiße Säule). Die Werte für die pellikelfreien Schmelzproben sind durch die schwarze Säule dargestellt.*

Aus den pellikelfreien Schmelzproben wurde bei pH 2,0 zum initialen Messzeitpunkt  $t = 15$  s mehr Kalzium pro Minute erodiert als aus den pellikelbedeckten Proben. Aus den pellikelfreien Proben löste sich initial  $24,0 \text{ nmol}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ , aus den Proben mit der 3-min-Pellikel  $23,6$ , aus den Proben mit der 30-min-Pellikel  $22,0$  und aus den Proben mit der 120-min-Pellikel  $20,8 \text{ nmol}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Diese Tendenz blieb bis zum Zeitpunkt  $t = 60$  s erhalten, wobei aus den Proben mit der 120-min-Pellikel immer am wenigsten Kalzium pro Minute gelöst wurde. Innerhalb des Messzeitraumes  $t = 15$  s bis  $t = 60$  s war die Kalzium-Freisetzung zudem abhängig von der Pellikelbildungszeit. Aus den Proben mit der 3-min-Pellikel wurde tendenziell mehr Kalzium pro Minute erodiert als aus den Proben mit der 30-min-Pellikel. Die 120-min-Pellikel schien bei pH 2,0 bis zu einem Messzeitpunkt von  $t = 60$  s den größten protektiven Effekt gegenüber erosiven Veränderungen durch Salzsäure zu besitzen.

Bereits ab einem Messzeitpunkt von  $t = 120$  s waren diese Tendenzen jedoch nicht mehr feststellbar. Die Kalzium-Freisetzung pro Minute war bei pH 2,0 in den ersten 60 s deutlich geringer als nach 2 bis 5 min. Ab einem Messzeitpunkt von  $t = 60$  s nahm die Kalzium-Freisetzung pro Minuten stetig zu und erreichte bei  $t = 240$  s ein Maximum.

Die pellikel-assoziierten Effekte auf die Kalzium-Freisetzung pro Minute waren also insbesondere initial zu beobachten. Mit Zunahme der Inkubationszeit verlor dieser Pellikel-Effekt an Wirkung.

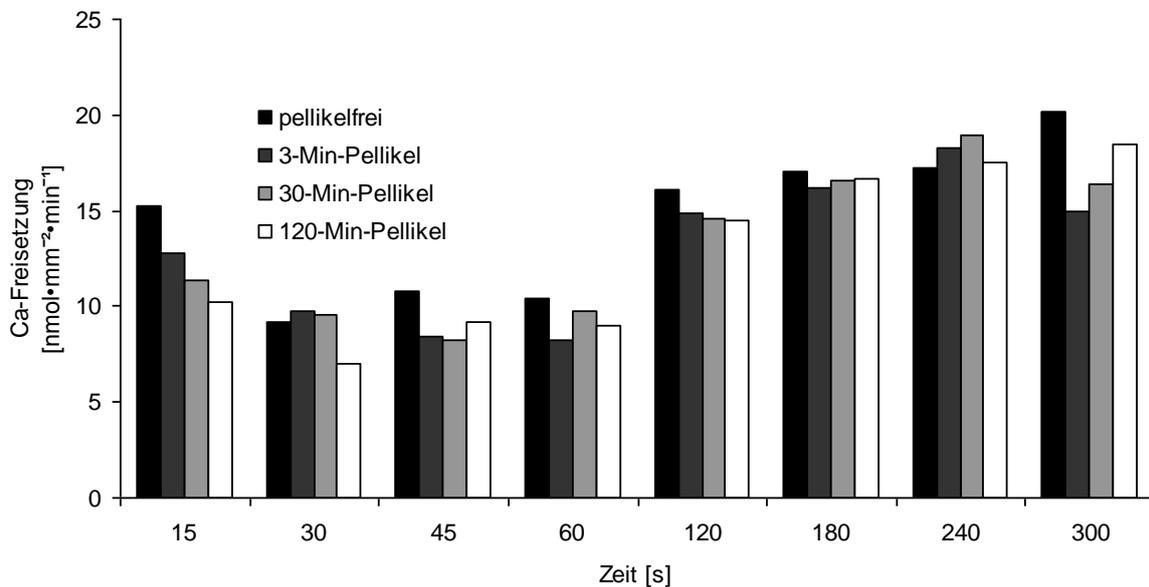


Abb. 9: *Mittlere Kalzium-Freisetzung pro Minute [nmol•mm<sup>-2</sup>•min<sup>-1</sup>] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,3 und einer Pellicelbildungszeit von 3 min (dargestellt als dunkelgraue Säule), 30 min (dargestellt als hellgraue Säule) und 120 min (dargestellt als weiße Säule). Die Werte für die pellikelfreien Schmelzproben sind durch die schwarze Säule dargestellt.*

Bei einem pH-Wert von 2,3 wurde zum Zeitpunkt  $t = 15 \text{ s}$  aus den pellikelfreien Schmelzproben mit  $15,2 \text{ nmol}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$  deutlich mehr Kalzium pro Minute erodiert als aus den pellikelbedeckten Proben. Die Proben mit einer intraoralen Expositionszeit von 120 min wiesen mit  $10,2 \text{ nmol}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$  die geringste Kalzium-Freisetzung pro Minute zum Zeitpunkt  $t = 15 \text{ s}$  auf. Tendenziell war auch über den gesamten Messzeitraum von 5 min die Kalzium-Freisetzung pro Minute aus den pellikelbedeckten Proben geringer als aus den pellikelfreien. Die Abhängigkeit des protektiven Effektes der Pellicel von der Pellicelbildungszeit war bei pH 2,3 geringer als bei pH 2,0. Auch bei pH 2,3 war insbesondere in der initialen Phase der Säureinkubation tendenziell ein protektiver Effekt der Pellicel zu beobachten, der jedoch mit Zunahme der Inkubationszeit nicht mehr nachweisbar war.

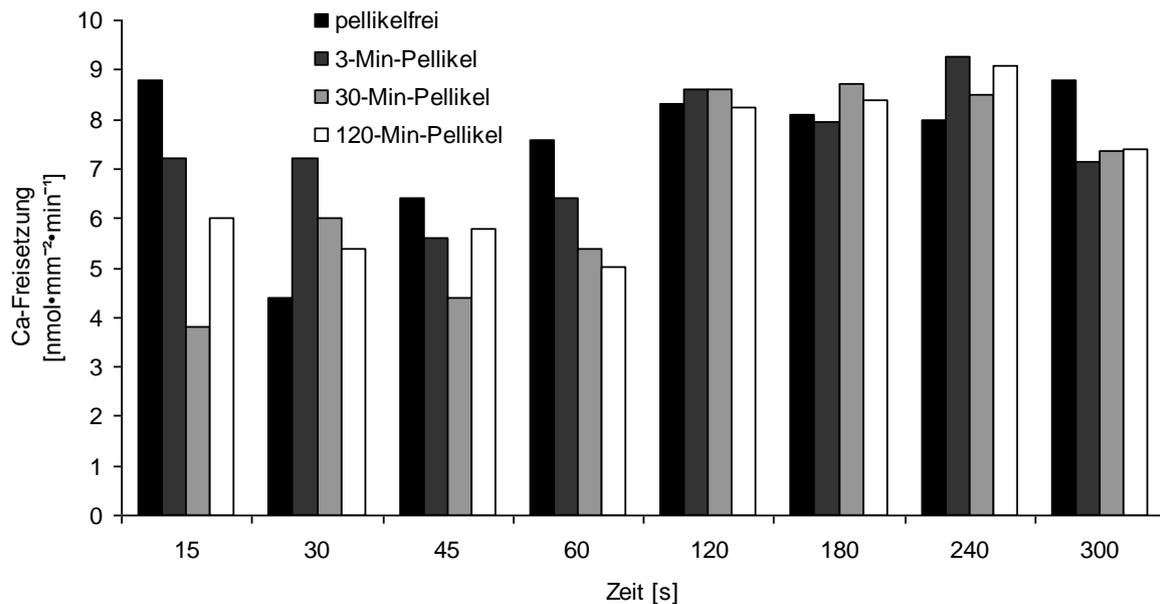


Abb. 10: *Mittlere Kalzium-Freisetzung pro Minute [ $\text{nmol}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ ] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,6 und einer Pellikelbildungszeit von 3 min (dargestellt als dunkelgraue Säule), 30 min (dargestellt als hellgraue Säule) und 120 min (dargestellt als weiße Säule). Die Werte für die pellicelfreien Schmelzproben sind durch die schwarze Säule dargestellt.*

Bei pH 2,6 war die Kalzium-Freisetzung pro Minute im Vergleich zu den pH-Werten 2,0 und 2,3 am geringsten. Zum Messzeitpunkt  $t = 15$  s betrug die Kalzium-Freisetzung pro Minute aus pellicelfreien Schmelzproben  $8,8 \text{ nmol}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$  und war bei den pellicelbedeckten Proben mit  $7,2 \text{ nmol}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$  für die 3-Minuten-Pellikel,  $3,8 \text{ nmol}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$  für die 30-min-Pellikel und  $6,0 \text{ nmol}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$  für die 120-min-Pellikel deutlich geringer. Bei pH 2,6 war der Anstieg der Kalzium-Freisetzung pro Minute nach den ersten 60 s der Inkubationszeit nicht so ausgeprägt wie bei pH 2,0 und 2,3. Eine Abhängigkeit der Kalzium-Freisetzung pro Minute von der Pellikelbildungszeit war bei pH 2,6 tendenziell nicht festzustellen. Ein protektiver Effekt der Pellikel konnte bei pH 2,6 tendenziell nur nach initialer Säureinkubationszeit von 15 s beobachtet werden. Mit Zunahme der Inkubationszeit konnten diese protektiven Effekte nicht mehr nachgewiesen werden.

Die Kalzium-Freisetzung pro Minute bei den einzelnen pH-Werten wurde auch separat für die bukkalen und palatinalen Expositionsorte evaluiert. Es wurden keine ausgeprägten

Unterschiede zwischen den bukkal, bzw. palatinal lokalisierten Schmelzproben festgestellt. Ebenso war der protektive Effekt der Pellikel nach 15 s Expositionszeit im sauren Medium am größten. Exemplarisch ist die Kalzium-Freisetzung bukkaler und palatinaler Proben in Abbildung 11 und 12 für pH 2,0 dargestellt. Die Graphiken für die pH-Werte 2,3 und 2,6 befinden sich im Datenanhang (s. Kap. 8.4, Abb. 30-33).

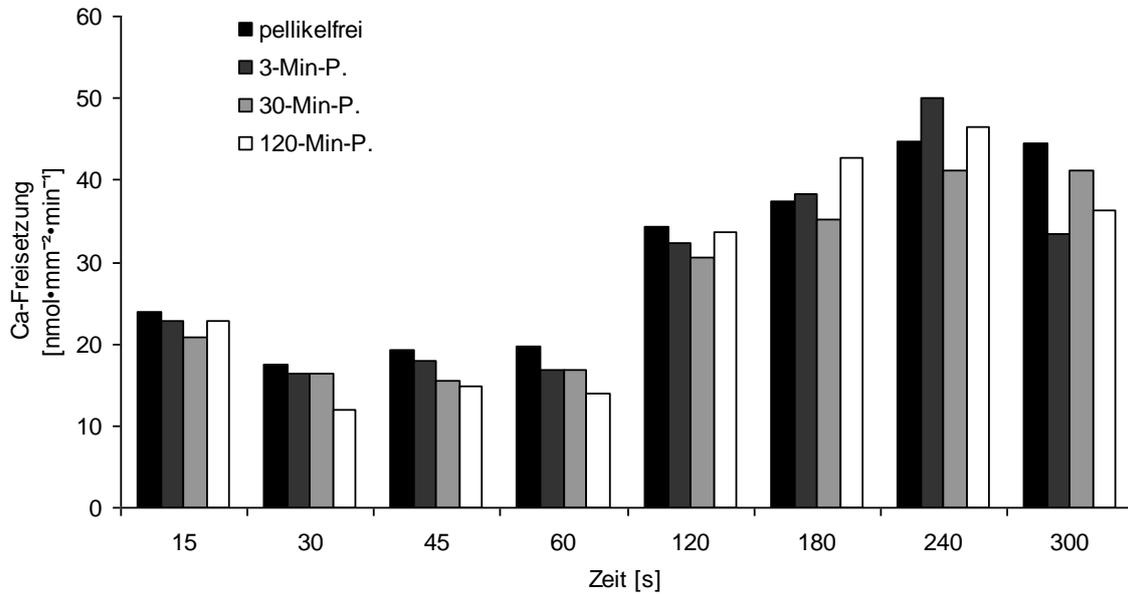


Abb. 11: Mittlere Kalzium-Freisetzung pro Minute  $[\text{nmol}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}]$  aus bukkalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,0 und einer Pellikelbildungszeit von 3 min (dargestellt als dunkelgraue Säule), 30 min (dargestellt als hellgraue Säule) und 120 min (dargestellt als weiße Säule). Die Werte für die pellikelfreien Schmelzproben sind durch die schwarze Säule dargestellt.

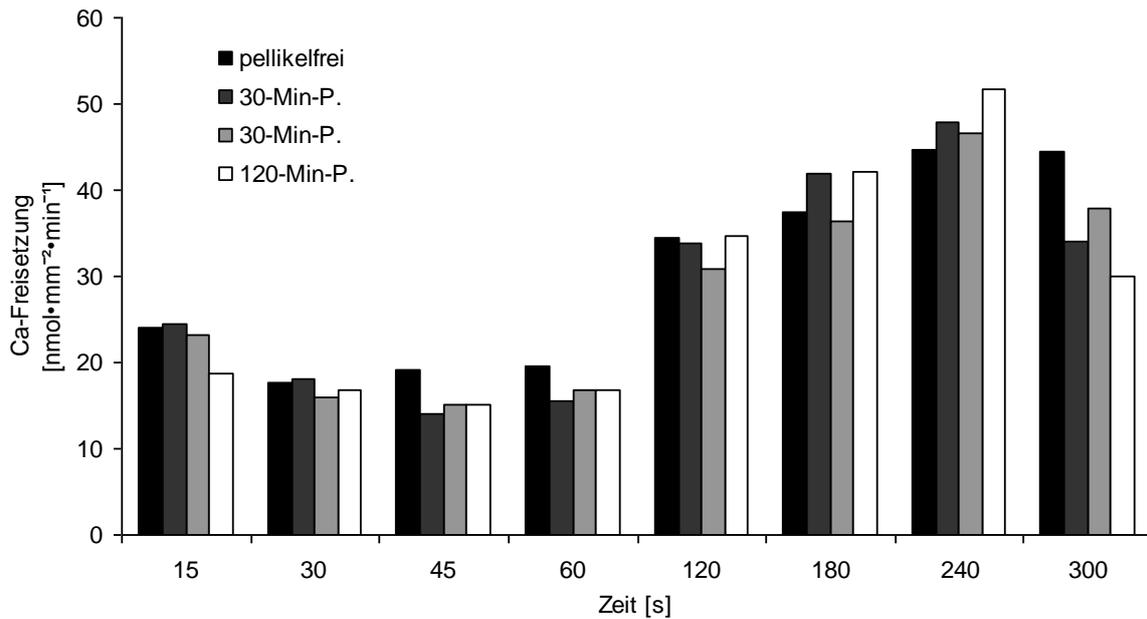


Abb. 12: *Mittlere Kalzium-Freisetzung pro Minute [nmol·mm<sup>-2</sup>·min<sup>-1</sup>] aus palatinalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,0 und einer Pellikelbildungszeit von 3 min (dargestellt als dunkelgraue Säule), 30 min (dargestellt als hellgraue Säule) und 120 min (dargestellt als weiße Säule). Die Werte für die pellikelfreien Schmelzproben sind durch die schwarze Säule dargestellt.*

#### 4.7 Kumulative Kalzium-Freisetzung aus Schmelz: Statistische Auswertung ausgewählter Säureexpositionszeiten

Für die ausgewählten Säureexpositionszeiten von 15, 60, 120 und 300 s erfolgte eine statistische Auswertung (ANOVA), um den protektiven Effekt der Pellikel zu erfassen. Ergab die Varianzanalyse einen signifikanten Einfluss der Pellikel (ANOVA  $p < 0,005$ ), erfolgte der ergänzende paarweise Vergleich mit der Scheffé-Prozedur.

#### 4.7.1 Statistische Auswertung der kumulativen Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure bei einer Säureexpositionszeit von 15 Sekunden

Die Gegenüberstellung der kumulativen Kalzium-Freisetzung unter dem Einfluss von Salzsäure mit den pH-Werten 2,0, 2,3 und 2,6 für die initiale Säureexpositionszeit von 15 s ist in Abbildung 13 dargestellt, die Ergebnisse der statistischen Auswertung finden sich im Datenanhang (s. Kap. 8.4, Tab. 7 - 9).

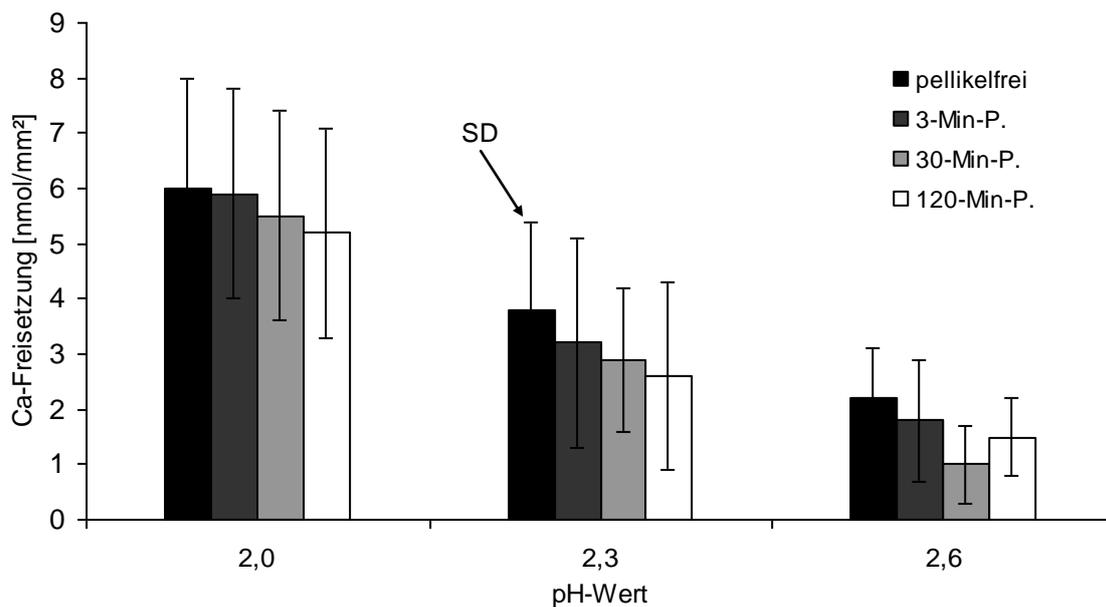


Abb 13: Messzeitpunkt  $t = 15$  s: Mittlere kumulative Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure mit dem pH-Wert von 2,0, 2,3 und 2,6 und unterschiedlichen Pellikelbildungszeiten. SD = Standardabweichung.

Die verschiedenen Pellikelbildungszeiten hatten bei pH 2,0 keinen signifikanten Einfluss auf die Kalzium-Freisetzung (ANOVA  $p = 0,377$ ). Bei Betrachtung der Werte ist jedoch eine tendenzielle Abhängigkeit der Kalzium-Freisetzung von der Pellikelbildungszeit erkennbar. Die mittlere Reduktion des Kalzium-Verlustes aus pellicelbedeckten Schmelzproben im Vergleich zu pellicelfreien Proben betrug bei der 3-min-Pellikel 3,3 %, bei der 30-min-Pellikel 8,3 % und bei der 120-min-Pellikel 13,7 % (s. Tab. 3).

<b>15 s</b>	<b>3-min-Pellikel</b>	<b>30-min-Pellikel</b>	<b>120-min-Pellikel</b>
<b>pH 2,0</b>	3,3	8,3	13,7
<b>pH 2,3</b>	16,3	25,0	34,2
<b>pH 2,6</b>	17,7	57,7	31,8

*Tab. 3: Messzeitpunkt  $t = 15$  s: Mittlere Reduktion der Kalzium-Freisetzung aus pellikelbedeckten Schmelzproben im Vergleich zu pellikelfreien Referenzproben in Prozent.*

Bei pH 2,3 hatte die Pellikel demgegenüber einen signifikanten Einfluss auf die Kalzium-Freisetzung (ANOVA  $p = 0,012$ ). Der ergänzende paarweise Vergleich ergab signifikante Unterschiede zwischen den Pellikelbildungszeiten. So unterschied sich der Wert für die kumulative Kalzium-Freisetzung aus Proben mit der 120-min-Pellikel signifikant von allen anderen Pellikelbildungszeiten (Scheffé-Prozedur  $p = 0,020$ ). Die mittlere Reduktion des Kalzium-Verlustes gegenüber pellikelfreien Proben betrug 16,3 % bei der 3-min-Pellikel, 25,0 % bei der 30-min-Pellikel und 34,2 % bei der 120-min-Pellikel (s. Tab. 3).

Bei pH 2,6 hatte die Pellikel ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf die Kalzium-Freisetzung (ANOVA  $p < 0,001$ ). Der ergänzende paarweise Vergleich ergab signifikante Unterschiede zwischen den Pellikelbildungszeiten. Der Unterschied zwischen pellikelfreien Proben und der 3-min-Pellikel war nicht signifikant. Demgegenüber war der Unterschied zwischen den pellikelfreien Proben und der 30-min-Pellikel, bzw. zwischen den pellikelfreien Proben und der 120-min-Pellikel signifikant ( $p < 0,001$ , bzw.  $p < 0,05$ ). Weiterhin war der Unterschied zwischen der 30- und der 120-min-Pellikel signifikant ( $p = 0,022$ ). Aus Proben mit der 30-min-Pellikel wurde die niedrigste Kalzium-Freisetzung gemessen. In Anwesenheit der 3-min-Pellikel wurde im Mittel 17,7 % weniger Kalzium aus den Proben erodiert als aus den pellikelfreien Proben. Bei der 30-min-Pellikel betrug diese Reduktion 57,7 %, bei der 120-min-Pellikel 31,8 % (s. Tab. 3).

#### 4.7.2 Statistische Auswertung der kumulativen Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure bei einer Säureexpositionszeit von 60 Sekunden

Die Gegenüberstellung der kumulativen Kalzium-Freisetzung unter dem Einfluss von Salzsäure mit den pH-Werten 2,0, 2,3 und 2,6 für die Säureexpositionszeit von 60 s ist in Abbildung 14 dargestellt, die Ergebnisse der statistischen Auswertung finden sich im Datenanhang (s. Kap. 8.4, Tab. 10 - 12).

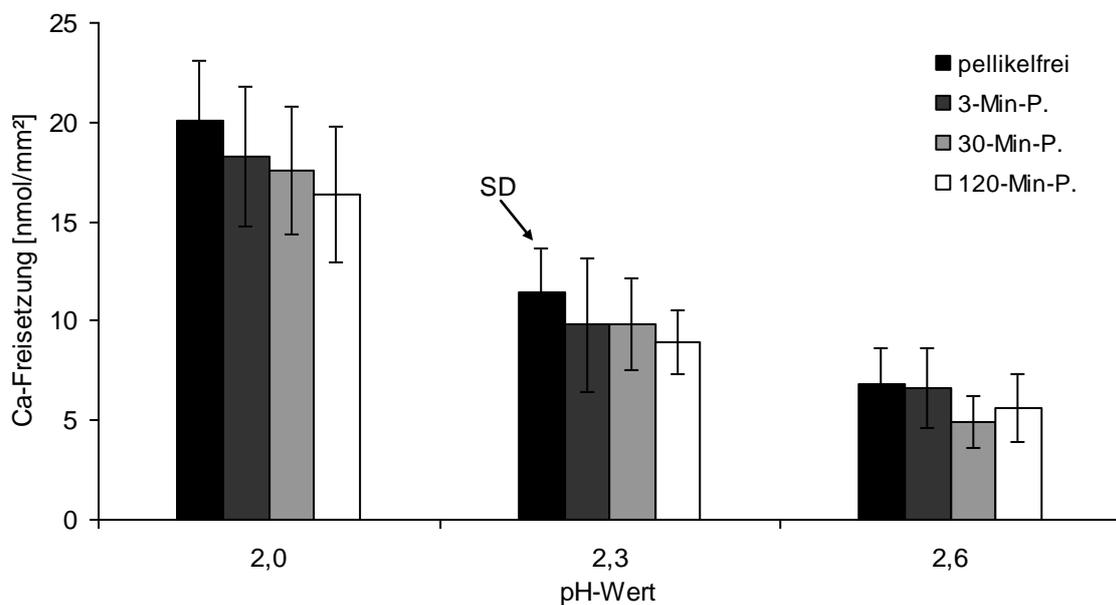


Abb 14: Messzeitpunkt  $t = 60$  s: Mittlere kumulative Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure mit dem pH-Wert von 2,0, 2,3 und 2,6 und unterschiedlichen Pellikelbildungszeiten. SD = Standardabweichung.

Bei pH 2,0 hatte die Pellikel zum Messzeitpunkt  $t = 60$  s einen signifikanten Einfluss auf die Kalzium-Freisetzung (ANOVA  $p = 0,003$ ). Der ergänzende paarweise Vergleich ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der 120-min-Pellikel und den pellicelfreien Proben. Die Kalzium-Freisetzung aus Proben mit 3-min-, bzw. 30-min-Pellikel unterschied sich nicht signifikant von der Kalzium-Freisetzung aus pellicelfreien Proben. Tendenziell war eine Abhängigkeit der Kalzium-Freisetzung von der Pellikelbildungszeit erkennbar. Bezogen auf die pellicelfreien Kontroll-Proben zeigte die 3-min-Pellikel eine Reduktion der Kalzium-Freisetzung von 9,1 %, die 30-min-Pellikel von 12,5 % und die 120-min-Pellikel von 18,5 % (s. Tab. 4).

<b>60 s</b>	<b>3-min-Pellikel</b>	<b>30-min-Pellikel</b>	<b>120-min-Pellikel</b>
<b>pH 2,0</b>	9,1	12,5	18,5
<b>pH 2,3</b>	14,2	14,2	22,8
<b>pH 2,6</b>	3,4	27,9	19,1

*Tab.4: Messzeitpunkt  $t = 60$  s: Mittlere Reduktion der Kalzium-Freisetzung aus pellikelbedeckten Schmelzproben im Vergleich zu pellikelfreien Referenz-Proben in Prozent.*

Auch bei pH 2,3 hatte die Pellikel einen signifikanten Einfluss auf die Kalzium-Freisetzung (ANOVA  $p < 0,05$ ). Die Kalzium-Freisetzung aus Schmelzproben mit der 3-min- und der 30-min-Pellikel war nicht signifikant geringer als die aus pellikelfreien Proben. Allerdings wurde aus den Proben mit der 120-min-Pellikel signifikant weniger Kalzium erodiert als aus den pellikelfreien Proben (Scheffé-Prozedur  $p = 0,004$ ). Die mittlere Reduktion der Kalzium-Freisetzung gegenüber pellikelfreien Kontroll-Proben betrug für die 3-min-Pellikel 14,2 %, für die 30-min-Pellikel 14,2 % und für die 120-min-Pellikel 22,8 % (s. Tab. 4).

Bei pH 2,6 war ebenfalls ein signifikanter Einfluss der Pellikel auf das Ausmaß der Erosion erkennbar (ANOVA  $p < 0,001$ ). Die Kalzium-Freisetzung aus Proben mit der 30-min-Pellikel war signifikant geringer als die Kalzium-Freisetzung aus pellikelfreien Proben. Demgegenüber unterschieden sich die Werte der 3-min-Pellikel bzw. 120-min-Pellikel nicht signifikant von den Werten der pellikelfreien Proben. Die mittlere Reduktion des Kalzium-Verlustes aus pellikelbedeckten Schmelzproben im Vergleich zu pellikelfreien Proben betrug bei der 3-min-Pellikel 3,4 %, bei der 30-min-Pellikel 27,9 % und bei der 120-min-Pellikel 19,1 %. (s. Tab. 4).

Während der prozentual ermittelte protektive Effekt der Pellikel bei pH 2,0 vom Messzeitpunkt  $t = 15$  s bis  $t = 60$  s zunahm (s. Abb. 15), nahm er bei pH 2,3 und pH 2,6 bereits nach dem Messzeitpunkt  $t = 15$  s ab (s. Abb. 16 und Abb. 17).

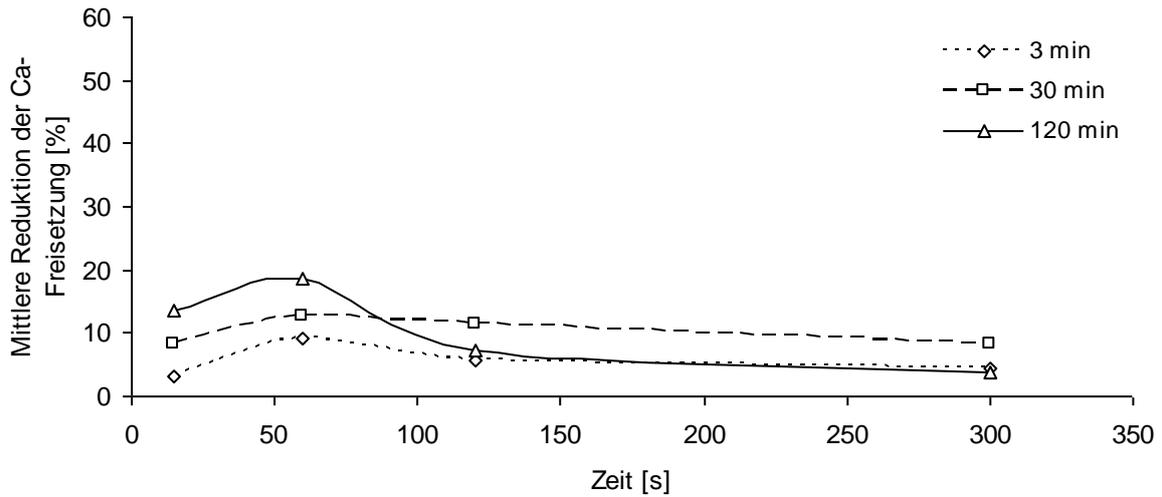


Abb. 15: pH 2,0: Mittlere Reduktion der Kalzium-Freisetzung aus pellikelbedeckten Schmelzproben mit Pellikelbildungszeiten von 3, 30 und 120 min im Vergleich zu pellikelfreien Kontrollproben.

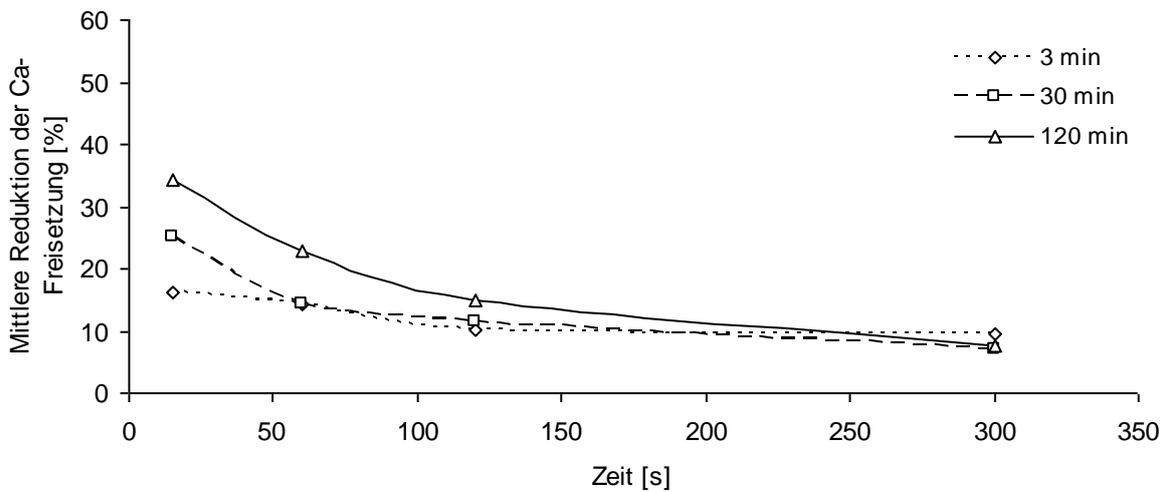


Abb. 16: pH 2,3: Mittlere Reduktion der Kalzium-Freisetzung aus pellikelbedeckten Schmelzproben mit Pellikelbildungszeiten von 3, 30 und 120 min im Vergleich zu pellikelfreien Kontrollproben.

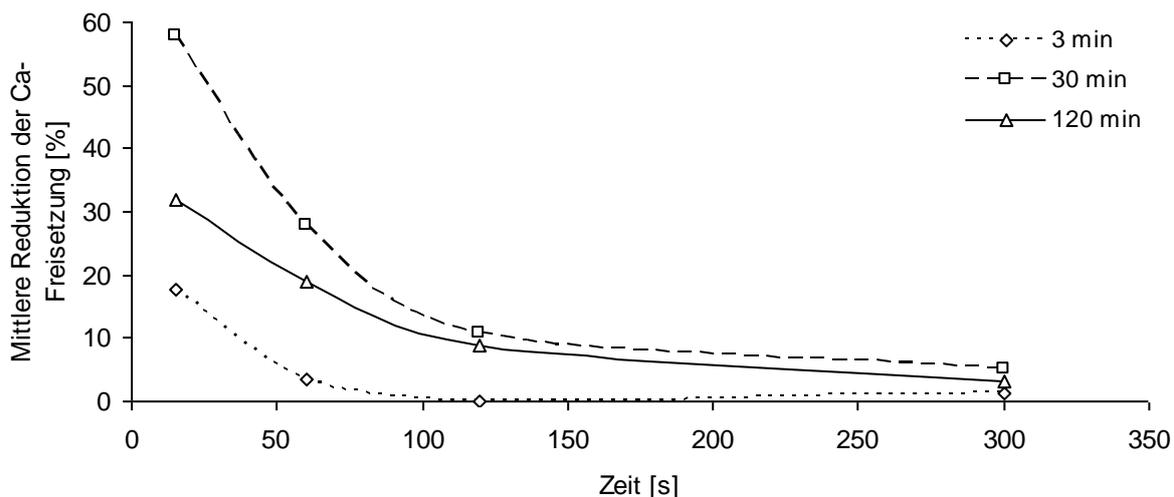


Abb. 17: *pH 2,6: Mittlere Reduktion der Kalzium-Freisetzung aus pellikelbedeckten Schmelzproben mit Pellikelbildungszeiten von 3, 30 und 120 min im Vergleich zu pellikelfreien Kontrollproben.*

#### 4.7.3 Statistische Auswertung der kumulativen Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure bei einer Säureexpositionszeit von 120 Sekunden

Die Gegenüberstellung der kumulativen Kalzium-Freisetzung unter dem Einfluss von Salzsäure mit den pH-Werten 2,0, 2,3 und 2,6 für die Säureexpositionszeit von 120 s ist in Abbildung 18 dargestellt, die Ergebnisse der statistischen Auswertung finden sich im Datenanhang (s. Kap. 8.4, Tab. 13 - 15).

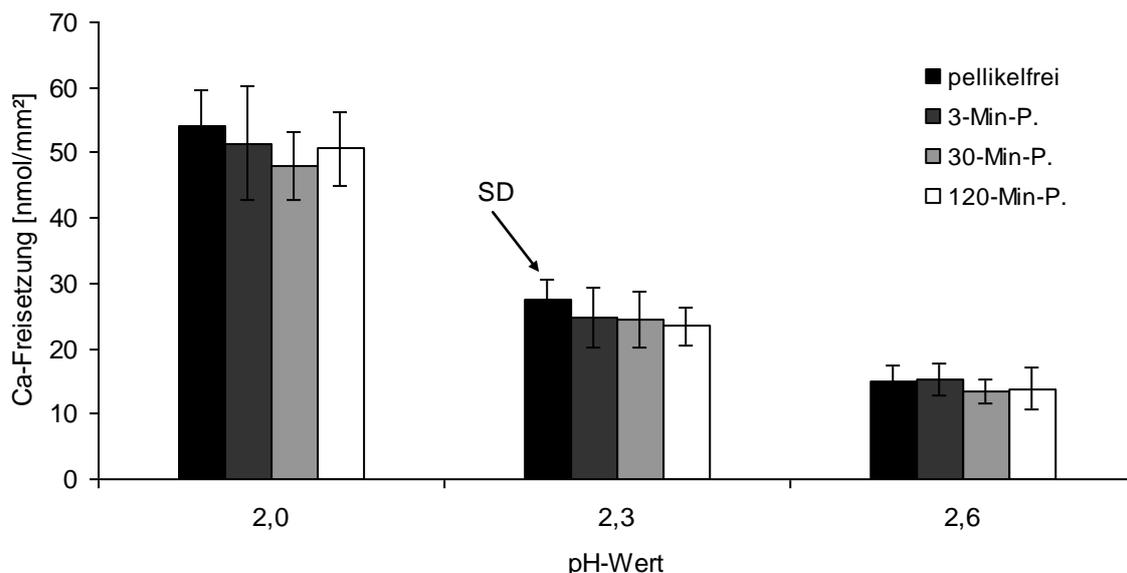


Abb 18: Messzeitpunkt  $t = 120$  s: Mittlere kumulative Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure mit dem pH-Wert von 2,0, 2,3 und 2,6 und unterschiedlichen Pellikelbildungszeiten. SD = Standardabweichung.

Bei pH 2,0 hatte die Pellikel bei einer Säureinkubationszeit von 120 s einen signifikanten Einfluss auf die Kalzium-Freisetzung (ANOVA  $p = 0,036$ ). Der sich anschließende paarweise Vergleich ergab einen signifikanten Unterschied der 30-min-Pellikel zu den pellikelfreien Kontroll-Proben (Scheffé-Prozedur  $p = 0,044$ ). Die Kalzium-Freisetzung aus Schmelzproben mit 3-min-Pellikel und 120-min-Pellikel unterschied sich nicht signifikant von pellikelfreien Proben.

Die Reduktion des Kalzium-Verlustes aus pellikelbedeckten Schmelzproben im Vergleich zu pellikelfreien Proben betrug bei der 3-min-Pellikel 5,7 %, bei der 30-min-Pellikel 11,4 % und bei der 120-min-Pellikel 7,2 % (s. Tab. 5). Während bei pH 2,0 zunächst eine Zunahme des protektiven Effekts der Pellikel bei allen Pellikelbildungszeiten nach  $t = 15$  s zu beobachten war, wurde ab dem Messzeitpunkt  $t = 120$  s ein Nachlassen der protektiven Wirkung der Pellikel festgestellt (s. Abb. 15).

<b><u>120 s</u></b>	<b>3-min-Pellikel</b>	<b>30-min-Pellikel</b>	<b>120-min-Pellikel</b>
<b>pH 2,0</b>	5,7	11,4	7,2
<b>pH 2,3</b>	10,2	11,4	15,0
<b>pH 2,6</b>	0,0	10,6	8,7

*Tab. 5: Messzeitpunkt  $t = 120$  s: Mittlere Reduktion der Kalzium-Freisetzung aus pellikelbedeckten Schmelzproben im Vergleich zu pellikelfreien Referenz-Proben in Prozent.*

Bei pH 2,3 hatte die Pellikel ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf die Kalzium-Freisetzung (ANOVA  $p = 0,004$ ). Tendenziell war eine Abhängigkeit der Kalzium-Freisetzung von der Pellikelbildungszeit zu erkennen. Während sich die Werte für die 3-min-Pellikel nicht signifikant von denen der pellikelfreien Proben unterschieden, war der Unterschied zwischen den pellikelfreien Proben und der 30-min-Pellikel bzw. 120-min-Pellikel signifikant. Aus Proben mit einer 120-min-Pellikel wurde am wenigsten Kalzium erodiert.

Bezogen auf die pellikelfreien Kontroll-Proben zeigte die Pellikel eine mittlere Reduktion der Kalzium-Freisetzung von 10,2 %, 11,4 % und 15,0 % für die 3-, 30- und 120-min-Pellikel (s. Tab. 5). Beim Vergleich dieser Prozentangaben mit den Werten des Messzeitpunktes  $t = 60$  s war bei pH 2,3 ein kontinuierliches Nachlassen der anti-erosiven Kapazität der Pellikel zu beobachten (s. Abb. 16).

Auch bei pH 2,6 konnte ein signifikanter Unterschied zwischen pellikelfreien und pellikelbedeckten Proben aufgezeigt werden (ANOVA  $p = 0,009$ ). Der ergänzende paarweise Vergleich ergab, dass sich der Wert für die 30-min-Pellikel signifikant von den Werten der pellikelfreien Proben und 3-min-Pellikel, aber nicht von denen der 120-min-Pellikel unterschied. Aus den Proben mit der 30-min-Pellikel wurde am wenigsten Kalzium erodiert.

Die mittlere Reduktion des Kalzium-Verlustes aus pellikelbedeckten Schmelzproben im Vergleich zu pellikelfreien Proben betrug bei der 3-min-Pellikel 0,0 %, bei der 30-min-Pellikel 10,6 % und bei der 120-min-Pellikel 8,7 % (s. Tab. 5). Auch hier war (wie bei pH 2,0 und 2,3) ein weiteres Nachlassen der protektiven Funktion der Pellikel, bezogen auf den Messzeitpunkt  $t = 60$  s, feststellbar (s. Abb. 17).

#### 4.7.4 Statistische Auswertung der kumulativen Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure bei einer Säureexpositionszeit von 300 Sekunden

Die Gegenüberstellung der kumulativen Kalzium-Freisetzung unter dem Einfluss von Salzsäure mit den pH-Werten 2,0, 2,3 und 2,6 für die Säureexpositionszeit von 300 s ist in Abbildung 19 dargestellt, die Ergebnisse der statistischen Auswertung finden sich im Datenanhang (s. Kap. 8.4, Tab. 16 - 18).

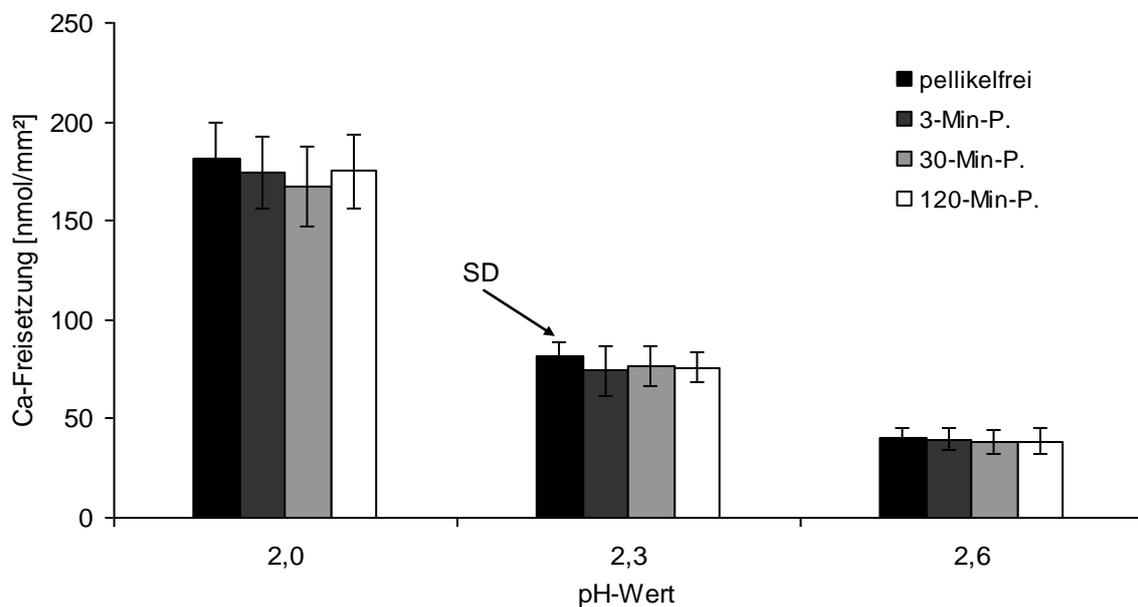


Abb 19: Messzeitpunkt  $t = 300$  s: Mittlere kumulative Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure mit dem pH-Wert von 2,0, 2,3 und 2,6 und unterschiedlichen Pellikelbildungszeiten. SD = Standardabweichung.

Bei pH 2,0 und einer Säureexpositionszeit von 300 s hatte die Pellikel keinen signifikanten Einfluss auf die Kalzium-Freisetzung. Die mittlere Reduktion des Kalzium-Verlustes aus pellicelbedeckten Schmelzproben im Vergleich zu pellicelbedeckten Proben betrug bei der 3-min-Pellikel 4,3 %, bei der 30-min-Pellikel 8,2 % und bei der 120-min-Pellikel 3,7 % (s. Tab. 6). Im Vergleich zum Messzeitpunkt  $t = 120$  s ist auch hier eine weitere Reduktion des anti-erosiven Potentials der Pellikel zu erkennen (s. Abb. 15).

Eine tendenzielle Abhängigkeit der Kalzium-Freisetzung von der Pellikelbildungszeit ist bei einem Messzeitpunkt von  $t = 300$  s nicht mehr nachweisbar.

<b>300 s</b>	<b>3-min-Pellikel</b>	<b>30-min-Pellikel</b>	<b>120-min-Pellikel</b>
<b>pH 2,0</b>	4,3	8,2	3,7
<b>pH 2,3</b>	9,6	7,0	7,7
<b>pH 2,6</b>	1,2	4,9	3,3

Tab. 6: *Messzeitpunkt  $t = 300$  s: Mittlere Reduktion der Kalzium-Freisetzung aus pellikelbedeckten Schmelzproben im Vergleich zu pellikelfreien Referenzproben in Prozent.*

Auch bei pH 2,3 unterschieden sich die verschiedenen Pellikelbildungszeiten nicht signifikant voneinander (ANOVA  $p = 0,06$ ). Die Pellikel hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Kalzium-Freisetzung.

Die mittlere Reduktion des Kalzium-Verlustes aus pellikelbedeckten Proben im Vergleich zu pellikelfreien Proben betrug bei der 3-min-Pellikel 9,6 %, bei der 30-min-Pellikel 7,0 % und bei der 120-min-Pellikel 7,7 % (s. Tab. 6).

Wie bei pH 2,0 und 2,3 hatte die Pellikel auch bei pH 2,6 keinen signifikanten Einfluss auf die Kalzium-Freisetzung (ANOVA  $p = 0,611$ ). Es wurde aus den pellikelfreien Kontrollproben so viel Kalzium erodiert wie aus den pellikelbedeckten Proben. Die mittlere Reduktion des Kalzium-Verlustes aus pellikelbedeckten Proben im Vergleich zu pellikelfreien Proben betrug bei der 3-min-Pellikel 1,2 %, bei der 30-min-Pellikel 4,9 % und bei der 120-min-Pellikel 3,3 % (s. Tab. 6).

#### 4.8 Kinetik der Kalzium-Freisetzung aus Schmelz und Dentin unter dem Einfluss von Salzsäure mit pH 2,3 aus pellikelfreien und pellikelbedeckten Proben

In Zusatzversuchen wurde die Kalzium-Freisetzung aus Dentin unter dem Einfluss von Salzsäure mit pH 2,3 aus pellikelfreien und pellikelbedeckten Dentinproben über einen Zeitraum von 270 s ermittelt. Eine Unterscheidung hinsichtlich des Pellikelbildungsortes wurde bei den Dentinproben nicht vorgenommen. Die Pellikelbildungszeit betrug 120 min. Die Kinetiken für die kumulative Kalzium-Freisetzung aus Dentin- und Schmelzproben sind

in Abbildung 20 dargestellt. Salzsäure mit einem pH-Wert von 2,3 führte bei pellikelfreien und pellikelbedeckten Dentinproben zu einer stärkeren Kalzium-Freisetzung als aus den pellikelfreien und pellikelbedeckten Schmelzproben. Aus den pellikelfreien Dentinproben wurde mehr Kalzium erodiert als aus den pellikelbedeckten Proben. Die kumulative Kalzium-Freisetzung aus Dentin war, wie auch aus Schmelz, deutlich zeitabhängig.

Der protektive Effekt der *In-situ*-Pellikel mit einer Bildungszeit von 120 min war bei der Säureinkubation der Dentinproben stärker ausgeprägt als bei den Schmelzproben.

Zum Messzeitpunkt  $t = 30$  s wurde aus den pellikelfreien Dentinproben  $21,58 \pm 5,89$  nmol/mm<sup>2</sup> Kalzium erodiert, aus den Proben mit der 120-min-Pellikel  $14,47 \pm 2,59$  nmol/mm<sup>2</sup>. Aus den pellikelbedeckten Dentinproben wurden zum Messzeitpunkt  $t = 30$  s somit 32,9 % weniger Kalzium gelöst als aus den pellikelfreien Dentinproben.

Bis zum Messzeitpunkt  $t = 270$  s nahm die Differenz in der kumulativen Kalzium-Freisetzung zwischen pellikelfreien und pellikelbedeckten Dentinproben kontinuierlich zu. Der erosive Kalzium-Verlust betrug zu diesem Messzeitpunkt bei pellikelfreien Dentinproben  $183,33 \pm 27,77$  nmol/mm<sup>2</sup>, bei pellikelbedeckten  $132,71 \pm 16,65$  nmol/mm<sup>2</sup>. Es wurde also zu diesem Messzeitpunkt aus den pellikelbedeckten Dentinproben 27,6 % weniger Kalzium erodiert als aus den pellikelfreien.

Aus den pellikelfreien Schmelzproben wurde zum Messzeitpunkt  $t = 30$  s  $6,1 \pm 1,6$  nmol/mm<sup>2</sup> Kalzium gelöst, aus den pellikelbedeckten Proben  $4,3 \pm 1,2$  nmol/mm<sup>2</sup>. Die Reduktion des Kalzium-Verlustes aus pellikelbedeckten Schmelzproben im Vergleich zu pellikelfreien Schmelzproben betrug zum Messzeitpunkt  $t = 30$  s im Mittel 29,5 %. Zum Messzeitpunkt  $t = 300$  s wurde aus den pellikelfreien  $81,9 \pm 6,8$  nmol/mm<sup>2</sup>, aus den pellikelbedeckten Schmelzproben  $76,0 \pm 7,3$  nmol/mm<sup>2</sup> Kalzium erodiert. Das entsprach einer Reduktion des Kalzium-Verlustes durch die Pellikel um 7,7 %.

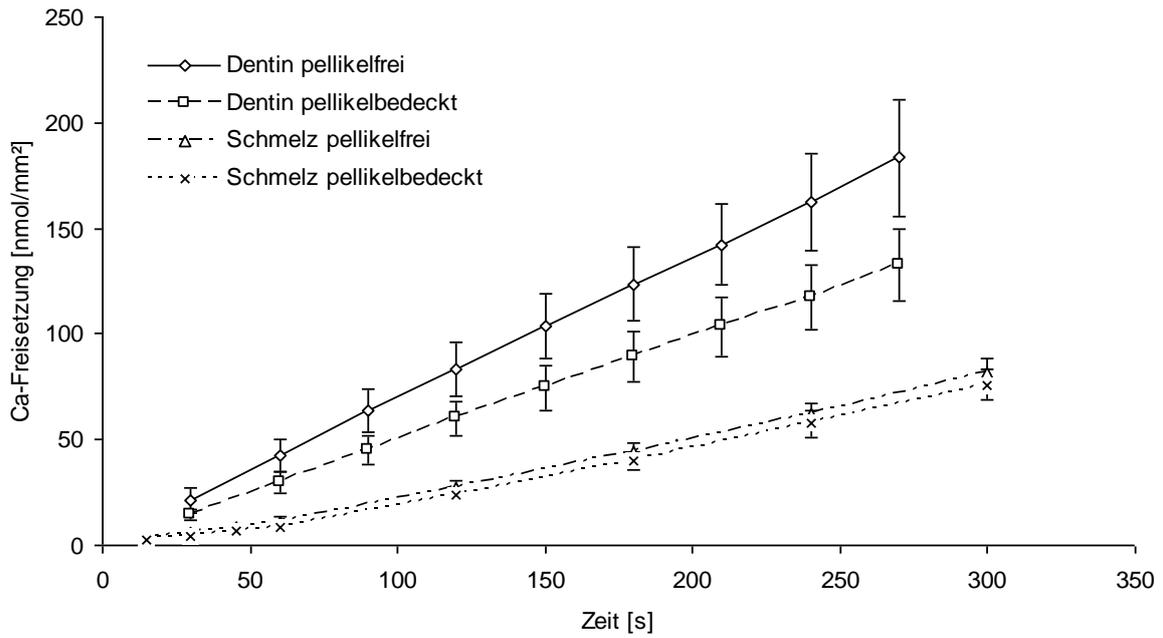


Abb. 20: Mittlere kumulative Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus pellikelfreien und pellikelbedeckten Schmelzproben bzw. Dentinproben unter dem Einfluss von Salzsäure mit pH 2,3. Die Inkubationszeit betrug bei den Schmelzproben 300 s, bei den Dentinproben 270 s. Die Pellikelbildungszeit betrug 120 min. Probenanzahl  $n = 46$ . SD = Standardabweichung.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine photometrische Methode zur hochsensitiven Bestimmung erosiver Effekte durchgeführt (Attin et al. 2005a, Attin et al. 2005b, Hannig C et al. 2005, Hannig C et al. 2008a). Durch einen direkten photometrischen Kalzium-Nachweis war eine Quantifizierung kleinster Mengen erodierter Zahnhartsubstanz nach Kurzzeitinkubation mit Salzsäure möglich.

Die angewandte Methode basiert auf Arsenazo III und zeichnet sich durch eine sehr hohe Sensitivität aus, die in früheren Studien belegt wurde (Smith HG und Bauer 1979, Attin et al. 2005a, Attin et al. 2005b, Ganss et al. 2005, Hannig C et al. 2005a, Hannig C et al. 2008a, Ganss et al. 2009). Sie ist sicher in sauren Medien durchzuführen (Morgan et al. 1993), weist eine sehr hohe Präzision und einen sehr niedrigen Variationskoeffizienten auf (Hannig C et al. 2008a). Ein wichtiger Vorteil der Methode ist, dass schon sehr geringe Mengen an gelöstem Kalzium sicher detektiert werden können. Bei Verwendung von Salzsäure lassen sich bereits Kalziummengen von 400 pmol in einer Testlösung von 1 bis 20 µl nachweisen (Attin et al. 2005a, Hannig C et al. 2005a). Damit können erosiv bedingte Kalzium-Freisetzen gemessen werden, die bereits nach 5 s im sauren Medium in Lösung gehen (Hannig C et al. 2008a). Hannig C et al. (2008a) konnten nachweisen, dass gängige Methoden zur Evaluation erosiver Schmelzverluste, wie Oberflächenhärte-Messung und Profilometrie, keine vergleichbare Sensitivität besitzen. Sie sind nicht zur Messung initialer Schmelz-Verluste durch Säuren geeignet. Somit ist die in dieser Studie verwendete Methode anderen Methoden für eine quantitative, initiale Untersuchung von dentalen Erosionen überlegen (Hannig C et al. 2008a).

Da für die Arsenazo-III-Methode zudem nur sehr geringe Testvolumina benötigt werden, eignet sich diese Methode hervorragend für fortlaufende Messungen über einen längeren Zeitraum und damit zur Erfassung der Erosions-Kinetik (Hannig C et al. 2005a). Ein weiterer Vorteil besteht in der Tatsache, dass die empfindliche, erosiv veränderte Oberfläche der Schmelzproben nicht durch mechanische Beeinflussung verändert wird. Es werden nur erodierte Kalzium-Ionen detektiert. Erweichte, aber remineralisierbare Oberflächen werden nicht erfasst (Attin 2006). Ein Nachteil der Methode ist jedoch, dass die photometrische Bestimmung der erosiven Effekte niemals in einer *In-situ*-Versuchsanordnung durchgeführt werden kann. Ein weiterer Nachteil der photometrischen Kalzium-Bestimmung liegt darin, dass die Auswirkung von Erosionen nur quantitativ, aber nicht qualitativ erfasst werden

können. Eine Aussage über Strukturveränderungen der erodierten Zahnhartsubstanzoberfläche oder über die genaue Tiefe des Substanzabtrages kann nicht getroffen werden (Ganss et al. 2009). Um diese Strukturveränderungen zu evaluieren, wird empfohlen, die colorimetrische Methode mit anderen Techniken zu kombinieren (Attin 2006). Rein rechnerisch sind bei einem Probendurchmesser von 2 mm erosive Schmelzverluste von 1,6 nm und mehr sicher detektierbar (Attin et al. 2005a). Die exakte metrische Quantifizierung der erosiven Effekte über die Bestimmung der Kalzium-Freisetzung ist limitiert. Eine näherungsweise Umrechnung der gelösten Kalzium-Menge in einen Betrag für den Substanz-Abtrag ist jedoch möglich und dient der besseren Vergleichbarkeit mit anderen Erosions-Studien (Ganss et al. 2005). Jedoch müssen diese Berechnungen zurückhaltend bewertet werden. Sie setzen voraus, dass der Erosionsprozess homogen verläuft und vor allem der Mineralgehalt und die Dichte des Zahnschmelzes bekannt und überall gleich sind (Elliot et al. 1997). Wilson und Beynon (1989) konnten jedoch zeigen, dass die Schmelzdichte ausgehend von der Schmelzoberfläche nach zentral abnimmt. Weiterhin nimmt die Kalzium-Konzentration von koronal in Richtung zervikal ab (Theuns et al. 1983). Diese Abweichungen innerhalb der Schmelzproben müssen bei der Interpretation der Berechnungsergebnisse beachtet werden (Ganss et al. 2005). In der vorliegenden Studie wurde deshalb der Angabe einer Masseneinheit gegenüber einer metrischen Quantifizierung der Vorzug gegeben.

In der vorliegenden Studie wurden finierte bovine Schmelzproben verwendet. Im Vergleich zu humanem Zahnschmelz steht der Rinderzahnschmelz in nahezu unbegrenzter Menge für Versuchszwecke zur Verfügung (Oesterle et al. 1998). Da für die Durchführung der Versuche eine Probenanzahl von mindestens  $n = 384$  benötigt wurde, wurde auf die Gewinnung von humanen Schmelzproben verzichtet. Rinderzahnschmelz wurde bereits in vielen *In-vitro*-Studien als Substituent des menschlichen Schmelzes verwendet, da er strukturell mit dem menschlichen Schmelz vergleichbar ist. (Oesterle et al. 1998, Esser et al. 1998, Ruse et al. 1990, Rytömaa et al. 1999, Attin et al. 2003, Turssi et al. 2010). Mikrohärtigkeit, Dichte und der Gehalt an Kalzium und Phosphat entsprechen den Werten humanen Schmelzes (Nakamichi et al. 1983, Esser et al. 1998). Bei der Bewertung der Messergebnisse muss jedoch berücksichtigt werden, dass Erosionen an bovinem Schmelz doppelt so schnell voranschreiten wie an humanem Schmelz (Amaechi et al. 1999a, Attin et al. 2007). Mögliche Gründe können die geringere Fluoridkonzentration von ca. 200 ppm bei bovinem Zahnschmelz sein, die deutlich unter dem Wert von menschlichem Zahnschmelz liegt (ca. 1300 ppm) (Mellberg und Loertscher, 1974), die größeren Apatitkristallite in bovinem Schmelz (Arends und Jongebloed

1978) oder der breitere interprismatische Raum (Edmunds et al. 1988). Aktuelle Studien haben jedoch gezeigt, dass boviner Schmelz trotzdem als möglicher Ersatz für humanen Schmelz in Erosions-Versuchen verwendet werden kann (Attin et al. 2007, Turssi et al. 2010). Zur Standardisierung der Prüfkörper wurden aus den extrahierten Rinderzähnen mit einem Trepanbohrer (5 mm Durchmesser) Proben herauspräpariert, deren Oberfläche in einem genau definierten Schleifprozess um 200 µm reduziert wurde, um eventuell vorhandene Entkalkungen und Oberflächen-Alterationen zu entfernen. Vorversuche zeigten, dass die Proben unter Aussparung der Oberfläche dreimal mit einem licht-härtenden Haftvermittler versiegelt werden mussten, damit in den Versuchsreihen Kalzium ausschließlich aus der Schmelzoberfläche herausgelöst wurde. In einer Studie von Hannig C et al. (2005a) zeigte sich, dass bei gleicher Probenherstellung die initialen photometrischen Messwerte durch die nicht erosiv bedingten Kalzium-Anhaftungen an der Probenversiegelung, bzw. der Probenoberfläche, verfälscht wurden. Daher wurden die Schmelzproben in der vorliegenden Studie zusätzlich in einem Ultraschallbad mit Natriumhypochlorit gereinigt und hiernach intensiv mit einem Heißdampfgerät gesäubert, um diese Kalzium-Rückstände zu entfernen. 24 Stunden vor der Versuchsdurchführung wurden die Schmelzproben in aqua bidest. überführt, um das feuchte Milieu der Mundhöhle zu simulieren und durch die Ausbildung einer Hydrat-Hülle die Adsorption der Speichelproteine an die Schmelzoberfläche zu begünstigen.

In Zusatzversuchen wurde zudem die Kalzium-Freisetzung aus bovinem Dentin unter dem Einfluss von Salzsäure mit pH 2,3 evaluiert. Hierzu wurden bovine Schmelzproben verwendet, bei denen in einem Schleifprozess der Schmelz abgetragen wurde, bis das Dentin exponiert war. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss jedoch beachtet werden, dass sich die Zusammensetzung und Struktur von bovinem Dentin von humanem Dentin unterscheiden. Bovines Dentin weist eine geringere Mikrohärtigkeit auf (Hara et al. 2003) und besitzt einen größeren Querschnitt der Dentin-Tubuli (Jung et al. 2010). Die Verwendung von bovinem Dentin als Ersatz von humanem Dentin ist limitiert und die Ergebnisse aus Erosionsstudien mit bovinem Dentin dürfen nur zurückhaltend auf humanes Dentin übertragen werden (Schmalz et al. 2001, Wegehaupt et al. 2008, Jung et al. 2010, Turssi et al. 2010).

Auch wenn sich bovines Dentin von humanem Dentin im Erosionsverhalten unterscheidet, kann davon ausgegangen werden, dass die Pellikelformation und Pellikelzusammensetzung auf beiden Zahnhartsubstanzen ähnlich ist. Mehrere Studien belegten, dass die Pellikelbildung nicht abhängig vom pellikelbedeckten Material ist, sondern von den in der Mundhöhle

verfügbaren Proteinen und Biopolymeren (Hannig M 1997, Hannig M et al. 2004, Hannig C et al. 2006, Hannig C et al. 2007c) und somit die Dentin-Pellikel der Schmelz-Pellikel gleicht.

Für die Untersuchung der protektiven Eigenschaften der *In-situ*-Pellikel wurde Salzsäure als Erosionsmedium gewählt. Wiegand et al. (2008a) fanden unter Anwendung der Atomabsorptions-Spektroskopie heraus, dass der protektive Effekt der *In-situ*-Pellikel bei pH 2,6 für Salzsäure, Zitronensäure und Phosphorsäure für Schmelz und Dentin identisch ist. Daher wurde in der vorliegenden Studie nur Salzsäure als Erosionsmedium verwendet. Es wurden pH-Werte von 2,0, 2,3 und 2,6 gewählt, da der pH-Wert vieler säurehaltiger Getränke und Lebensmittel in diesem Bereich liegt (Lussi et al. 2002, Lussi et al. 2004). Im Gegensatz zu sauren Getränken, in denen meist Kombinationen verschiedener Säuren und Erosion beeinflussende Zusätze, wie zum Beispiel Mineralien (Kalzium, Fluoride) enthalten sind (Bartlett, Coward et al. 2001), liegt Salzsäure oftmals in reiner Form in der Mundhöhle vor (Featherstone, Lussi 2006). Dies ist besonders relevant bei Personen, die unter chronischem Erbrechen (Anorexia nervosa, Bulimie oder Alkoholabusus) oder chronischem gastrooesophagealen Reflux leiden (Lussi 2006, Wang und Lussi 2010). Gelangt Salzsäure als Bestandteil des Magensaftes in die Mundhöhle, so verursacht sie schwerwiegendere erosive Zahnhartsubstanzdefekte als säurehaltige Getränke, da der pH-Wert von Magensaft signifikant niedriger ist (Bartlett und Coward 2001).

Für mehrere Säuren ist bekannt, dass sie eine korrekte Kalzium-Messung mit Arsenazo-III verhindern, indem sie unter anderem mit Schmelzbestandteilen Chelat-Komplexe eingehen (Oxal- und Zitronensäure) (Hannig C et al. 2005a, Attin et al. 2005a, Attin et al. 2006) oder aber durch Chemisorption an die Schmelzoberfläche binden (Malein- und Weinsäure) (Fu et al. 2004, Fu et al. 2005). Diese chemischen Wechselwirkungen sind für Salzsäure nicht bekannt, da sie in Wasser vollständig in Protonen und Chlorid-Ionen dissoziiert. Ausschließlich die Protonen lösen die Erosion aus, die Chlorid-Ionen haben keinen Einfluss auf die erosiven Prozesse (Featherstone und Lussi 2006). Mit Salzsäure lassen sich daher gut definiert und reproduzierbar die protektiven Eigenschaften der Pellikel, besonders in der initialen Phase des Säureangriffs, evaluieren. Mit anderen Säuren, die komplexere Interaktionen mit Schmelz aufweisen, ist dieses nicht möglich.

In vielen früheren Studien, die die protektiven Eigenschaften der Pellikel untersuchten, wurden Säure-Inkubationszeiten von 1 min (Hannig M et al. 2004, Wiegand et al. 2008a), 5 bis 30 min (Nekrashevych und Stösser 2003, Hara et al. 2004, Hara et al. 2006, Wetton et al. 2007, Wiegand et al. 2008b) bzw. bis zu 2 Stunden gewählt (Meurman und Frank 1991). In

der vorliegenden Studie wurden erstmals fortlaufende Inkubationszeiten von 15 s bis 300 s evaluiert, da in die Mundhöhle eingebrachte Säuren innerhalb weniger Minuten durch die komplexen Clearance-Funktionen (Erhöhung der Speichelfließrate, Pufferfunktionen des Speichels) verdünnt bzw. neutralisiert werden (Millward 1997, Zero und Lussi 2005, Attin 2006, Hara und Lussi 2006). Weiterhin wurde sichergestellt, dass durch die Wahl ausreichend großer Inkubationsvolumina der pH-Wert über den gesamten Messzeitraum von 300 s konstant gehalten wurde. Es trat kein Säureverbrauch ein, da ein Säureüberschuss vorhanden war (Attin et al. 2005a). Die Kurzzeituntersuchung mit dem Konstanthalten des pH-Wertes entspricht daher weitgehend der *In-vivo*-Situation, in der die Säure zum Beispiel beim Genuss eines sauren Getränkes oder bei chronischem Erbrechen über einen kurzen Zeitraum im Überschuss (mit konstantem pH-Wert) in der Mundhöhle vorliegt. Dieser Säureüberschuss führt dazu, dass der pH-Wert auf den Zahnoberflächen und auf den oralen Weichgeweben für wenigstens 2 min niedrig bleibt (Meurman et al. 1987, Millward et al. 1997, Dawes 2008).

In früheren Studien wurde bereits nachgewiesen, dass die Erosion von Schmelz unter dem Einfluss von Säuren Zeit- und pH-abhängig ist. Je länger die Inkubationszeit oder je niedriger der pH-Wert, desto stärkere erosive Wirkungen wurden festgestellt (Grobler et al 1990, West et al. 2001, Hannig C et al. 2005a). In dieser Studie wurde die Abhängigkeit des erosiven Substanzabtrages von der Expositionszeit und dem pH-Wert bestätigt. Diese Abhängigkeit fand sich sowohl bei pellikelfreien als auch bei pellikelbedeckten Schmelz- und Dentin-Proben.

Weiterhin wurde in vielen bisherigen Studien angenommen, dass die erosive Kapazität von Säuren nicht nur vom pH-Wert, sondern auch von der Menge an titrierbarer Säure abhängt (Lussi et al. 1993, Zero et al. 1996, Bartlett und Coward 2001, Lussi et al. 2004). Es wurde vermutet, dass die Menge an titrierbarer Säure sogar wichtiger ist als der pH-Wert (Grenby et al. 1989, Bartlett und Coward 2001). In der vorliegenden Studie wurde ausschließlich der pH-Wert der Säure untersucht und nicht die Menge an titrierbarer Säure. Hannig C et al. (2005a) stellten fest, dass bei der photometrischen Kalzium-Messung mit Arsenazo-III und bei Kurzzeit-Inkubation über einen Zeitraum von 5 min keine Korrelation zwischen der Menge an titrierbarer Säure und dem Erosionspotential zu beobachten war.

Wie bereits oben beschrieben, ermöglicht der photometrische Kalzium-Nachweis mit der Arsenazo-III-Methode die sichere Evaluation erosiver Effekte schon nach einer Säureinkubationszeit von 5 s (Hannig C et al. 2008a). In dieser Studie liegen die initialen Messintervalle jedoch bei 15 s, da sich in Vorversuchen gezeigt hat, dass eine Testvolumenentnahme im Abstand von 5 s nicht realisierbar ist. Säureentnahme aus den

Inkubationsgefäßen, Auffüllen der Inkubationsvolumina mit frischer Säure und anschließender Durchmischung der Säure mit der Pipettenspitze sind innerhalb dieses Inkubationszeitraumes nicht möglich. Der Durchmischung der Säure zwischen den Entnahmezeiten kam wesentliche Bedeutung zu, da die Fließbewegung der Säure einen wichtigen Einfluss auf das Ausmaß der Erosion in Schmelz und Dentin besitzt (Lussi et al. 1993, Wiegand et al. 2007).

In dieser Studie wurden Pellikelbildungszeiten von 3, 30 und 120 min gewählt, um mögliche Unterschiede des protektiven Effekts der Kurzzeit-Pellikel in Abhängigkeit von der Pellikelbildungszeit zu untersuchen. In vielen früheren Studien wurden Pellikelbildungszeiten von mehreren Stunden, einigen Tagen (Meurman und Frank 1991, Skørland et al. 1995, Maupoméé et al. 1999, Hannig M und Balz 2001, Hannig M et al. 2003, Nekrashevych und Stösser 2003) bis zu 2 Wochen (Hall et al. 1999) untersucht. Hannig M und Balz (2001), sowie Hannig M (2003) konnten jedoch feststellen, dass die Pellikel durch die Säureeinwirkung innerhalb von wenigen Minuten ausgedünnt wird und dadurch der protektive Effekt schnell abnimmt. Daher haben sehr lange Pellikelbildungszeiten wenig klinische Relevanz, besonders bei Risikopatienten für Erosionen, die häufig saure Medien konsumieren (Wetton et al. 2006, Wetton et al. 2007). Weiterhin stellten Hannig M et al. (2003) fest, dass eine Pellikelbildungszeit von 6, 12 oder 24 Stunden nicht mehr Schutz vor Säureangriffen bietet als eine Pellikel mit einer Bildungszeit von 2 Stunden. Andererseits postulierten Hannig M et al. (2004), dass eine *In-situ*-Pellikel mit einer Bildungszeit von 30 min keine signifikanten Unterschiede zu einer *In-situ*-Pellikel mit einer Bildungszeit von 60 oder 120 min aufweist. Ferner fanden Wetton et al. (2007) heraus, dass erst eine Pellikelbildungszeit von 60 min einen protektiven Effekt auf Säureangriffe auf Schmelz gewährte. Diese Feststellung steht im Gegensatz zu den Ergebnissen einer Studie von Hannig M et al. (2004), die besagt, dass bereits eine *In-situ*-Kurzzeit-Pellikel von 3 min einen gewissen Schutz vor erosiven Säureangriffen bietet. In der genannten Studie von Wetton et al. (2007) wurde zur Erfassung des erosiven Substanzabtrages die Profilometrie angewandt, die wesentlich weniger sensitiv ist als die photometrische Messung mit der Arsenazo-III-Methode (Attin 2006, Hannig C et al. 2008a). Weiterhin fand die Pellikelreifung, im Gegensatz zur Studie von Hannig M et al. (2004) und zur vorliegenden Studie, nicht *in situ*, sondern *in vitro* statt. Dass die 3-min-Pellikel *in situ* dennoch einen gewissen anti-erosiven Schutz gewährt, kann mit Studien von Kautsky und Featherstone (1993) und Hannig M (2003) erklärt werden, die aufzeigten, dass der Reife- bzw. Alterungsprozess der Pellikel bei *In-vivo*-Experimenten

weniger Relevanz hat als *in vitro*. Generell muss bei der Interpretation von *In-vitro*-Experimenten beachtet werden, dass sich der Reifungsprozess der Pellikel von dem der *In-situ*-Pellikel unterscheidet. So konnten Yao et al. (2001) zeigen, dass sich in einer *In-vitro*-Pellikel mehr unveränderte native Proteine befinden, während unter *In-situ*-Bedingungen mehr enzymatisch degradierte Proteine in der Pellikel vorhanden sind. Diese Tatsache kann ein Grund für den unterschiedlichen protektiven Effekt der Pellikel zwischen *In-vitro*- und *In-situ*-Experimenten sein.

In der vorliegenden Studie wurde ferner der Einfluss des oralen Expositionsortes auf die protektiven Eigenschaften der *In-situ*-Pellikel bei Kurzzeitinkubation in Salzsäure evaluiert. In verschiedenen Studien wurde bereits festgestellt, dass die Pellikel an bukkalen Zahnflächen des Oberkiefers dicker ist als an palatinalen Zahnflächen des Oberkiefers (Amaechi et al. 1999b, Hannig M 1999, Hannig M et al. 2003). Amaechi et al. (1999b) fanden heraus, dass die Pellikel mit einer Bildungszeit von einer Stunde im Oberkiefer bukkal dicker ist als palatinal und einen größeren erosiven Schutz aufweist als die dünnere palatinale Pellikel. Jedoch wurde die erosive Erfassung des Schmelzverlustes mit der transversen Mikroradiographie durchgeführt, die initiale Kurzzeiteffekte von Erosionen nicht erfassen kann (Attin 2006). Die Pellikelbildungszeit betrug in jener Studie 1 Stunde, die Inkubationszeit des sauren Reagenz (Orangensaft mit pH 3,85) sogar 2 Stunden (Amaechi et al. 1999b).

In der vorliegenden Studie wäre zu erwarten gewesen, dass die palatinale Pellikel einen geringeren protektiven Effekt besitzt als die bukkale Pellikel. Palatinale Zahnflächen werden nicht nur mit geringeren Speichelmengen benetzt als bukkale Zahnflächen im Oberkiefer oder bukkale und linguale Zahnflächen im Unterkiefer (Amaechi et al 1999b). Sie unterliegen auch den abscherenden Zungenkontakten, die die Pellikeldicke reduzieren und die Progression erosiver Substanzverluste steigern können (Amaechi et al. 1999, Amaechi et al. 2003, Gregg et al. 2004). Weiterhin variiert die Speichelzusammensetzung an verschiedenen Orten innerhalb der Mundhöhle (Dawes et al. 1989, Dawes und Macpherson 1993, Veerman 1996), so dass sich die Pellikel daher an verschiedenen Bildungsorten in der Mundhöhle in Zusammensetzung, Dicke und Aufbau unterscheidet (Carlén et al. 1998, Hannig M 1999, Amaechi et al. 1999b, Hannig M und Joiner 2006). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass der orale Expositionsort bei kurzer Säureinkubationszeit nur einen minimalen Einfluss auf den erosiven Kalzium-Verlust hat. Bei niedrigem pH-Wert (2,0) unterscheidet sich der Schutzeffekt der bukkalen Pellikel nicht von dem der palatinalen Pellikel. Das wurde bei pH

2,0 für alle Pellikelbildungszeiten beobachtet. Die 3-min-Pellikel wies bei allen pH-Werten (2,0, 2,3 und 2,6) keinen Unterschied im Erosionsschutz hinsichtlich des oralen Expositionsortes auf, während bei höheren pH-Werten (2,3 und 2,6) die 30-min- und 120-min-Pellikel bukkal tendenziell einen etwas größeren Schutzeffekt hatte als die entsprechenden palatinalen Pellikel. Allerdings waren diese Unterschiede nicht signifikant. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Studien überein, die einen nur geringen Unterschied im Schutzeffekt zwischen der dickeren bukkalen und der dünneren palatinalen 24-Stunden-Pellikel feststellen konnten (Hannig M und Balz 1999, Hannig M und Balz 2001). Auch eine jüngere Studie kommt zu dem Schluss, dass eine Kurzzeit-Pellikel mit einer Bildungszeit von 3, 30 und 120 min bei einer Säureinkubation von Zitronensäure für 1 min bukkal keinen signifikant größeren Erosionsschutz bietet als palatinal (Hannig M et al. 2004b).

Möglicherweise besitzt die initiale, elektronendichte Basal-Schicht der Pellikel, die innerhalb der ersten Minuten der oralen Expositionszeit auf der Schmelzoberfläche gebildet wird, eine stärkere protektive, anti-erosive Eigenschaft als die äußeren Pellikelschichten, die aus locker strukturierten globulären Bestandteilen aufgebaut sind (Hannig M und Balz 2001). Die initiale Basal-Schicht ist in elektronenmikroskopischen Bildern sowohl auf bukkalen als auch auf palatinal exponierten Schmelzproben erkennbar, in ihrer Dicke identisch und weist einen relativ hohen Säurewiderstand auf (Hannig M 1999). Die äußere, locker strukturierte, globuläre Pellikel-Schicht ist bukkal wesentlich dicker als palatinal, aber in Erosionsversuchen säurelöslicher (Skørland et al. 1995, Hannig M 1999, Vitkov et al. 2004, Hannig und Joiner 2006). Ein weiterer Hinweis darauf, dass eher die initiale elektronendichte Pellikelschicht hauptverantwortlich für den Erosionsschutz ist, ist die Tatsache, dass bereits eine 3-min-Pellikel einen gewissen Erosionsschutz bietet und sich dieser Schutz nicht signifikant von dem einer Pellikel mit einer Bildungszeit von 120 min unterscheidet (Hannig M et al. 2004b).

Eine fortlaufende Erosionsuntersuchung innerhalb eines Messzeitraumes von 15 bis 300 s wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Mit dem vorliegenden Messprotokoll war es erstmals möglich, den zeitlichen Verlauf des Kalzium-Verlustes aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure unterschiedlicher Konzentration in Anwesenheit einer *In-situ*-Pellikel mit verschiedenen Bildungszeiten in den ersten Sekunden der Säureinkubation zu untersuchen.

Die Pellikel zeigte bei hoher Säurekonzentration (pH 2,0) in den ersten 15 s der Inkubation einen tendenziellen protektiven Einfluss auf die Kalzium-Freisetzung aus Schmelz. Dieser

Effekt war jedoch nicht signifikant. Erst ab einer Inkubationszeit der Säure von 60 s reduzierte die Pellikel mit Bildungszeiten von 30 min bzw. 120 min signifikant die Kalzium-Freisetzung im Vergleich zu pellikelfreien Proben. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Pellikelbildungszeiten von 30 min und 120 min war nicht erkennbar. Mit Zunahme der Säureeinwirkzeit reduzierte sich dieser protektive Effekt deutlich. Die Pellikel mit einer Bildungszeit von 3 min hatte bei hoher Säurekonzentration keinen signifikanten Einfluss auf die Kalzium-Freisetzung über den gesamten Messzeitraum.

Bei höherem pH-Wert (pH 2,3 und 2,6) war der Schutzeffekt der Pellikel mit einer Bildungszeit von 30 min bzw. 120 min bereits in der initialen Phase ( $t = 15$  s) des Säureangriffs erkennbar, wobei eine tendenzielle Abhängigkeit des anti-erosiven Schutzes von der Pellikelbildungszeit feststellbar war. Eine Pellikelbildungszeit von 3 min bot bei schwächerer Säurekonzentration einen geringen, jedoch nicht signifikanten Schutz vor der sauren Noxe. Wie bei pH 2,0 wurde mit Zunahme der Säureinkubationszeit der protektive Pellikeleffekt geringer und war ab einem Inkubationszeitpunkt von  $t = 300$  s nicht mehr nachweisbar. Ein möglicher Grund für die Abnahme des Pellikeleffektes über die Zeit ist die Reduktion der Pellikeldicke durch die einwirkende Säure, die in früheren Studien beschrieben wurde (Hannig M und Balz 2001, Hannig M et al 2003, Hannig C et al. 2009a).

Die *In-situ*-Pellikel bot gegenüber erosiven Säureangriffen auf Schmelz keinen völligen Schutz. Sie zeigte einen gewissen protektiven Effekt, wenn der Säureangriff zeitlich limitiert und die Säurekonzentration moderat war. Die Pellikelbildungszeit besaß einen tendenziellen Einfluss auf die initiale erosive Kalzium-Freisetzung, dieser nahm jedoch mit zunehmender Dauer der Säureinkubation ab. Diese Ergebnisse werden bestätigt durch eine Studie von Hannig C et al. (2009a), die ebenfalls einen zeit- und pH-abhängigen anti-erosiven Schutz der Pellikel nachweisen konnte.

Die Pellikel kann daher nicht als eine dichte Diffusionsbarriere angesehen werden, die vor Säureangriffen auf die Zahnhartsubstanzen schützt. Vielmehr kann sie als eine semipermeable Membran interpretiert werden, die den Ionenaustausch zwischen Zahnhartsubstanzoberfläche und Speichel steuert. Diese Erkenntnisse werden durch viele andere Studien über die Pellikel bestätigt (Zahradnik et al. 1976, Busscher et al. 2003, Hannig M et al. 2003, Hara et al. 2006, Wiegand et al. 2008a, Hannig C et al. 2009a). Möglicherweise verlangsamt die Pellikel die Diffusion von Säure in die Zahnhartsubstanz hinein und die Diffusion von Kalzium- und Phosphat-Ionen aus der Zahnhartsubstanz heraus (Zahradnik et al. 1976, Slomiany et al. 1986).

Als Konsequenz dieser Ergebnisse hinsichtlich der Prophylaxe dentaler Erosionen kann ein schnelles Trinken säurehaltiger Getränke als weniger erosiv angesehen werden. Eine häufige Aufnahme kleiner säurehaltiger Mengen über einen längeren Zeitraum oder ein Umspülen des sauren Getränkes im Munde vor dem Schluckvorgang sollten vermieden werden (Johansson et al. 2004). Um die Etablierung der protektiven Pellikel zu fördern, sollte direkt nach vollständiger Entfernung der Pellikel (Bleaching, professionelle Zahnreinigung, intensive Mundhygiene) auf den Konsum säurehaltiger Lebensmittel verzichtet werden. Wirken jedoch Säuren mit sehr niedrigen pH-Werten auf die Zahnhartsubstanzen ein (z.B. Magensäure bei chronischem Erbrechen), so ist die erosionsinhibitorische Wirkung einer Pellikel auch mit langer Pellikelbildungszeit sehr eingeschränkt.

In Zusatzversuchen wurde evaluiert, ob die 120-min-Pellikel einen protektiven Effekt auf Dentin-Proben ausübt, die mit Salzsäure (pH 2,3) inkubiert wurden. Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass die 120-min-Pellikel die Dentin-Oberfläche zu einem gewissen Grad vor erosiven Säureangriffen schützt und den erosiven Kalzium-Verlust im Vergleich zu pellikelfreien Dentin-Proben um durchschnittlich 30 % senkt. Diese Ergebnisse werden durch andere Studien über den protektiven Effekt der Dentin-Pellikel bestätigt (Wetton et al. 2006, Wiegand et al. 2008a). Hara et al. (2006) hingegen postulierten, dass die Pellikel auf Dentin keinen anti-erosiven Effekt hat. Allerdings wurde diese Studie mit Orangensaft als saurem Medium und einer Inkubationszeit von 10 bis 30 min durchgeführt, wodurch die abweichenden Ergebnisse erklärt werden können.

Ein weiteres Ergebnis der vorliegenden Arbeit stellt die Tatsache dar, dass die Dentin-Pellikel gegenüber der Schmelz-Pellikel einen protektiven Effekt über einen längeren Zeitraum zeigte. Während der protektive Effekt bei der Schmelz-Pellikel spätestens ab einem Messzeitpunkt von  $t = 60$  s nachließ, hielt er bei der Dentin-Pellikel über den gesamten Messzeitraum von 270 s an. Ein möglicher Grund hierfür kann eine stärkere Säureresistenz der Dentin-Pellikel sein. Möglicherweise haftet die Pellikel durch Protein-Protein-Wechselwirkungen an den organischen Komponenten des Dentins, die durch den erosiven Prozess demaskiert wurden, fester an der Dentin-Oberfläche. Dieser Aspekt könnte Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

TEM-Bilder belegen weiterhin die Semipermeabilität der Dentin-Pellikel, wie sie bereits für die Schmelz-Pellikel beschrieben wurde (siehe oben). Hannig C et al. (2007a) bewiesen, dass die Dentin-Pellikel während der Säureinkubation nicht vollständig von der Dentin-Oberfläche

gelöst wird, es aber zeitgleich zu einer Demineralisation der oberflächlichen Dentinschicht kommt.

Die in dieser Studie angewandte Methode bietet die Möglichkeit, die protektiven Eigenschaften oraler Therapeutika auf die Zahnhartsubstanzen bereits in der initialen Phase des Säureangriffs zu testen. So könnten diese Therapeutika zeitgleich mit Schmelzproben *in situ* eingebracht werden. Nach definierter Einwirkzeit der Therapeutika und Entnahme der Schmelzproben erfolgt dann die Evaluation der Kalzium-Freisetzung *ex vivo/in vitro*. Dieser Versuchsaufbau ermöglicht einerseits die Untersuchung der biofunktionellen Modulation der Pellikel durch die Anflutung und Immobilisation protektiver Pellikelenzyme wie Peroxidase, Lysozym oder IgA z.B. in Form von Mundspüllösungen. Andererseits können die protektiven Effekte verschiedenster Fluorid-Präparate oder Hydroxylapatit-haltiger Zahncremes auf die Zahnhartsubstanzen mit dieser Methode evaluiert werden.

#### **Schlussfolgerungen:**

- Die *In-situ*-Pellikel mit einer Bildungszeit von 3, 30 und 120 min bietet keinen vollständigen Schutz gegenüber Salzsäure im pH-Bereich 2 bis 3.
- Der anti-erosive Effekt der Pellikel ist zeitlich limitiert. Während der protektive Effekt der Pellikel bei pH 2,0 vom Messzeitpunkt  $t = 15$  s bis  $t = 60$  s zunächst ansteigt und ab  $t = 60$  s nachläßt, nimmt er bei pH 2,3 und 2,6 bereits nach  $t = 15$  s kontinuierlich ab.
- Der Schutzeffekt der Pellikel ist tendenziell abhängig von der Pellikelbildungszeit.
- Die protektive Wirkung bukkaler und palatinaler Pellikel unterscheidet sich nicht.
- Die Dentin-Pellikel zeigt einen etwas höheren protektiven Effekt als die Schmelz-Pellikel.

## 6 Zusammenfassung

**Ziel der Studie:** In der vorliegenden Studie wurde der protektive Effekt der *In-situ*-Pellikel gegenüber Salzsäure unterschiedlicher pH-Werte untersucht.

**Material und Methoden:** Die Pellikelbildung erfolgte auf bovinen Schmelzproben bei 6 Probanden *in situ* für 3, 30 bzw. 120 min bukkal und palatinal. Die Schmelzproben wurden *in vitro* mit Salzsäure der pH-Werte 2,0, 2,3 bzw. 2,6 inkubiert. Pellikelfreie Schmelzproben dienten als Referenzproben. Die Kalzium-Freisetzung aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure wurde mit einem photometrischen Verfahren (Arsenazo-III-Methode) ermittelt. Die Messungen erfolgten fortlaufend zu den Zeitpunkten  $t = 15$  s, 30 s, 45 s, 60 s, 120 s, 180 s, 240 s und 300 s.

**Ergebnisse:** Die Kalzium-Freisetzung erfolgte bei pellikelfreien und pellikelbedeckten Schmelzproben zeitabhängig in direkter Korrelation zum pH-Wert. Die Kalzium-Freisetzung aus bukkal getragenen Schmelzproben unterschied sich nicht oder nur geringfügig von palatinal getragenen Proben.

Die Pellikel hatte, außer bei pH 2,0, initial (Messzeitpunkt  $t = 15$  s) einen signifikanten Einfluss auf die Kalzium-Freisetzung aus Schmelz, wobei eine tendenzielle Abhängigkeit der Kalzium-Freisetzung von der Pellikelbildungszeit zu beobachten war. Der Schutz-Effekt der Pellikel reduzierte sich mit Zunahme der Inkubationszeit. Während der protektive Effekt der Pellikel bei pH 2,0 vom Messzeitpunkt  $t = 15$  s bis  $t = 60$  s zunächst anstieg und ab  $t = 60$  s nachließ, nahm er bei pH 2,3 und 2,6 bereits nach dem Messzeitpunkt  $t = 15$  s kontinuierlich ab. Zum finalen Messzeitpunkt  $t = 300$  s konnte kein signifikanter Einfluss der Pellikel mehr nachgewiesen werden.

**Schlussfolgerungen:** Mit der angewandten Methode war es erstmals möglich, die Kinetik des Kalzium-Verlustes aus Schmelz unter dem Einfluss von Salzsäure unterschiedlicher Konzentration in Anwesenheit einer *In-situ*-Pellikel mit verschiedenen Pellikelbildungszeiten zu untersuchen.

Die Pellikel bietet gegenüber erosiven Säureangriffen auf Schmelz keinen vollständigen Schutz. Sie hat einen gewissen protektiven Effekt, wenn der Säureangriff zeitlich limitiert und die Säurekonzentration moderat ist, wobei die Pellikelbildungszeit einen tendenziellen Einfluss auf den anti-erosiven Schutz hat.

## Summary

**Aim:** The aim of the present study was to investigate the protective properties of the pellicle layer with regard to different formation times and intraoral sites during incubation with hydrochloric acid (HCl).

**Materials and Methods:** Bovine enamel slabs were fixed on buccal and palatal sites of individual upper jaw splints and exposed to the oral cavity of 6 subjects for 3, 30 or 120 min for pellicle formation *in situ*. In the following, the slabs were incubated with HCl (pH 2.0, 2.3 and 2.6) *in vitro* and erosive calcium-release was measured photometrically (arsenazo-III-method). Pellicle free samples served as controls. The measurements were conducted continuously at t = 15 s, 30 s, 45 s, 60 s, 120 s, 180 s, 240 s and 300 s.

**Results:** Calcium-release from pellicle coated and pellicle free samples was correlated with pH level and incubation time. Calcium-release from buccal samples was not or only marginally different from calcium-release from palatal samples. Except of pH 2.0, the pellicle initially showed a significant influence on calcium-release, which in general depended on pellicle formation time. The protective effect was reduced with increasing incubation time in HCl. At pH 2.0 the anti-erosive property increased between t = 15 s to t = 60 s and decreased after t = 60 s, whereas the protective effect decreased continuously at pH 2.3 and 2.6. At the final point of measurement (t = 300s), there was no significant influence of the pellicle.

**Conclusions:** For the first time, the methods of the present study allowed investigation of kinetics of calcium-release in the presence of an *in situ* acquired pellicle with regard to different pH levels and pellicle formation time.

The protective properties of the acquired pellicle against an erosive impact on the enamel surface are limited. The pellicle offers a certain anti-erosive effect, if the time of the acidic challenge is limited and the pH level is moderate. The pellicle formation time has an influence on the anti-erosive effect of the pellicle.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aguirre A, Mendoza B, Levine MJ, Hatton MN, Douglas WH (1989): In vitro characterization of human salivary lubrication. *Arch Oral Biol* 34(8), 675-7
- Alfaro EV, Aps JK, Martens LC (2008): Oral implications in children with gastroesophageal reflux disease. *Curr Opin Pediatr* 20(5), 576-83
- Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM (1999a): Factors influencing the development of dental erosion in vitro: enamel type, temperature and exposure time. *J Oral Rehabil* 26(8), 624-30
- Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM, Milosevic A (1999b): Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. *J Dent Res* 78(12), 1821-8
- Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM (2003): Influence of abrasion in clinical manifestation of human dental erosion. *J Oral Rehabil* 30(4), 407-13
- Amin WM, Al-Omouh SA, Hattab FN (2001): Oral health status of workers exposed to acid fumes in phosphate and battery industries in Jordan. *Int Dent J* 51(3), 169-74
- Arends J, Jongebloed WL (1979): Crystallites dimension of enamel. *J Biol Buccale* 6, 161-71
- Arowojolu MO (2001): Erosion of tooth enamel surfaces among battery chargers and automobile mechanics in Ibadan: a comparative study. *Afr J Med Sci* 30(1-2), 5-8
- Attin T (2006): Methods for assessment of dental erosion. *Monogr Oral Sci* 20, 152-72
- Attin T, Hilgers RD, Hellwig E (1997): Beeinflussung des erosionsbedingten Oberflächenhärteverlustes von Zahnschmelz durch Fluorid. *Dtsch Zahnärztl Z* 52, 241-5
- Attin T, Kocabiyik M, Buchalla W, Hannig C, Becker K (2003a): Susceptibility of enamel surfaces to demineralization after application of fluoridated carbamide peroxide gels. *Caries Res* 37(2), 93-9
- Attin T, Meyer K, Hellwig E, Buchalla W, Lennon AM (2003b): Effect of mineral supplements to citric acid on enamel erosion. *Arch Oral Biol* 48(11), 753-9
- Attin T, Becker K, Hannig C, Buchalla W, Hilgers R (2005a): A method to detect minimal amounts of calcium dissolved in acidic solutions. *Caries Res* 39(5), 432-6

- Attin T, Becker K, Hannig C, Buchalla W, Wiegand A (2005b): Suitability of a malachite green procedure to detect minimal amounts of phosphate dissolved in acidic solutions. *Clin Oral Invest* 9(3), 203-7
- Attin T, Weiss K, Becker K, Buchalla W, Wiegand A (2005): Impact of modified acidic soft drinks on enamel erosion. *Oral Dis* 11(1), 7-12
- Attin T, Wegehaupt F, Gries D, Wiegand A (2007): The potential of deciduous and permanent bovine enamel as substitute for deciduous and permanent human enamel: Erosion-abrasion experiments. *J Dent* 2007 35(10), 773-7
- Azzopardi A, Bartlett DW, Watson TF, Smith BG (2000): A literature review of the techniques to measure tooth wear and erosion. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 8(3), 93-7
- Barbour ME, Rees JS (2004): The laboratory assessment of enamel erosion: a review. *J Dent* 32(8), 591-602
- Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD (2005): Human enamel erosion in constant composition citric acid solutions as a function of degree of saturation with respect to hydroxyapatite. *J Oral Rehabil* 32(1), 16-21
- Bartlett DW, Coward PY, Nikkah C, Wilson RF (1998): The prevalence of tooth wear in a cluster sample of adolescent schoolchildren and its relationship with potential explanatory factors. *Br Dent J* 184(3), 125-9
- Bartlett DW, Coward PY (2001): Comparison of the erosive potential of gastric juice and a carbonated drink in vitro. *J Oral Rehabil* 28(11), 1045-7
- Bartlett D (2006): Intrinsic causes of erosion. *Monogr Oral Sci* 20, 119-39
- Bennick A, Cannon M, Madapallimattam G (1979): The nature of the hydroxyapatite-binding site in salivary acidic proline-rich proteins. *Biochem J* 183(1), 115-26
- Bennick A, Chau G, Goodlin R, Abrams S, Tustian D, Madapallimattam G (1983): The role of human salivary acidic proline-rich proteins in the formation of acquired dental pellicle in vivo and their fate after adsorption to the human enamel surface. *Arch Oral Biol* 28(1), 19-27
- Berg IC, Rutland MW, Arnebrant T (2003): Lubricating properties of the initial salivary pellicle – an AFM study. *Biofouling* 19(6), 365-9
- Bieri JG, McCay CM, Restarski JS, Gortner RA (1946): Further studies on in vivo tooth decalcification by acid beverages. *Arch Biochem* 11, 33-40
- Brookes SJ, Strong M, Robinson C, Kirkham J, Bonass WA, Shore RC et al. (1995): Site-specific protein profiles in saliva. *Caries Res* 29, 322-3

- Bueno MG, Marsicano JA, Sales-Peres SH (2010): Preventive effect of iron gel with or without fluoride on bovine enamel erosion in vitro. *Aust Dent J* 55(2), 177-80
- Busscher HJ, White DJ, Kamminga-Rasker HJ, Poortinga AT, van der Mei HC (2003): Influence of oral detergents and chlorhexidine on soft-layer electrokinetic parameters of the acquired enamel pellicle. *Caries Res* 37(6), 431-6
- Cai F, Manton DJ, Shen P, Walker GD, Cross KJ, Yuan Y, Reynolds C, Reynolds EC (2007): Effect of addition of citric acid and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate to a sugar-free chewing gum on enamel remineralization in situ. *Caries Res* (5), 377-83
- Cardenas M, Elofsson U, Lindh L (2007): Salivary mucin MUC5B could be an important component of in vitro pellicles of human saliva: an in situ ellipsometric and atomic force microscopy study. *Biomacromolecules* 8, 1149-56
- Carlén A, Börjesson AC, Nikdel K, Olsson J (1998): Composition of pellicles formed in vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition, and in vitro on hydroxyapatite. *Caries Res* 32, 447-55
- Centerwall BS, Armstrong CW, Funkhouser LS, Elzay RP (1986): Erosion of dental enamel among competitive swimmers at a gas-chlorinated swimming pool. *Am J Epidemiol* 123(4), 641-7
- Dawes C (2008): Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *J Am Dent Assoc* 139, 18-24
- Dawes C, Macpherson LM (1993): The distribution of saliva and sucrose around the mouth during the use of chewing gum and the implication for the site-specificity of caries and calculus deposition. *J Dent Res* 72, 852-57
- Dawes C, Jenkins GN, Tonge CH (1963): The nomenclature of the integuments of the enamel surface of the teeth. *Br Dent J* 115, 65-8
- Dawes C, Watanabe S, Biglow-Lecomte P, Dibdin GH (1989): Estimation of the velocity of the salivary film at some different locations in the mouth. *J Dent Res* 68, 1479-82
- 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(3), 211-6
- Dige I, Raarup MK, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B (2009): *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. *Microbiology* 155, 2116-26

- Douglas WH, Reeh ES, Ramasubbu N, Raj PA, Bhandary KK, Levine MJ (1991): Statherin: a major boundary lubricant of human saliva. *Biochem Biophys Res Commun* 180(1), 91-7
- Douglas CW (1994): Bacterial-protein interactions in the oral cavity – Review. *Adv Dent Res* 8(2), 254-62
- Dugmore CR, Rock WP (2003): The progression of tooth erosion in a cohort of adolescents of mixed ethnicity. *Int J Paediatr Dent* 13(5), 295-303
- Dukić W, Dobrijević TT, Katunarić M, Milardović S, Segović S (2010): Erosive lesions in patients with alcoholism. *J Am Dent Assoc* 141(12), 1452-8
- Dynesen AW, Bardow A, Petersson B, Nielsen LR, Nauntofte B (2008): Salivary changes and dental erosion in bulimia nervosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 106(5), 696-707
- Eccles JD (1979): Dental erosion of nonindustrial origin. A clinical survey and classification. *J Prosthet Dent* 42(6), 649-53
- Eccles JD, Jenkins WG (1974): Dental erosion and diet. *J Dent* 2(4), 153-9
- Edmunds DH, Whittaker DK, Green RM (1988): Suitability of human, bovine, equine and ovine tooth enamel for studies of artificial bacterial carious lesions. *Caries Res* 22, 327-36
- Eisenburger M, Shellis RP, Addy M (2004): Scanning electron microscopy of softened enamel. *Caries Res* 38(1), 67-74
- Ekstrand J, Oliveby A (1999): Fluoride in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 57(6), 330-3
- Elliott JC (1997): Structure, crystal chemistry and density of enamel apatites. *Ciba Found Symp* 205, 54-67
- Ericson R, Pruitt K, Arwin H, Lundström I (1982): Ellipsometric studies of film formation on tooth enamel and hydrophilic silicon surfaces. *Acta Odontol Scand* 40, 197-201
- Esser M, Tinschert J, Marx R (1998): Materialkennwerte der Zahnschmelz des Rindes im Vergleich zur humanen Zahnhartsubstanz. *Dtsch Zahnärztl Z* 53(10), 713-7
- Featherstone JD, Lussi A (2006): Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci* 20, 66-76
- Finke M, Jandt KD, Parker DM (2000): The Early Stages of Native Enamel Dissolution Studied with Atomic Force Microscopy. *J Colloid Interface Sci* 232(1), 156-64

- Fu B, Yuan J, Qian W, Shen Q, Sun X, Hannig M (2004): Evidence of chemisorption of maleic acid to enamel and hydroxyapatite. *Eur J Oral Sci* 112(4), 362-7
- Fu B, Shen Q, Qian W, Zeng Y, Sun X, Hannig M (2005): Interfacial interactions of tartaric acid with hydroxyapatite and enamel. *J Mater Sci Mater Med* 16(9), 827-31
- Ganss C, Schlechtriemen M, Klimek J (1999): Dental erosions in subjects living on a raw food diet. *Caries Res* 33(1), 74-80
- Ganss C, Klimek J, Brune V, Schürmann A (2004): Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in situ. *Caries Res* 38(6), 561-6
- Ganss C, Lussi A, Klimek (2005): Comparison of calcium/phosphorus analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosive demineralisation. *Caries Res* 39, 178-84
- Ganss C, Lussi A, Scharmann I, Weigelt T, Hardt M, Klimek J, Schlüter N (2009): Comparison of Calcium Analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosion in dentine. *Caries Res* 43, 422-29
- Ganss C, Neutard L, von Hinckeldey J, Klimek J, Schlueter N (2010): Efficacy of a tin/fluoride rinse: a randomized in situ trial on erosion. *J Dent Res* 89(11), 1214-8
- Gedalia I, Dakuar A, Shapira L, Lewinstein I, Goultschin J, Rahamim E (1991): Enamel softening with Coca-Cola and rehardening with milk or saliva. *Am J Dent* 4(3), 120-2
- Gottfried EB, Korsten MA, Lieber CS (1978): Alcohol-induced gastric and duodenal lesions in man. *Am J Gastroenterol* 70(6), 587-92
- 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(6), 557-60
- Grenby TH, Phillips A, Desai T, Mistry M (1989): Laboratory studies of the dental properties of soft drinks. *Br J Nutr* 62(2), 451-64
- Grobler SR, Senekal PJ, Laubscher JA (1990): In vitro demineralization of enamel by orange juice, apple juice, Pepsi Cola and Diet Pepsi Cola. *Clin Prev Dent* 12(5), 5-9
- Hahn Berg IC, Lindh L, Arnebrant T (2004): Intraoral lubrication of PRP-1, statherin and mucin as studied by AFM. *Biofouling* 20(1), 65-70
- Hannig C, Hannig M (2009): The oral cavity--a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig* 13(2), 123-39

- Hannig C, Attin T, Hannig M, Henze E, Brinkmann K, Zech R (2004): Immobilisation and activity of human alpha-amylase in the acquired enamel pellicle. *Arch Oral Biol* 49(6), 469-75
- Hannig C, Hamkens A, Becker K, Attin R, Attin T (2005a): Erosive effects of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate in vitro. *Arch Oral Biol* 50(6), 541-52
- Hannig C, Hannig M, Attin T (2005b): Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci* 113(1), 2-13
- 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(4), 755-61
- Hannig C, Becker K, Häusler N, Hoth-Hannig W, Attin T, Hannig M (2007a): Protective effect of the in situ pellicle on dentin erosion – an ex vivo pilot study. *Arch Oral Biol* 52(5), 444-9
- Hannig C, Hannig M, Rehmer O, Braun G, Hellwig E, Al-Ahmad A (2007b): Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. *Arch Oral Biol* 52(11), 1048-56
- Hannig C, Huber K, Lambrichts I, Gräser J, D'Haen J, Hannig M (2007c): Detection of salivary alpha-amylase and lysozyme exposed on the pellicle formed in situ on different materials. *J Biomed Mater Res A* 83(1), 98-103
- Hannig C, Becker K, Yankeu-Ngalene VE, Attin T (2008a): Applicability of common methods for short time erosion analysis in vitro. *Oral Health Prev Dent* 6(3), 239-48
- Hannig C, Spitzmüller B, Knausenberger S, Hoth-Hannig W, Hellwig E, Hannig M (2008b): Detection and activity of peroxidase in the in situ formed enamel pellicle. *Arch Oral Biol* 53(9), 849-58
- Hannig C, Spitzmüller B, Miller M, Hellwig E, Hannig M (2008c): Intrinsic enzymatic crosslinking and maturation of the in situ pellicle. *Arch Oral Biol* 53(5), 416-22
- Hannig C, Ruggeri A, Al-Khayer B, Schmitz P, Spitzmüller B, Deimling D, Huber K, Hoth-Hannig W, Bowen WH, Hannig M (2008d): Electron microscopic detection and activity of glucosyltransferase B, C, and D in the in situ formed pellicle. *Arch Oral Biol* 53(11), 1003-10
- Hannig C, Berndt D, Hoth-Hannig W, Hannig M (2009a): The effect of acidic beverages on the ultrastructure of the acquired pellicle – an in situ study. *Arch Oral Biol* 54(6), 518-26

- Hannig C, Spitzmüller B, Hannig M (2009b): Transaminases in the acquired pellicle. *Arch Oral Biol* 54(5), 445-8
- Hannig C, Spitzmüller B, Hannig M (2009c): Characterisation of lysozyme activity in the in situ pellicle using a fluorimetric assay. *Clin Oral Investig* 13(1), 15-21
- Hannig M (1997): Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. *Eur J Oral Sci* 105, 422-33
- Hannig M (1999): Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Investig* 3(2), 88-95
- Hannig M, Balz M (1999): Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res* 33(5), 372-9
- Hannig M, Balz M (2001): Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. *Caries Res* 35(2), 142-8
- Hannig M, Joiner A (2006): The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci* 19, 29-64
- Hannig M, Hannig C (2010): Nanomaterials in preventive dentistry. *Nat Nanotechnol* 5(8), 565-9
- Hannig M, Hess NJ, Hoth-Hannig W, De Vrese M (2003): Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization--an in situ pilot study. *Clin Oral Investig* 7(3), 158-61
- 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(5), 532-8
- 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(11), 903-10
- Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA (2003): Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. *Caries Res* 37, 390-394
- Hara AT, Ando M, González-Cabezas C, Cury JA, Serra MC, Zero DT (2006): Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ. *J Dent Res* 85(7), 612-6
- Hara AT, Lussi A, Zero DT (2006): Biological factors. *Monogr Oral Sci* 20, 88-99
- Hasselkvist A, Johansson A, Johansson AK (2010): Dental erosion and soft drink consumption in Swedish children and adolescents and the development of a simplified erosion partial recording system. *Swed Dent J* 34(4), 187-95

- Hay DI (1967): The adsorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel. *Arch Oral Biol* 12(8), 937-46
- Hay DI (1973): The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. *Arch Oral Biol* 18(12), 1517-29
- Hemingway CA, White AJ, Shellis RP, Addy M, Parker DM, Barbour ME (2010): Enamel erosion in dietary acids: inhibition by food proteins in vitro. *Caries Res* 44(6), 525-30
- Hickel R (1989): Schmelzschäden durch Säureeinwirkung. *Zahnärztl Mitt* 79, 1298-1305
- Holbrook WP, Furuholm J, Gudmundsson K, Theodórs A, Meurman JH (2009): Gastric reflux is a significant causative factor of tooth erosion. *J Dent Res* 88(5), 422-6
- Imfeld T (1996): Dental erosion. Definition, classification and links. *Eur J Oral Sci* 104(2), 151-5
- Jaeggi T, Lussi A (2006): Prevalence, incidence and distribution of erosion. *Monogr Oral Sci* 20, 44-65
- Järvinen V, Meurman JH, Hyvärinen H, Rytömaa I, Murtomaa H (1988): Dental erosion and upper gastrointestinal disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 65(3), 298-303
- Järvinen VK, Rytömaa II, Heinonen OP (1991): Risk factors in dental erosion. *J Dent Res* 70(6), 942-7
- Johansson AK, Lingström P, Imfeld T, Birkhed D (2004): Influence of drinking method on tooth-surface pH in relation to dental erosion. *Eur J Oral Sci* 112(6), 484-9
- Jung DJ, Al-Ahmad A, Follo M, Spitzmüller B, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C (2010): Visualization of initial bacterial colonization on dentine and enamel in situ. *J Microbiol Methods* 81(2), 166-74
- Kato MT, Maria AG, Vaz LG, Italiani Fde M, Sales-Peres SH, Buzalaf MA (2007): Effect of iron supplementation on the erosive potential of carbonated or decarbonated beverage. *J Appl Oral Sci* 15(1), 61-4
- Kato MT, Magalhães AC, Rios D, Hannas AR, Attin T, Buzalaf MA (2009): Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. *J Appl Oral Sci* 17(6), 560-4
- Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MA (2010): Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. *J Dent Res* 89(5), 468-72

- Kautsky MB, Featherstone JD (1993): Effect of salivary components on dissolution rates of carbonated apatites. *Caries Res* 27, 373-7
- Lagerweij MD, Buchalla W, Kohnke S, Becker K, Lennon AM, Attin T (2006): Prevention of erosion and abrasion by a high fluoride concentration gel applied at high frequencies. *Caries Res* 40(2), 148-53
- Larsen MJ, Nyvad B (1999): Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res* 33(1), 81-7
- Larsen MJ, Richards A (2002): Fluoride is unable to reduce dental erosion from soft drinks. *Caries Res* 36(1), 75-80
- Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG (2000): Saliva and dental pellicle – a review. *Adv Dental Res* 14, 22-8
- Lennon AM, Pfeffer M, Buchalla W, Becker K, Lennon S, Attin T (2006): Effect of a casein/calcium phosphate-containing tooth cream and fluoride on enamel erosion in vitro. *Caries Res* 40(2), 154-7
- Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS, Oppenheim FG (2004a): Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 97(6), 1311-8
- Li J, Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG (2004b): Identification of in vivo pellicle constituents by analysis of serum immune responses. *J Dent Res* 83(1), 60-4
- Li J, Helmerhorst EJ, Yao Y, Nunn ME, Troxler RF, Oppenheim FG (2004c): Statherin is an in vivo pellicle constituent: identification and immuno-quantification. *Arch Oral Biol* 49(5), 379-85
- Linkosalo E, Markkanen H (1985): Dental erosions in relation to lactovegetarian diet. *Scand J Dent Res* 93(5), 436-41
- Lupi-Pegurier L, Muller M, Leforestier E, Bertrand MF, Bolla M (2003): In vitro action of Bordeaux red wine on the microhardness of human dental enamel. *Arch Oral Biol* 48(2), 141-5
- Lussi A (2009): Dental erosion--novel remineralizing agents in prevention or repair. *Adv Dent Res* 21(1), 13-6
- Lussi A, Hellwig E (2006): Risk assessment and preventive measures. *Monogr Oral Sci* 20, 190-9
- Lussi A, Jaeggi T (2006): Chemical factors. *Monogr Oral Sci* 20, 77-87

- Lussi A, Jaeggi T, Schärer S (1993): The influence of different factors on in vitro enamel erosion. *Caries Res* 27(5), 387-93
- Lussi A, Jaeggi T, Jaeggi-Schärer S (1995): Prediction of the erosive potential of some beverages. *Caries Res* 29(5), 349-54
- Lussi A, Jaeggi T, Schaffner M (2002): Diet and dental erosion. *Nutrition* 18(9), 780-1
- Lussi A, Jaeggi T, Zero D (2004): The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res* 38(1), 34-44
- Lussi A, Schaffner M, Hotz P, Suter P (1991): Dental erosion in a population of Swiss adults. *Community Dent Oral Epidemiol* 19(5), 286-90
- Magalhaes AC, Rios D, Honório HM, Delbem AC, Buzalaf MA (2009a): Effect of 4% titanium tetrafluoride solution on the erosion of permanent and deciduous human enamel: an in situ/ex vivo study. *J Appl Oral Sci* 17(1), 56-60
- Magalhaes AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MA (2009b): Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. *J Dent* 37(12), 994-8
- Magalhaes AC, Wiegand A, Rios D, Honório HM, Buzalaf MA (2009c): Insights into preventive measures for dental erosion. *J Appl Oral Sci* 17(2), 75-86
- Maupomé G, Díez-de-Bonilla J, Torres-Villaseñor G, Andrade-Delgado LC, Castaño VM (1998): In vitro quantitative assessment of enamel microhardness after exposure to eroding immersion in a cola drink. *Caries Res* 32(2), 148-53
- Mayhall CW, Butler WT (1976): The carbohydrate composition of experimental salivary pellicles. *J Oral Pathol* 5(6), 358-70
- Mayhall CW (1977): Amino acid composition of experimental salivary pellicles. *J Periodont* 48, 78-91
- Mellberg JR, Loertscher KL (1974): Comparison of in vitro fluoride uptake by human and bovine enamel from acidulated phosphate-fluoride solutions. *J Dent Res* 53, 64-7
- Meurman 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(6), 491-9
- Meurman JH, Frank RM (1991): Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res* 25(1), 1-6
- Meurman JH, Ten Cate JM (1996): Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *Eur J Oral Sci* 104(2), 199-206

- Meurman JH, Rytömaa I, Kari K, Laakso T, Murtomaa H (1987): Salivary pH and glucose after consuming various beverages, including sugar-containing drinks. *Caries Res* 21(4), 353-9
- Meurman JH, Toskala J, Nuutinen P, Klemetti E (1994): Oral and dental manifestations in gastroesophageal reflux disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78(5), 583-9
- Millward A, Shaw L, Harrington E, Smith AJ (1997): Continuous monitoring of salivary flow rate and pH at the surface of the dentition following consumption of acidic beverages. *Caries Res* 31(1), 44-9
- Moazzez R, Bartlett D, Anggiansah A (2004): Dental erosion, gastro-oesophageal reflux disease and saliva: how are they related? *J Dent* 32(6), 489-94
- Morgan BR, Artiss JD, Zak B (1993): Calcium determination in serum with stable alkaline Arsenazo III and diglyceride clearing. *Clin Chem* 39(8), 1608-12
- Nakamichi I, Iwaku M, Fusayama T (1983): Bovine teeth as possible substitutes in the adhesion test. *J Dent Res* 62(10), 1076-81
- Nekrashevych Y, Stösser L (2003): Protective influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion. An in vitro study. *Caries Res* 37(3), 225-31
- Neves BG, Farah A, Lucas E, de Sousa VP, Maia LC (2010): Are paediatric medicines risk factors for dental caries and dental erosion? *Community Dent Health* 27(1), 46-51
- Nieuw Amerongen AV, Oderkerk CH, Driessen AA (1987): Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralisation in vitro. *Caries Res* 21, 297-309
- Nogueira FN, Souza DN, Nicolau J (2000): In vitro approach to evaluate potential harmful effects of beer on teeth. *J Dent* 28(4), 271-6
- Oesterle LJ, Shellhart WC, Belanger GK (1998): The use of bovine enamel in bonding studies. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 113, 514-9
- Øgaard B (2001): CaF<sub>2</sub> formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. *Caries Res* 35 Suppl 1, 40-4
- O'Sullivan EA, Curzon ME (1998): Dental erosion associated with the use of 'alcopop' - a case report. *Br Dent J* 184(12), 594-6
- O'Sullivan EA, Curzon ME (2000): A comparison of acidic dietary factors in children with and without dental erosion. *ASDC J Dent Child* 67(3), 186-92

- Pace F, Pallotta S, Tonini M, Vakil N, Bianchi Porro G (2008): Systematic review: gastro-oesophageal reflux disease and dental lesions. *Aliment Pharmacol Ther* 27(12), 1179-86
- Pontefract H, Hughes J, Kemp K, Yates R, Newcombe RG, Addy M (2001): The erosive effects of some mouthrinses on enamel. A study in situ. *J Clin Periodontol* 28(4), 319-24
- Ramasubbu N, Thomas LM, Bhandary KK, Levine MJ (1993): Structural characteristics of human salivary statherin: a model for boundary lubrication at the enamel surface. *Crit Rev Oral Biol Med* 4(3), 363-70
- Rees JS, Griffiths J (2002): An in vitro assessment of the erosive potential of conventional and white ciders. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 10(4), 167-71
- Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ, Shen P, Walker GD, Morgan MV, Reynolds C (2008): Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Dent Res* 87(4), 344-8
- Robb ND, Smith BG (1990): Prevalence of pathological tooth wear in patients with chronic alcoholism. *Br Dent J* 169(11), 367-9
- Rogalla K, Finger W, Hannig M (1992): Influence of buffered and unbuffered acetylsalicylic acid on dental enamel and dentine in human teeth: an in vitro pilot study. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 14(5), 339-46
- Roveri R, Battistella E, Bianchi CL, Foltran I, Foresti E, Iafisco M, Lelli M, Naldoni A, Palazzo B, Rimondini L (2009): Surface Enamel Remineralization: Biomimetic Apatite Nanocrystals and Fluoride Ions Different Effects. *J Nanomaterials* 2009, Article ID 746383
- Ruse ND, Smith DC, Torneck CD, Titley KC: Preliminary surface analysis of etched, bleached and normal bovine enamel. *J Dent Res* 69(9), 1610-3
- Rykke M, Smistadt G, Rølla G, Karlsen J (1995): Micelle-like structures in human saliva. *Colloids Surf B Biointerfaces* 4, 33-40
- Rytömaa I, Järvinen V, Kanerva R, Heinonen OP (1998): Bulimia and tooth erosion. *Acta Odontol Scand* 56(1), 36-40
- Rytömaa I, Meurman JH, Koskinen J, Laakso T, Gharazi L, Turunen R (1988): In vitro erosion of bovine enamel caused by acidic drinks and other foodstuff. *Scand J Dent Res* 96(4), 324-33
- Scannapieco FA (1994): Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit Rev Oral Biol Med* 5(3-4), 203-48

- Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W (2000): Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol* 45(5), 355-61
- Schlüter N, Neutard L, von Hinckeldey J, Klimek J, Ganss C (2010): Tin and fluoride as anti-erosive agents in enamel and dentine in vitro. *Acta Odontol Scand* 68(3), 180-4
- Schmalz G, Hiller KA, Nunez LJ, Stoll J, Weis K (2001): Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endod* 27(1), 23-30
- Schüpbach P, Oppenheim FG, Lendenmann U, Lamkin MS, Yao Y, Guggenheim B (2001): Electron-microscopic demonstration of proline-rich proteins, statherin, and histatins in acquired enamel pellicles in vitro. *Eur J Oral Sci* 109(1), 60-8
- Serra MC, Messias DC, Turssi CP (2009): Control of erosive tooth wear: possibilities and rationale. *Braz J Oral Res* 23, 49-55
- Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A et al. (1991): Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference Report. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 16, 249-255
- Shah VP, Midha KK, Findlay JW, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ et al. (2000): Bioanalytical method validation – a revisit with a decade of progress. *Pharm Res* 17, 1551-1557
- Shellis RP, Hallsworth AS (1987): The use of scanning electron microscopy in studying enamel caries. *Scanning Microsc* 1(3), 1109-23
- Shellis RP, Duckworth RM (1994): Studies on the cariostatic mechanisms of fluoride. *Int Dent J* 44(3 Suppl 1), 263-73
- Siqueira WL, Oppenheim FG (2009): Small molecular weight proteins/peptides present in the in vivo formed human acquired enamel pellicle. *Arch Oral Biol* 54(5), 437-44
- Siqueira WL, Margolis HC, Helmerhorst EJ, Mendes FM, Oppenheim FG (2010): Evidence of intact histatins in the in vivo acquired enamel pellicle. *J Dent Res* 89(6), 626-30
- Skjørland KK, Rykke M, Sønju T (1995): Rate of pellicle formation in vivo. *Acta Odontol Scand* 53(6), 358-62
- 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(3), 187-91

- Smith BG, Robb ND (1989): Dental erosion in patients with chronic alcoholism. *J Dent* 17(5), 219-21
- Smith HG, Bauer PJ (1979): Light-induced permeability changes in sonicated bovine disks: Arsenazo III and flow system measurements. *Biochemistry* 18(23), 5067-73
- Smoak BR, Koufman JA (2001): Effects of gum chewing on pharyngeal and esophageal pH. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 110(12), 1117-9
- Sognnaes RF, Wolcott RB, Xhonga FA (1972): Dental erosion. I. Erosion-like patterns occurring in association with other dental conditions. *J Am Dent Assoc* 84(3), 571-6
- Sønju T (1975): Investigations of some salivary glycoproteins and their possible role in pellicle formation. *Nor Tannlaegeforen Tid* 85(10), 393-403
- Sønju T, Christensen TB, Kornstad L, Rølla G (1974): Electron microscopy, carbohydrate analyses and biological activities of the proteins adsorbed in two hours to tooth surfaces in vivo. *Caries Res* 8(2), 113-22
- Stafne EC, Lovstedt SA (1947): Dissolution of tooth substance by lemon juice, acid beverages and acids from some other sources. *J Am Dent Assoc* 34(9), 586-92
- Suyama Y, Takaku S, Okawa Y, Matsukubo T (2010): Dental erosion in workers exposed to sulfuric acid in lead storage battery manufacturing facility. *Bull Tokyo Dent Coll* 51(2), 77-83
- Tabak LA (1995): In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Annu Rev Physiol* 57, 547-64
- Theuns HM, van Dijk JWE, Jongebloed WL, Groeneveld A (1983): The mineral content of human enamel studied by polarizin microscopy, microradiography and scanning microscopy. *Arch Oral Biol* 28, 797-803
- Tuominen M, Tuominen R (1991): Dental erosion and associated factors among factory workers exposed to inorganic acid fumes. *Proc Finn Dent Soc* 87(3), 359-64
- Turssi CP, Messias DF, Corona SM, Serra MC (2010): Viability of using enamel and dentin from bovine origin as a substitute for human counterparts in an intraoral erosion model. *Braz Dent J* 21(4), 332-6
- Vacca Smith AM, Bowen WH (2000): In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Arch Oral Biol* 45(4), 277-91
- Veerman EC, van den Keybus PA, Vissink A, Nieuw Amerongen AV (1996): Human glandular salivas: their separate collection and analysis. *Eur J Oral Sci* 104(4), 346-52
- Vitkov L, Hannig M, Nekrashevych Y, Krautgartner WD (2004): Supramolecular pellicle precursors. *Eur J Oral Sci* 112(4), 320-5

- Vitorino R, Lobo MJ, Duarte J, Ferrer-Correia AJ, Tomer KB, Dubin JR, Domingues PM, Amado FM (2004): In vitro hydroxyapatite adsorbed salivary proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 320(2), 342-6
- Vongsawan K, Surarit R, Rirattanapong P (2010): The effect of high calcium milk and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on enamel erosion caused by chlorinated water. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 41(6), 1494-9
- von Schönfeld J, Hector M, Evans DF, Wingate DL (1997): Oesophageal acid and salivary secretion: is chewing gum a treatment option for gastro-oesophageal reflux? *Digestion* 58(2), 111-4
- Wang X, Lussi A (2010): Assessment and management of dental erosion. *Dent Clin North Am* 54(3), 565-78
- Wegehaupt F, Attin T (2010): The role of fluoride and casein phosphopeptide/amorphous calcium phosphate in the prevention of erosive/abrasive wear in an in vitro model using hydrochloric acid. *Caries Res* 44(4), 358-63
- Wegehaupt F, Gries D, Wiegand A, Attin T (2008): Is bovine dentine an appropriate substitute for human dentine in erosion/abrasion tests? *J Oral Rehabil* 35(5), 390-4
- West NX, Hughes JA, Addy M (2000): Erosion of dentine and enamel in vitro by dietary acids: the effect of temperature, acid character, concentration and exposure time. *J Oral Rehabil* 27(10), 875-80
- West NX, Hughes JA, Addy M (2001): The effect of pH on the erosion of dentine and enamel by dietary acids in vitro. *J Oral Rehabil* 28(9), 860-4
- 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(3), 213-7
- Wetton S, Hughes J, Newcombe RG, Addy M (2007): The effect of saliva derived from different individuals on the erosion of enamel and dentin. *Caries Res* 41, 423-27
- Wiegand A, Attin T (2003): Influence of fluoride on the prevention of erosive lesions – a review. *Oral Health Prev Dent* 1(4), 245-53
- Wiegand A, Stock A, Attin R, Werner C, Attin T (2007): Impact of the acid flow rate on dentin erosion. *J Dent* 35(1), 21-7
- Wiegand A, Bliggenstorfer S, Magalhaes AC, Sener B, Attin T (2008a): Impact of the in situ formed salivary pellicle on enamel and dentine erosion induced by different acids. *Acta Odontol Scand* 66(4), 225-30

- Wiegand A, Meier W, Sutter E, Magalhaes AC, Becker K, Roos M, Attin T (2008b): Protective effects of different tetrafluorides on erosion of pellicle-free and pellicle-covered enamel and dentine. *Caries Res* 42, 247-54
- Wiegand A, Hiestand B, Sener B, Magalhães AC, Roos M, Attin T (2010): Effect of TiF<sub>4</sub>, ZrF<sub>4</sub>, HfF<sub>4</sub> and AmF on erosion and erosion/abrasion of enamel and dentin in situ. *Arch Oral Biol* 55(3), 223-8
- Willershausen B, Philipp E, Pirke KM, Fichter M (1990): Oral complications in patients with anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl* 78(4), 293-9
- Wilson PR, Beynon AD (1989): Mineralization differences between human deciduous and permanent enamel measured by quantitative microradiography. *Arch Oral Biol* 34, 85-8
- Wiktorsson AM, Zimmerman M, Angmar-Månsson B (1997): Erosive tooth wear: prevalence and severity in Swedish winetasters. *Eur J Oral Sci* 105(6), 544-50
- 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
- Yao Y, Berg EA, Costello CE, Troxler RF, Oppenheim FG (2003): Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches *J Biol Chem* 278(7), 5300-8
- Zahradnik RT, Moreno EC, Burke EJ (1976): Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. *J Dent Res* 55(4), 664-70
- Zero DT (1996): Etiology of dental erosion - extrinsic factors. *Eur J Oral Sci* 104(2), 162-77
- Zero DT, Lussi A (2005): Erosion – chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. *Int Dent J* 55(4 Suppl 1), 285-90

## 8 Datenanhang

### 8.1 Liste der Geräte und Instrumente

- Abdampfgerät
- Abformlöffel, konfektioniert in den Größen S, M und L
- Mikrometer, Digimatic Micrometer, Mitutoyo Corporation, Beijing, China
- Mikrotiterplattenphotometer, kinetic microplate reader UV max, Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, USA
- pH-Meter, Typ 761 Calimatic, Knick, Berlin, Deutschland
- Polymerisationslampe, Degulux softstart, Degussa Dental, Hanau, Deutschland
- Schleifmaschine, Typ DP-U3, Struers, Kopenhagen, Dänemark
- Standbohrmaschine, Typ T6, Metabo, Nürtingen, Deutschland
- Tiefziehgerät für Kunststofffolien
- Titrationspipetten
- Trepanbohrer, Eigenproduktion, Wissenschaftliche Werkstätten des Klinikums, Göttingen, Deutschland
- Ultraschall-Reinigungsgerät

### 8.2 Liste des sonstigen Verbrauchsmaterials

- Abruckmaterial: Alginat Super 500 DS, Pluradent AG & Co. KG, Offenbach
- Adhäsivsystem, Optibond (2-Flaschen-System), Optibond FL Primer (Flasche 1) und Adhesive (Flasche 2), Kerr Corporation, Orange, Kalifornien, USA
- Ätzel, Phosphorsäure 37%, Ultra-Etch, Ultradent, South Jordan, Utah, USA
- Eppendorfgefäße 2 ml, Safe-Lock-Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Lichtpolymerisierbarer Kunststoff (Tetric ceram, Ivoclar Vivadent, Liechtenstein)
- Mikrotiterplatten (96 well, Flachboden), Sarstedt, Numbrecht, Deutschland
- Polyvinyl-Siloxan, President light body, Coltene, Schweiz
- Schleifpapier (Körnung 2000 und 4000), dia-plus, Oststeinbeck, Deutschland
- Tiefziehschienen, 1.5 mm aus Methacrylat

- verschließbare Kunststoffgefäße 5 ml, PS-Röhrchen, Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland

### 8.3 Liste der Chemikalien und Reagenzien

- Salzsäure (5mol/l), Merck, Darmstadt, Deutschland

Die sauren Lösungen der untersuchten pH-Werte von 2,0 (10 mmol/l), 2,3 (5mmol/l) und 2,6 (2,5 mmol/l) wurden vor Gebrauch stets frisch angesetzt.

- Kalzium-Indikator: Fluitest Ca-A-III (0,12 mmol Arsenazo III/l und 100 mmol/l Imidazol-Puffer bei pH 6,5) Biocon, Vöhl/Marienhagen, Deutschland.
- Kalzium-Stammlösung als Standard-Reagenz zur Bestimmung der erodierten Kalzium-Konzentration, 2,5 mmol/l Kalzium (Fluitest, Ca-A-III, Analyticon, Lichtenfels, Germany).
- Aqua-bidest
- NaOCl 3%
- Ethanol 70 %

8.4 Abb. 21 - 33, Tab. 7 - 18

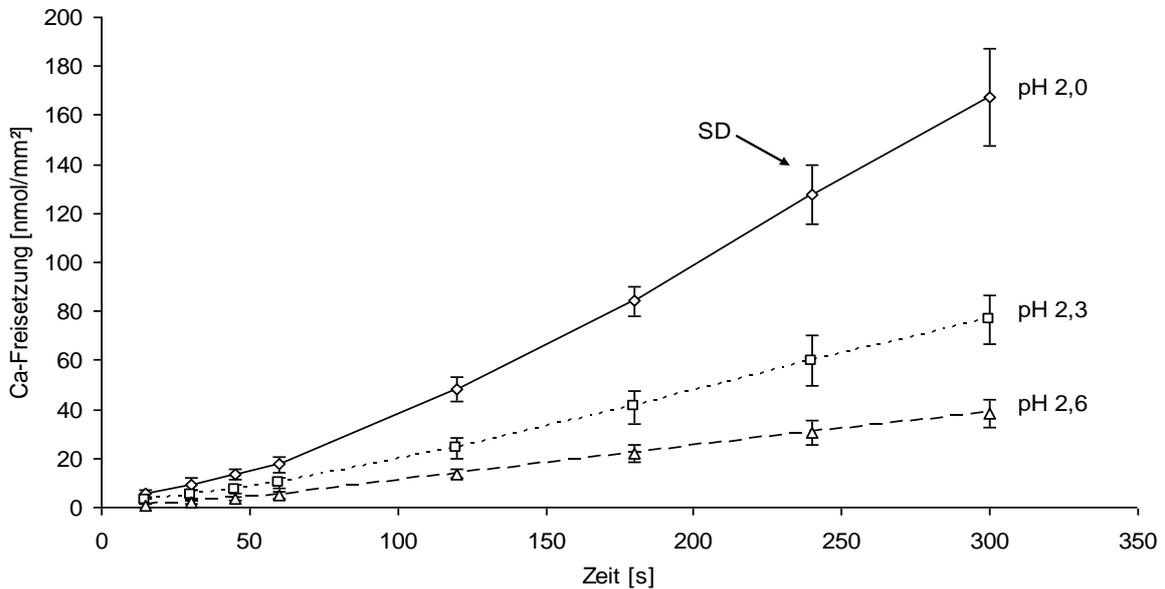


Abb. 21: Mittlere Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,0, 2,3 und 2,6 und einer Pellikelbildungszeit von 30 min. Probandenzahl 6, Probenanzahl n = 36. SD = Standardabweichung.

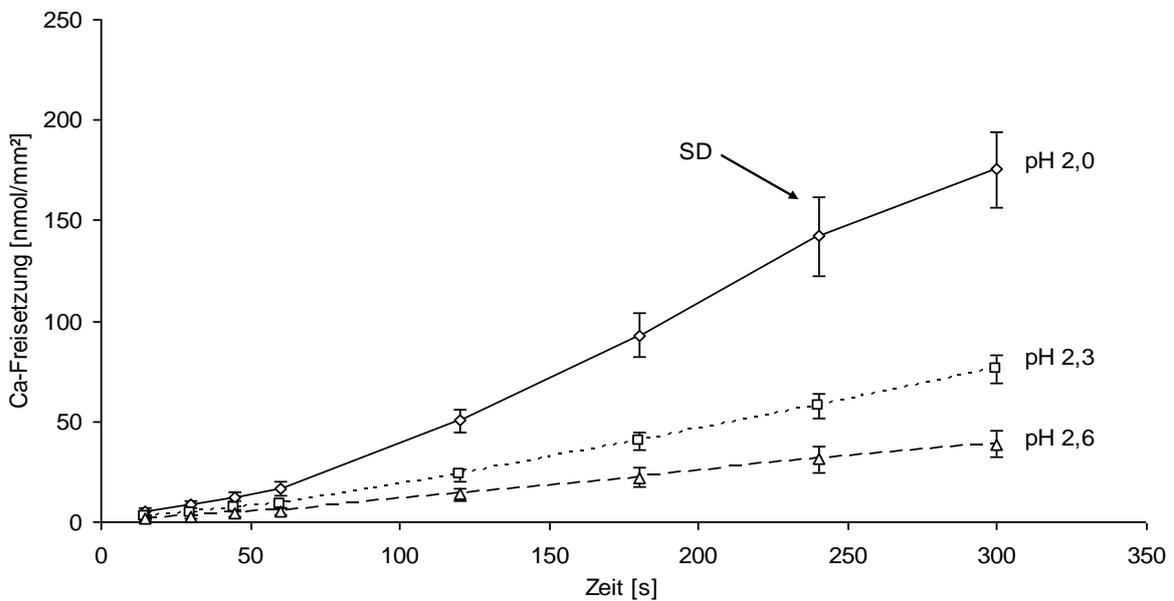


Abb. 22: Mittlere Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,0, 2,3 und 2,6 und einer Pellikelbildungszeit von 120 min. Probandenzahl 6, Probenanzahl n = 36. SD = Standardabweichung.

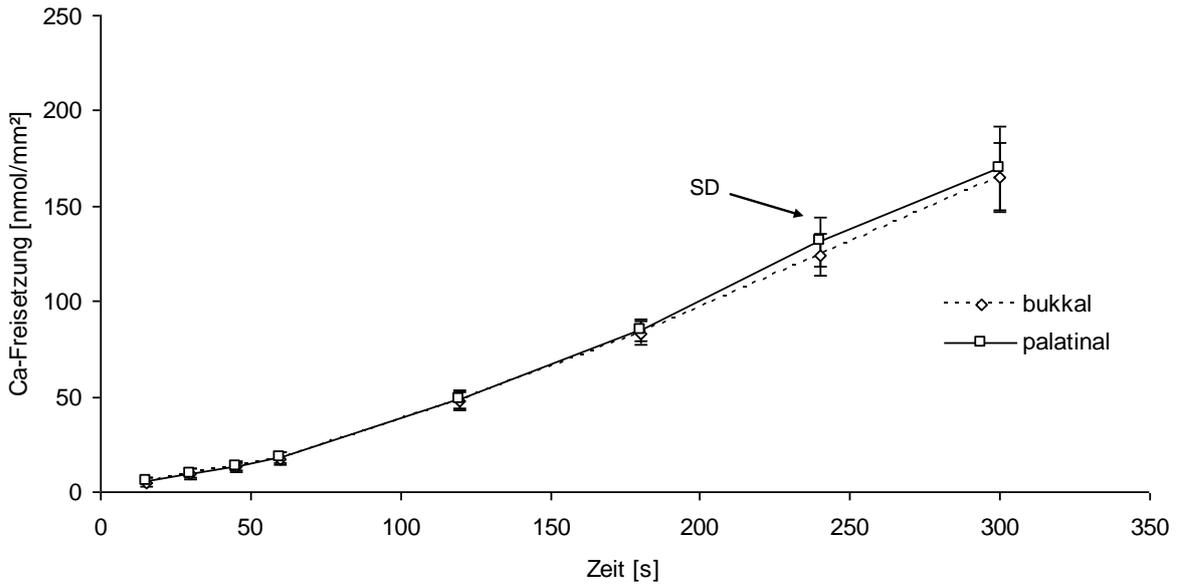


Abb. 23: Mittlere Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen bzw. palatinalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,0 und einer Pellicelbildungszeit von 30 min. Probandenzahl 6, Probenanzahl n = 36. SD = Standardabweichung.

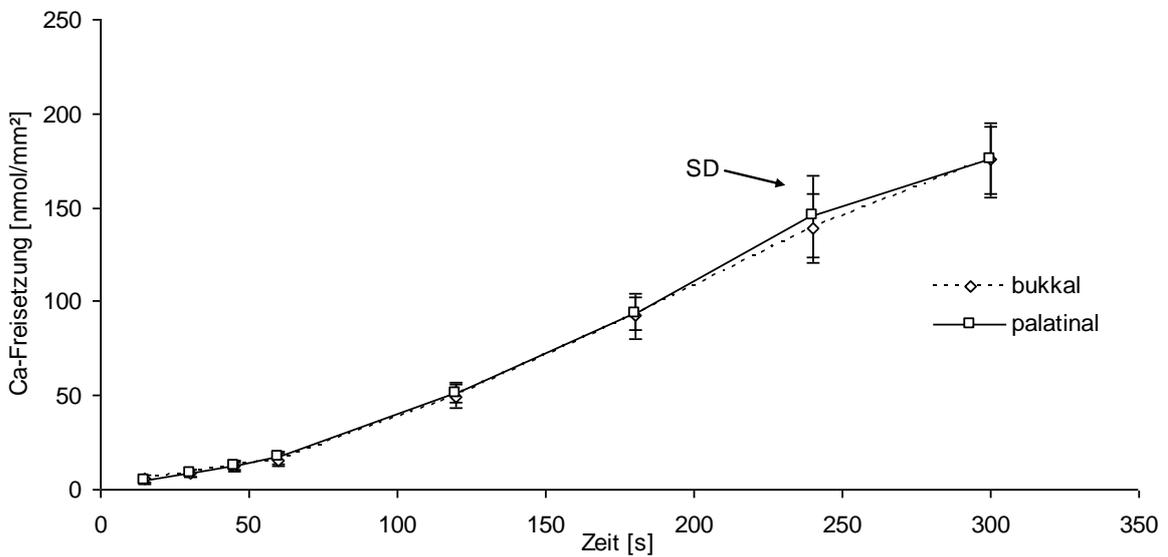


Abb. 24: Mittlere Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen bzw. palatinalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,0 und einer Pellicelbildungszeit von 120 min. Probandenzahl 6, Probenanzahl n = 36. SD = Standardabweichung.

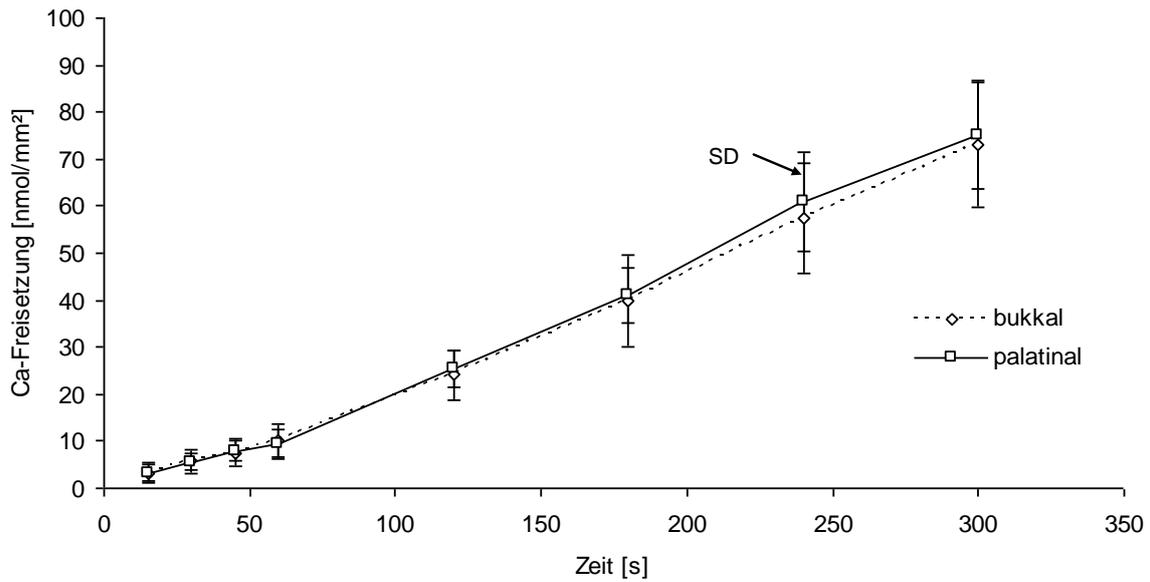


Abb. 25: Mittlere Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen bzw palatinalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,3 und einer Pellikelbildungszeit von 3 min. Probandenzahl 6, Probenanzahl n = 36. SD = Standardabweichung.

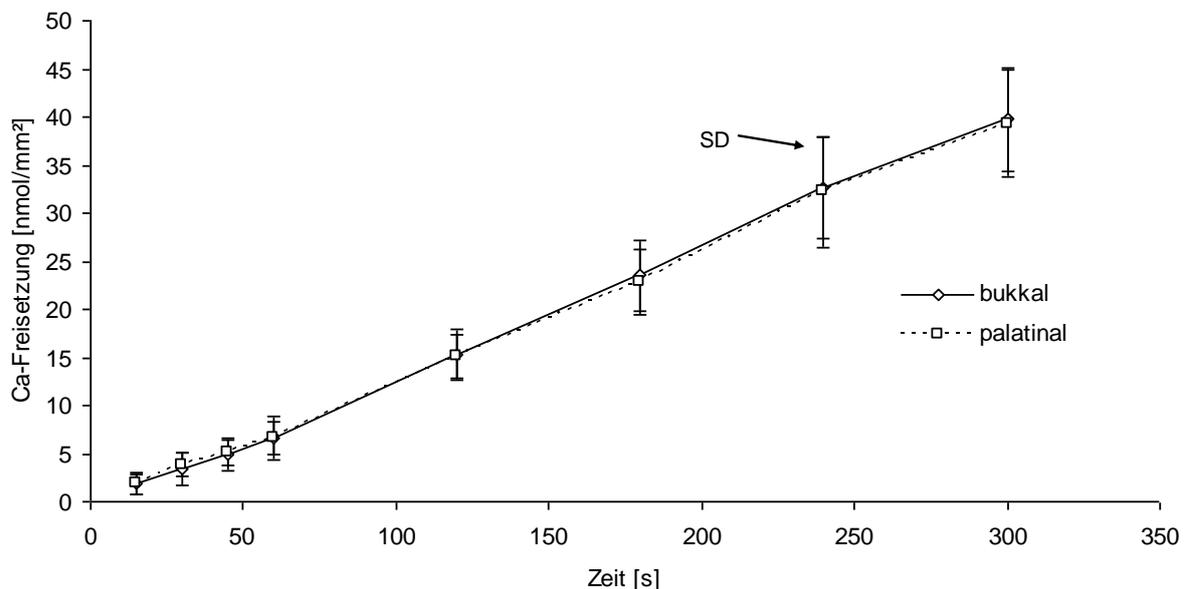


Abb. 26: Mittlere Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen bzw. palatinalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,6 und einer Pellikelbildungszeit von 3 min. Probandenzahl 6, Probenanzahl n = 36. SD = Standardabweichung.

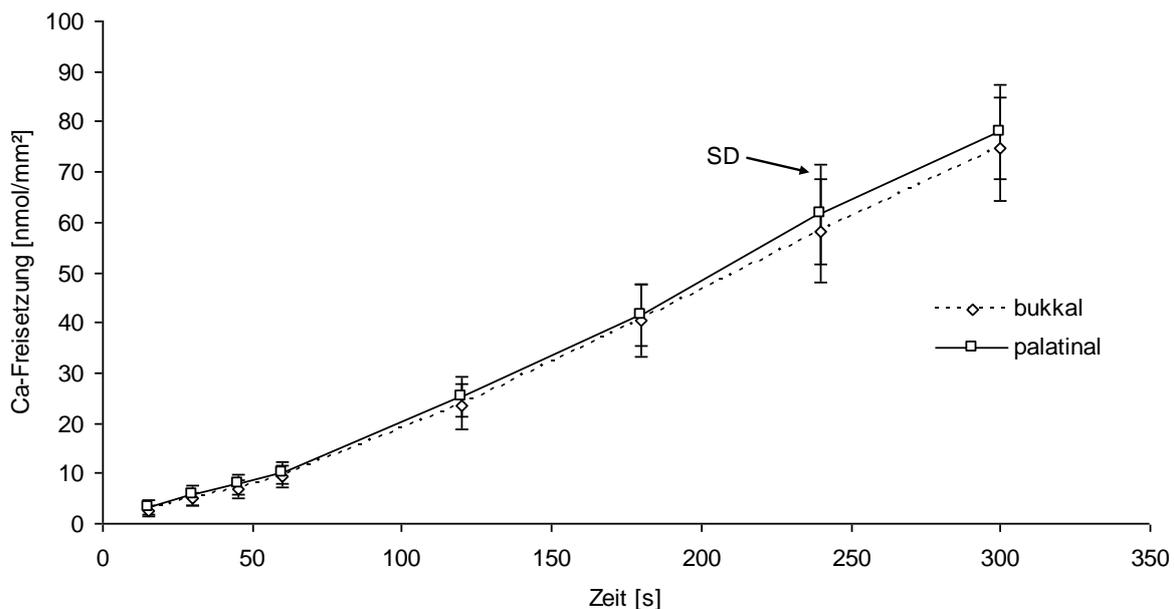


Abb. 27: Mittlere Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen bzw. palatinalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,3 und einer Pellikelbildungszeit von 30 min. Probandenzahl 6, Probenanzahl n = 36. SD = Standardabweichung.

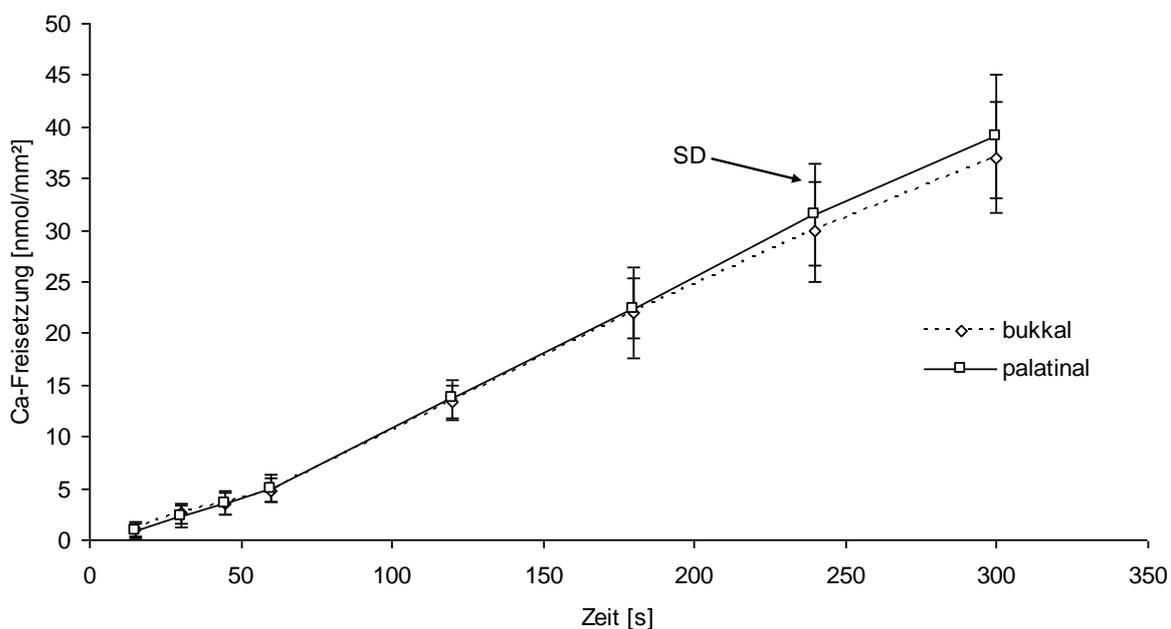


Abb. 28: Mittlere Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen bzw. palatinalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,6 und einer Pellikelbildungszeit von 30 min. Probandenzahl 6, Probenanzahl n = 36. SD = Standardabweichung.

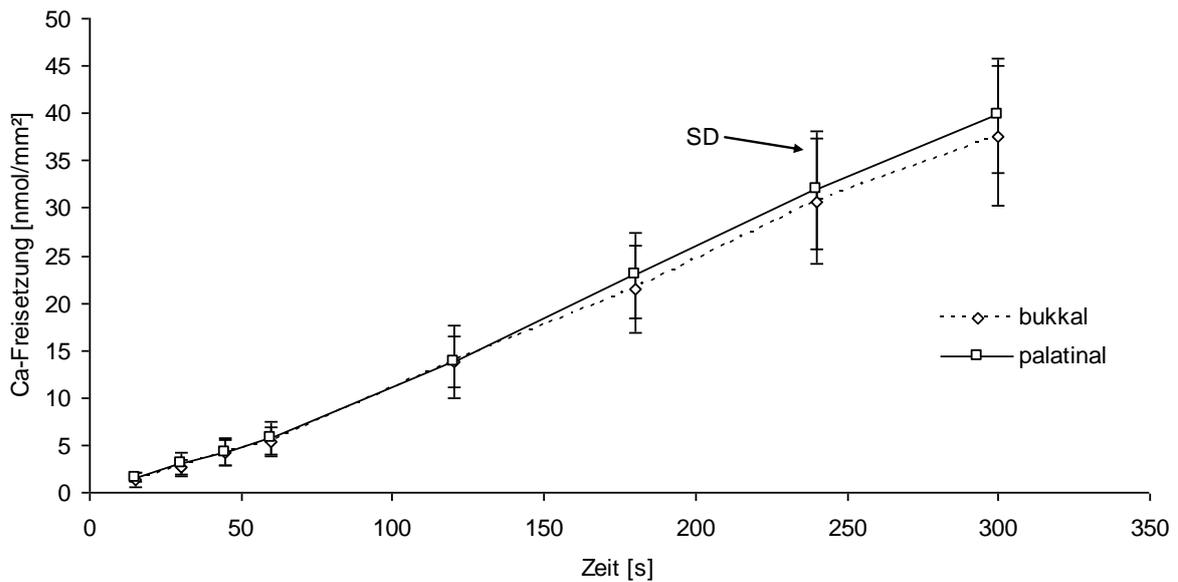


Abb. 29: Mittlere Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen bzw. palatinalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,6 und einer Pellikelbildungszeit von 120 min. Probandenzahl 6, Probenanzahl  $n = 36$ . SD = Standardabweichung.

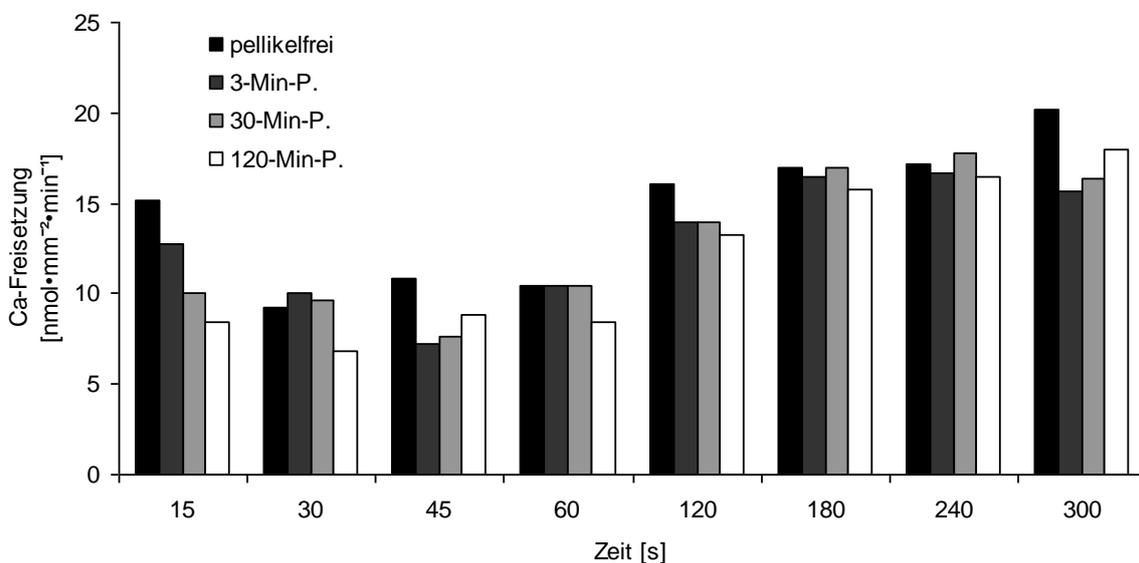


Abb. 30: Mittlere Kalzium-Freisetzung pro Minute [nmol·mm<sup>-2</sup>·min<sup>-1</sup>] aus bukkalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,3 und einer Pellikelbildungszeit von 3 min (dargestellt als dunkelgraue Säule), 30 min (dargestellt als hellgraue Säule) und 120 min (dargestellt als weiße Säule). Die Werte für die pellikelfreien Schmelzproben sind durch die schwarze Säule dargestellt.

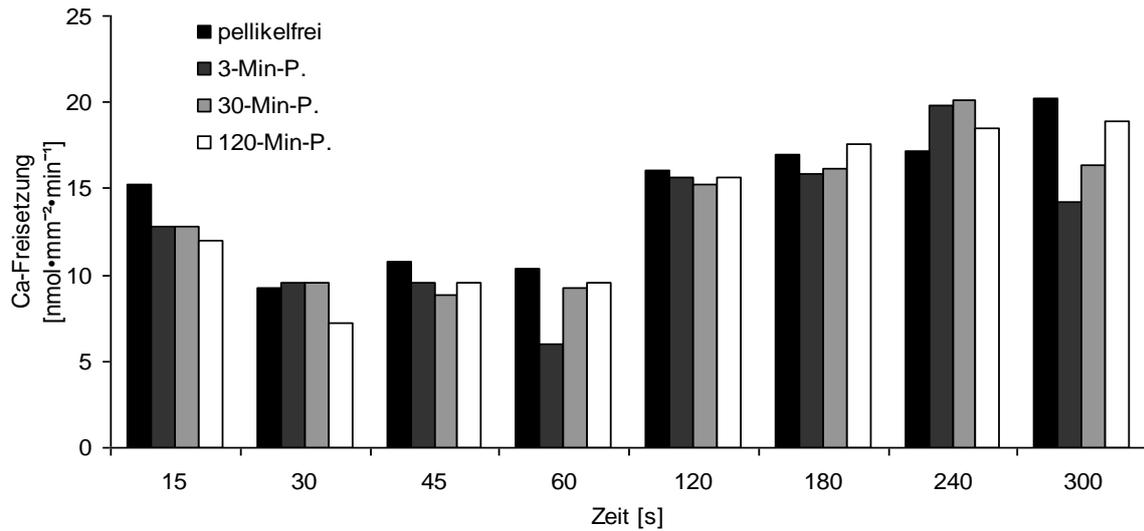


Abb. 31: Mittlere Kalzium-Freisetzung pro Minute [ $\text{nmol}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ ] aus palatinalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,3 und einer Pellikelbildungszeit von 3 min (dargestellt als dunkelgraue Säule), 30 min (dargestellt als hellgraue Säule) und 120 min (dargestellt als weiße Säule). Die Werte für die pellikelfreien Schmelzproben sind durch die schwarze Säule dargestellt.

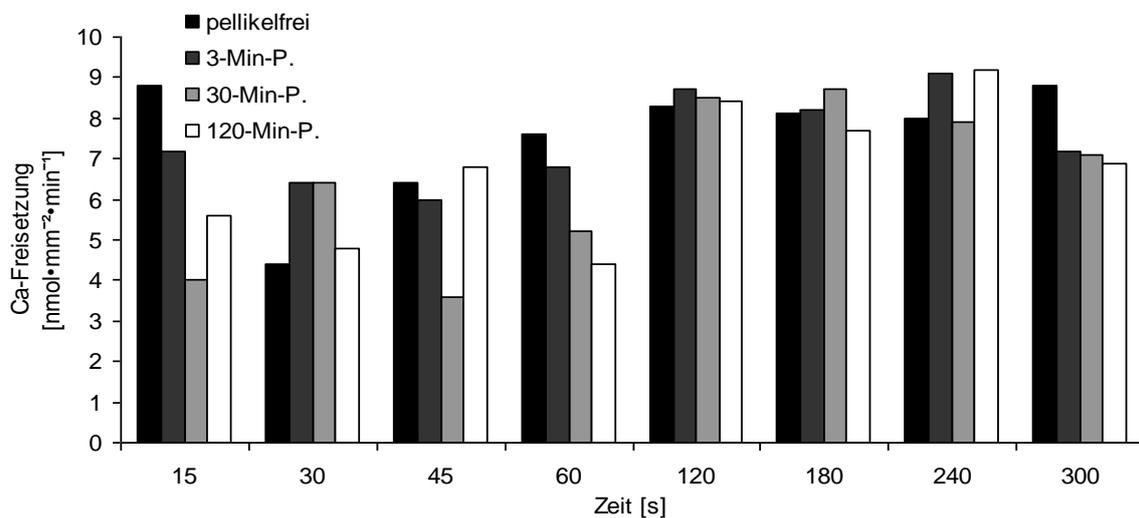


Abb. 32: Mittlere Kalzium-Freisetzung pro Minute [ $\text{nmol}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ ] aus bukkalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,6 und einer Pellikelbildungszeit von 3 min (dargestellt als dunkelgraue Säule), 30 min (dargestellt als hellgraue Säule) und 120 min (dargestellt als weiße Säule). Die Werte für die pellikelfreien Schmelzproben sind durch die schwarze Säule dargestellt.

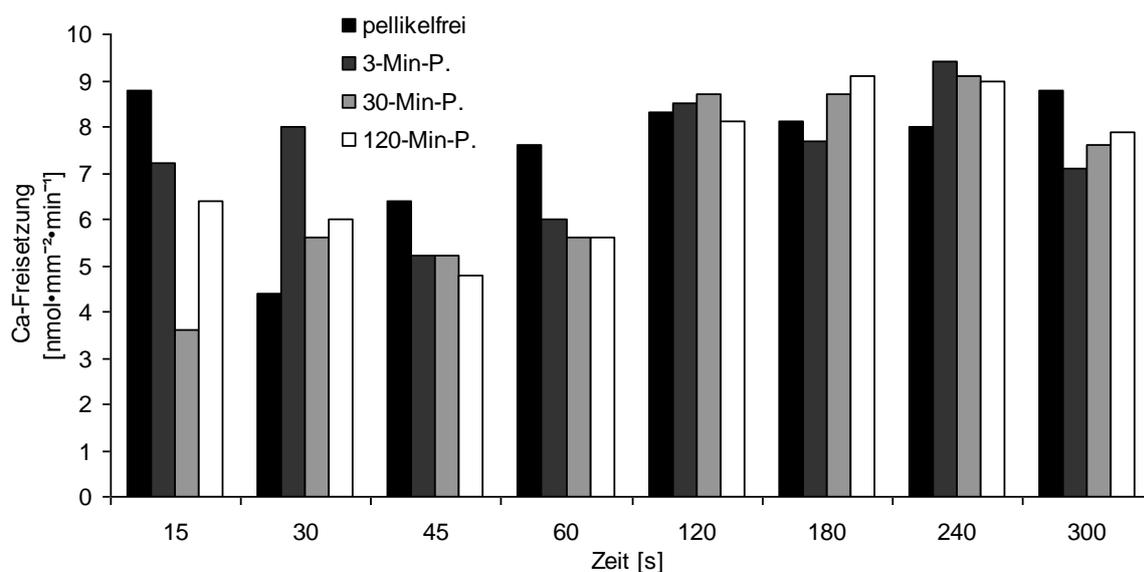


Abb. 33: Mittlere Kalzium-Freisetzung pro Minute [ $\text{nmol}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ ] aus palatinalen Schmelzproben bei 5 min Einwirkzeit von Salzsäure mit konstantem pH-Wert von 2,6 und einer Pellikelbildungszeit von 3 min (dargestellt als dunkelgraue Säule), 30 min (dargestellt als hellgraue Säule) und 120 min (dargestellt als weiße Säule). Die Werte für die pellikelfreien Schmelzproben sind durch die schwarze Säule dargestellt.

ANOVA $p = 0,377$	Pellikelfrei	3-min-P.	30-min-P.	120-min-P.
Pellikelfrei	---	0,999	0,893	0,612
3-Min-P.	0,999	---	0,889	0,499
30-Min-P.	0,893	0,889	---	0,935
120-Min-P.	0,612	0,499	0,935	---

Tab. 7: Statistischer Vergleich (ANOVA mit Post-Hoc-Test: Scheffé-Prozedur) der mittleren kumulativen Kalzium-Freisetzung [ $\text{nmol}/\text{mm}^2$ ] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben unter dem Einfluss von Salzsäure mit pH 2,0 zum Messzeitpunkt  $t = 15$  s.

ANOVA p = 0,012	Pellikelfrei	3-min-P.	30-min-P.	120-min-P.
Pellikelfrei	---	0,536	0,113	<b>0,020</b>
3-Min-P.	0,536	---	0,760	0,276
30-Min-P.	0,113	0,760	---	0,792
120-Min-P.	<b>0,020</b>	0,276	0,792	---

Tab. 8: Statistischer Vergleich (ANOVA mit Post-Hoc-Test: Scheffé-Prozedur) der mittleren kumulativen Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben unter dem Einfluss von Salzsäure mit pH 2,3 zum Messzeitpunkt t = 15 s.

ANOVA p < 0,001	Pellikelfrei	3-min-P.	30-min-P.	120-min-P.
Pellikelfrei	---	0,480	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,043</b>
3-Min-P.	0,480	---	<b>&lt; 0,001</b>	0,471
30-Min-P.	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	---	<b>0,022</b>
120-Min-P.	<b>0,043</b>	0,471	<b>0,022</b>	---

Tab. 9: Statistischer Vergleich (ANOVA mit Post-Hoc-Test: Scheffé-Prozedur) der mittleren kumulativen Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben unter dem Einfluss von Salzsäure mit pH 2,6 zum Messzeitpunkt t = 15 s.

ANOVA p = 0,003	Pellikelfrei	3-min-P.	30-min-P.	120-min-P.
Pellikelfrei	---	0,357	0,131	<b>0,005</b>
3-Min-P.	0,357	---	0,872	0,116
30-Min-P.	0,131	0,872	---	0,548
120-Min-P.	<b>0,005</b>	0,116	0,548	---

Tab. 10: Statistischer Vergleich (ANOVA mit Post-Hoc-Test: Scheffé-Prozedur) der mittleren kumulativen Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben unter dem Einfluss von Salzsäure mit pH 2,0 zum Messzeitpunkt t = 60 s.

ANOVA p = 0,004	Pellikelfrei	3-min-P.	30-min-P.	120-min-P.
Pellikelfrei	---	0,160	0,124	<b>0,004</b>
3-Min-P.	0,160	---	1,000	0,506
30-Min-P.	0,124	1,000	---	0,432
120-Min-P.	<b>0,004</b>	0,506	0,432	---

Tab. 11: Statistischer Vergleich (ANOVA mit Post-Hoc-Test: Scheffé-Prozedur) der mittleren kumulativen Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben unter dem Einfluss von Salzsäure mit pH 2,3 zum Messzeitpunkt t = 60 s.

ANOVA p < 0,001	Pellikelfrei	3-min-P.	30-min-P.	120-min-P.
Pellikelfrei	---	0,984	<b>0,002</b>	0,080
3-Min-P.	0,984	---	<b>&lt; 0,001</b>	0,060
30-Min-P.	<b>0,002</b>	<b>&lt; 0,001</b>	---	0,411
120-Min-P.	0,080	0,060	0,411	---

Tab. 12: Statistischer Vergleich (ANOVA mit Post-Hoc-Test: Scheffé-Prozedur) der mittleren kumulativen Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben unter dem Einfluss von Salzsäure mit pH 2,6 zum Messzeitpunkt t = 60 s.

ANOVA p = 0,036	Pellikelfrei	3-min-P.	30-min-P.	120-min-P.
Pellikelfrei	---	0,536	<b>0,044</b>	0,314
3-Min-P.	0,536	---	0,325	0,961
30-Min-P.	<b>0,044</b>	0,325	---	0,602
120-Min-P.	0,314	0,961	0,602	---

Tab. 13: Statistischer Vergleich (ANOVA mit Post-Hoc-Test: Scheffé-Prozedur) der mittleren kumulativen Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben unter dem Einfluss von Salzsäure mit pH 2,0 zum Messzeitpunkt t = 120 s.

ANOVA p = 0,004	Pellikelfrei	3-min-P.	30-min-P.	120-min-P.
Pellikelfrei	---	0,122	<b>0,044</b>	<b>0,005</b>
3-Min-P.	0,122	---	0,989	0,620
30-Min-P.	<b>0,044</b>	9,989	---	0,757
120-Min-P.	<b>0,005</b>	0,620	0,757	---

Tab. 14: Statistischer Vergleich (ANOVA mit Post-Hoc-Test: Scheffé-Prozedur) der mittleren kumulativen Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben unter dem Einfluss von Salzsäure mit pH 2,3 zum Messzeitpunkt t = 120 s.

ANOVA p = 0,009	Pellikelfrei	3-min-P.	30-min-P.	120-min-P.
Pellikelfrei	---	1,000	0,167	0,331
3-Min-P.	1,000	---	<b>0,038</b>	0,122
30-Min-P.	0,167	<b>0,038</b>	---	0,965
120-Min-P.	0,331	0,122	0,965	---

Tab. 15: Statistischer Vergleich (ANOVA mit Post-Hoc-Test: Scheffé-Prozedur) der mittleren kumulativen Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben unter dem Einfluss von Salzsäure mit pH 2,6 zum Messzeitpunkt t = 120 s.

ANOVA p < 0,001	Pellikelfrei	3-min-P.	30-min-P.	120-min-P.
Pellikelfrei	---	0,643	0,141	0,372
3-Min-P.	0,643	---	0,587	0,003
30-Min-P.	0,141	0,587	---	< 0,001
120-Min-P.	0,372	0,003	< 0,001	---

Tab. 16: Statistischer Vergleich (ANOVA mit Post-Hoc-Test: Scheffé-Prozedur) der mittleren kumulativen Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben unter dem Einfluss von Salzsäure mit pH 2,0 zum Messzeitpunkt t = 300 s.

ANOVA p = 0,045	Pellikelfrei	3-min-P.	30-min-P.	120-min-P.
Pellikelfrei	---	0,056	0,222	0,164
3-Min-P.	0,056	---	0,816	0,925
30-Min-P.	0,222	0,816	---	0,995
120-Min-P.	0,164	0,925	0,995	---

Tab. 17: Statistischer Vergleich (ANOVA mit Post-Hoc-Test: Scheffé-Prozedur) der mittleren kumulativen Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben unter dem Einfluss von Salzsäure mit pH 2,3 zum Messzeitpunkt  $t = 300$  s.

ANOVA p = 0,611	Pellikelfrei	3-min-P.	30-min-P.	120-min-P.
Pellikelfrei	---	0,995	0,735	0,891
3-Min-P.	0,995	---	0,776	0,941
30-Min-P.	0,735	0,776	---	0,979
120-Min-P.	0,891	0,941	0,979	---

Tab. 18: Statistischer Vergleich (ANOVA mit Post-Hoc-Test: Scheffé-Prozedur) der mittleren kumulativen Kalzium-Freisetzung [nmol/mm<sup>2</sup>] aus bukkalen und palatinalen Schmelzproben unter dem Einfluss von Salzsäure mit pH 2,6 zum Messzeitpunkt  $t = 300$  s.

## Lebenslauf

Am 15.10.1980 wurde ich in Wolfenbüttel als erstes Kind des Ehepaares Christiane Marie Häusler und Hans-Walter Häusler geboren.

1987 wurde ich in der Grundschule in Salzgitter Thiede eingeschult. Von 1991 bis 1993 besuchte ich die Orientierungsstufe Wallstrasse in Wolfenbüttel, anschließend von 1993 bis 2000 das Gymnasium Große Schule in Wolfenbüttel. Am 26.06.2000 erlangte ich die Allgemeine Hochschulreife.

Während meines Wehrdienstes 2000/01 arbeitete ich als Sanitätssoldat im Heeresfliegerregiment 16 in Celle. Im Wintersemester 2001 begann ich das Studium der Zahnheilkunde an der Georg-August-Universität in Göttingen. Ich beendete 2007 das Studium mit der Note „sehr gut“ und erhielt am 24.02.2008 meine Approbation als Zahnarzt. 2005 begann ich mit den Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation.

Von April 2008 bis März 2010 arbeitete ich als Vorbereitungsassistent in einer zahnmedizinischen Praxis in Diepholz, seit April 2010 bin ich als Zahnarzt in einer Praxis in Göttingen tätig.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits international publiziert:

- Hannig C, Becker K, Häusler N, Hoth-Hannig W, Attin T, Hannig M (2007a): Protective effect of the in situ pellicle on dentin erosion – an ex vivo pilot study. Arch Oral Biol 52(5), 444-9

## **Danksagungen**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med dent M. Hülsmann für die Betreuung als Doktorvater.

Herrn Prof. Dr. med dent C. Hannig, Dresden, und Herrn Prof. Dr. med dent T. Attin, Zürich, danke ich ganz herzlich für die Anregung zur Arbeit, die hervorragende Betreuung der Experimente, Interpretation der Daten und die engagierte Unterstützung zu jedem Zeitpunkt der Arbeit.

Weiterhin danke ich den labortechnischen Mitarbeitern der Abteilung Zahnerhaltung im Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde Göttingen, die mir während der Durchführung der Experimente hilfreich zur Seite standen, insbesondere Frau G. Grzyb und Herrn K. Becker.