

Aus dem Institut für Physiologische Chemie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Ein neuartiger biomimetischer Ansatz zur Reparatur von White-Spot-Läsionen durch  
Polyphosphate

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Zahnmedizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Dr. med. Lena Katharina Müller-Heupt  
aus Mainz

Mainz, 2022

Tag der Promotion: 23. Mai 2023

**Meiner Familie**

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Literaturdiskussion</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Der Zahnschmelz</b> .....	<b>3</b>
2.1.1 Chemische Zusammensetzung .....	3
2.1.2 Histologische Struktur .....	4
2.1.3 Amelogenese .....	6
<b>2.2 Ätiologie und Charakteristika kariöser Läsionen</b> .....	<b>7</b>
2.2.1 Faktoren der Kariesentstehung .....	7
2.2.2 Mikrobiologie der Karies .....	8
2.2.3 Klassifikation kariöser Läsionen .....	9
2.2.3 Histologische Eigenschaften kariöser Zahnhartsubstanz .....	11
2.2.5 White-Spot-Läsionen .....	13
2.2.6 Funktionen des Speichels .....	15
2.2.7 Chemie der dentalen Karies .....	18
<b>2.3 Therapieoptionen von White Spot Läsionen</b> .....	<b>20</b>
2.3.1 Fluorid .....	20
2.3.1.1 Chemische Eigenschaften .....	20
2.3.1.2 Wirkungsmechanismus auf den Zahnschmelz .....	20
2.3.1.3 Limitationen und Toxikologie des Fluorideinsatzes .....	21
2.3.2 Casein Phosphopeptid - Amorphes Calcium Phosphate (CPP-ACP) .....	22
2.3.3 ICON - Kariesinfiltration .....	22
2.4 Polyphosphate .....	23

<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1. Material</b> .....	<b>26</b>
3.1.1. Herstellung der Polyphosphat Mikropartikel.....	26
3.1.2. Herstellung der remineralisierenden Zahngel .....	27
3.1.2.1. Biomimetische polyphosphatbasierte Zahngel.....	27
3.1.2.2. Fluorid Zahngel.....	28
3.1.2.3. Placebo Zahngel.....	29
3.1.3. Präparation und Demineralisation der Molaren.....	29
3.1.4. Künstlicher Speichel.....	32
3.1.5. Behandlungsprotokoll.....	33
<b>3.2. Methoden</b> .....	<b>34</b>
3.2.1. Rasterelektronenmikroskopie.....	34
3.2.2. Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie .....	34
3.2.3. Quantifizierung des Karbonatanteils .....	35
3.2.4. Kristallinitätsindex .....	35
3.2.5. Nanoindentierung.....	35
3.2.6. Lichtmikroskopie .....	37
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
4.1. Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie .....	38
4.2. Ergebnisse der Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie.....	41
4.3. Quantifizierung des Karbonat Anteils .....	44
4.4. Ergebnisse des Kristallinitätsindex.....	45
4.5. Ergebnisse der Nanoindentierung.....	48
4.5.1. Ergebnisse der Vorversuche (Versuchsaufbau 1).....	48
4.5.2. Ergebnisse Versuchsaufbau 2.....	50
4.6. Ergebnisse der Lichtmikroskopie .....	51
4.6.1. Artificielle White-Spot-Läsionen .....	51
4.6.2. Natürliche White-Spot-Läsionen .....	51

<b>5. Diskussion</b> .....	<b>53</b>
<b>5.1. Diskussion des Materials und der Methoden</b> .....	<b>53</b>
5.1.1. Diskussion des Materials .....	53
5.1.1.1. Einfluss der Lokalisation der Schmelzprobe auf die Kristallinität .....	53
5.1.2. Diskussion der Methoden .....	53
5.1.2.1. De- und Remineralisationszyklen .....	53
<b>5.2. Diskussion der Ergebnisse</b> .....	<b>54</b>
<b>6. Schlussfolgerung</b> .....	<b>56</b>
6.1. Biomimetische Reparatur von White-Spot-Läsionen durch Ca-PolyP .....	56
6.2. Klinische Anwendungsmöglichkeiten von Ca-PolyP .....	57
<b>7. Zusammenfassung</b> .....	<b>59</b>
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>XVII</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>XVIII</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A <sub>c</sub>	Kontaktfläche
Ca-PolyP	Calciumpolyphosphat
CT	Computertomographie
CPP-ACP	Casein Phosphopeptid - Amorphes Calcium Phosphat
FHAp	Fluorid Hydroxyapatit
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
HAp	Hydroxyapatit
HCl	Salzsäure
ICDAS II	International Caries Detection and Assessment System II
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
KHN	Knoop Hardness Number
KHAp	Karbonat Hydroxyapatit
KI	Kristallinitätsindex
Mg-PolyP	Magnesiumpolyphosphat
MHAp	Magnesium modifiziertes Hydroxyapatit
mL	Milliliter
mN	Millinewton
min	Minute
Na-PolyP	Natriumpolyphosphat
Nm	Nanometer
PolyP	Polyphosphat
ppm	parts per million
REM	Rasterelektronenmikroskop
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
S	Steifigkeit
Spp.	Spezies
u.a.	unter anderem
UK	United Kingdom
USA	United States of America

WSL	White-Spot-Läsion
wt%	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Kavitätenklassen nach Black.....	9
Tabelle 2: ICDAS-II Codierung.....	11
Tabelle 3: Vergleich der Härte und Verformung der Zahnschmelzproben .....	45

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von humanem Zahnschmelz .....	5
Abbildung 2: Trias der Kariesentstehung nach Keyes .....	8
Abbildung 3: Schematische Abbildung der Klassifikation nach Marthaler .....	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zonen der Schmelzkaries .....	12
Abbildung 5: White-Spot Läsionen nach 14-monatigem Tragen kieferorthopädischer Brackets..	14
Abbildung 6: pH-Wert Änderungen nach 2-minütiger Mundspülung mit einer 10%igen Glukoselösung .....	17
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Schmelzprismen .....	19
Abbildung 8: Ionische Bindungen von Polyphosphatketten .....	23
Abbildung 9: Reparatur der Risse im Schmelzbereich durch PolyP .....	24
Abbildung 10: Amorphe Ca-polyP Mikropartikel und ihre Interaktion mit Calcium und Phosphat im Zahnschmelz.....	25
Abbildung 11: Herstellung der Ca-PolyP Mikropartikel .....	27
Abbildung 12: Schematischer Aufbau des AmF .....	29
Abbildung 13: Makroskopisch sichtbare natürliche White Spot Läsion.....	30
Abbildung 14: Schritte der Demineralisation.....	31
Abbildung 15: Schematische Darstellung Versuchsaufbau 1 .....	31
Abbildung 16: Schematische Darstellung Versuchsaufbau 2 .....	32
Abbildung 17: Einbettung der Zahnschmelzproben in Kunststoff .....	36
Abbildung 18: Vergleich der kariösen Läsionen im Rasterelektronenmikroskop .....	39
Abbildung 19: Vergleich der Schmelzoberfläche der Zahnproben.....	40
Abbildung 20: Exemplarische FTIR einer Zahnschmelzprobe .....	41
Abbildung 21: FTIR der Zahnschmelzproben Versuchsaufbau 1 .....	42
Abbildung 22: Exemplarische FTIR der Zahnschmelzproben verschiedener Zahnteile eines Zahns remineralisiert mit Ca-PolyP .....	43
Abbildung 23: Karbonatanteil der Zähne ohne künstlichen Speichel.....	44
Abbildung 24: Karbonatanteil der Zähne mit künstlichem Speichel.....	45
Abbildung 25: KI des Zahnschmelzes der Zähne ohne künstlichen Speichel .....	46
Abbildung 26: KI des Zahnschmelzes der Zähne mit künstlichem Speichel.....	49
Abbildung 27: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Nanoindentierung.....	46
Abbildung 28: Einfluss der Demineralisation und Remineralisation durch Polyphosphate auf die Härte des Zahnschmelzes (GPa).....	50
Abbildung 29: Lichtmikroskopische Aufnahmen artifizierlicher White Spot Läsionen .....	51
Abbildung 30: Lichtmikroskopische Aufnahmen natürlicher WSL.....	52

## 1. Einleitung / Ziel der Dissertation

Zahnschmelz ist das härteste Gewebe des menschlichen Körpers. Er besteht aus Hydroxyapatit (HAp), welches stäbchenförmig gebündelt ist. Diese Bündel werden als Schmelzprismen bezeichnet [1-3]. Bei pH-Werten unter 5,5 kommt es zu einer Auflösung der Apatitkristalle. Calcium und Phosphat werden in den Speichel freigesetzt. Dieser Prozess wird als Demineralisation bezeichnet [4]. Im Gegensatz hierzu werden bei der Remineralisation Mineralien aus dem Speichel in den Zahnschmelz eingelagert. Phasen der De- und Remineralisation wechseln sich zyklisch und physiologisch an den Oberflächen des Zahnschmelzes ab [5]. Sofern Zyklen der Demineralisation überwiegen, verlieren die Schmelzprismen konsekutiv ihre Struktur, bis Gewebe schließlich kollabiert [6-8].

Das erste klinische Zeichen für eine Demineralisation des Zahnschmelzes sind sogenannte White Spot Läsionen (WSL), welche makroskopisch als weißlich opake Flecken imponieren [9]. Durch säurebedingte Demineralisation vergrößern sich interkristalline Poren, weshalb der Brechungsindex verändert wird und optisch weiß imponierende Flecken entstehen. WSL sind der wichtigste iatrogen induzierte und unerwünschte Nebeneffekt einer kieferorthopädischen Therapie mit festsitzenden Apparaturen. In einer Metaanalyse von Sundararaj et al. [10] wurde eine 68,4%ige Prävalenz von WSL bei Patienten nach kieferorthopädischer Behandlung festgestellt. Tufekci et. al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass 46 Prozent der Patienten zwölf Monate nach einer festsitzenden kieferorthopädischen Behandlung mindestens eine WSL aufwiesen [11]. Die oberen Schneidezähne waren dabei häufiger betroffen als die unteren, wahrscheinlich durch eine geringere Benetzung mit Speichel.

Eine WSL als initiale kariöse Läsion kann durch intensive Mundhygiene und Fluoridierungsmaßnahmen in einen inaktiven Zustand überführt werden. Die ästhetische Beeinträchtigung und ein erhöhtes Risiko für eine Kariesprogression bleiben jedoch bestehen [12]. Mit weiterem Fortschreiten der Demineralisation erhöht sich die Porosität des Schmelzes, es kommt zum Einbruch der Schmelzoberfläche und kariogene, säureproduzierende Bakterien können sich leicht ansiedeln. Durch die Säureproduktion der Bakterien wird der Zahnschmelz weiter demineralisiert.

Für die Therapie von WSL kommen aktuell hochkonzentrierte Fluoridlacke und -pasten in Frage, die die Progression der Demineralisation durch die Bildung von säurestabilem Fluorhydroxyapatit (FHAp) verlangsamen [13]. Die Wirksamkeit des Fluorids ist jedoch von der Qualität und Quantität des Speichels abhängig [14]. Auch Casein-Phosphopeptid-amorphes Calciumphosphat (CPP-ACP) kommt für die

Behandlung in Frage. Dieses ermöglicht freiem Calcium und Phosphat die Anlagerung an den Schmelz und bildet dort Calciumphosphatkristalle [15]. Um die optische Beeinträchtigung zu kaschieren, wurde ein Kariesinfiltrationssystem erfunden, welches Kunststoff in die Porositäten infiltriert (ICON). Insgesamt gibt es bisher kein Verfahren, welches insbesondere die tiefen Läsionen remineralisiert. Aus diesem Grund ist die Erforschung neuartiger Therapeutika zur Prävention und Therapie initialer Kariesläsionen von enormer Wichtigkeit. Müller et al. konnten in einer Studie zeigen, dass Polyphosphat Mikropartikel das Potenzial besitzen, Schmelzrisse und Dentintubuli zu versiegeln. Zudem besitzen Polyphosphate antimikrobielle Eigenschaften [16]. Da die Demineralisation des Zahnschmelzes im Wesentlichen durch einen Verlust von Phosphat und Calcium stattfindet [5], könnten Polyphosphate als Phosphatdonor, insbesondere Polyphosphat-Koazervate und Ca-PolyP als Calcium und Phosphatdonor dienen.

Ziel der vorliegenden *in vitro* Arbeit war daher, die Remineralisation initialer kariöser Läsionen durch Polyphosphate nachzuweisen.

## 2. Literaturdiskussion

### 2.1 Der Zahnschmelz

#### 2.1.1 Chemische Zusammensetzung

Als Zahnschmelz (*Substantia adamantina*) wird die äußerste, nicht innervierte oder vaskularisierte, den koronalen Zahnanteil umgebende Zahnschicht bezeichnet. Sie ist die härteste Substanz des menschlichen Körpers mit einer durchschnittlichen Knoop Härte von 250 KHN (Knoop Hardness Number) an der Schmelz-Dentin-Grenze und 390 KHN an der Schmelzoberfläche [3]. Aufgrund dieser Härte, kombiniert mit seiner hohen Elastizität, kann Zahnschmelz Beißkräfte von bis 1000 Newton (N) aushalten, sowie extreme pH- und Temperaturschwankungen [17]. Obwohl Zahnschmelz im Laufe des Lebens weder repariert noch umgebaut werden kann, hält er den Bedingungen in der Mundhöhle oft viele Jahrzehnte stand. Er zeichnet sich durch einen hohen Mineralanteil mit den Hauptbestandteilen Calcium, Phosphat, Karbonat, Magnesium und Natrium aus. Ameloblasten bilden Kristalle aus Calciumphosphat, welche aus hochorganisierten, stabförmigen Bündeln aus HAp bestehen. Diese werden als Schmelzprismen bezeichnet [1-3]. HAp besitzt die chemische Summenformel:



Das Verhältnis von Calcium zu Phosphat beträgt in etwa 1,7 bis 2,4 im Zahnmineral. Demzufolge ist Zahnschmelz chemisch betrachtet aus unterschiedlichen Calciumphosphaten der Apatitgruppe aufgebaut und gilt durch die Abweichung des Calcium-/Phosphat Verhältnisses für reines HAp (molares Verhältnis 1,67) als nicht-stöchiometrisch [5]. Durch die außergewöhnliche Härte kann Zahnschmelz besonders gut physikalischen Kräften widerstehen, sodass physiologisch eine Ernährung auch mit sehr festen und harten Substanzen gut möglich ist. Das unter dem Schmelz liegende Dentin ist deutlich geringer mineralisiert, zudem sind seine Apatitkristalle kleiner und die Härte des Dentins ist im Vergleich zu Schmelz um den Faktor 4,2 geringer [18].

Auf chemischer Ebene können die Ionen des HAp substituiert werden, was zu einer unreineren Form des HAp führt. Substitution mit Fluorid führt zur Bildung von FHAp, mit Karbonat zu Karbonathydroxyapatit (KHAp) und mit Magnesium zu Magnesium modifiziertem Hydroxyapatit (MHAp). Obwohl Schmelz das härteste

Gewebe des menschlichen Körpers ist, löst er sich bei einem pH unter 5,5 auf. Alle Formen des HAp werden mit fallendem pH des umgebenden wässrigen Milieus löslicher, wobei FHAp weniger löslich als HAp ist, welches wiederum weniger löslich als MHAp ist [19]. Daraus resultiert eine geringere Säureresistenz des Zahnschmelzes, welche die Problematik kariöser Läsionen durch säureproduzierende Bakterien bedingt.

Anders als beispielsweise Knochen, Zement oder Dentin ist ausgereifter Schmelz azellulär und besitzt je nach Analysemethode und analysierter Probe einen Mineralanteil von 96 wt%, sowie weniger als 1-2% organisches Material. Hier sind insbesondere die schmelzspezifischen Proteine zu nennen, sogenannte Enameline, welche eine hohe Affinität zur Bindung von Hydroxyapatitkristallen aufweisen. Zudem beinhaltet Zahnschmelz noch Wasser, welches in etwa 4 wt% seiner Zusammensetzung ausmacht. Im Gegensatz hierzu besitzt Dentin nur 70 wt% Mineral, 20 wt% organische Matrix und 10 wt% Wasser [20].

Das Alter, die individuelle Ernährungsweise, sowie genetische und zahlreiche andere externe Faktoren beeinflussen die individuelle chemische Zusammensetzung des Zahnschmelzes. Daher kann sich dieser bezüglich seiner Härte und Dicke, sowie in seiner histologischen Struktur zwischen Personen, aber auch zwischen Zähnen derselben Person unterscheiden. Dies kann in einer unterschiedlichen Farbgebung der Zähne, von gelblichen, weißlichen bis hin zu gräulichen Schattierungen resultieren [21-24].

### **2.1.2 Histologische Struktur**

Zahnschmelz besteht aus stäbchenförmigen Kristalliten, die sich in parallel angeordneten Schmelzprismen bündeln.

Ein Kristall ist ein Festkörper, dessen Elemente (Atome, Ionen oder Moleküle) sich in einem festen, sich wiederholendem dreidimensionalen Muster, der sogenannten Kristallstruktur, anordnen. Kristallite sind Kristalle, welche die eigentliche Kristallform nicht oder nur teilweise abzeichnen. HAp kristallisiert im hexagonalen Kristallsystem, mit einem Durchmesser von ca. 40 nm. Die Länge der Kristalle beträgt um die 100 nm bis 1000 nm [25]. Die stäbchenförmigen Schmelzprismen entspringen der Schmelz-Dentin Grenze und verlaufen bis zur Oberfläche des Zahnschmelzes. Ihr Durchmesser beträgt 4 µm bis 5 µm [26]. Der interkristalline Abstand, oft auch als Poren bezeichnet,

ist gefüllt mit Luft, Wasser oder Proteinen. Der Abstand bzw. die Größe der Poren nimmt Richtung Oberfläche zu. Die Poren erlauben sowohl Diffusion als auch einen Austausch von Flüssigkeiten mit der Umgebung. Sofern der lokale pH-Wert länger andauernd unter 5,5 sinkt, vergrößert sich der interkristalline Abstand durch Demineralisation und den Verlust von Calcium- und Phosphat Ionen. Dies kann die Entstehung kariöser Läsionen begünstigen. Insbesondere, da in die interkristallinen Poren Mikroorganismen eindringen können, welche die Kariesentstehung durch die Produktion eines sauren Mikromilieus fördern [19].



Abbildung 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von humanem Zahnschmelz (5 µm). Zu sehen sind zu Stäbchen gebündelte Apatitkristallite. Bildquelle [27].

Quer zu den Schmelzprismen verlaufen sogenannten Querstreifen („cross striations“), welche das appositionelle Wachstum des Schmelzes innerhalb von 24 Stunden darstellen. Der Abstand zwischen zwei Querstreifen beträgt 3 µm bis 6 µm und markiert das Schmelzwachstum eines Tages. Diagonal zu den Querstreifen lassen sich konzentrisch angeordnete, parallel verlaufende Linien erkennen, sogenannte Retzius-Streifen. Sie sind nahe der Schmelzoberfläche typischerweise 30 µm bis 40 µm voneinander entfernt und sind dort häufig als grabenartige Vertiefungen, als sogenannte Perikymatien, sichtbar [28,29].

Auf der Oberfläche des Zahnschmelzes lassen sich mikroskopisch entwicklungsbedingte Störungen, wie Mikroporen, dünne Risse im Schmelz oder Schmelzvorsprünge erkennen. Zudem gibt es physiologisch bzw. entwicklungsbedingte Ursachen für Unebenheiten auf der Schmelzoberfläche: Sogenannte Tomes-Fortsätze. Dies sind keilförmige Zellfortsätze der Adamantoblasten, der schmelzbildenden Zellen. In diesen mikroskopischen Irregularitäten auf der Schmelzoberfläche können sich Mikroorganismen gut ansiedeln [30].

### 2.1.3 Amelogenese

Die Schmelzentwicklung läuft in rhythmischen Schüben ab, die am ausgereiften Schmelz histologisch an den Querstreifen, Retzius Streifen und weiteren strukturellen Eigenheiten erkennbar sind. Es erfolgt zunächst die präeruptive Schmelzentwicklung, die mit dem Durchbruch der Zähne endet. Ameloblasten, welche sich aus Zellen des inneren Schmelzepithels differenzieren und ektodermalen Ursprungs sind, sezernieren Schmelzmatrixproteine, welche aus Amelogeninen und Nonamelogeninen (Tuftelin, Ameloblastin, Enamelin, Proteinase) bestehen und als Matrixgranula an den Seitenfortsätzen der Tomes Fortsätze sezerniert werden. Während der sofort einsetzenden initialen Mineralisationsphase stellen die Ameloblasten hauptsächlich Calcium und Phosphat bereit, welches Kristallisationskerne bildet (Nukleation). Im weiteren Verlauf reifen die Kristallite zu ihrer Apatitstruktur aus [31]. Die extrazelluläre Matrix wird während der Kristallreifungsphase abgebaut, um die Mineralisierung abzuschließen [32,33]. Durch gerichtetes Aufwachsen kleiner Kristalle (Epitaxie) oder durch Zusammenlagerung mehrerer Primärkristalle wachsen die Kristalle [34,35]. Während die Kristallgitter an Größe zunehmen, nimmt der wässrige und organische Gehalt des Schmelzes ab [36,37]. So wird eine Matrix, die ungefähr 30 wt% Mineral enthält in eine hochorganisierte Struktur umgewandelt, die fast vollständig anorganisch ist (>99%) [38,39].

Mit dem Durchbruch der Zähne endet die präeruptive Schmelzentwicklung. Der Schmelz ist noch nicht vollständig mineralisiert und verliert ab diesem Zeitpunkt die Fähigkeit, sich zu regenerieren oder reparieren. Während der posteruptiven Schmelzreifung werden Calcium, Phosphat und Fluorid Ionen aus dem Speichel, der Nahrung oder der Zahnpasta aufgenommen, um den noch porösen Zahnschmelz weiter zu mineralisieren [22].

## **2.2. Ätiologie und Charakteristika kariöser Läsionen**

### **2.2.1. Faktoren der Kariesentstehung**

Das Wort Karies entstammt dem lateinischen „caries“ ab, welches übersetzt „Fäulnis“ oder „Morschheit“ bedeutet. Karies beschreibt eine destruierende Erkrankung der Zahnhartgewebe, die multifaktoriell bedingt ist. Sie wird durch einen bakteriellen Biofilm induziert und durch die Zufuhr vergärbare Kohlenhydrate aufrecht erhalten [40]. Karies ist die häufigste, nicht übertragbare Krankheit weltweit, mit höherer Prävalenz in sozial niedrigeren Schichten [41,42]. Listl et. al schätzen die durchschnittlich durch Karies verursachten Kosten in industrialisierten und nicht industrialisierten Ländern auf bis zu 5% der allgemeinen Gesundheitsausgaben [43]. Im Jahr 1890 formulierte Willoughby D. Miller, amerikanischer Zahnarzt und Wissenschaftler der oralen Mikrobiologie, die chemoparasitäre Theorie der Karies. Diese Theorie besagt, dass Karies durch Säuren verursacht wird, welche orale Bakterien nach der Fermentation von Zucker produzieren.

Diese Theorie wurde zu einem Meilenstein für zukünftige Studien in der Kariologie. Im Jahr 1962 ernannte Paul Keyes folgende Triade der Ätiologie der Kariesentstehung: Wirt/Zahn, Mikroorganismen und Substrat [44]. Während zwei Faktoren einen begünstigenden Effekt auf die Entstehung einer kariösen Läsion haben, ist das Zusammenspiel aller drei Faktoren für die Initiierung der Läsion notwendig. 1971 fügte Klaus König der Trias von Keyes den Faktor Zeit als vierten Faktor hinzu (Abbildung 2). Aus dieser simplifizierten Tetrade lassen sich multiple Einflussfaktoren für die Entstehung einer Karies ableiten [19]:

- Individuelle Faktoren: individuelle orale Bakterienflora, die Struktur der Zahnhartsubstanzen, die Löslichkeit der Zahnmineralien, die Speichelflussrate und die Zusammensetzung und der pH-Wert des Speichels, Immunabwehr, Zahnfehlstellungen
- Verhaltensmuster: Frequenz und Art der Aufnahme vergärbare Kohlenhydrate, Frequenz und Effektivität der oralen Hygiene, Frequenz der Zahnarztbesuche und individuellen Prophylaxe.
- Soziale Faktoren: Sozioökonomischer Status, Bildungsniveau und Kariesinzidenz im Kindesalter.

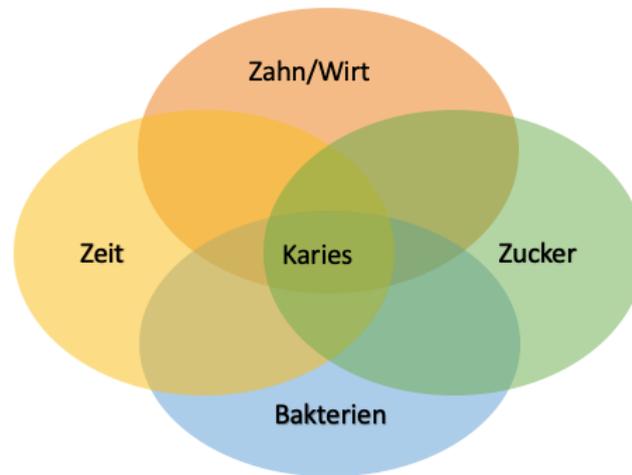


Abbildung 2: Trias der Kariesentstehung nach Keyes, modifiziert bzw. ergänzt um den Faktor Zeit nach König (1971).

## 2.2.2 Mikrobiologie der Karies

Die „chemisch-parasitären Kariestheorie“ von Miller fokussierte auf die Mischkultur des dentalen Biofilms als infektiöser Ursache der Karies. Diese Hypothese ist heutzutage durch die „spezifische Plaquehypothese“, die „unspezifische Plaquehypothese“, sowie die „ökologische Plaquehypothese“ in den Hintergrund getreten [45].

Die spezifische Plaquehypothese postuliert, dass eine Infektion mit *Streptococcus mutans* für die Entstehung einer Karies verantwortlich ist [46]. Im Gegensatz zu dieser Theorie wird bei der „unspezifischen Plaquehypothese“ angenommen, dass die gesamte orale Mikroflora bzw. deren Zusammensetzung für orale Erkrankungen ursächlich ist [47,48]. Die „ökologische Plaquehypothese“ impliziert, dass eine Dysbalance der oralen Mikroflora durch ökologischen Stress auftritt. Dieser fördert das Wachstum bestimmter oralpathogener Keime [49]. Durch häufigen bzw. hohen Konsum fermentierbarer Kohlenhydrate findet im oralen Milieu eine Selektion für Bakterien statt, welche diese zu Säuren verstoffwechseln. Es findet aus diesem Grund eine schrittweise Verschiebung des oralen Milieus zugunsten von azidogenen, säurebildenden, Bakterien und azidurischen, säuretoleranten Bakterien statt. Zu diesen gehören beispielsweise *Lactobacillus* spp und *Bifidobacterium* spp, sowie *S. mutans* oder *Streptococcus sobrinus*. Säureproduzierende Bakterien verringern den pH-Wert im dentalen Biofilm, was zur Demineralisation des Zahnschmelzes führt [46,50]. Aus dieser Demineralisation kann eine Initialkaries

resultieren, sofern kariesprotektive Faktoren (Fluoride, Pufferkapazität des Speichels etc.) dieses Ungleichgewicht nicht ausgleichen können. In weiter fortgeschrittenen kariösen Läsionen wurden vermehrt Bakterienstämme wie *Dialister* spp., *Prevotella* spp., *Eubacterium* spp., *Selenomonas* spp., oder *Fusobacterium* spp. gefunden [51]. Diese Stämme konnten auch vermehrt im oralen Mikrobiom von Kindern mit aktiver Karies im Vergleich zu Kindern mit kariesfreien Gebissen nachgewiesen werden [52]. Eine Limitierung aller mikrobiologischen Hypothesen ist die Negierung der spezifischen Wirtsantwort.

Die Vipeholm Studie aus den 1950er Jahren zeigte, dass trotz gleicher kariesfördernder ernährungsphysiologischer Bedingungen (Verabreichung kohlenhydratreicher Zwischenmahlzeiten mit einer hohen Frequenz über den Tag verteilt) über zwei Jahre nur circa 80% der Studienteilnehmer Karies entwickelten [53]. Diese Studie bestätigt, dass die Ätiopathogenese der Karies multifaktoriell bedingt ist und immer im Kontext mit wirtsspezifischen Faktoren betrachtet werden sollte.

### 2.2.3 Klassifikation kariöser Läsionen

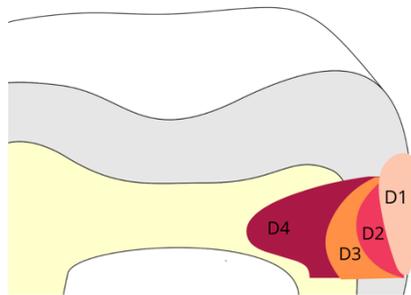
Die Klassifikation kariöser Läsionen dient als Entscheidungshilfe für geeignete therapeutische Interventionen. Die erste Klassifizierung stammt aus dem Jahr 1889 von dem amerikanischen Zahnarzt Green Vardiman Black. Sie orientiert sich an der Lokalisation der Kavität am Zahn und findet heute noch Anwendung. Es wurden jedoch aufgrund der immer minimal invasiveren Techniken zur Restauration von Zahnhartsubstanzdefekten diverse weitere Klassifikationen entwickelt, von denen an dieser Stelle die wichtigsten kurz dargestellt werden. Dentale Kavitäten werden nach Black in fünf verschiedene Klassen eingeteilt [54]:

Klasse I	Okklusale Kavität
Klasse II	Approximale Kavität im Seitenzahnbereich
Klasse III	Approximale Kavität im Frontzahnbereich ohne Beteiligung der Schneidekante
Klasse IV	Approximale Kavität im Frontzahnbereich mit Beteiligung der Schneidekante
Klasse V	Zahnhalbkavität

Tabelle 1: Kavitätenklassen nach Black [54].

Als Basis zur Quantifizierung der Ausbreitung einer kariösen Läsion in die Tiefe der Zahnhartsubstanzen, auch radiologisch, dient die Klassifikation nach Marthaler [55].

Diese teilt die Progression einer kariösen Läsion von der Schmelzoberfläche bis in die Tiefe des Dentins in vier Stufen ein (Abbildung 3):



D0 – Keine Anzeichen einer Karies

D1 – Karies ist auf die äußere Schmelzhälfte begrenzt

D2 – Karies in der inneren Schmelzhälfte

D3 – Karies ist auf äußere Dentinhälfte begrenzt

D4 – Karies erreicht die innere Dentinhälfte

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Klassifikation dentaler Karies nach Marthaler [55].

Im Jahr 2002 wurde ein weiteres Klassifikationsschema entwickelt und im Jahre 2005 modifiziert, welches sich auf die visuelle Inspektion des Zahnes im trockenen und feuchten Zustand bezieht. Mit Hilfe des in Tabelle 2 dargestellten Kodierungssystem „International Caries Detection and Assessment System II“ (ICDAS-II) können kariöse Veränderungen an Okklusal- und Glattflächen der Zähne, sowie den Wurzeloberflächen und an Restaurationen und Versiegelungen erhoben werden [56]. Da dieses auch Initialläsionen im Zahnschmelz klassifiziert, können frühe therapeutische Maßnahmen zum Verhindern der Kariesprogression eingeleitet werden.

Code 0	Keine sichtbaren kariösen Läsionen, auch nach gezielter Lufttrocknung (auch Fluorose, Verfärbungen und Erosionen werden mit 0 befundet).
Code 1	Erste visuelle Veränderungen im Schmelz, die nach gezielter Lufttrocknung sichtbar werden.
Code 2	Optisch sichtbare Schmelzveränderungen am feuchten Zahn, die sich wie folgt zeigen können: Opazitäten im Sinne einer WSL und/oder bräunlich-kariösen Verfärbung in den Fissuren/Grübchen. Die Veränderungen müssen auch am luftgetrockneten Zahn noch sichtbar sein.
Code 3	Verlust der Schmelzstruktur ohne klinisch visuell sichtbare Beteiligung des Dentins.

Code 4	Schattenbildung im Dentin (bläulich, gräulich oder bräunlich), mit oder ohne Schmelzeinbruch.
Code 5	Kavitätenbildung mit sichtbarem Dentin.
Code 6	Großflächige Kavitätenbildung mit deutlich sichtbarem Dentin. Mindestens die Hälfte der Schmelzoberfläche ist kariös zerstört.

*Tabelle 2: ICDAS-II Codierung [56].*

#### **2.2.4. Histologische Eigenschaften kariöser Zahnhartsubstanz**

Jeder kariöse Prozess am Zahnschmelz beginnt mit der Bildung und Reifung eines bakteriellen Biofilms, welcher durch die Bildung eines sauren pH-Wertes Ionen aus dem Kristallgitter des Schmelzes löst [57]. Von diesem Vorgang abzugrenzen sind erosive Veränderungen des Zahnschmelzes, welche durch nicht bakterielle Säuren hervorgerufen werden. Erosive Veränderungen an Zahnhartsubstanzen können beispielsweise durch das exzessive Trinken von Soft- oder Fruchtsaftgetränken mit sehr saurem pH-Wert oder durch Magensäure bei gastroösophagealem Reflux oder durch häufiges Erbrechen bei Patienten mit Bulimie entstehen [58]. Unter dem Biofilm löst sich die makroskopische Oberflächenbeschaffenheit des Zahnschmelzes auf. Im Laufe der Zeit wird Mineral herausgelöst und auch Schichten unter der Oberfläche werden demineralisiert. Die Entfernung des Biofilms kann die strukturellen Veränderungen im Zahnschmelz nur partiell rückgängig machen [59].

Histologisch lässt sich Schmelzkaries in vier Zonen einteilen (Abbildung 4), die sich jeweils durch ihre Porosität und ihren Mineralgehalt unterscheiden: Pseudointakte Oberflächenschicht, Läsionskörper, dunkle Zone, transluzente Zone [60-62].



Abbildung 4: Schematische Darstellung der vier Zonen einer Schmelzkaries von außen nach innen: Pseudointakte Oberflächenschicht, Läsionskörper, dunkle Zone, transluzente Zone, intakter Schmelz.

### **Pseudointakte Oberflächenschicht**

Die äußerste Zone, auch pseudointakte Oberflächenschicht genannt, charakterisiert sich durch eine relative gesunde Schmelzschicht, welche der demineralisierten Zone aufliegt. Sie zeichnet sich durch einen Verlust von weniger als 1% Mineral aus, sowie einer Porosität von 1-2%, welche annähernd gesundem Schmelz gleicht. Dies erklärt sich durch die Ablagerung von fluoridreichem Mineral in dieser Schicht, was zudem zu einer erhöhten Säureresistenz führt. Allerdings können durch die poröse Schmelzstruktur Säuren in tiefere Strukturen diffundieren und dort Mineral lösen [61]. Die Dicke der pseudointakten Oberflächenschicht beträgt zwischen 10 µm und 50 µm, im Durchschnitt ungefähr 40 µm. Sie kann jedoch auch bis zu 120 µm betragen [63].

### **Läsionskörper**

Diese Schicht weist eine Porosität von 25-50% auf. Auch in dieser Zone akkumuliert Fluorid, sowie organisches Material. Die Poren vergrößern sich konsekutiv, bis die Schmelzstruktur letztendlich kollabiert und das Gewebe zerstört ist.

### **Dunkle Zone**

Die Porosität beträgt in der dunklen Zone ungefähr 5-10%. Die Poren scheinen in dieser Zone deutlich kleiner zu sein, als in den darüber liegenden Schichten [61]. Dies

könnte sich durch Remineralisationsvorgänge im Rahmen eines natürlichen Reparatursprozesses erklären lassen oder durch Akkumulation exogener Proteine oder endogenem, organischem Material [22].

### **Transluzente Zone**

Die innerste Schicht wird als transluzente Zone bezeichnet, in welcher es zu ca. 1-2% Mineralverlust kommt. Sie zeichnet sich durch wenige, aber große Poren aus.

### **2.2.5. White Spot Läsionen**

Das erste klinische Zeichen für eine Demineralisation des Zahnschmelzes sind sogenannte White-Spot-Läsionen (WSL), welche makroskopisch als weißlich, opake Flecken imponieren [9]. Diese können, müssen aber nicht zur Ausbildung einer manifesten Karies führen. Durch gezielte Remineralisation mit Fluorid kann eine weitere Demineralisation verhindert werden [64]. Zunächst werde WSL am trockenen Zahn sichtbar, was auf eine oberflächliche Demineralisation im Schmelz hindeutet. Zum Zeitpunkt des Erscheinens von WSL am trockenen Zahn muss ein mindestens zwei Wochen bis mehrere Monate lang andauernder Demineralisationsprozess stattgefunden haben [65,66]. Bei Progression der Demineralisation in tiefere Schmelzschichten, sind die Opazitäten bereits am feuchten Zahn sichtbar [9].

WSL zeichnen sich durch eine erhöhte Porosität und größere interkristalline Abstände aus, welche durch organisches Material gefüllt werden. Diese Poren ermöglichen sowohl die Diffusion von Mineralien als auch von Säuren in die Läsion [67]. Hierdurch ist eine weitere Demineralisation, aber auch eine Remineralisation möglich. Sie erscheinen aufgrund eines optischen Phänomens weiß, welches von der Größe der Poren im Läsionskörper abhängig ist. Mit zunehmender Demineralisation nimmt die Porengröße zu, wodurch der Brechungsindex des Lichts im Zahnmineral geändert wird. Der Brechungsindex beeinflusst die Lichtbrechung im Zahnschmelz, weshalb die Stellen mit vergrößerten Poren weißlich erscheinen. Die Sichtbarkeit der Opazität nimmt im trockenen Zustand des Zahns zu, weil der Unterschied des Brechungsindex von Luft (1,0) zu Zahnschmelz (1,63) größer ist, als der von Zahnschmelz zu Wasser (1,33) [68].

WSL besitzen eine pseudointakte Oberflächenschicht, die im Vergleich zu gesundem Zahnschmelz nur wenig Mineralverlust (ca. 1%) aufweist. In dieser Schicht

akkumuliert zudem Fluorid, was zu einer erhöhten Säureresistenz führt. Durch etwas porösere Schmelzstruktur von 1-2%, welche annähernd gesundem Schmelz gleicht, können Säuren in die tieferen Schichten diffundieren und dort Mineral lösen [61]. WSL können klinisch aktiv oder inaktiv sein [69]. Die pseudointakte Oberflächenschicht ist bei aktiven Läsionen poröser als bei inaktiven [70]. Arends et al. beschreiben, dass der Mineralanteil in der pseudointakten Oberflächenschicht einer WSL den Aktivitätsgrad der Läsion wiedergibt [71]. Cochrane et al. konnten in ihrer Studie jedoch keine Korrelation bezüglich des Mineralgehalts und der Aktivität der Läsionen feststellen [70].

Die Prävalenz der WSL ist insbesondere bei Patienten mit kieferorthopädischen festsitzenden Apparaturen hoch und wird in der Literatur mit 2% bis 96% beschrieben [72]. WSL sind eine der häufigsten Nebenwirkungen einer kieferorthopädischen Therapie und stellen eine funktionelle und ästhetische Beeinträchtigung der Patienten dar (Abbildung 5).



*Abbildung 5: WSL nach Entbänderung von Multibracket-Apparaturen. A) Patient mit Deckbiss und stark ausgeprägten WSL auf der gesamten Zahnfläche der Oberkiefer Front- und Seitenzähne. B) Patient mit WSL kranial und kaudal der zuvor adhäsiv befestigten Brackets.*

Therapeutisch können WSL entweder remineralisiert werden (z.B. mit Fluorid) oder mit niedrigviskösen Kunststoffen infiltriert werden (ICON) [73]. Die Remineralisation durch Fluorid beeinflusst bestehende Opazitäten nicht und ist rein funktionell. Mit ICON können optische Verbesserung der Opazitäten erreicht werden. Das Ausmaß des ästhetischen Ergebnisses variiert in der Praxis.

## 2.2.6. Funktionen des Speichels

Der Speichel ist nicht nur ein wichtiges physiologisches Hilfsmittel bei der Nahrungsaufnahme, sondern besitzt auch relevante Funktionen zum Schutz der Zahnhartsubstanz. Er besteht zu 99% aus Wasser und zu ca. 1% aus Proteinen, Glykoproteinen und Enzymen. Die paarig angelegten großen Speicheldrüsen des Kopfes sind für die Produktion und Sekretion von ca. 90% des Speichels verantwortlich. Zu diesen zählen die Glandulae submandibulares, von denen ca. 65 % des Speichels produziert werden, die Glandulae parotideae, die für ca. 30 % der Speichelproduktion verantwortlich sind und die Glandulae sublinguales, die ungefähr 5% des Speichels produzieren. Die kleinen Speicheldrüsen, welche diffus palatinal, labial und lingual verteilt sind, sind für 10% der Speichelproduktion verantwortlich. Pro Minute werden ca. 0,1 bis 0,3 mL Speichel aus den Speicheldrüsen sezerniert [74]. Die sogenannte Speichelflussrate variiert jedoch inter- und intraindividuell und wird beispielsweise durch die Aktivität des Parasympathikus stimuliert. Bei Dehydrierung, sportlicher Betätigung oder bei sympathischer Aktivität und dem Ausstoß von Adrenalin ist sie erniedrigt [75]. Im Rahmen einer medikamentösen Therapie, einer tumorbedingten Bestrahlung im Kopf-Hals-Bereich oder bei bestimmten Erkrankungen, zum Beispiel dem Sicca-Syndrom im Rahmen eines Sjögren Syndroms kann der Speichelfluss dauerhaft erniedrigt sein. Dieser Zustand wird als Hyposalivation bezeichnet. Eine dauerhafte Trockenheit der Mundhöhle als Xerostomie. Zu einer gesteigerten Produktion von Speichel, einer Hypersalivation, kann es physiologisch durch den zirkadianen Rhythmus kommen, bei Übelkeit oder durch neurologische Erkrankungen [74,76]. In Bezug auf die Prävention kariöser Läsionen besitzt Speichel vier wesentliche Eigenschaften: Spülfunktion (Clearance), Pufferfunktion, Remineralisationsfunktion, sowie antibakterielle Wirkung.

### **Spülfunktion (Clearance)**

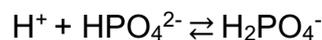
Saure und stark zuckerhaltige Bestandteile der Nahrung werden durch den Speichel verdünnt und konsekutiv aus der Mundhöhle in den Magen transportiert. Neben der Spülfunktion an sich, scheint auch die Fließgeschwindigkeit des Speichels eine Rolle bei der Clearance kariogener Substrate zu spielen [77]. Diese ist an den Lingualflächen der Unterkiefermolaren durch die anatomische Lage der Speicheldrüsen und Ausführungsgänge höher und beträgt circa 8 mm/min, an den

Bukkalfächen der Molaren beträgt sie hingegen nur 1 mm/min [78], was die erhöhte Inzidenz von Karies an Bukkalfächen erklären könnte. Bei Patienten mit Xerostomie ist die Spülfunktion generell erniedrigt, was mitunter zur erhöhten Inzidenz kariöser Läsionen führt [79].

### **Die Pufferfunktion**

Speichel verfügt über drei wichtige Puffersysteme, die Säuren in der Mundhöhle bis zu einem gewissen Grad neutralisieren können: Das Phosphat, das Bikarbonat und das Protein Puffersystem. Bei einem pH von 5 bis 5,5 löst sich die Kristallstruktur des Zahnschmelzes auf [80]. Die Funktion der Puffer im Speichel liegt daher in der effektiven pH-Wert Erhöhung, nachdem diese direkt durch den Konsum von Säuren oder indirekt über den Konsum von Zucker und die daraufhin folgende Verstoffwechselung der säureproduzierenden Bakterien vermindert wurde. Wie effektiv der Speichel im oralen Biofilm die Säuren neutralisieren kann, hängt mit der Dicke des Biofilms zusammen [74].

Phosphat liegt bei einem pH-Wert von 6,0 – 7,5 vor allem als Dihydrogen- ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) und Monohydrogen- ( $\text{HPO}_4^-$ ) Phosphat vor und reagiert mit Wasserstoff-Ionen nach der folgenden Gleichung:

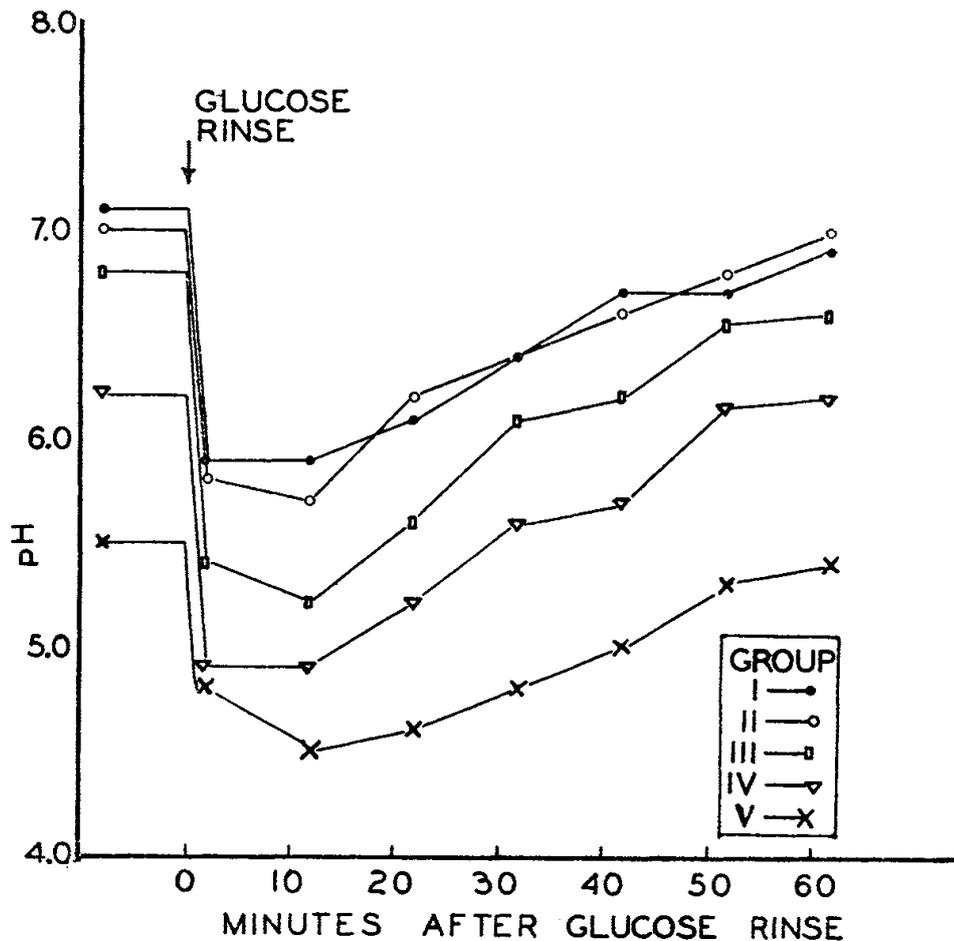


Sofern genügend Monohydrogenphosphat im Speichel befindet, senkt sich der pH-Wert auch bei Vorliegen von Wasserstoff-Ionen nicht. Sofern der pH-Wert auf ca. 6 sinkt, greift der Bikarbonat Puffer und reagiert mit Wasserstoff-Ionen in der folgenden Gleichung:



Der Bikarbonatpuffer nimmt mit Zunahme der Fließrate überproportional zu, da die Konzentration von Bikarbonat mit dieser auch zunimmt [78]. Bilbilova et. al konnten in einer Fall-Kontroll-Studie zeigen, dass die Kohorte kariesfreier Probanden höhere Konzentrationen an Bikarbonat im Speichel aufwiesen, als die Kohorte mit Karies [81].

Der Proteinpuffer weist eine eher geringe Pufferkapazität auf. Er besteht aus einer Vielzahl von Proteinen (Statherine, prolinreiche Proteine) und wirkt bei pH-Werten von 3,3 - 7,2 [82]. Unterschiedliche Pufferkapazitäten des Speichels zwischen Individuen mit und ohne Karies wurden bereits 1944 von Robert Stephan beschrieben (Abbildung 6). Aus dieser Studie leitet sich die „Stephanskurve“ ab, welche die durchschnittliche Änderung des pH-Wertes nach dem Konsum von Zucker darstellt.



**Fig. 1.** pH Curves of plaques on labial surfaces of upper anterior teeth in different caries activity groups. Groups: I = caries-free; II = previous caries but caries-inactive during period of study; III = slight caries-activity; IV = marked caries-activity; V = extreme caries-activity.

Abbildung 6: pH-Wert Änderungen nach 2-minütiger Mundspülung mit einer 10%igen Glukoselösung. Bildquelle: [83].

## **Remineralisationsfunktion**

Remineralisation im Kontext der dentalen Materialien bedeutet, dass herausgelöste Mineralien wieder in den Schmelz eingelagert werden. Da Speichel an Mineralien, insbesondere an Calcium und Phosphat übersättigt ist, können diese wieder in den Schmelz eingelagert werden [84]. Statherin, ein Speichelprotein, welches durch seine Größe nicht durch die Poren des Schmelzes in diesen eindringen kann, sorgt dafür, dass die Mineralien nicht schon im Speichel ausfallen, sondern erst im Schmelz. Da die Statherine aufgrund ihrer Größe nicht in den Schmelz eindringen können, findet dort auch keine Hemmung der Ausfällung statt [80]. Remineralisationsvorgänge durch den Speichel können jedoch die komplexe Mikrostruktur des Schmelzes nicht wiederherstellen [85]. Aus der geringeren Speichelbefeuchtung der bukkalen Zahnflächen resultiert eine geringere Remineralisationskapazität. Aus diesem Grund konnte an Bukkalflächen im Vergleich zu Lingualflächen eine erhöhte Kariesinzidenz festgestellt werden [86,87].

## **Antibakterielle Wirkung**

Speichel enthält sowohl die Immunglobuline IgA, IgG und IgM, sowie nicht-immunologisch wirksame antibakterielle Komponenten: Muzine, Peptide, Enzyme (Laktoferrin, Lysozyme, Peroxidase). Zudem wirken die Proteine des Speichels antibakteriell, da sie beispielsweise Bakterien aggregieren und so „verklumpen“. Eine starke antibakterielle Wirkung kommt auch dem „Spüleffekt“ des Speichels zu, der planktonische Bakterien regelmäßig in den Magen-Darm-Trakt befördert [88].

### **2.2.7 Chemie der dentalen Karies**

Die De- und Remineralisation ist ein physiologischer Prozess, der an den Oberflächen des Zahnschmelzes zyklisch abläuft. Während der Demineralisation kommt es zu einer Auflösung der HAp Kristalle durch Säuren, welche in den porösen Schmelz diffundieren können.  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{PO}_4^{3-}$  werden hierdurch gelöst und in den Speichel freigesetzt (Abbildung 7).

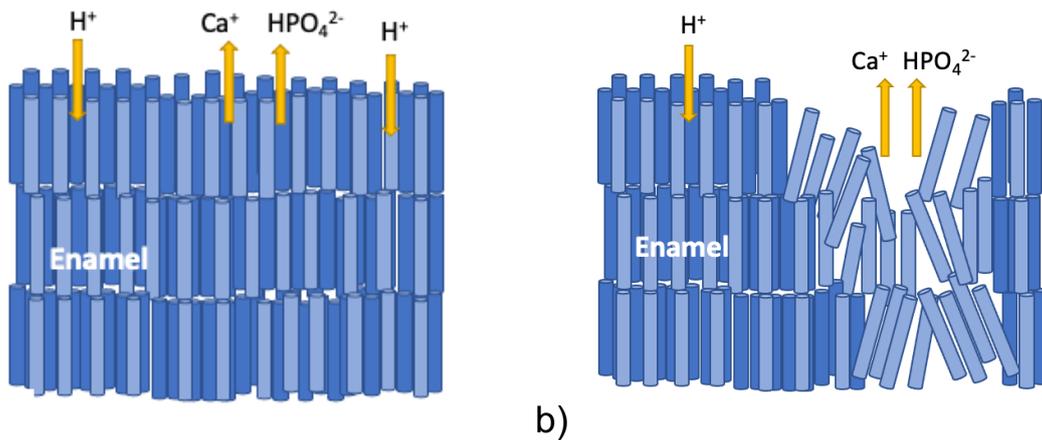
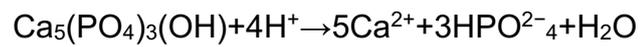


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Schmelzprismen von a) gesundem Schmelz und b) demineralisiertem Schmelz. Schematische Darstellung in Anlehnung an Mohammed et al. [89].

Die Auflösung der Schmelzstrukturen läuft nach folgender Gleichung ab [90]:



Sofern Zyklen der Demineralisation überwiegen, verlieren die Schmelzprismen konsekutiv ihre Struktur und das Hartgewebe kollabiert. Dieser Vorgang kann durch Remineralisationsvorgänge aufgehalten werden [6-8].

## **2.3. Therapieoptionen von White-Spot-Läsionen**

### **2.3.1. Fluorid**

#### **2.3.1.1. Chemische Eigenschaften**

Fluorid (F<sup>-</sup>) entsteht aus der Elektronenaufnahme von Fluor (F<sub>2</sub>) und ist ein Säureanion der Fluorwasserstoffsäure:



Fluorid kommt in der Luft, im Wasser, in der Lithospäre, in Lebensmitteln, in Salz oder in dentalen Hygieneprodukten, z.B. Zahnpasta, Mundspüllösungen, Zahngelen, Zahnlacken etc. vor bzw. kann diesen zugesetzt sein. In der Dentalindustrie verwendete fluoridhaltige Salzverbindungen sind beispielsweise Natriumfluorid, Natriummonofluorphosphat, Zinnfluorid oder Aminfluorid (z.B. Olaflur, Dectaflur). Die Fluoridmenge wird in parts per million (ppm) angegeben. Die in Deutschland zulässige Höchstmenge für Zahnpasta beträgt 1500 ppm für Erwachsene, sowie 1000 ppm für zwei- bis sechsjährige Kinder [91]. In Mundspüllösungen dürfen 250 - 500 ppm und in Zahngelen und -lacken > 5000 ppm enthalten sein [92].

#### **2.3.1.2. Wirkungsmechanismus auf den Zahnschmelz**

Fluorid hemmt die Demineralisation des Zahnschmelzes und fördert seine Remineralisation [93]. Sofern genügend Fluorid Ionen im Speichel oder lokal am Zahn verfügbar sind, wird ionisch gebundenes Fluorid strukturell als FAp oder FHAp in den Schmelz eingebaut und stabilisiert sie. Da die Löslichkeit von FHAp geringer ist, als die von HAp, wird der Schmelz resistenter gegen Säureangriffe [19]. Die Konzentration von FAp/FHAp ist im kariösen Schmelz signifikant höher als im gesunden Schmelz [94]. Zudem besitzt Fluorid eine direkt antibakterielle Wirkung durch die Interaktion mit dem Stoffwechsel oraler Mikroben [95].

Die kariesprotektive Wirksamkeit von Fluorid konnte durch diverse randomisiert kontrollierte Studien und Metaanalysen gezeigt werden. Eine Cochrane Metaanalyse mit 40.000 Kindern zeigte eine mittlere Reduktion der Kariesläsionen um 24% bei Kindern, die sich täglich mit fluoridhaltiger Zahnpasta die Zähne putzten [96]. Eine

zweimalige Anwendung am Tag erhöht den präventiven Effekt. Auch bezüglich der Remineralisation von WSL nach kieferorthopädischer Therapie zeigte die Anwendung von 5%igem Natriumfluorid (1x/Monat beim Zahnarzt aufgetragen) über sechs Monate einen Remineralisationseffekt. Die Ästhetik der Läsionen wurde jedoch nicht verbessert [97].

### **2.3.1.3. Limitationen und Toxikologie des Fluorideinsatzes**

Die Fluoridierung kann lokal (Zahnpasta, Mundspüllösungen, Zahngel etc.) oder systemisch (Fluoridtabletten, fluoridiertes Trinkwasser, fluoridiertes Speisesalz etc.) erfolgen. Um die Gesamtmenge an Fluorid nicht zu übersteigen, wird jedoch nur eine Form der systemischen Fluoridzufuhr empfohlen. Insbesondere im Kindesalter, wenn Schmelzbildung noch nicht abgeschlossen ist, kann eine chronisch zu hohe Zufuhr von Fluorid zu Zahnfluorose führen. Zu hohe Dosen an Fluorid scheinen die Ameloblastenfunktion und somit die Schmelzbildung zu stören [98]. Zähne mit Fluorose besitzen durch Hypomineralisierungen unter der Zahnschmelzoberfläche eine weiß-opake Zeichnung. Bei schweren Formen der Fluorose kommt es zum sogenannten „Mottling“ oder „Pitting“, sowie einem Verlust der Schmelzoberfläche, was als bräunliche Färbung imponiert [99]. Der Begriff „Mottling“ bezeichnet gleichmäßig über die Schmelzoberfläche verteilte weißlich-opake Linien. Der Begriff „Pitting“ beschreibt lochartige, scharf begrenzte Vertiefungen im Schmelz.

Eine akute Vergiftung mit Fluorid kann mit Symptomen wie Übelkeit, Schwindel und Erbrechen einhergehen, wobei die letale Fluorid-Dosis mit einer Schwankung von 32 bis 64 mg/kg Körpergewicht angegeben wird [100]. Die tolerablen oberen Zufuhrmengen von Fluorid werden durch die europäische Lebensmittelbehörde EFSA festgelegt. Bei Kindern im Alter von 1 - 8 Jahren liegt sie bei 0,1 mg/kg Körpergewicht, bei Kindern im Alter von 9 - 14 Jahren liegt sie bei 5 mg/Tag und für Jugendliche über 15 Jahren wird sie mit 7 mg/Tag angegeben [95]. Die wahrscheinlich toxische Grenze von Fluorid für Erwachsene wird bei 5 mg Fluorid pro kg Körpergewicht angegeben.

Da Fluorid sowohl Calcium als auch Phosphat Ionen aus dem Speichel benötigt, um den Remineralisationsprozess zu verbessern, wird die Wirksamkeit durch Hyposalivation bzw. Xerostomie herabgesetzt. In diesen Fällen können Produkte mit Calcium und Phosphat, beispielsweise Casein Phosphopeptid - Amorphes Calcium Phosphate (CPP - ACP) einen zusätzlichen Nutzen erbringen [101,102].

### **2.3.2. Casein Phosphopeptid - Amorphes Calcium Phosphat**

CPP – ACP besteht aus Calcium und Phosphat, komplexiert mit Casein, welches aus Milchproteinen gewonnen wird. CPP – ACP bindet an Dentin, Bakterien und Weichgewebe. Sein Wirkmechanismus beruht wahrscheinlich auf einer Erhöhung an bioverfügbarem Calcium und Phosphat im Speichel und der Schmelzoberfläche. Unter sauren Bedingungen wird das ACP vom CPP – ACP Komplex abgespalten und dissoziiert zu Calcium und Phosphat Ionen, sodass eine Übersättigung dieser Ionen an der Zahnoberfläche vorherrscht [103]. *In vitro* Studien zeigten durch CPP – ACP eine Reduktion des Mineralienverlusts und eine Reduktion der Läsionstiefe [104-106].

### **2.3.3. ICON – Kariesinfiltration**

Die Kariesinfiltration ist eine minimalinvasive Füllungsmethode für initiale Kariesläsionen, die maximal bis ins erste Drittel des Dentins reichen (D1). Sie wird unter dem Namen Icon® von der Firma DMG America Company vermarktet und soll demineralisierten Schmelz stabilisieren, füllen und die interkristallin vergrößerten Poren versiegeln, ohne durch die Füllung Zahnhartsubstanz opfern zu müssen [107]. Dabei wird der durch die Demineralisation porös gewordene Zahnschmelz mit Kunststoff infiltriert. Die Oberfläche wird zunächst mit 15%iger Salzsäure (HCl) geätzt, um die pseudointakte Oberflächenschicht zu entfernen. Durch diese Maßnahme wird das Porensystem nach außen geöffnet, sodass Kunststoff einfließen kann [63]. Durch die Kapillarkräfte zieht sich der nachfolgend aufgetragene Kunststoff in die Poren und verschließt diese. Es konnte gezeigt werden, dass der Kunststoff bis zu 100 µm tief eindringt [108].

So entsteht zum einen eine Diffusionsbarriere für Säuren, zum anderen eine optische Verbesserung der weißen Läsionen, da der Brechungsindex des Kunststoffes 1,52 beträgt und die Lichtbrechung durch die Infiltration wieder dem Brechungsindex des gesunden Zahnschmelzes ähnlicher wird (Brechungsindex 1,63) [97]. Mit der Kariesinfiltration können circa  $60 \pm 10\%$  des Porenvolumens verschlossen werden [109]. In einer Fall-Kontroll-Studie konnte gezeigt werden, dass sich das klinische Erscheinungsbild der WSL verbesserte und sich die Kariesläsionen verkleinerten [110]. Zwei Meta-Analysen bestätigen die Inaktivierung initialer kariöser Läsionen durch die Kariesinfiltration [111,112].

### 2.3.4. Polyphosphate

Polyphosphate (PolyP) sind Polymere von Orthophosphatmolekülen, welche über Phosphorsäureanhydridgruppen zu unverzweigten Ketten verbunden werden. Je nach Kettenlänge kommen sie in Mikroorganismen (lange PolyP Ketten mit bis zu tausend Einheiten [113]) und Säugetieren (kurze Ketten) vor. PolyP kommt in Säugetieren sowohl extrazellulär in Blut und Synovia als auch intrazellulär in Thrombozyten, Fibroblasten, Mononuklearen Zellen und Osteoblasten vor [114,115].

PolyP als Polyanion kann Salzverbindungen zu mono- oder polyvalenten Kationen, beispielsweise  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$ , eingehen. Während  $\text{Na}^+$  an eine Phosphatgruppe bindet, kann das zweifach positiv geladene  $\text{Ca}^{2+}$  zwei PolyP Ketten über ionische Bindungen miteinander verbinden (Abbildung 8).

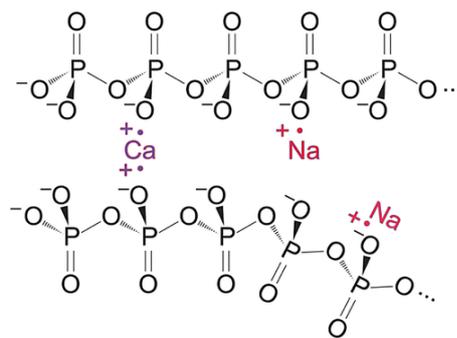


Abbildung 8: Das polyanionische PolyP bindet ein  $\text{Na}^+$ -Ion pro Phosphateinheit, via  $\text{Ca}^{2+}$  können zwei PolyP Ketten über ionische Bindungen miteinander verbunden werden, Bildquelle [116].

Müller et al. untersuchten die Wirkung von PolyP auf Zähne *in vitro* [16]. Das in der Studie verwendete PolyP konnte Dentintubuli verschließen, weshalb PolyP bei Dentinhypersensitivität eingesetzt werden könnte. Zudem konnte eine antibakterielle Wirkung des PolyP gezeigt werden. Es zeigte sich zudem, dass PolyP die Fähigkeit besitzt, Risse im Zahnschmelz zu reparieren (Abbildung 9) [16]. Es wird vermutet, dass PolyP Mikropartikel mit HAp interagieren und  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen in den Mikropartikeln eine brückenartige Struktur zu HAp bilden (Abbildung 10) [117].

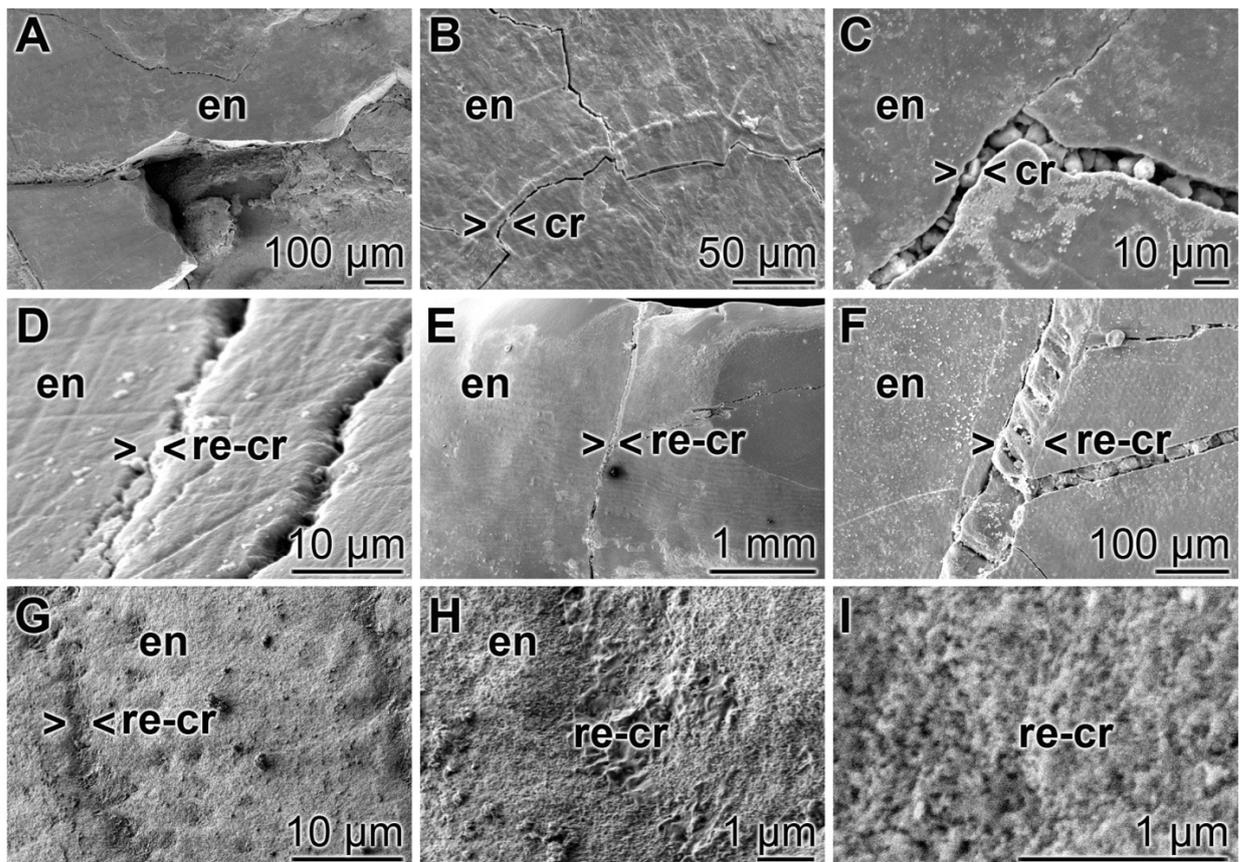


Abbildung 9: Reparatur der Risse im Schmelzbereich durch PolyP; ESEM: (A - C) Behandlung der Zahnproben mit Zahnpasta ohne Ca-PolyP. Die Risschäden (cr) sind deutlich zu sehen. (D - F) Zähneputzen mit Zahnpasta plus 1% Ca-PolyP führte zu einer Reparatur der Risse (> <re-cr) im Schmelzbereich (en). (G - I) Bei a höheren Vergrößerung wurden die kugelförmigen, aus dem PolyP stammenden Mikropartikel sichtbar. Bildquelle [16].

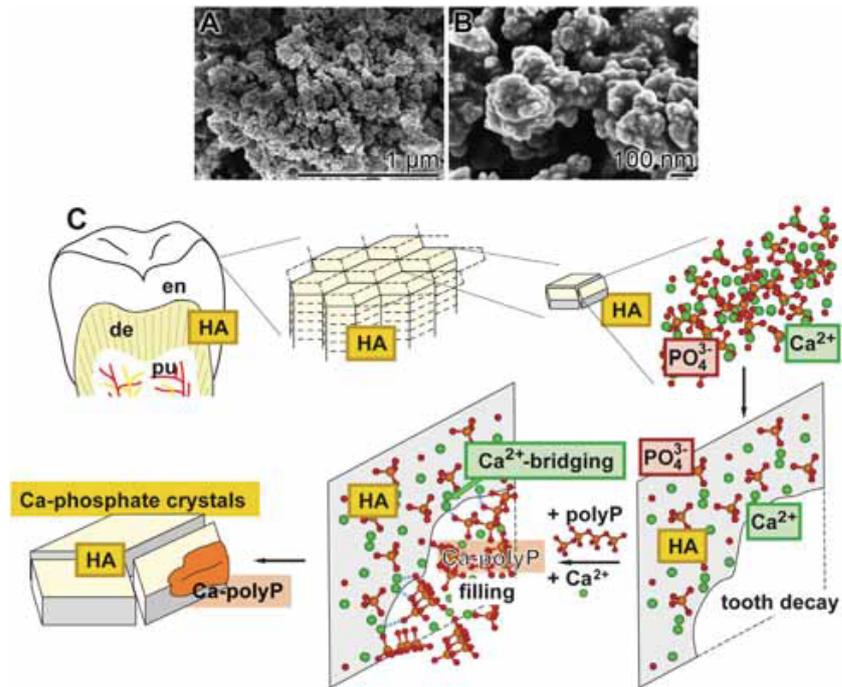


Abbildung 10: Amorphe Ca-PolyP Mikropartikel (aCa-PolyP-MP) und ihre Interaktion mit Calcium und Phosphat im Zahnschmelz (A und B); REM Aufnahme. (C) Vermutete Interaktion der Mikropartikel mit HAp, welches hauptsächlich aus  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{PO}_4^{3-}$  besteht. Es wird vermutet, dass die  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen in den Mikropartikeln eine Brückenartige Struktur zum HAp hin bilden, Bildquelle [117].

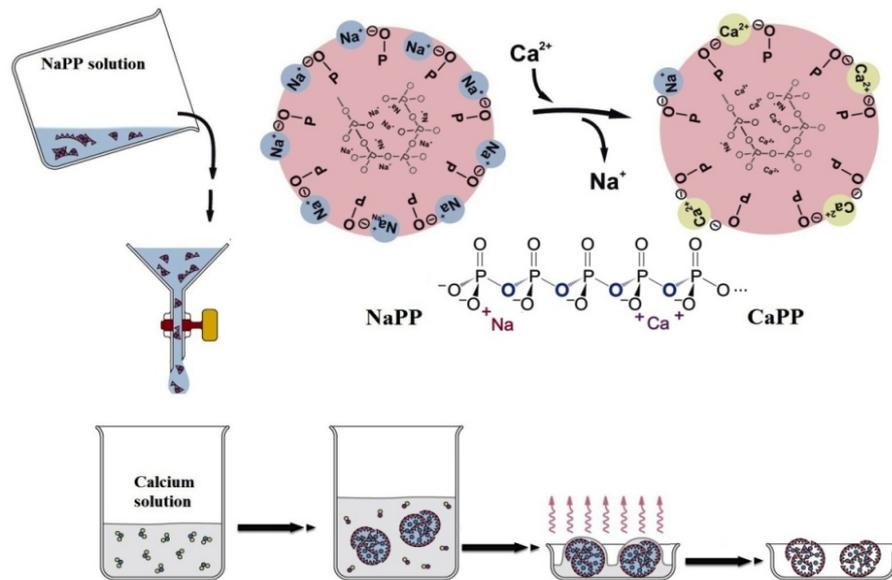
### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Herstellung der Polyphosphat Mikropartikel

Alle für die Herstellung der Mikropartikel verwendeten Chemikalien, sofern nicht anders angegeben, sind Reagenzien von anerkannter Analysequalität und wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Calciumpolyphosphat (Ca-PolyP) - Mikropartikel wurden durch ein nasschemisches Fällungsverfahren aus Calciumchloriddihydrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; Sigma-Aldrich, Taufkirchen; Deutschland) als  $\text{Ca}^{2+}$  - Quelle hergestellt. 2,8 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  wurden in 50 mL Ethanol (96%) gelöst und bei Raumtemperatur tropfenweise zu 1 g Natriumpolyphosphat (Na-PolyP, chemische Fabrik Budenheim, Budenheim, Deutschland) welches in 50 mL destilliertem Wasser gelöst wurde, gegeben. Im ersten Schritt wurde der pH-Wert der Na-PolyP und Calciumchloridlösung durch Zugabe von NaOH auf einen pH-Wert von 6 eingestellt und 5 Stunden gerührt.

Die ausgefällten Aufschlämmungen wurden aus dem Reaktor gegossen und die festen Teilchen durch Vakuumfiltration durch eine Nalgene-Filtereinheit (Porengröße 0,45  $\mu\text{m}$ ; Cole-Parmer, Kehl / Rhein; Deutschland) herausgefiltert und dreimal mit Ethanol gewaschen, um das nicht gebundene  $\text{Ca}^{2+}$  und andere Abfallprodukte zu entfernen. Die Partikel wurden bei 60°C getrocknet. Schließlich wurden die getrockneten Festkörper zu feinen Pulvern gemahlen und durch ein 100  $\mu\text{m}$  Sieb (Retsch GmbH, Haan, Deutschland) gesiebt. Das hier erläuterte Herstellungsverfahren wird in der schematischen Zeichnung in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung der Herstellung der Ca-PolyP Mikropartikel mit Hilfe des nasschemischen Fällungsverfahrens.

Die Standard Ca-PolyP Mikropartikel haben eine Größe zwischen von  $285 \pm 95$  nm und sie sind kugelförmig. Ihre Größe kann von 100 nm bis 600 nm variieren. Die Mikropartikel können mit einer definierten Größe hergestellt werden, indem das Verhältnis von Ca:P verändert wird. Ein Verhältnis von Ca:P  $> 2$  resultiert in einer kleineren Partikelgröße, während Ca:P Verhältnisse von  $< 2$  größere Partikeln generieren. Für unsere Studie wurden Partikel mit einem Verhältnis von  $\approx 2$  für Ca:P gewählt.

### 3.1.2. Herstellung der remineralisierenden Zahngel

#### 3.1.2.1. Biomimetisches Polyphosphat-basiertes Zahngel

##### 10%iges Calcium Polyphosphat

Herstellung eines wasserbasierten, 10%igen Ca-PolyP Zahngels für die erste Versuchsreihe: 1 g Ca-PolyP (hergestellt wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben), 2,5 g Xylitol (10% [w/w]; Natur Total B.V., Apeldoorn; Niederlande), 50 mg Xanthan (0.5% [w/w]; Special Ingredients Ltd., Foxwood Industrial Park, Chesterfield; UK), 50 mg Jota - Carragen (0.5% [w/w]; Special Ingredients Ltd), 50 mg Kappa - Carragen (0.5% [w/w]; Special Ingredients Ltd). Zu diesen wurden 3 g Glycerin (50% [w/w]; Dragonspice Naturwaren, Reutlingen; Deutschland) gegeben und die Zutaten zu einer homogenen Masse gemischt. Dann wurden 1,25 mL destilliertes Wasser und 100  $\mu$ L

Natriumlaurylsulfat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben. Das Gemisch wurde auf 70°C erhitzt und 10 Minuten gerührt bis ein homogenes, milchig-trübes Gel entstand. Das so entstandene Zahngel enthielt 15,15% Ca-PolyP.

### **3%iges Calcium-Polyphosphat, 3%iges Natrium- und 3%iges Magnesium-Polyphosphat**

Für die folgenden Versuchsreihen wurde 3%iges Ca-PolyP, 3%iges Na-PolyP und 3%iges Mg-PolyP hergestellt: 300 mg Ca-PolyP (hergestellt wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben) oder 300 mg Mg-PolyP oder 300 mg Mg-PolyP, sowie 2,5 g Xylitol (10% [w/w]; Natur Total B.V., Apeldoorn; Niederlande), 50 mg Xanthan (0.5% [w/w]; Special Ingredients Ltd., Foxwood Industrial Park, Chesterfield; UK), 50 mg Jota - Carragen (0.5% [w/w]; Special Ingredients Ltd), 50 mg Kappa - Carragen (0.5% [w/w]; Special Ingredients Ltd). Zu diesen wurden 3 g Glycerin (50% [w/w]; Dragonspice Naturwaren, Reutlingen; Deutschland) gegeben und die Zutaten zu einer homogenen Masse gemischt. Dann wurden 1,25 mL destilliertes Wasser und 100 µL Natriumlaurylsulfat (Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben. Das Gemisch wurde auf 70°C erhitzt und 10 Minuten gerührt bis ein homogenes, milchig-trübes Gel entstand. Das so entstandene Zahngel enthielt 3% Ca-PolyP.

#### **3.1.2.2. Fluorid Zahngel**

Als Kontrollgel wurde Elmex® Gelée verwendet. Dieses ist ein hochdosiertes, apothekenpflichtiges Fluoridgel der Firma GABA und wird für die Heimfluoridierung bei initialer Karies und bei kariesaktiven Gebissen empfohlen (S2k-Leitlinie „Kariesprophylaxe bei bleibenden Zähnen – grundlegende Empfehlungen“). Das 1,25%ige Fluoridgel enthält neben Natriumfluorid auch Aminfluorid (AmF), welches als kationisches Tensid aufgebaut ist und über eine lange hydrophobe Alkylgruppe sowie ein polares hydrophiles, protoniertes tertiäres Amin mit einem Fluorid als Anion verfügt (Abbildung 12).

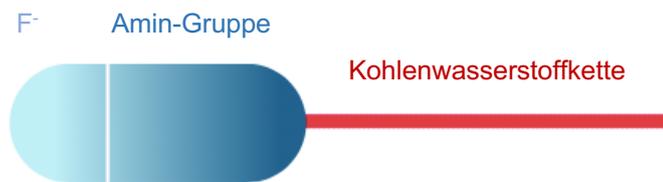


Abbildung 12: Schematischer Aufbau des AmF.

AmF bildet einen molekularen Film auf dem Zahn und eine besonders stabile Calciumfluorid-Schicht. Der molekulare Film wird gebildet, da sich der hydrophile Kopf des AmF zum Zahnschmelz hin ausrichtet. Es kommt zu ionischen Wechselwirkungen des Aminteils mit der Zahnoberfläche [118]. 100 g Elmex Gelée enthalten: Aminfluoride Dectaflur 0,287 g, Olaflur 3,032 g, Natriumfluorid 2,210 g (Fluoridgehalt 1,25%), gereinigtes Wasser, Propylenglycol, Hyetellose, Saccharin, Apfel-Aroma, Pfefferminzöl, Krauseminzöl, Menthol-Aroma, Bananen-Aroma.

### 3.1.2.3. Placebo Zahngel

Für die Herstellung eines wasserbasierten Placebo-Zahngels für die erste Versuchsreihe wurden folgende Zutaten verwendet: 3,5 g Xylitol (10% [w/w]; Natur Total B.V., Apeldoorn; Niederlande), 50 mg Xanthan (0.5% [w/w]; Special Ingredients Ltd., Foxwood Industrial Park, Chesterfield; UK), 50 mg Jota - Carragen (0.5% [w/w]; Special Ingredients Ltd), 50 mg Kappa - Carragen (0.5% [w/w]; Special Ingredients Ltd). Zu diesen wurden 3 g Glycerin (50% [w/w]; Dragonspice Naturwaren, Reutlingen; Deutschland) gegeben und die Zutaten zu einer homogenen Masse gemischt. Dann wurden 1,25 mL destilliertes Wasser, 100 µL CaCl<sub>2</sub> (CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O; Sigma-Aldrich, Taufkirchen; Deutschland) und 100 µL Natriumlaurylsulfat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben. Das Gemisch wurde auf 70°C erhitzt und 10 Minuten gerührt bis ein homogenes, milchig-trübes Gel entstand.

### 3.1.3. Präparation und Demineralisation der Molaren

Die in dieser Studie verwendeten Zähne wurden uns durch die Zahnklinik der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, den ethischen Richtlinien der Universitätsmedizin Mainz folgend, zur Verfügung gestellt. Extrahierte Molaren ohne makroskopische Anzeichen von WSL oder Karies, sowie Molaren mit sichtbaren WSL wurden in 90%igem Ethanol aufbewahrt. Makroskopische

Gewebereste, sowie die Pulpa wurden manuell entfernt. Die Zähne mit sichtbaren WSL wurden der Gruppe 6 (Abbildung 13) zugeteilt.



*Abbildung 13: Makroskopisch sichtbare, natürlich entstandene WSL an einem humanen Molar.*

Gesunden Zähne ohne WSL wurden in Technovit® 3040 Kunststoff (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) eingebettet und mit dem Mikrotom (Leica SP1600; Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) mit einer diamantierten Säge von 3 mm Dicke unter Wasserkühlung gefünfelt. Die Zahnteile wurden mit destilliertem Wasser gereinigt und getrocknet.

### **Versuchsaufbau 1 (Vorversuche):**

1. Gruppe: Gesunder Schmelz (Kontrolle)
2. Gruppe: Demineralisierter Schmelz ohne Behandlung
3. Gruppe: Demineralisierter Schmelz und Ca-PolyP Behandlung
4. Gruppe: Demineralisierter Schmelz und Elmex Gelée Behandlung
5. Gruppe: Demineralisierter Schmelz und Placebo Behandlung

Die Zahnteile der Gruppen 2.-5. wurden für die Demineralisation präpariert und hierfür zweifach mit wasserfestem Klarlack (Ultra quick dry Top coat, essence™) überzogen. Dabei wurde eine kreisförmige Fläche mit dem Durchmesser 5,5 mm freigelassen und nicht mit Lack überzogen (Abbildung 14).

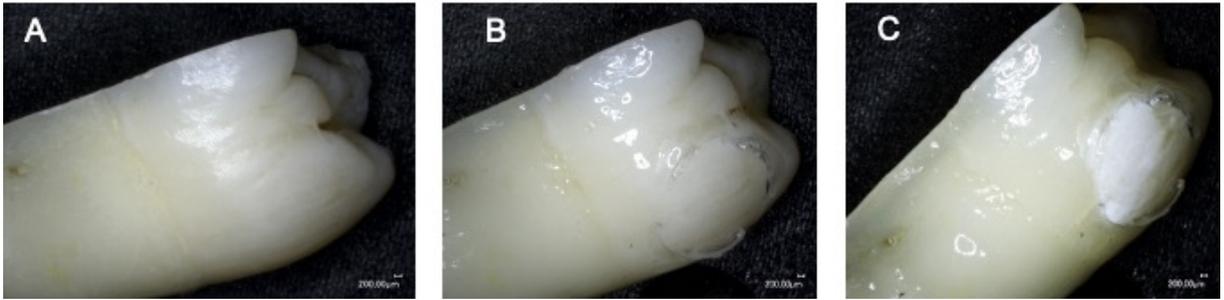


Abbildung 14: Schritte der Demineralisation. A) Gesunder Schmelz B) Schutzlack mit Fenster C) Demineralisierter Schmelz.

Die demineralisierende Lösung wurde nach Zhang et al. [119] mit einem pH-Wert von 4,8 hergestellt und beinhaltete 1.5 mM  $\text{CaCl}_2$  (Sigma-Aldrich, Taufkirchen; Deutschland), 0.9 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma-Aldrich, Taufkirchen; Deutschland) 50 mM  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (Sigma-Aldrich, Taufkirchen; Deutschland) und 3 mM  $\text{NaN}_3$  (Sigma-Aldrich, Taufkirchen; Deutschland). Die Zahnteile der Gruppen 2-5 wurden in diese Lösung für sieben Tage in einem Plattenschüttler bei 50 rpm und  $37^\circ\text{C}$  eingelegt, um künstliche WSL zu erstellen. Nach sieben Tagen wurden sie mit destilliertem Wasser gereinigt, getrocknet und in Petrischalen aufbewahrt (Abbildung 15).

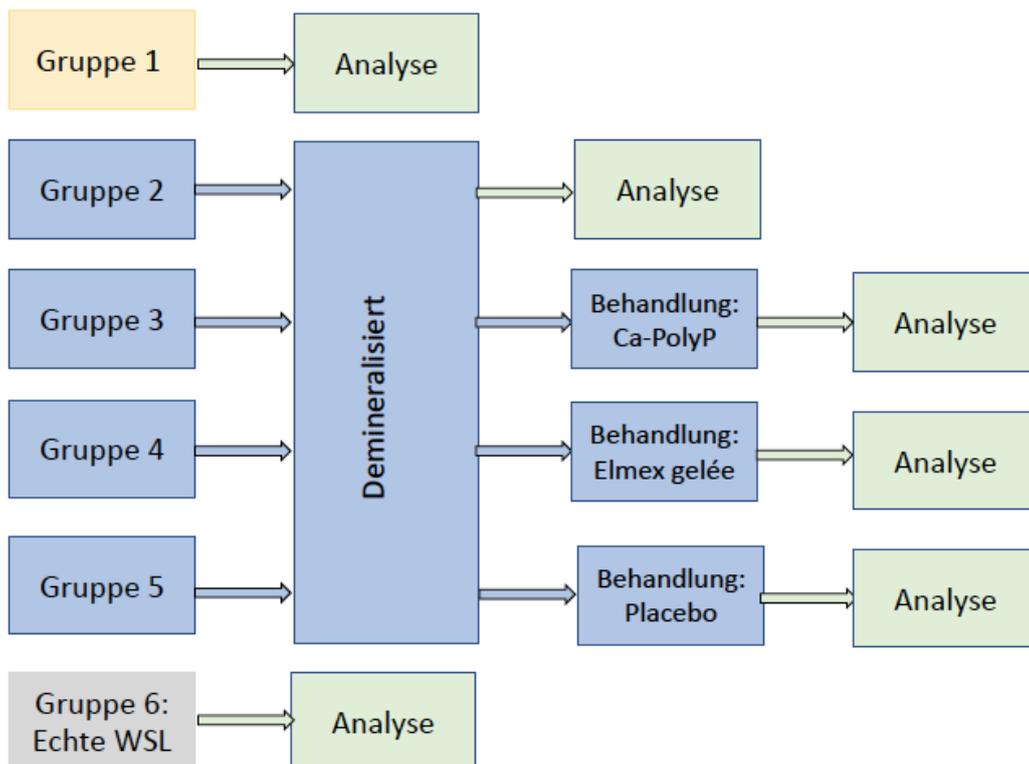


Abbildung 15: Schematische Darstellung Versuchsaufbau 1.

## Versuchsaufbau 2:

Der Versuchsaufbau wird in Abbildung 16 schematisch dargestellt. 50 Zahnteile humaner Molaren wurden zufällig in folgenden Gruppen zugeteilt:

1. Gruppe: Gesunder Schmelz (n=10)
2. Gruppe: Demineralisierter Schmelz ohne Behandlung (n=10)
3. Gruppe: Demineralisierter Schmelz und Ca-PolyP Behandlung (n=10)
4. Gruppe: Demineralisierter Schmelz und Na-PolyP Behandlung (n=10)
5. Gruppe: Demineralisierter Schmelz und Mg-PolyP Behandlung (n=10)

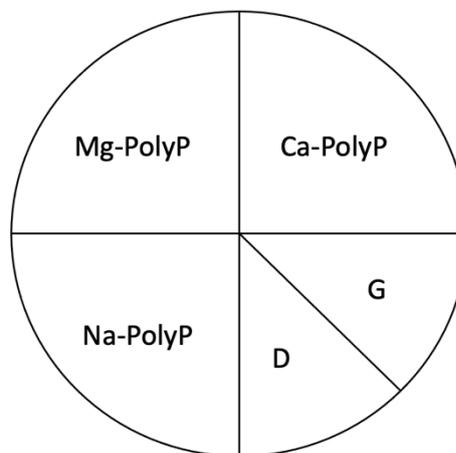


Abbildung 16: Schematische Darstellung Versuchsaufbau 2. G = gesunder Zahnschmelz. D = demineralisierter Zahnschmelz. Ca-PolyP = Calcium Polyphosphat. Na-PolyP = Natrium Polyphosphat. Mg-PolyP = Magnesium Polyphosphat.

Dabei wurden bei der Remineralisation 25 Zahnteile in destilliertem Wasser aufbewahrt (Zähne 1-5), die Teile der Zähne 6-10 wurden bei der Remineralisation in künstlichem Speichel aufbewahrt.

### **3.1.4. Künstlicher Speichel**

Der künstliche Speichel wurde nach Pratten et al. [120] angefertigt und beinhaltete 1 g Lab-Lemco™, 2 g Hefeextrakt, 5 g Protease Pepton, 2,5 g Muzin aus Schweinemagen Typ 3, 0,2 g NaCl, 0,25 g KCl, 0,3 g CaCl<sub>2</sub>. Die Inhaltsstoffe wurden autoklaviert. Anschließend wurden 1,25 mL einer 40% steril filtrierten Urealösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen; Deutschland) hinzugefügt.

### **3.1.5. Behandlungsprotokoll**

#### **Versuchsaufbau 1:**

Die artifiziellen WSL der Zahnteile der Gruppen 2.-5. wurden für zwei Wochen zweimal pro Woche mit 0,25 g Zahngel (je nach Gruppe mit Ca-PolyP, Elmex Gelée oder Placebo) zwei Minuten mit dem rund angelegten Borstenfeld einer Handzahnbürste (Today Dent, Dental-Kosmetik GmbH, Dresden, Deutschland) ohne Druck gebürstet. Anschließend wirkte das Zahngel jeweils 3 Minuten ein und wurde für 30 Sekunden mit destilliertem Wasser abgespült. Die Zähne wurden feucht auf Filterpapier (Whatman® Filter Papier, Sigma Aldrich, Taufkirchen; Deutschland) aufbewahrt. Zur Befeuchtung wurde destilliertes Wasser verwendet.

#### **Versuchsaufbau 2:**

Die artifiziellen WSL der Zahnteile wurden für zwei Wochen zweimal pro Woche mit 0,25 g Ca-PolyP, Na-PolyP oder Mg-PolyP für zwei Minuten mit dem rund angelegten Borstenfeld einer Handzahnbürste (Today Dent, Dental-Kosmetik GmbH, Dresden, Deutschland) ohne Druck gebürstet. Anschließend wirkte das Zahngel jeweils 3 Minuten ein und wurde für 30 Sekunden mit destilliertem Wasser abgespült. Die Zähne wurden in destilliertem Wasser (Zahn 1-5) oder künstlichem Speichel (Zahn 6-10) aufbewahrt.

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Rasterelektronenmikroskopie**

Die Rasterelektronenmikroskopie wurde genutzt, um die Morphologie der Zahnschmelzoberfläche der verschiedenen Zahnproben miteinander zu vergleichen. Die Proben wurden hierfür in einem Sputter-Beschichtungsverfahren mit Gold überzogen (Leica EM ACE200, Wetzlar, Deutschland) und mit dem Rasterelektronenmikroskop ESEM (environmental scanning electron microscope) XL-30 (Philips, Eindhoven, Niederlande) aufgenommen.

### **3.2.2. Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR)**

Die Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie ermöglicht es, alle spektralen Informationen der Moleküle zeitgleich aufzunehmen. Die Moleküle des Probenmaterials absorbieren Licht im infraroten Bereich und wandeln diese Energie in Molekülschwingungen um. Diese Absorption wird in Abhängigkeit der Wellenlänge gemessen (von 4000 bis 600  $\text{cm}^{-1}$ ). Das Licht durchläuft dabei zunächst ein Interferometer und dann die Probe. Das Interferogramm, das festgehaltene Bild der Interferenzerscheinung, wird über eine Fourier Transformation in ein Spektrum umgewandelt. Diese spektrale Erfassung ermöglicht es, Materialproben auf ihre organischen und anorganischen Komponenten zu untersuchen.

Die oberflächlichen Schichten des Zahnschmelzes der für diese Studie verwendeten Proben wurden zur Gewinnung eines Mikropulvers für die FTIR mit einem Zahntechnikerhandstück bei niedriger Umdrehungszahl (5000 U/min) und einer kreuzverzahnten, feinen Superhartmetallfräse abgefräst. Das so gewonnene Pulver wurde in einem FTIR-Spektroskop, Varian 660-IR-Spektrometer (Agilent, Santa Clara, USA), ausgestattet mit einer Golden Gate-ATR-Einheit (Specac Ltd, Orpington; UK) analysiert.

### 3.2.3. Quantifizierung des Karbonat Anteils

Die Quantifizierung des Karbonat Anteils in den Zahnschmelzproben erfolgte basierend auf den FTIR-Spektraldaten nach der Methode von Grunenwald et al. [121]. Die Flächen unter der Kurve von  $\nu_3$  ( $\text{CO}_3$ ) bei  $1330 \text{ cm}^{-1} - 1530 \text{ cm}^{-1}$  und  $\nu_1\nu_3$  ( $\text{PO}_4$ ) bei  $900 \text{ cm}^{-1} - 1230 \text{ cm}^{-1}$  wurden errechnet und anschließend ins Verhältnis zueinander gesetzt:

$$r_{c/p} = \frac{a(\nu_3(\text{CO}_3))}{a \nu_1\nu_3(\text{PO}_4)}$$

Das so errechnete Verhältnis der Flächen wurde dann genutzt, um den Karbonatanteil nach der folgenden Formel nach Grunenwald et al. [121] auszurechnen:

$$\text{wt}\% \text{ CO}_3 = 28.62 * r_{c/p} + 0.0843$$

### 3.2.4. Kristallinitätsindex

Aus den Spektraldaten der FTIR wurden nach der Methode von Weiner und Bar-Yosef [122] die Kristallinitätsindizes der Zahnproben errechnet. Hierfür wurde die Höhe der geteilten Phosphatpeaks  $\nu_4$  genutzt, sowie das Minimum zwischen den Peaks. Die Formel hierfür lautet:

$$\text{KI} = \frac{A_{565\text{cm}^{-1}} + A_{603\text{cm}^{-1}}}{A_{590\text{cm}^{-1}}}$$

Aus dieser Formel geht hervor, dass der KI steigt, wenn die Kristallgröße zunimmt und somit auch  $A_{565}$  und  $A_{505}$  steigen bzw.  $A_{595}$  abnimmt [123].

### 3.2.5. Nanoindentierung

Die Nanoindentierung ist ein häufig genutztes und erprobtes Verfahren zur Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften mineralisierter Gewebe [124]. Zur Messung der Härte und des Elastizitätsmoduls der hier verwendeten Zahnproben wurde der „NanoTest Vantage Nanoindentation“ (Micro Materials Ltd, Wrexham, UK) verwendet, ausgestattet mit einer dreiseitigen Berkovich Nanoindenterspitze aus Diamant. Die Spitze kann über elektromagnetische Kräfte Richtung Prüfkörper bewegt werden und misst die Eindringtiefe mit einer präzisen definierten Kraft. Die Nanoindentierung ermöglicht mittels dieser Technik Härtemessungen im Bereich der Nanometer Skala.

Die Zahnteile wurden hierfür in schnellhärtendem Kunststoff auf Methylmethacrylat-Basis (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) fest eingebettet und 24 Stunden in der Messkammer aufbewahrt, um vor der Härtemessung eine ausreichend thermische Stabilität zu gewährleisten (Abbildung 17).



Abbildung 17: Einbettung der Zahnschmelzproben in Kunststoff.

Jede Messung umfasste drei Phasen: Belastungsphase, Verweilphase und Entlastungsphase. Für unser Experiment wurde eine definierte Tiefenkontrolle von 1000 nm, einer fixierten Belastungs- und Entlastungsrate von 2 mN/s und einer Verweilphase von 30 Sekunden gewählt. An jeder Probe wurden 20 Indentierungen in einem Abstand von 30  $\mu\text{m}$  zueinander durchgeführt.

Die Härte  $H$  wurde automatisch mittels der Oliver-Pharr Methode [125] errechnet:

$$H = \frac{P}{Ac}$$

Wobei  $Ac$  die aktuelle Kontaktfläche und  $P$  die maximale Belastungsrate beschreibt.

Die elastische Verformung  $E_r$  wurde mit folgender Formel berechnet:

$$E_r = \frac{1}{\beta} \frac{\sqrt{\pi}}{2} \frac{S}{\sqrt{Ac}}$$

$\beta$  ist eine konstante mit einem Wert von 1.034 für Berkovich Indenter,  $S$  bezeichnet die Kontaktsteifigkeit und  $Ac$  die aktuelle Kontaktfläche.

Die Ergebnisse wurden in einer Kraft - Eindringkurve bzw. Kraft - Verformungskurve dargestellt. Diese zeigt die Eindringtiefe bzw. Verformung in Abhängigkeit von der verwendeten Kraft.

### **3.2.6. Lichtmikroskopie**

Die lichtmikroskopischen Bilder wurden mit dem VHX-600 Digitalmikroskop (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) aufgenommen. Für die mikroskopischen Bilder der Zahnlängsschnitte wurden die Zähne in Technovit® 3040 Kunststoff (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) eingebettet und mit dem Mikrotom (Leica SP1600; Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) mit einer diamantierten Säge von 3 mm Dicke unter Wasserkühlung geteilt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie

Um die Morphologie der verschiedenen Proben zu vergleichen, wurden rasterelektronenmikroskopische Bilder angefertigt. Gesunde Zahnschmelz (Control, A und B) zeigt die typischen Entwicklungsdefekte in Form von Grübchen der Tomes-Fortsätze, die dem Kopf der Ameloblasten entsprechen. Die Grübchen sind groß genug, um Mikroorganismen zu beherbergen. Die in Bündeln gruppierten Kristallite (Prismen), verlaufen perpendicular zur Oberfläche.

Die REM Bilder der natürlichen WSL (Abbildung 18: White Spots, C und D) zeigen die für WSL bekannten charakteristischen „Micropits“. Zentrale Mulden, welche durch die Abwesenheit der Grübchen der Tomes-Fortsätze charakterisiert sind und zentral kollabiertes Gewebe enthalten [126].

Die artifiziell mittels Säureätzung hergestellten kariösen Läsionen (Abbildung 18: Acid Treatment, E und F) zeigen, wie die natürlichen WSL auch, „Micropits“, die von der Größenordnung etwas kleiner sind als im Vergleich zur natürlichen White-Spot-Läsion. Zudem sind noch wenige Grübchen der Tomes-Fortsätze erkennbar. Im Vergleich zum gesunden Schmelz jedoch vereinzelter und abgeflachter. Dies spricht für einen Zusammenbruch der Schmelzkristalle. Insgesamt zeigen sich die artifiziellen WSL als weniger ausgeprägte und oberflächlichere Läsionen im Vergleich zu den im Rahmen der Studie analysierten natürlichen WSL.

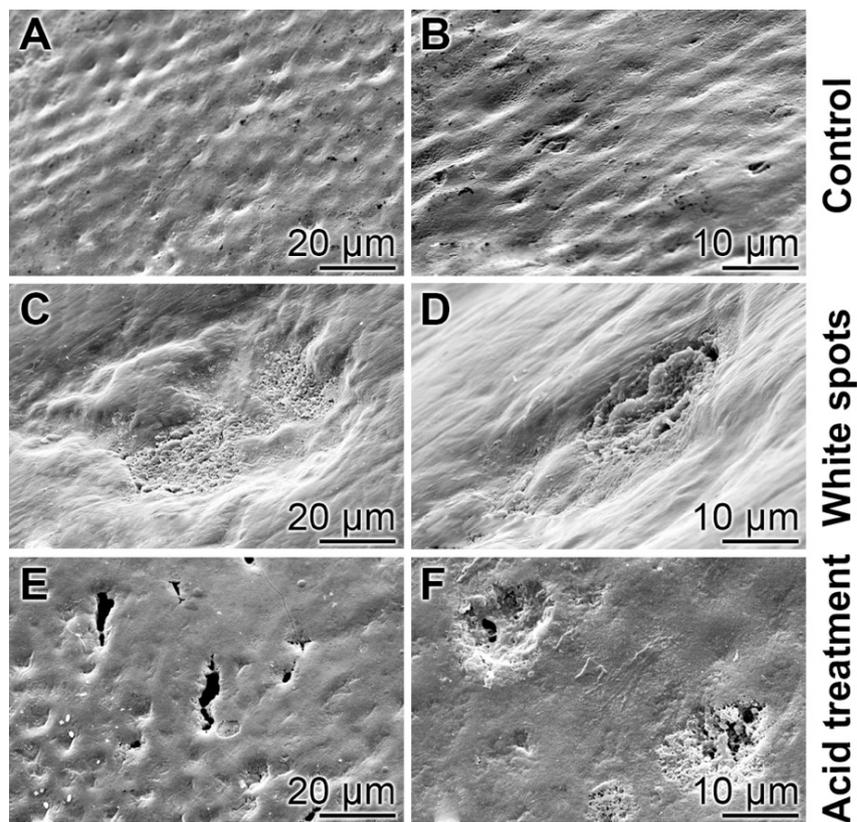


Abbildung 18: Vergleich kariöser Läsionen im Rasterelektronenmikroskop. Control = gesunder Zahnschmelz. White spots = natürliche WSL. Acid treatment = künstliche WSL.

Nachfolgend wurden die zunächst demineralisierten und anschließend mit den verschiedenen Substanzen (Fluorid, Ca-PolyP, Placebo) behandelten Zahnschmelzproben analysiert (Abbildung 19). Die Proben der mit Fluorid behandelten, künstlichen WSL (Elmex, A-C), zeigten Grübchen, die mit runden bis oval-eckigen Kugeln gefüllt waren. Diese Agglomerate stellen ein Reservoir aus Calciumfluorid ( $\text{CaF}_2$ ) dar.

Die Proben der mit Ca-PolyP behandelten, künstlichen WSL (polyP, D-F), zeigen eine Oberfläche ohne „Micropits“ und mit wellenförmig aufgeworfenen Erhebungen, bestehend aus amorphem Ca-PolyP. Es sind keine Mulden oder Micropits sichtbar.

Die Proben der mit Placebo behandelten, künstlichen WSL (Placebo, G-I), zeigen eine porös wirkende Schmelzoberfläche mit kleinen „Micropits“, sowie eine zentrale Mulde, gekennzeichnet durch den Kollaps der Kristallstrukturen.

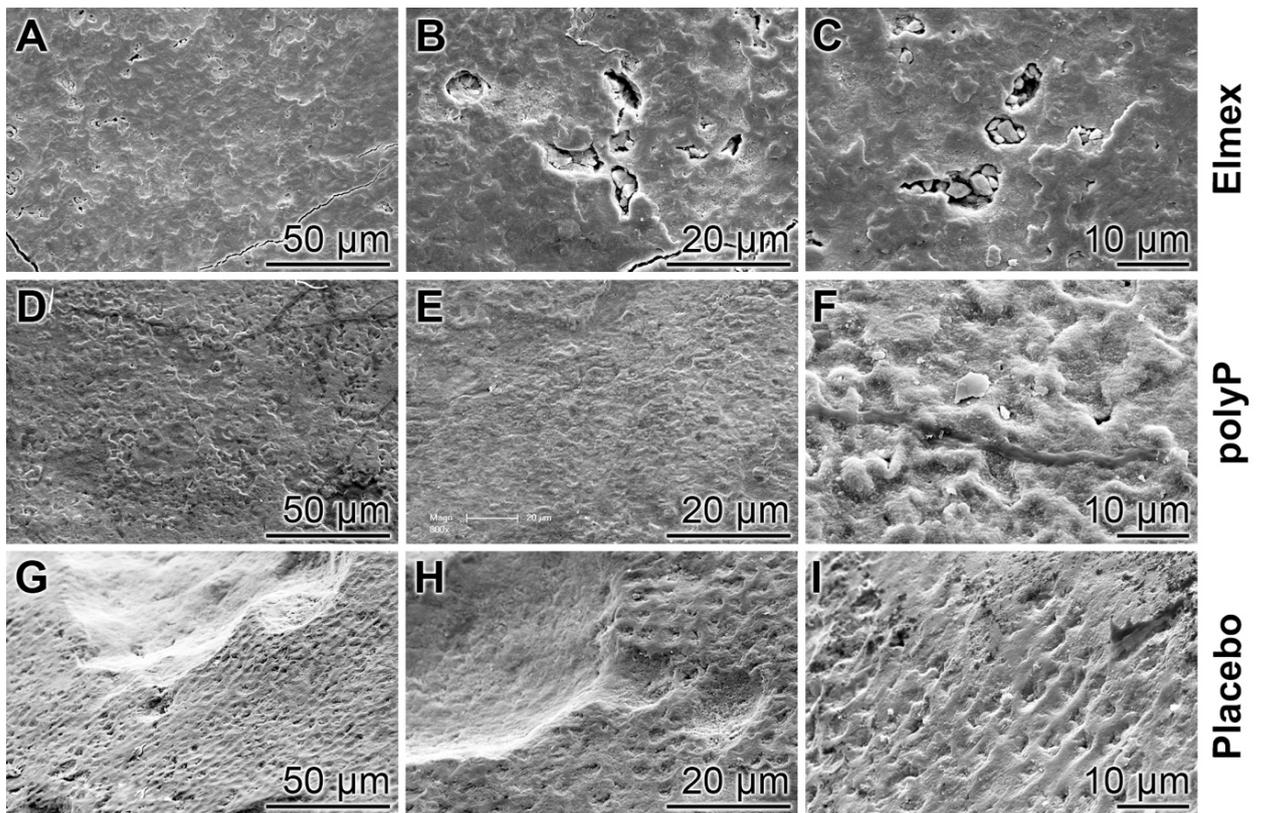


Abbildung 19: Vergleich der Schmelzoberfläche der Zahnproben mit artifiziellen White-Spot-Läsionen nach Behandlung mit Fluorid (Elmex, A-C), Ca-PolyP (polyP, D-F) und Placebo (Placebo, G-I).

## 4.2. Ergebnisse der Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie

Im Bereich von 500 bis 2000  $\text{cm}^{-1}$  zeigen die FTIR-Spektren die charakteristischen Banden von  $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$  bei 958  $\text{cm}^{-1}$  und  $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$  bei 1040 – 1160  $\text{cm}^{-1}$  [127] und die Karbonat Banden  $\nu_3 \text{CO}_3^{2-}$  bei 1405 - 1450  $\text{cm}^{-1}$ . Das FTIR Spektrum des natürlichen Zahnschmelz wird durch die Peaks bei 566  $\text{cm}^{-1}$ , 604  $\text{cm}^{-1}$  und 1037  $\text{cm}^{-1}$  charakterisiert, welche die Valenzschwingungen der P-O Verbindung in der Phosphatgruppe visualisieren (Abbildung 20) [128].

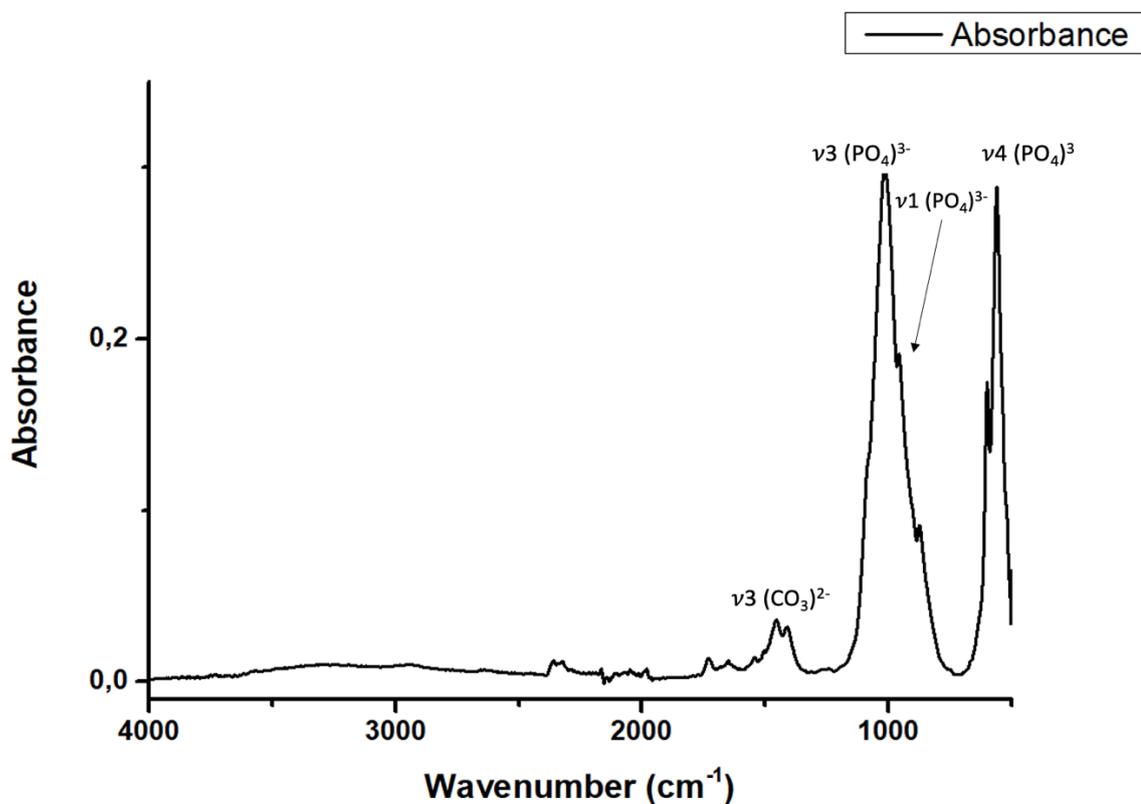


Abbildung 20: Exemplarische FTIR einer Zahnschmelzprobe.

Die Größe der Apatitkristalle und eine zunehmende Anordnung im Kristallgitter führt zu einem größeren Split der zwei Phosphatbanden in der FTIR [122,129]. Die FTIR-Spektren des Zahnschmelzes aus dem Versuchsaufbau 1 jeweils vor und nach der Behandlung mit Fluorid, Placebo und Ca-PolyP Partikeln sind in Abbildung 21 dargestellt. Alle Spektren zeigen die typischen Banden des Apatits mit einigen Veränderungen.

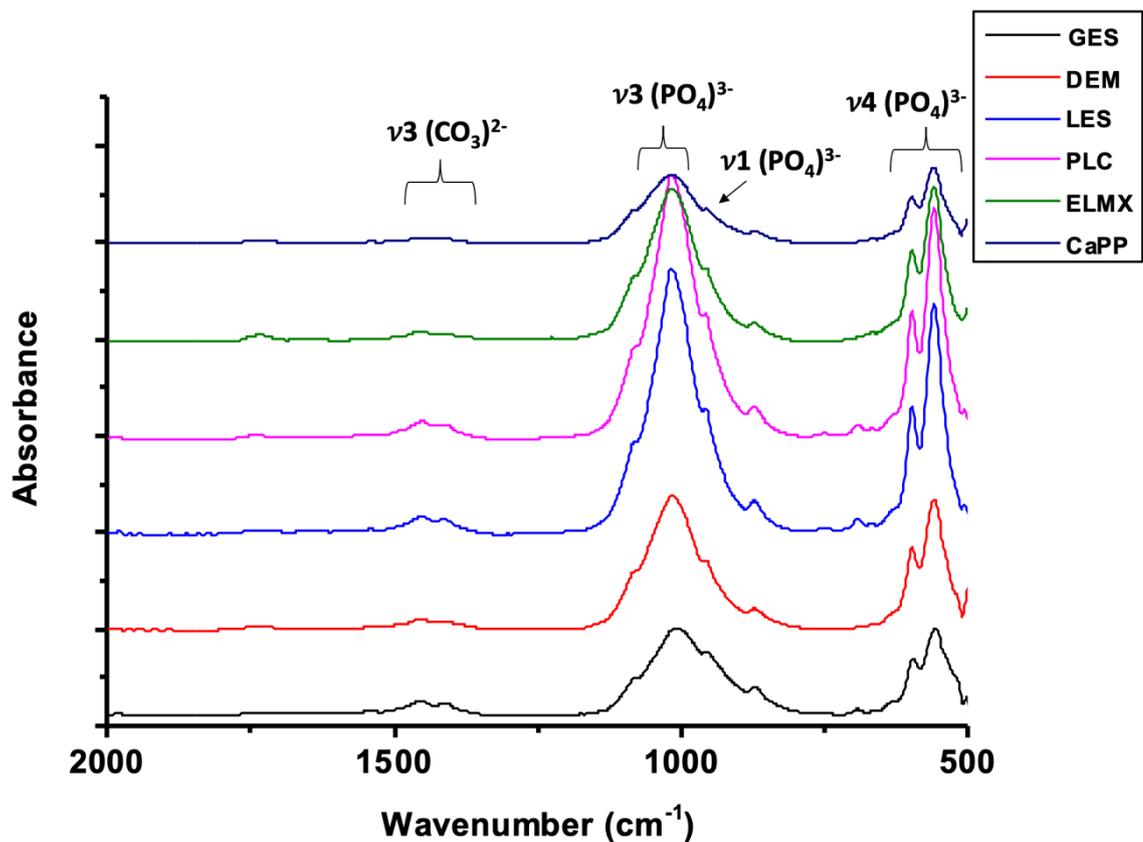


Abbildung 21: FTIR der Zahnschmelzproben aus der ersten Versuchsreihe und unterschiedliche Absorptionsspektren. GES = gesunder Zahnschmelz, DEM = demineralisierter Zahnschmelz, LES – echte WSL, PLC = Behandlung artifizierter WSL mit Placebo, ELMX = Behandlung artifizierter WSL mit Elmex Gelée, CAPP = artifizierliche WSL behandelt mit Ca-PolyP.

Der künstlich demineralisierte Zahnschmelz sowie die natürlichen WSL zeigen die charakteristischen Phosphatbanden von  $\nu_1$   $\text{PO}_4^{3-}$  bei  $958\text{ cm}^{-1}$  und  $\nu_3$   $\text{PO}_4^{3-}$  bei  $1040 - 1160\text{ cm}^{-1}$  und die Karbonatbande bei  $\nu_3$   $\text{CO}_3^{2-}$  bei  $1405 - 1450\text{ cm}^{-1}$ . Die Größe der Apatitkristalle und eine zunehmende Anordnung im Kristallgitter führt zu einem Größeren Split der zwei Phosphatbanden [122,129]. Die Remineralisation durch Ca-PolyP zeigt erhöhte Peaks der  $\nu_1$   $\text{PO}_4^{3-}$  bei  $958\text{ cm}^{-1}$  und  $\nu_3$   $\text{PO}_4^{3-}$  bei  $1040 - 1160\text{ cm}^{-1}$  und der Karbonatbande bei  $\nu_3$   $\text{CO}_3^{2-}$  bei  $1405 - 1450\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 22).

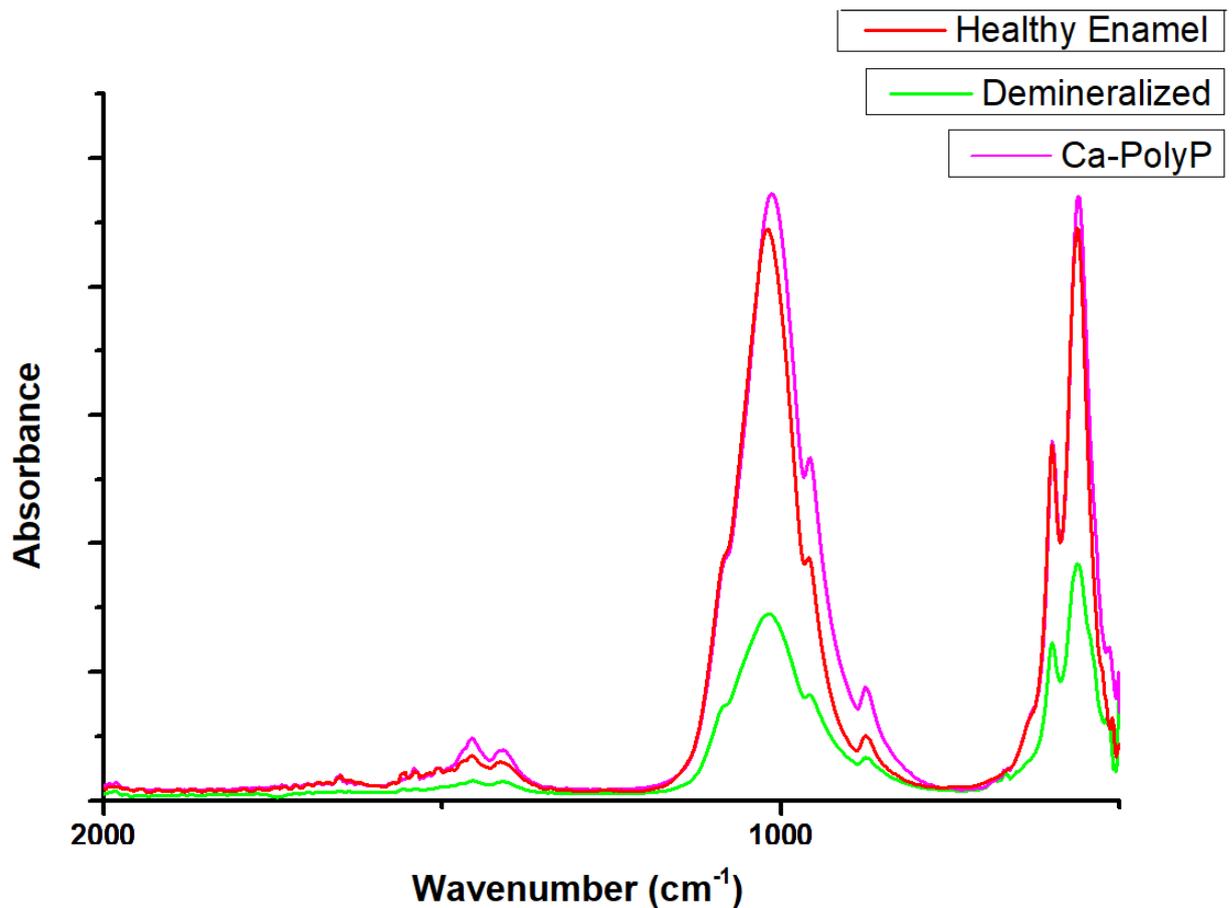


Abbildung 22: Exemplarische FTIR der Zahnschmelzproben verschiedener Zahnteile eines Zahns remineralisiert mit Ca-PolyP. Rot = gesunder Schmelz, grün = demineralisiert, lila = demineralisiert + Ca-PolyP.

### 4.3. Quantifizierung des Karbonatanteils

In unseren Versuchen zeigte sich keine signifikante Veränderung des Karbonatanteils bei den unterschiedlich behandelten und analysierten Zahnproben. Der Karbonatanteil zeigte, insbesondere in den demineralisierten Proben eine hohe Varianz, weshalb sich keine signifikante Änderung des Karbonatanteils der unterschiedlichen Proben ohne künstlichen Speichel ergab (Abbildung 23).

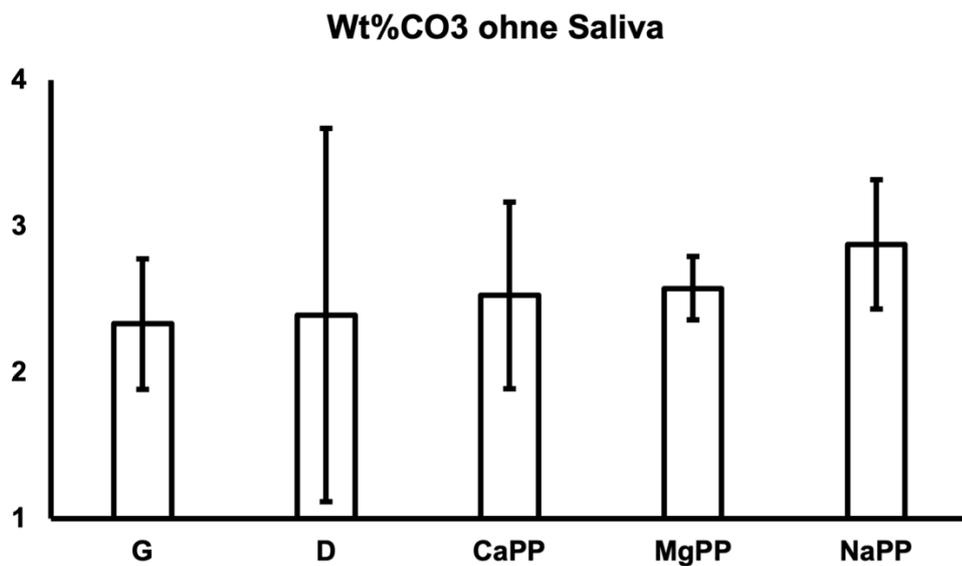


Abbildung 23: Karbonatanteil der Zähne eingelagert in Aqua dest. ohne künstlichen Speichel (n=4). G = gesunder Zahnschmelz. D = demineralisierter Zahnschmelz. CaPP = demineralisierter Zahnschmelz behandelt mit Calcium Polyphosphat. MgPP = demineralisierter Zahnschmelz behandelt mit Magnesium Polyphosphat. NaPP = demineralisierter Zahnschmelz behandelt mit Natrium Polyphosphat.

Auch in Anwesenheit blieb der Karbonatanteil ungefähr gleich, jedoch zeigte die Auswertung der Proben eine höhere Standardabweichung (Abbildung 24).

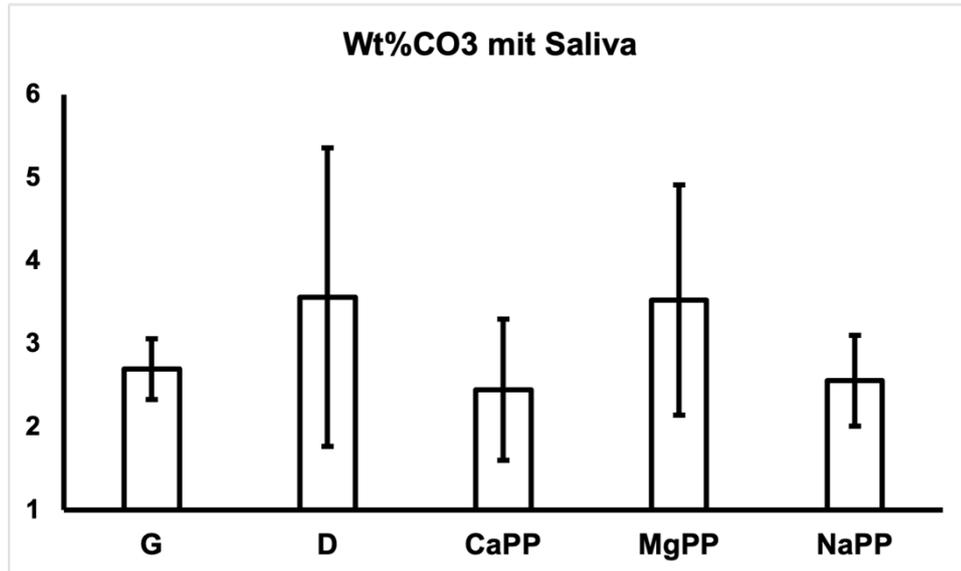


Abbildung 24: Karbonatanteil der Zähne eingelagert mit künstlichem Speichel (n=4). G = gesunder Zahnschmelz. D = demineralisierter Zahnschmelz. CaPP = demineralisierter Zahnschmelz behandelt mit Calcium Polyphosphat. MgPP = demineralisierter Zahnschmelz behandelt mit Magnesium Polyphosphat. NaPP = demineralisierter Zahnschmelz behandelt mit Natrium Polyphosphat.

#### 4.4. Kristallinitätsindex

Die Demineralisation erniedrigte den KI des Zahnschmelzes. Eine Remineralisation durch Calcium- und Magnesiumpolyphosphate erhöhte den KI von demineralisiertem Schmelz in unseren Versuchen signifikant (Abbildung 25).

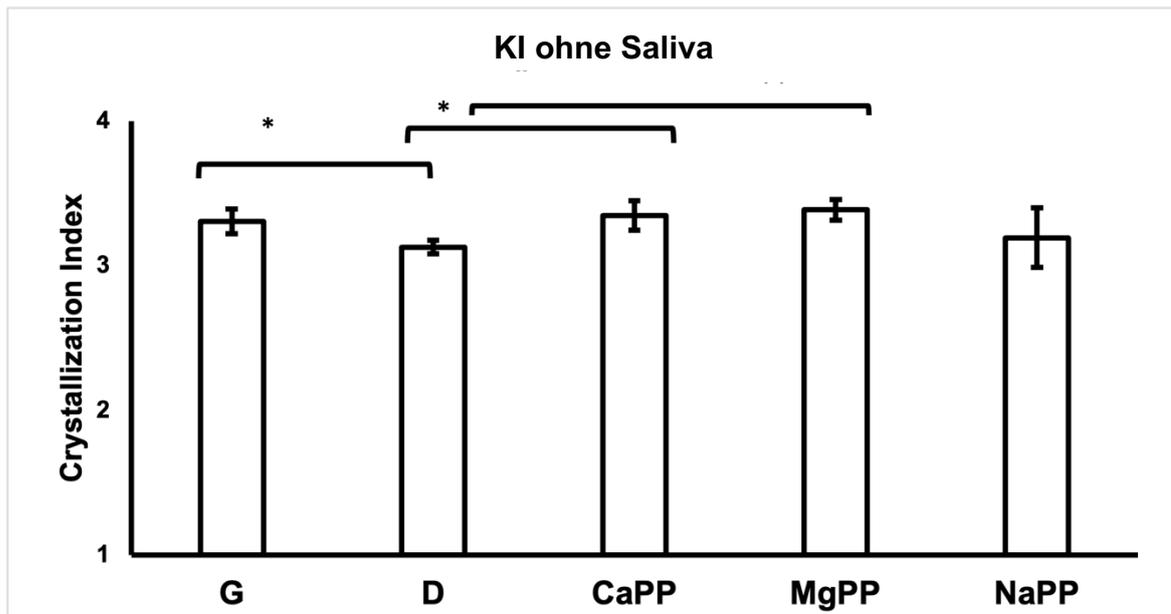


Abbildung 25: KI des Zahnschmelzes der Zähne eingelagert in Aqua dest. ohne künstlichen Speichel. G = gesunder Zahnschmelz. D = demineralisierter Zahnschmelz. CaPP = demineralisierter Zahnschmelz behandelt mit Calcium Polyphosphat. MgPP = demineralisierter Zahnschmelz behandelt mit Magnesium Polyphosphat. NaPP = demineralisierter Zahnschmelz behandelt mit Natrium Polyphosphat.

In Anwesenheit von künstlichem Speichel konnte der KI des gesunden Zahnschmelzes signifikant durch die Anwendung von Calcium- und Natriumpolyphosphat erhöht werden (Abbildung 26).

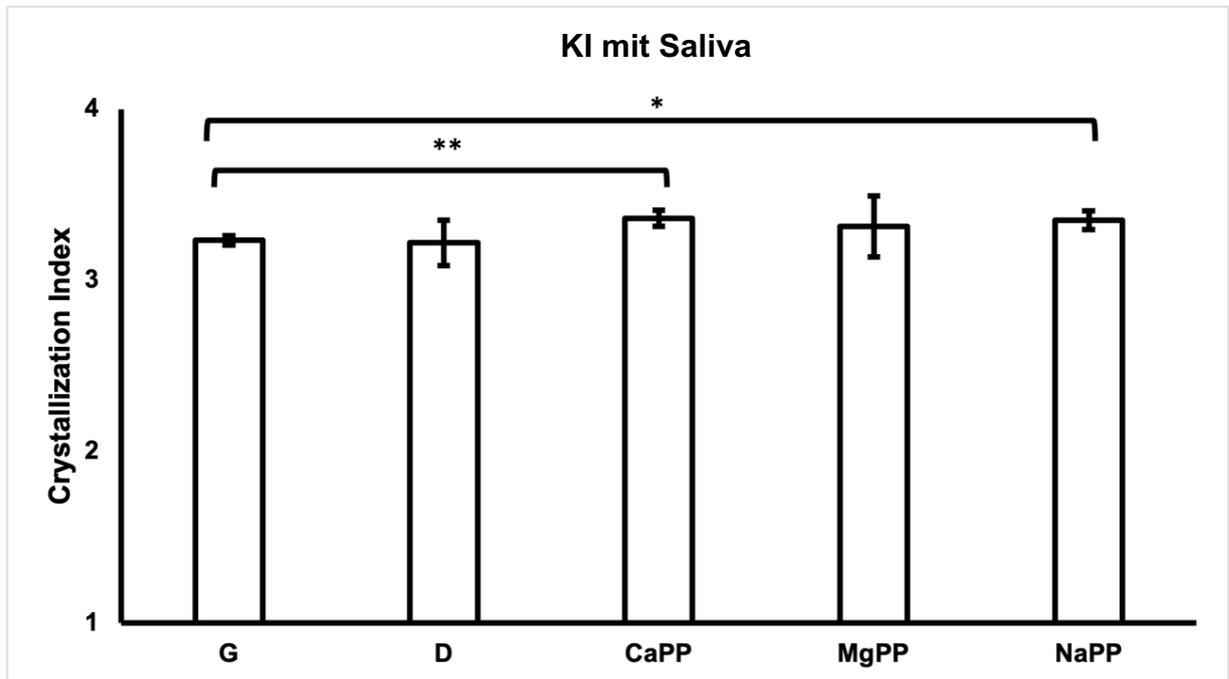


Abbildung 26: KI des Zahnschmelzes der Zähne eingelagert mit künstlichem Speichel. G = gesunder Zahnschmelz. D = demineralisierter Zahnschmelz. CaPP = demineralisierter Zahnschmelz behandelt mit Calcium Polyphosphat. MgPP = demineralisierter Zahnschmelz behandelt mit Magnesium Polyphosphat. NaPP = demineralisierter Zahnschmelz behandelt mit Natrium Polyphosphat.

## 4.5. Ergebnisse der Nanoindentierung

### 4.5.1 Auswertung Versuchsaufbau 1 (Vorversuche)

Um die Vergleichbarkeit der analysierten Proben zu gewährleisten, wurde für die Nanoindentierung ein Zahn geviertelt. Die Härte des gesunden unbehandelten Zahnschmelzes betrug 5,22 GPa (Probe 1.1). Nach einwöchiger Demineralisation mit Säure betrug die Härte 1,355 GPa (Probe 2.2) und konnte nach zweiwöchiger Behandlung mit Ca-PolyP auf einen Wert von 4,04 GPa (Probe 2.1) gehoben werden (Tabelle 3). Um zu vergleichen, ob gesunder Schmelz noch weiter gehärtet werden kann, wurde eine gesunde Zahnschmelzprobe für 2 Wochen mit Ca-PolyP (Probe 1.1) behandelt. Eine Zunahme der Härte konnte nicht gemessen werden. Die Härte betrug 4,76 GPa.

<b>Probe</b>	<b>Behandlungsschema</b>	<b>Härte H (GPa)</b>	<b>Elastische Verformung <math>E_R</math> (GPa)</b>
<b>1.1</b>	Gesunder Zahnschmelz+ Ca-PolyP	4,76 ± 0,92	111,53 ± 18,36
<b>1.2</b>	Gesunder Zahnschmelz	5,22 ± 1,52	119,29 ± 23,10
<b>2.1</b>	Demineralisierter Zahnschmelz + Ca-PolyP	4,04 ± 0,96	106,84 ± 23,95
<b>2.2</b>	Demineralisierter Zahnschmelz	1,355 ± 0,41	43,33 ± 7,22

Tabelle 3: Vergleich der Härte und elastischen Verformung der Zahnschmelzproben.

In der folgenden Kraft-Verformungs-Kurve (Abbildung 27) wird die Kraft in mN auf der Y-Achse, sowie die Verformung auf der X-Achse dargestellt. Durch die einzigartige Prismenstruktur und den organischen Anteil des Zahnschmelzes ist dieser verformbarer als rein anorganische Materialien, wie beispielsweise reines Hydroxyapatit [130]. In der Grafik ist gut erkennbar, dass der demineralisierte Zahnschmelz bei einer Kraft von 25 mN bereits eine Verformung von über 1000 nm aufweist, während der gesunde Schmelz oder der durch Ca-PolyP remineralisiert Schmelz erst bei 75 mN eine Verformung von 950 nm aufweist.

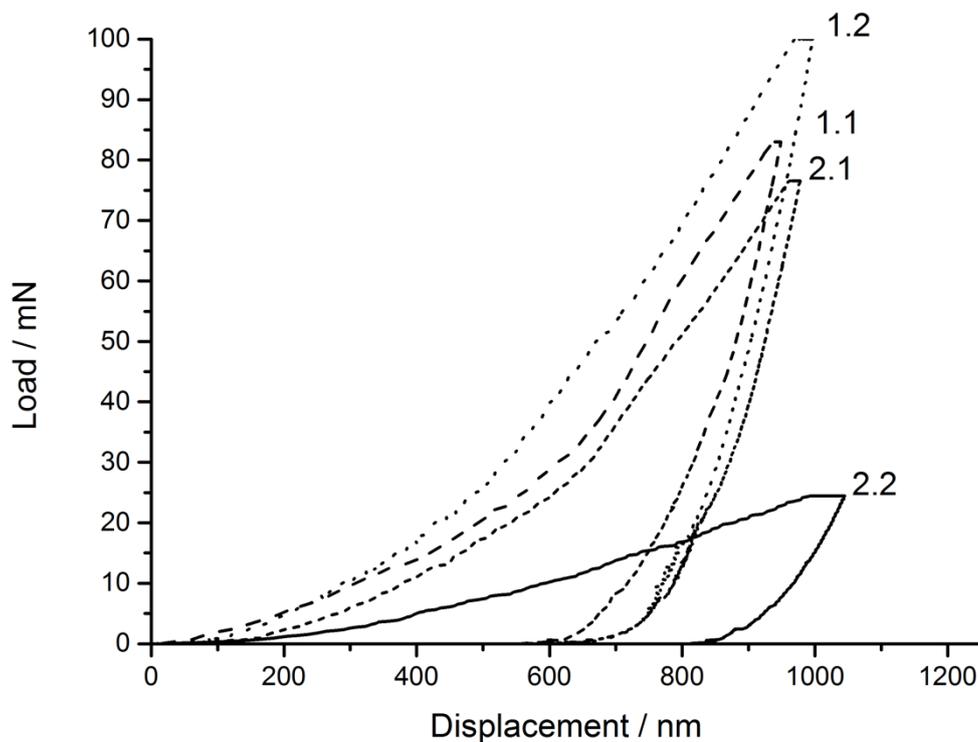


Abbildung 27: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Nanoindentierung. 1.1 = gesunder Zahnschmelz + Ca-PolyP. 1.2 = gesunder Zahnschmelz. 2.1 = demineralisierter Zahnschmelz + Ca-PolyP. 2.2 = demineralisierter Zahnschmelz.

#### 4.5.2. Auswertung Versuchsaufbau 2

Es zeigt sich eine Abnahme der Härte des Zahnschmelzes durch Demineralisation ( $2,72 \pm 0,64$  GPa auf  $2,145 \pm 0,412$  GPa). Die Remineralisation durch Polyphosphate konnte die Härte des zuvor demineralisierten Zahnschmelzes signifikant von  $2,145 \pm 0,412$  GPa auf  $3,27 \pm 0,52$  GPa erhöhen (Abbildung 28). Bei der Auswertung der Daten wurden Messwerte  $<2$  GPa als Fehlmessung interpretiert und ausgeschlossen.

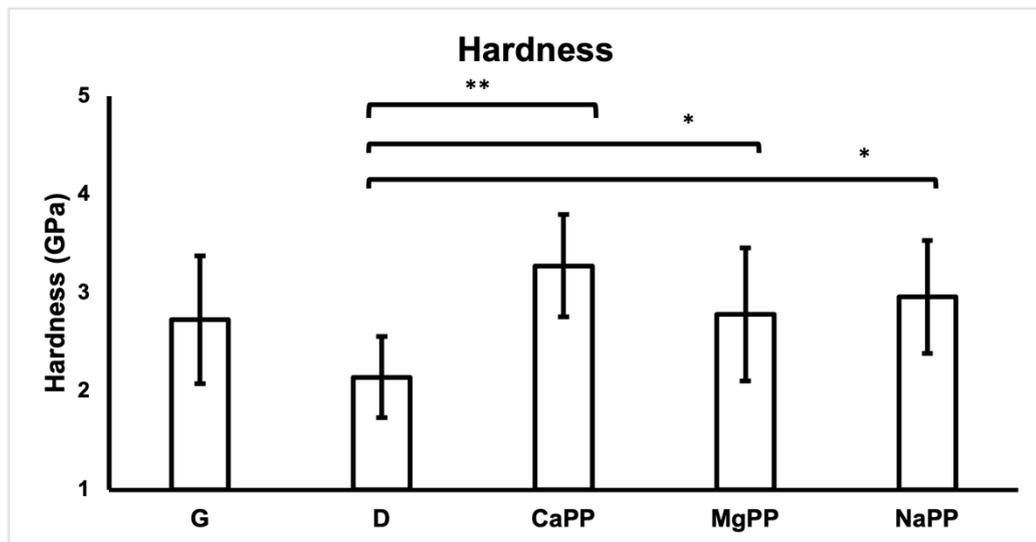


Abbildung 28: Einfluss der Demineralisation und Remineralisation durch Polyphosphate auf die Härte des Zahnschmelzes (GPa). G = gesunder Zahnschmelz. D = demineralisierter Zahnschmelz. CaPP = demineralisierter Zahnschmelz behandelt mit Calcium Polyphosphat. MgPP = demineralisierter Zahnschmelz behandelt mit Magnesium Polyphosphat. NaPP = demineralisierter Zahnschmelz behandelt mit Natrium Polyphosphat.

## 4.6. Ergebnisse der Lichtmikroskopie

### 4.6.1. Artificielle White-Spot-Läsionen

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der künstlich hergestellten WSL zeigen die erfolgreiche Demineralisation des Zahnschmelzes. Sie erscheinen aufgrund eines optischen Phänomens weiß (Abbildung 29). Durch die Demineralisation nimmt die Porengröße zu, wodurch der Brechungsindex des Lichts geändert wird [68]. Je größer die Poren im Läsionskörper sind, desto weißer erscheint die Läsion.

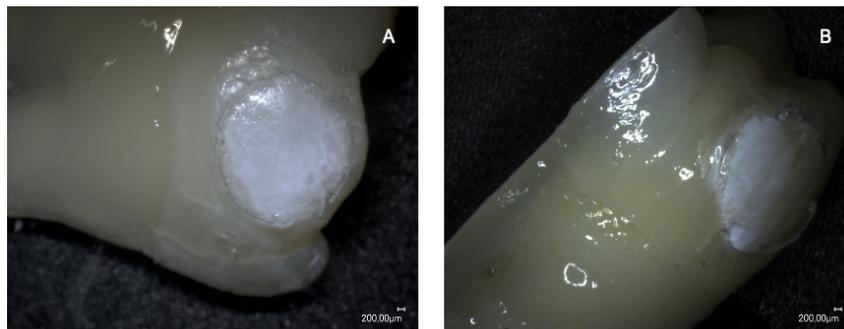


Abbildung 29: Lichtmikroskopische Aufnahmen künstlicher WSL.

#### 4.6.2. Natürliche White-Spot-Läsionen

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der natürlichen WSL zeigen die Demineralisation des Zahnschmelzes. Sie erscheinen aufgrund eines optischen Phänomens weiß (Abbildung 30 A-F) und reichen je nach Läsionstiefe bis an die äußere Hälfte des Dentins.

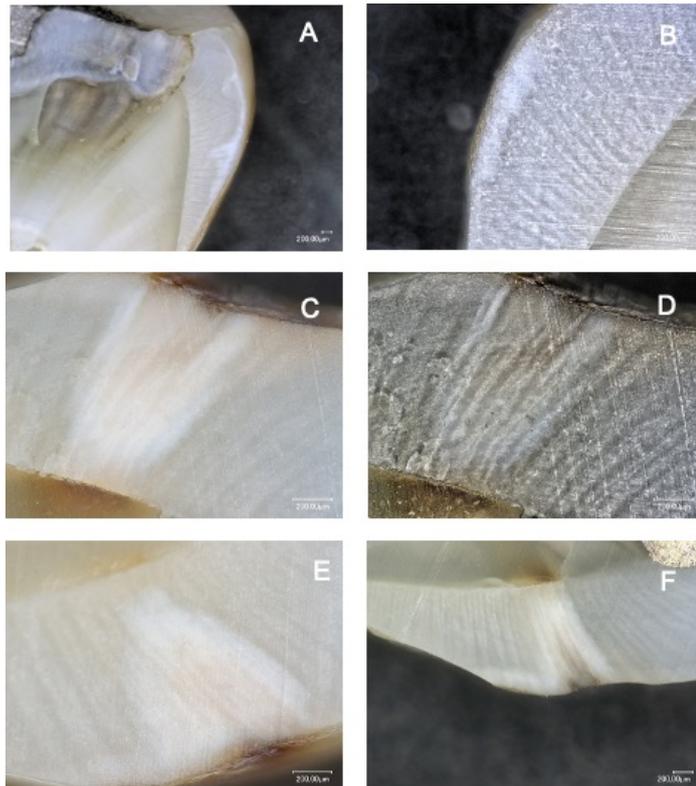


Abbildung 30: Lichtmikroskopische Aufnahmen natürlicher WSL. Die Läsionen erreichen nicht das Dentin (A, B). Die Läsion erreicht die äußere Dentinhälfte, die pseudointakte Oberflächenschicht der Läsion wird mikroskopisch sichtbar porös (C-F).

## **5. Diskussion**

### **5.1 Diskussion des Materials und der Methoden**

#### **5.1.1 Diskussion des Materials**

##### **5.1.1.1. Einfluss der Lokalisation der Schmelzprobe auf die Kristallinität**

Neben dem Alter könnte die Lokalisation der Schmelzprobe im Mund des Patienten Einfluss auf die hier verwendete Methodik haben. Bezüglich der Kariesinzidenz wird in der Literatur beschrieben, dass bukkale Zahnflächen im Vergleich zu Lingualflächen höhere Inzidenzraten für WSL und Karies aufweisen [86,87]. Zudem werden in der Literatur mechanische Unterschiede bezüglich der Härte von Lingualflächen zu Bukkalflächen der Molaren beschrieben. Lingualflächen werden als härter beschrieben [131]. Diese Ergebnisse könnten mit der höheren Speichelbefeuchtung der lingualen Zahnflächen und somit einer höheren Remineralisationskapazität erklärt werden. Da die Zähne für diese Studie geviertelt bzw. gefünftelt wurden, könnten unterschiedliche Zahnteile andere kristalline Ausgangsvoraussetzungen mitbringen, die im Rahmen der Methodik dieser Studie nicht aus den Ergebnissen herausgerechnet werden könnten. Um diesen Einflussfaktor zu untersuchen, sind weitere Studien zum Vergleich der Kristallinität von Lingual- im Vergleich zu Bukkalflächen von Molaren notwendig.

#### **5.1.2. Diskussion der Methoden**

##### **5.1.2.1. De- und Remineralisationszyklen**

Für die hier verwendeten Experimente wurden die ausgewählte und randomisierten Zahnschmelzproben einmalig innerhalb eines Zyklus von 7 Tagen demineralisiert und anschließend, je nach Gruppenzuordnung, für zwei Wochen remineralisiert. *In vivo* unterliegt der Zahnschmelz jedoch einem zyklischen Wechsel von De- und Remineralisationsvorgängen [5]. Während der Demineralisation kommt es zu einer Auflösung der Apatitkristalle und  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{PO}_4^{3-}$  werden in den Speichel freigesetzt. Die Remineralisation erfolgt durch Aufnahme von Ionen aus dem Speichel und der Zahnpasta. Sofern Demineralisationsvorgänge überwiegen, kollabieren die Kristallstrukturen und der Zahnschmelz wird porös. Dieser Effekt kann bis dato nicht rückgängig gemacht werden [85]. Der hier verwendete Versuchsaufbau ist aus den

oben genannten Gründen als simplifiziert anzusehen, da kein zyklischer Prozess imitiert wurde und während der Demineralisation keinerlei Remineralisationsphase stattfand. Umgekehrt fand während der Remineralisation keine Demineralisationsphase statt.

## **5.2. Diskussion der Ergebnisse**

### **REM**

Die artifiziell mittels Säureätzung hergestellten kariösen Läsionen zeigten kleinere „Micropits im Vergleich zu natürlichen WSL. Zudem waren noch wenige Grübchen der Tomes-Fortsätze erkennbar, im Vergleich zum gesunden Schmelz jedoch vereinzelter und abgeschwächer. Insgesamt zeigte sich in den REM Bildern eine oberflächlichere Ätzung durch künstlich induzierte WSL im Vergleich zu echten WSL. Dieses Phänomen wird bereits in der Literatur beschrieben [132].

Bezüglich der Remineralisation zeigten sich in den REM Bildern der mit Fluorid remineralisierten Bereiche kugelförmige Aggregate mit einer Größe von 0,2 µm bis 2 µm. Diese waren größer als bisher beschrieben. In der Literatur werden die Calciumfluorid Kugeln in einer Größenordnung von 0,2 µm bis 0,6 µm beschrieben [133].

### **Karbonatanteil**

Der Karbonatanteil im Zahnschmelz beträgt ungefähr 3,5 wt% [134] und stellt die größte anorganische Verunreinigung des HAp des Zahnschmelzes dar, weshalb dieses auch karboniertes Apatit bezeichnet wird. Karbonat Ionen sind zudem ein signifikanter Substituent in der Kristallstruktur und befinden sich an zwei Flächen des PO<sub>4</sub> Tetrahedron [135]. Die Demineralisation findet im Wesentlichen durch einen Verlust von Phosphat und Calcium statt [5]. In sehr initialen Phasen der Demineralisation, insbesondere in der transluzenten Zone, wurde ein selektiver Verlust von Magnesium- und Karbonat Ionen beschrieben [136]. Der Hauptsubstituent in biologischem Apatit ist (CO<sub>3</sub>)<sup>2-</sup>, welches die Phosphatgruppe (PO<sub>4</sub>)<sup>3-</sup> ersetzt, um karboniertes HAp vom B-Typ mit 4-6 wt% Karbonat zu bilden [137]. Die Einlagerung von Karbonat in den Zahnschmelz beeinträchtigt die Kristallstruktur und -größe. Durch

die Karbonatsubstitution wird der Schmelz anfälliger für Säureauflösung und Kariesprogression.

In unseren Versuchen zeigte sich keine signifikante Veränderung des Karbonatanteils durch die De- oder Remineralisationsvorgänge. Der Karbonatanteil zeigte jedoch insbesondere in den demineralisierten Proben eine hohe Varianz.

### **Kristallinitätsindex**

Der KI ist ein quantitativer Indikator für die Kristallinität und hängt mit der Kristallgröße und dem Ordnungsgrad innerhalb der Kristalle zusammen. Der Grad der Kristallinität beeinflusst die Härte und Dichte des Materials [138]. Am Beispiel des Zahnschmelzes wird dessen Kristallinität durch Karies oder Amelogenesis imperfecta verringert, die Kristallinität des Knochens wird durch Osteoporose vermindert [139-141]. Darüber hinaus gibt der KI sowohl Informationen über die relative Größe der Apatitkristalle, als auch über die Anordnung innerhalb der Kristallgitters wieder [138]. Die Größe der Apatitkristalle und eine zunehmende Anordnung im Kristallgitter führen zu einem größeren Split der zwei Phosphatbanden  $\nu_4$  und somit zu einem höheren KI [122,129]. Der KI des Zahnschmelzes nimmt durch Demineralisation ab, hierbei insbesondere durch den Verlust von Phosphat.

Remineralisationsvorgänge führen auch zu einer Zunahme der Kristallinität und einer Zunahme der Kristallgröße. Dieses Phänomen wird in der Literatur auch als „Scar tissue formation“ bezeichnet [142]. Aus diesem Grund sind die Kristalle im äußeren Schmelz größer, als im inneren Schmelz an der Schmelz-Dentin Grenze [143].

In Abwesenheit von Speichel konnte der KI durch Remineralisation mit Ca-PolyP und Mg-PolyP signifikant erhöht werden. In Anwesenheit von künstlichem Speichel konnte der KI des gesunden Zahnschmelzes signifikant durch die Anwendung von Calcium- und Natriumpolyphosphat erhöht werden.

### **Nanoindentierung**

Es zeigt sich in allen Versuchen mit künstlichen WSL eine Abnahme der Härte des Zahnschmelzes durch die Demineralisation ( $2,72 \pm 0,64$  GPa auf  $2,145 \pm 0,412$  GPa). Die Werte stimmen mit den bisher publizierten Werten für die Härte von Zahnschmelz von 2 GPa - 3.5 GPa überein, wobei die maximalen Werte von 3,5 GPa in den äußersten Schmelzschichten gemessen wurden [144].

Die Remineralisation durch Polyphosphate konnte die Härte des zuvor demineralisierten Zahnschmelzes in unseren Versuchen signifikant von  $2,145 \pm 0,412$  GPa auf  $3,27 \pm 0,52$  GPa erhöhen. Ähnliche Werte wurden durch Dai et al. für die Remineralisation von demineralisiertem Zahnschmelz für calciumphosphathaltige Mineralien publiziert. In den Versuchen von Dai et al. betrug die durchschnittliche Härte der Demineralisierten Zähne 2,7 GPa [145].

Bei der Auswertung unserer Daten wurden Messwerte  $< 2$  GPa als Fehlmessung interpretiert und ausgeschlossen, da diese für Zahnschmelz als nicht plausibel gewertet wurden. Eine gewisse Varianz der Härte wurde in der Literatur bezüglich der Härte von Lingual- bzw. Palatinalflächen zu Bukkalflächen der Molaren beschrieben. Lingualflächen werden als härter beschrieben [131]. In unserer Studie konnte nach Fünfteilung der Zähne nicht mehr zugeordnet werden, welche Fläche sich zuvor an welcher Stelle im Mund befand. Eine Härte  $< 2$  GPa erscheint dennoch als nicht plausibler Messwert für Zahnschmelz im äußeren Bereich.

## **6. Schlussfolgerung**

### **6.1. Biomimetische Reparatur von White-Spot-Läsionen durch Polyphosphate**

Während der Demineralisation des Zahnschmelzes durch Säuren kommt es zu einer Auflösung der Apatitkristalle.  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{PO}_4^{3-}$  werden in den Speichel freigesetzt. Für eine Remineralisation werden Calcium und Phosphat, sowie idealerweise Fluorid benötigt. Ca-PolyP kann zweiwertiges Calcium liefern, welches durch das Aufbringen auf den Schmelz an die negativ geladenen Ionen der Apatitkristalle binden kann. Polyphosphate können zudem Phosphat Ionen substituieren. Durch Polyphosphate, insbesondere durch Ca-PolyP, kann die Menge an bioverfügbarem Calcium und Phosphat im Speichel und der Schmelzoberfläche erhöht werden.

Neben den Remineralisationsvorgängen konnte ein „Versiegelungseffekt“ in den REM-Aufnahmen durch PolyP gezeigt werden. Durch diesen Effekt können vergrößerte interkristalline Poren bei initialen Kariesläsionen, in welche Mikroorganismen eindringen können, durch Polyphosphate verschlossen werden. Durch die zusätzlich antibakterielle Wirkung des Ca-PolyP [16], könnte somit ein durch bakterielle saure Stoffwechselprodukte verursachter Progress initialer Kariesläsionen aufgehalten werden. Ohne den Verschluss der Poren durch Polyphosphate senken Stoffwechselprodukte kariogener Bakterien in den vergrößerten Poren des demineralisierten Zahnschmelzes den pH-Wert. Durch den sauren pH-Wert wird die

Demineralisation gefördert und Apatitkristalle aufgelöst. Dieser *Circulus vitiosus* könnte durch den antibakteriellen Effekt des Ca-PolyP aufgehalten werden, denn Polyphosphate sind in der Lage, demineralisierten Zahnschmelz zu remineralisieren. Dies kann sowohl mit als auch ohne Speichel erfolgen, jedoch ist die remineralisierende Wirkung in Kombination mit Speichel besser. Polyphosphate könnten somit eine zusätzliche präventive oder therapeutische Option für WSL darstellen und insbesondere auch bei Patienten mit Xerostomie Anwendung finden. Die Anwendung von Polyphosphaten zur Therapie und Prävention von WSL sollte in weiteren Studien untersucht werden.

## **6.2. Klinische Anwendungsmöglichkeiten von Ca-PolyP**

Diverse Studien und Metaanalysen konnten zeigen, dass der Rückgang der Kariesprävalenz während der letzten Jahrzehnte auf die Anwendung von Fluoriden zurückzuführen ist [146-148]. Die Remineralisation des Zahnschmelzes durch Fluorid und die Bildung einer schützenden  $\text{CaF}_2$  Deckschicht auf der Oberfläche des Zahns erfordert jedoch die Anwesenheit von Ionen aus dem Speichel [14,149]. Insbesondere für Patienten mit Xerostomie die durch Einnahme von Medikamenten, chronischen Erkrankungen oder bei Bestrahlung im Kopf-Hals-Bereich bedingt sein kann [150], können Ergänzung zur Fluoridierung im Therapiekonzept zur Kariesprophylaxe sinnvoll sein.

In der hier vorgelegten Studie konnte gezeigt werden, dass auch ohne den Zusatz von Speichel eine Remineralisation und kariespräventive Wirkung von Polyphosphaten ausgeht. In Anwesenheit von Speichel konnten Remineralisationsvorgänge im Vergleich zu demineralisierten, aber auch sogar im Vergleich zu gesundem Schmelz gezeigt werden. Eine prophylaktische Anwendung von Ca-PolyP in Zahnpasten oder Mundspülungen, zusätzlich oder in Kombination mit Fluorid, könnte ein neuartiger Baustein in der Kariesprävention werden. Hierfür sind weitere Studien notwendig.

Zudem kann die Anwendung von Polyphosphaten in Adhäsivmaterialien für orthodontische Brackets diskutiert werden. Insbesondere für die Verwendung an den kariesanfälligen Bukkalflächen [86,87] festsitzender orthopädischer Apparaturen, die nach initialer Schmelzätzung auf die Bukkal- und Labialflächen der Zähne geklebt werden, scheinen Polyphosphate eine interessante Substanz für weitere präklinische oder anwendungsorientierte Studien.

Aktuelle Entwicklungen zur Prävention von WSL durch befestigte orthodontische Apparaturen berücksichtigen zwei Konzepte. Zum einen die Inkorporation antimikrobieller Substanzen, wie Silbernanopartikel, Titanium, Zink oder Kupfer in das Material zur adhäsiven Befestigung der Brackets am Zahnschmelz [151-153]. Zum anderen werden remineralisierende Substanzen wie Fluorid, Niobium Pentoxid [154,155] oder amorphes Calciumphosphat verwendet [156,157]. Durch die Inkorporation von amorphen Polyphosphaten könnten beide Komponenten, antimikrobielle Aktivität und Remineralisation, auch in Kombination mit Fluorid abgedeckt werden.

## 7. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden *in vitro* Arbeit war, die Remineralisation initialer kariöser Läsionen durch amorphe Polyphosphate (Ca-PolyP, Na-PolyP, Mg-PolyP) nachzuweisen.

Um diese Hypothese überprüfen, wurden extrahierte Molaren ohne makroskopische Anzeichen von WSL oder Karies, sowie Molaren mit sichtbaren WSL verwendet, randomisiert und analysiert. Gesunde Schmelzproben wurden in einer Lösung mit einem pH-Wert von 4,8 für eine Woche bei 37°C bei 50 rpm in einem Plattenschüttler demineralisiert. Die Demineralisation wurde visuell durch opake Verfärbungen kontrolliert. Anschließend wurden die demineralisierten Schmelzproben im Versuchsaufbau 1 mit einer Kombination aus Natrium- und Aminfluorid (12.500 ppm), einem biomimetischen, wasserbasierten Zahngel mit 10% Ca-PolyP oder einem Placebo für zwei Wochen mit einer Handzahnbürste gebürstet. Die Aufbewahrung zwischen den Behandlungen erfolgte in destilliertem Wasser. In den nachfolgenden Versuchen (Versuchsaufbau 2) wurden 50 Schmelzproben jeweils mit einem wasserbasierten Zahngel mit 3%igem Calcium-, Natrium- oder Magnesium Polyphosphat für 2 Wochen mit einer Handzahnbürste gebürstet. Die Hälfte der Proben wurde in destilliertem Wasser aufbewahrt, die andere Hälfte in künstlichem Speichel.

Die Analyse mit dem Rasterelektronenmikroskop ESEM XL-30 zeigte in den Bildern mit artifiziellen und natürlichen White-Spot-Läsionen zentral kollabiertes Gewebe, ein „Micropit“, eine in der Elektronenmikroskopie bei Karies charakteristische zentrale Mulde [126]. Die Proben der mit Ca-PolyP behandelten, künstlichen White-Spot-Läsionen zeigen eine Oberfläche ohne „Micropits“ und mit wellenförmig aufgeworfenen Erhebungen, bestehend aus amorphem Calcium Polyphosphat.

Die Spektralanalyse erfolgte mittels eines ATR-FTIR-Spektroskops, ausgestattet mit einer Golden Gate-ATR-Einheit. Die Quantifizierung des Karbonatanteils in den Zahnschmelzproben erfolgte basierend auf den FTIR-Spektraldaten nach der Methode von Grunenwald et al. [121]. In unseren Versuchen zeigte sich keine signifikante Veränderung des Karbonatanteils bei den unterschiedlich behandelten und analysierten Zahnproben. Der Karbonatanteil zeigte insbesondere in den demineralisierten Proben eine hohe Varianz, weshalb sich keine signifikante Änderung des Karbonatanteils der unterschiedlichen Proben ohne und mit künstlichem Speichel ergab.

Der KI wurde nach der Methode von Weiner und Bar-Yosef [123] errechnet. Die Demineralisation erniedrigte den KI des Zahnschmelzes. In Abwesenheit von Speichel konnte der KI durch Remineralisation mit Ca-PolyP und Mg-PolyP signifikant erhöht werden. In Anwesenheit von künstlichem Speichel konnte sogar der KI des gesunden Zahnschmelzes signifikant durch die Anwendung von Calcium- und Natriumpolyphosphat erhöht werden. Auch der KI des demineralisierten Zahnschmelzes wurde erhöht, jedoch aufgrund der Standardabweichung nicht signifikant.

Für die Messung der Härte wurde der „NanoTest Vantage Nanoindentation“ verwendet, ausgestattet mit einer dreiseitigen Berkovich - Nanoindenterspitze aus Diamant. Es zeigt sich in unseren Versuchen eine Abnahme der Härte des Zahnschmelzes durch die Demineralisation. Die Remineralisation durch Polyphosphate konnte die Härte signifikant erhöhen.

In unserer Studie konnte erstmalig gezeigt werden, dass Polyphosphate demineralisierten Zahnschmelz *in vitro* remineralisieren und härten können. Die Demineralisation findet im Wesentlichen durch einen Verlust von Phosphat und Calcium statt. Polyphosphate bewirken eine Übersättigung des Mikromilieus mit Phosphat. Dies könnte einen möglichen Mechanismus für die remineralisierende Wirkung erklären. Insbesondere PolyP-Koazervate können als ideale Carrier fungieren und Calcium und Phosphat zur Hydroxyapatitmatrix transportieren. Durch Ladungsunterschiede bilden sich Mikrosphären, die sich auf den Zahnschmelz legen und über ionische Wechselwirkung mit dem Zahnschmelz interagieren können. Darüber hinaus können durch die Demineralisation vergrößerte interkristalline Poren, in welchen sich Mikroorganismen befinden, durch Polyphosphate verschlossen werden. Durch die antibakterielle Wirkung des Ca-PolyP [16], könnte zusätzlich ein Progress initialer Kariesläsionen aufgehalten werden. Die Remineralisation durch Polyphosphate scheint auch unabhängig von Speichel zu funktionieren und könnte daher insbesondere für den Einsatz bei Patienten mit Xerostomie indiziert oder labial bzw. bukkal adhäsiv befestigten Brackets mit geringem Speichelkontakt geeignet sein. Die Substanz sollte, einzeln oder in Kombination mit Fluorid, in weiteren Studien für die Therapie und Prävention initialer Kariesläsionen untersucht werden.

Auch eine Kombination von Polyphosphaten mit Fluorid wäre umsetzbar, da sowohl PolyP als auch Fluorid in anionischer Form vorliegen. Diese Kombination könnte den klinischen Nutzen verstärken.

## Literaturverzeichnis

1. Veis, A. A window on biomineralization. *Science* **2005**, *307*, 1419-1420, doi:10.1126/science.1109440.
2. Eanes, E.D. Enamel apatite: Chemistry, structure and properties. *J Dent Res* **1979**, *58*, 829-836, doi:10.1177/00220345790580023501.
3. Hellwig, E.; Schäfer, E.; Klimek, J.; Attin, T. *Einführung in die Zahnerhaltung : Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie*; 2018; Volume 7. überarbeitete Auflage.
4. Sui, T.; Salvati, E.; Harper, R.A.; Zhang, H.; Shelton, R.M.; Landini, G.; Korsunsky, A.M. *In situ* monitoring and analysis of enamel demineralisation using synchrotron x-ray scattering. *Acta Biomaterialia* **2018**, *77*, 333-341, doi:10.1016/j.actbio.2018.07.027.
5. Abou Neel, E.A.; Aljabo, A.; Strange, A.; Ibrahim, S.; Coathup, M.; Young, A.M.; Bozec, L.; Mudera, V. Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. *Int J Nanomedicine* **2016**, *11*, 4743-4763, doi:10.2147/ijn.S107624.
6. Featherstone, J.D. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol* **1999**, *27*, 31-40, doi:10.1111/j.1600-0528.1999.tb01989.x.
7. Featherstone, J. Dental Caries: A dynamic disease process. *Aust Dent J* **2008**, *53*, 286-291, doi:10.1111/j.1834-7819.2008.00064.x.
8. Arends, J.; ten Bosch, J.J. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res* **1992**, *71 Spec No*, 924-928, doi:10.1177/002203459207100s27.
9. Kidd, E.A.; Fejerskov, O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res* **2004**, *83 Spec No C*, C35-38, doi:10.1177/154405910408301s07.
10. Sundararaj, D.; Venkatachalapathy, S.; Tandon, A.; Pereira, A. Critical evaluation of incidence and prevalence of white spot lesions during fixed orthodontic appliance treatment: a meta-analysis. *J Int Soc Prev Community Dent* **2015**, *5*, 433-439, doi:10.4103/2231-0762.167719.
11. Tufekci, E.; Dixon, J.S.; Gunsolley, J.C.; Lindauer, S.J. Prevalence of white spot lesions during orthodontic treatment with fixed appliances. *Angle Orthod* **2011**, *81*, 206-210, doi:10.2319/051710-262.1.
12. Al Makhmari, S.A.; Kaklamanos, E.G.; Athanasiou, A.E. Short-term and long-term effectiveness of powered toothbrushes in promoting periodontal health during orthodontic treatment: a systematic review and meta-analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* **2017**, *152*, 753-766.e757, doi:10.1016/j.ajodo.2017.09.003.
13. Dholam, K.P.; Somani, P.P.; Prabhu, S.D.; Ambre, S.R. Effectiveness of fluoride varnish application as cariostatic and desensitizing agent in irradiated head and neck cancer patients. *Int J Dent* **2013**, *2013*, 824982, doi:10.1155/2013/824982.
14. Petzold, M. The influence of different fluoride compounds and treatment conditions on dental enamel: a descriptive *in vitro* study of the CaF<sub>2</sub> precipitation and microstructure. *Caries Res* **2001**, *35 Suppl 1*, 45-51, doi:10.1159/000049110.
15. Cochrane, N.J.; Cai, F.; Huq, N.L.; Burrow, M.F.; Reynolds, E.C. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res* **2010**, *89*, 1187-1197, doi:10.1177/0022034510376046.
16. Müller, W.E.G.; Ackermann, M.; Neufurth, M.; Tolba, E.; Wang, S.; Feng, Q.; Schröder, H.C.; Wang, X. A novel biomimetic approach to repair enamel cracks/carious damages and to reseal dentinal tubules by amorphous polyphosphate. *Polymers* **2017**, *9*, doi:10.3390/polym9040120.

17. Chai, H.; Lee, J.J.; Constantino, P.J.; Lucas, P.W.; Lawn, B.R. Remarkable resilience of teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 7289-7293, doi:10.1073/pnas.0902466106.
18. Chun, K.; Choi, H.; Lee, J. Comparison of mechanical property and role between enamel and dentin in the human teeth. *J Dent Biomech* **2014**, *5*, 1758736014520809, doi:10.1177/1758736014520809.
19. Meyer-Lueckel, H.; Paris, S.; Ekstrand, K.R. *Caries management - science and clinical practice*; 2013.
20. Teruel Jde, D.; Alcolea, A.; Hernández, A.; Ruiz, A.J. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Arch Oral Biol* **2015**, *60*, 768-775, doi:10.1016/j.archoralbio.2015.01.014.
21. Simmer, J.P.; Hu, J.C. Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry. *J Dent Educ* **2001**, *65*, 896-905, doi:10.1002/j.0022-0337.2001.65.9.tb03438.x.
22. Robinson, C.; Brookes, S.J.; Shore, R.C.; Kirkham, J. The developing enamel matrix: nature and function. *Eur J Oral Sci* **1998**, *106 Suppl 1*, 282-291, doi:10.1111/j.1600-0722.1998.tb02188.x.
23. Fincham, A.G.; Moradian-Oldak, J.; Simmer, J.P. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol* **1999**, *126*, 270-299, doi:10.1006/jsbi.1999.4130.
24. Dolphin, A.E.; Goodman, A.H. Maternal diets, nutritional status, and zinc in contemporary mexican infants' teeth: implications for reconstructing paleodiets. *Am J Phys Anthropol* **2009**, *140*, 399-409, doi:10.1002/ajpa.21068.
25. Wang, L.; Guan, X.; Yin, H.; Moradian-Oldak, J.; Nancollas, G.H. Mimicking the self-organized microstructure of tooth enamel. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces* **2008**, *112*, 5892-5899, doi:10.1021/jp077105+.
26. Beniash, E.; Stiffler, C.A.; Sun, C.Y.; Jung, G.S.; Qin, Z.; Buehler, M.J.; Gilbert, P. The hidden structure of human enamel. *Nat Commun* **2019**, *10*, 4383, doi:10.1038/s41467-019-12185-7.
27. Pandya, M.; Diekwisch, T.G.H. Enamel biomimetics-fiction or future of dentistry. *Int J Oral Sci* **2019**, *11*, 8, doi:10.1038/s41368-018-0038-6.
28. Grupe, G.; Christiansen, K.; Schröder, I.; Wittwer-Backofen, U. *Anthropologie: Einführendes Lehrbuch*; Springer Lehrbuch: 2012.
29. Smith, T.M. Experimental determination of the periodicity of incremental features in enamel. *J Anat* **2006**, *208*, 99-113, doi:10.1111/j.1469-7580.2006.00499.x.
30. Fejerskov, O.; Josephsen, K.; Nyvad, B. Surface ultrastructure of unerupted mature human enamel. *Caries Res* **1984**, *18*, 302-314, doi:10.1159/000260781.
31. Gängler, P.; Hoffmann, T.; Willershausen, B.; Schwenger, N.; Ehrenfeld, M. *Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie*; Georg Thieme Verlag: 2005; Volume 2.
32. Smith, C.E. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med* **1998**, *9*, 128-161, doi:10.1177/10454411980090020101.
33. Robinson, C.; Kirkham, J.; Brookes, S.J.; Bonass, W.A.; Shore, R.C. The chemistry of enamel development. *Int J Dev Biol* **1995**, *39*, 145-152.
34. Stiefel, A.; Binus, W. [Maturation of enamel and tooth eruption]. *Dtsch Stomatol* **1991**, *41*, 337-340.
35. Buddecke, E. *Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin*; Walter de Gruyter: 1981; Volume 1.
36. Angmar, B.; Carlstrom, D.; Glas, J.E. Studies on the ultrastructure of dental enamel. IV. The mineralization of normal human enamel. *J Ultrastruct Res* **1963**, *8*, 12-23, doi:10.1016/s0022-5320(63)80017-9.
37. Robinson, C. Enamel maturation: a brief background with implications for some enamel dysplasias. *Front Physiol* **2014**, *5*, 388, doi:10.3389/fphys.2014.00388.

38. Robinson, C.; Fuchs, P.; Deutsch, D.; Weatherell, J.A. Four chemically distinct stages in developing enamel from bovine incisor teeth. *Caries Res* **1978**, *12*, 1-11, doi:10.1159/000260309.
39. Glick, P.L. Patterns of enamel maturation. *J Dent Res* **1979**, *58*, 883-895, doi:10.1177/00220345790580024201.
40. Nyvad, B.; Crielaard, W.; Mira, A.; Takahashi, N.; Beighton, D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. *Caries Res* **2013**, *47*, 89-102, doi:10.1159/000345367.
41. Sengupta, K.; Christensen, L.B.; Mortensen, L.H.; Skovgaard, L.T.; Andersen, I. Trends in socioeconomic inequalities in oral health among 15-year-old danish adolescents during 1995-2013: a nationwide, register-cased, repeated cross-sectional study. *Community Dent Oral Epidemiol* **2017**, *45*, 458-468, doi:10.1111/cdoe.12310.
42. World Health Organization. Sugars and dental caries. *WHO/NMH/NHD/17.12* **2017**.
43. Listl, S.; Galloway, J.; Mossey, P.A.; Marcenes, W. Global economic impact of dental diseases. *J Dent Res* **2015**, *94*, 1355-1361, doi:10.1177/0022034515602879.
44. Keyes, P.H.; Jordan, H.V. Factors influencing the initiation, transmission, and inhibition of dental caries *Harris RS, ed. Mechanisms of Hard Tissue Destruction. New York: Academic Press* **1963**, 261-263.
45. Rosier, B.T.; De Jager, M.; Zaura, E.; Krom, B.P. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Front Cell Infect Microbiol* **2014**, *4*, 92, doi:10.3389/fcimb.2014.00092.
46. Loesche, W.J. Role of *streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* **1986**, *50*, 353-380, PMID: 3540569.
47. Loesche, W.J. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev* **1976**, *9*, 65-107, PMID: 1067529.
48. Theilade, E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol* **1986**, *13*, 905-911, doi:10.1111/j.1600-051x.1986.tb01425.x.
49. Marsh, P.D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* **1994**, *8*, 263-271, doi:10.1177/08959374940080022001.
50. Becker, M.R.; Paster, B.J.; Leys, E.J.; Moeschberger, M.L.; Kenyon, S.G.; Galvin, J.L.; Boches, S.K.; Dewhirst, F.E.; Griffen, A.L. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* **2002**, *40*, 1001-1009, doi:10.1128/jcm.40.3.1001-1009.2002.
51. Nadkarni, M.A.; Caldon, C.E.; Chhour, K.L.; Fisher, I.P.; Martin, F.E.; Jacques, N.A.; Hunter, N. Carious dentine provides a habitat for a complex array of novel prevotella-like bacteria. *J Clin Microbiol* **2004**, *42*, 5238-5244, doi:10.1128/jcm.42.11.5238-5244.2004.
52. Hoceini, A.; Klouche, N.; Ben-Yelles, I.; Mesli, A.; Ziouani, S.; Aissaoui, N.; Nas Ep Rabehi, F.; Arab, M. Caries-related factors and bacterial composition of supragingival plaques in caries free and caries active algerian adults. *Asian Pac J Trop Biomed* **2016**, *6*, doi:10.1016/j.apjtb.2016.06.011.
53. Vieira, A.R. Genetics and caries: prospects. *Braz Oral Res* **2012**, *26 Suppl 1*, 7-9, doi:10.1590/s1806-83242012000700002.
54. Black, G.V. Extracts from the last century. Susceptibility and immunity by dental caries *Br Dent J* **1981**, *151*, 10, doi:10.1038/sj.bdj.4804617.
55. Marthaler, T.M. A standardized system of recording dental conditions. *Helv Odontol Acta* **1966**, *10*, 1-18, PMID: 4379484.
56. Dikmen, B. Icdas II criteria (international caries detection and assessment system). *J Istanb Univ Fac Dent* **2015**, *49*, 63-72, doi:10.17096/jiufd.38691.

57. Manji, F.; Fejerskov, O.; Nagelkerke, N.J.; Baelum, V. A random effects model for some epidemiological features of dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol* **1991**, *19*, 324-328, doi:10.1111/j.1600-0528.1991.tb00180.x.
58. Milosevic, A. Acid erosion: an increasingly relevant dental problem. Risk factors, management and restoration. *Prim Dent J* **2017**, *6*, 37-45.
59. Thylstrup, A.; Bruun, C.; Holmen, L. *In vivo* caries models—mechanisms for caries initiation and arrestment. *Adv Dent Res* **1994**, *8*, 144-157, doi:10.1177/08959374940080020401.
60. Silverstone, L.M. The surface zone in caries and in caries-like lesions produced *in vitro*. *Br Dent J* **1968**, *125*, 145-157.
61. Robinson, C.; Shore, R.C.; Brookes, S.J.; Strafford, S.; Wood, S.R.; Kirkham, J. The chemistry of enamel caries. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **2000**, *11*, 481-495, doi:10.1177/10454411000110040601.
62. Darling, A.I. The selective attack of caries on the dental enamel. *Ann R Coll Surg Engl* **1961**, *29*, 354-369.
63. Meyer-Lueckel, H.; Paris, S.; Kielbassa, A.M. Surface layer erosion of natural caries lesions with phosphoric and hydrochloric acid gels in preparation for resin infiltration. *Caries Res* **2007**, *41*, 223-230, doi:10.1159/000099323.
64. Featherstone, J.D. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc* **2000**, *131*, 887-899, doi:10.14219/jada.archive.2000.0307.
65. Featherstone, J.D. Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J* **2008**, *53*, 286-291, doi:10.1111/j.1834-7819.2008.00064.x.
66. Holmen, L.; Thylstrup, A.; Artun, J. Surface changes during the arrest of active enamel carious lesions *in vivo*. A scanning electron microscope study. *Acta Odontol Scand* **1987**, *45*, 383-390, doi:10.3109/00016358709096362.
67. Paris, S.; Meyer-Lueckel, H.; Cölfen, H.; Kielbassa, A.M. Resin infiltration of artificial enamel caries lesions with experimental light curing resins. *Dent Mater J* **2007**, *26*, 582-588, doi:10.4012/dmj.26.582.
68. Shivanna, V.; Shivakumar, B. Novel treatment of white spot lesions: a report of two cases. *J Conserv Dent* **2011**, *14*, 423-426, doi:10.4103/0972-0707.87217.
69. Nyvad, B.; Machiulskiene, V.; Baelum, V. Reliability of a new caries diagnostic system differentiating between active and inactive caries lesions. *Caries Res* **1999**, *33*, 252-260, doi:10.1159/000016526.
70. Cochrane, N.J.; Anderson, P.; Davis, G.R.; Adams, G.G.; Stacey, M.A.; Reynolds, E.C. An X-ray microtomographic study of natural white-spot enamel lesions. *J Dent Res* **2012**, *91*, 185-191, doi:10.1177/0022034511429570.
71. Arends, J.; Christoffersen, J. The nature of early caries lesions in enamel. *J Dent Res* **1986**, *65*, 2-11, doi:10.1177/00220345860650010201.
72. Kanthathas, K.; Willmot, D.; Benson, P. Differentiation of developmental and post-orthodontic white lesions using image analysis. *Eur J Orthod* **2005**, *27*, 167-172, doi:10.1093/ejo/cjh084.
73. Paris, S.; Meyer-Lueckel, H. Inhibition of caries progression by resin infiltration *in situ*. *Caries Res* **2010**, *44*, 47-54, doi:10.1159/000275917.
74. Humphrey, S.P.; Williamson, R.T. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* **2001**, *85*, 162-169, doi:10.1067/mpr.2001.113778.
75. Chicharro, J.L.; Lucía, A.; Pérez, M.; Vaquero, A.F.; Ureña, R. Saliva composition and exercise. *Sports Med* **1998**, *26*, 17-27, doi:10.2165/00007256-199826010-00002.
76. Nunes, L.A.; Mussavira, S.; Bindhu, O.S. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochem Med* **2015**, *25*, 177-192, doi:10.11613/bm.2015.018.

77. Collins, L.M.; Dawes, C. The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. *J Dent Res* **1987**, *66*, 1300-1302, doi:10.1177/00220345870660080201.
78. Dawes, C. Physiological factors Affecting salivary flow rate, oral sugar clearance, and the sensation of dry mouth in man. *J Dent Res* **1987**, *66 Spec No*, 648-653, doi:10.1177/00220345870660s107.
79. Dreizen, S.; Brown, L.R.; Daly, T.E.; Drane, J.B. Prevention of xerostomia-related dental caries in irradiated cancer patients. *J Dent Res* **1977**, *56*, 99-104, doi:10.1177/00220345770560022101.
80. Edgar, W.M. Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. *Br Dent J* **1990**, *169*, 96-98, doi:10.1038/sj.bdj.4807284.
81. Zabokova Bilbilova, E.; Sotirovska Ivkovska, A.; Georgiev, Z.; Stefanovska, E. Evaluation of buffer capacity of saliva in caries-free and caries-active children. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)* **2013**, *34*, 151-157.
82. Hay, D.I.; Schluckebier, S.K.; Moreno, E.C. Equilibrium dialysis and ultrafiltration studies of calcium and phosphate binding by human salivary proteins. Implications for salivary supersaturation with respect to calcium phosphate salts. *Calcif Tissue Int* **1982**, *34*, 531-538, doi:10.1007/bf02411299.
83. Stephan, R.M. Intra-oral hydrogen-ion concentrations associated with dental caries activity. *J Dent Res* **1944**, *23*, 257-266, doi:10.1177/00220345440230040401.
84. Arifa, M.K.; Ephraim, R.; Rajamani, T. Recent Advances in Dental Hard Tissue Remineralization: A Review of Literature. *Int J Clin Pediatr Dent* **2019**, *12*, 139-144, doi:10.5005/jp-journals-10005-1603.
85. Meyer, F.; Amaechi, B.T.; Fabritius, H.O.; Enax, J. Overview of calcium phosphates used in biomimetic oral care. *Open Dent J* **2018**, *12*, 406-423, doi:10.2174/1874210601812010406.
86. Birkeland, J.M.; Ibrahim, Y.E.; Ghandour, I.A.; Haugejorden, O. Severity of dental caries among 12-year-old sudanese children with different fluoride exposure. *Clin Oral Investig* **2005**, *9*, 46-51, doi:10.1007/s00784-004-0298-8.
87. Bjarnason, S.; Grondahl, H.G. Relationships between free smooth surface and proximal caries in the young permanent dentition. *Community Dent Oral Epidemiol* **1996**, *24*, 7-10, doi:10.1111/j.1600-0528.1996.tb00803.x.
88. Tenovuo, J. Antimicrobial function of human saliva—how important is it for oral health? *Acta Odontol Scand* **1998**, *56*, 250-256, doi:10.1080/000163598428400.
89. Mohammed, N.R. Effects of zinc and fluoride on *in vitro* enamel demineralisation conditions relevant to dental caries. **2014**.
90. Enax, J.; Epple, M. Synthetic hydroxyapatite as a biomimetic oral care agent. *Oral Health Prev Dent* **2018**, *16*, 7-19, doi:10.3290/j.ohpd.a39690.
91. Deutsche Gesellschaft für Kinderzahnheilkunde (DGKiZ), D.G.f.r.Z.D., Deutsche Gesellschaft für Präventivzahnmedizin (DGPZM), Bundesverband der Zahnärztinnen und Zahnärzte des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (BZÖG) und der Bundeszahnärztekammer (BZÄK). Empfehlung zur Fluoridkonzentration in Kinderzahnpasten. Stand 27.9.2018.
92. Ripa, L.W. A critique of topical fluoride methods (dentifrices, mouthrinses, operator-, and self-applied gels) in an era of decreased caries and increased fluorosis prevalence. *J Public Health Dent* **1991**, *51*, 23-41, doi:10.1111/j.1752-7325.1991.tb02172.x.
93. Ten Cate, J.M. *In vitro* studies on the effects of fluoride on de- and remineralization. *J Dent Res* **1990**, *69 Spec No*, 614-619; discussion 634-616, doi:10.1177/00220345900690s120.
94. Weatherell, J.A.; Deutsch, D.; Robinson, C.; Hallsworth, A.S. Assimilation of fluoride by enamel throughout the life of the tooth. *Caries Res* **1977**, *11 Suppl 1*, 85-115, doi:10.1159/000260297.

95. EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, N.a.A. Scientific opinion on dietary reference values for fluoride. . *EFSA Journal* 2013 **2013**, 46 pp, doi:10.2903/j.efsa.2013.3332.
96. Walsh, T.; Worthington, H.V.; Glenny, A.M.; Marinho, V.C.; Jeroncic, A. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries. *Cochrane Database Syst Rev* **2019**, 3, Cd007868, doi:10.1002/14651858.CD007868.pub3.
97. Fernández-Ferrer, L.; Vicente-Ruíz, M.; García-Sanz, V.; Montiel-Company, J.M.; Paredes-Gallardo, V.; Almerich-Silla, J.M.; Bellot-Arcís, C. Enamel remineralization therapies for treating postorthodontic white-spot lesions: a systematic review. *J Am Dent Assoc* **2018**, *149*, 778-786.e772, doi:10.1016/j.adaj.2018.05.010.
98. Bronckers, A.L.; Lyaruu, D.M.; DenBesten, P.K. The impact of fluoride on ameloblasts and the mechanisms of enamel fluorosis. *J Dent Res* **2009**, *88*, 877-893, doi:10.1177/0022034509343280.
99. DenBesten, P.; Li, W. Chronic fluoride toxicity: dental fluorosis. *Monogr Oral Sci* **2011**, *22*, 81-96, doi:10.1159/000327028.
100. Buzalaf, M.A.R.; Whitford, G.M. Fluoride metabolism. *Monogr Oral Sci* **2011**, *22*, 20-36, doi:10.1159/000325107.
101. Su, N.; Marek, C.L.; Ching, V.; Grushka, M. Caries prevention for patients with dry mouth. *J Can Dent Assoc* **2011**, *77*, b85, doi:10.1007/s00784-017-2096-0.
102. Sreebny, L.M.; Schwartz, S.S. A reference guide to drugs and dry mouth-2nd edition. *Gerodontology* **1997**, *14*, 33-47, doi:10.1111/j.1741-2358.1997.00033.x.
103. Somasundaram, P.; Vimala, N.; Mandke, L.G. Protective potential of casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate containing paste on enamel surfaces. *J Conserv Dent* **2013**, *16*, 152-156, doi:10.4103/0972-0707.108199.
104. Vieira, A.E.M.; Danelon, M.; Camara, D.M.D.; Rosselli, E.R.; Stock, S.R.; Cannon, M.L.; Xiao, X.; De Carlo, F.; Delbem, A.C.B. *In vitro* effect of amorphous calcium phosphate paste applied for extended periods of time on enamel remineralization. *J Appl Oral Sci* **2017**, *25*, 596-603, doi:10.1590/1678-7757-2016-0513.
105. Llena, C.; Forner, L.; Baca, P. Anticariogenicity of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: a review of the literature. *J Contemp Dent Pract* **2009**, *10*, 1-9, PMID: 19430620.
106. Mehta, R.; Nandlal, B.; Prashanth, S. Comparative evaluation of remineralization potential of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate fluoride on artificial enamel white spot lesion: an *in vitro* light fluorescence study. *Indian J Dent Res* **2013**, *24*, 681-689, doi:10.4103/0970-9290.127610.
107. Kugel, G.; Arsenault, P.; Papas, A. Treatment modalities for caries management, including a new resin infiltration system. *Compend Contin Educ Dent* **2009**, *30 Spec No 3*, 1-10; quiz 11-12, PMID: 19894293.
108. Kielbassa, A.M.; Muller, J.; Gernhardt, C.R. Closing the gap between oral hygiene and minimally invasive dentistry: a review on the resin infiltration technique of incipient (proximal) enamel lesions. *Quintessence Int* **2009**, *40*, 663-681, PMID: 19639091.
109. Robinson, C.; Hallsworth, A.S.; Weatherell, J.A.; Künzel, W. Arrest and control of carious lesions: a study based on preliminary experiments with resorcinol-formaldehyde resin. *J Dent Res* **1976**, *55*, 812-818, doi:10.1177/00220345760550051601.
110. Senestraro, S.V.; Crowe, J.J.; Wang, M.; Vo, A.; Huang, G.; Ferracane, J.; Covell, D.A., Jr. Minimally invasive resin infiltration of arrested white-spot lesions: a randomized clinical trial. *J Am Dent Assoc* **2013**, *144*, 997-1005, doi:10.14219/jada.archive.2013.0225.

111. Doméjean, S.; Ducamp, R.; Léger, S.; Holmgren, C. Resin infiltration of non-cavitated caries lesions: A systematic review. *Med Princ Pract* **2015**, *24*, 216-221, doi:10.1159/000371709.
112. Ammari, M.M.; Soviero, V.M.; da Silva Fidalgo, T.K.; Lenzi, M.; Ferreira, D.M.; Mattos, C.T.; de Souza, I.P.; Maia, L.C. Is non-cavitated proximal lesion sealing an effective method for caries control in primary and permanent teeth? A systematic review and meta-analysis. *J Dent* **2014**, *42*, 1217-1227, doi:10.1016/j.jdent.2014.07.015.
113. Noegel, A.; Gotschlich, E.C. Isolation of a high molecular weight polyphosphate from *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med* **1983**, *157*, 2049-2060, doi:10.1084/jem.157.6.2049.
114. Kumble, K.D.; Kornberg, A. Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 5818-5822, doi:10.1074/jbc.270.11.5818.
115. Müller, F.; Mutch, N.J.; Schenk, W.A.; Smith, S.A.; Esterl, L.; Spronk, H.M.; Schmidbauer, S.; Gahl, W.A.; Morrissey, J.H.; Renné, T. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators *in vivo*. *Cell* **2009**, *139*, 1143-1156, doi:10.1016/j.cell.2009.11.001.
116. Müller, W.E.G.; Tolba, E.; Schröder, H.C.; Wang, X. Polyphosphate: a morphogenetically active implant material serving as metabolic fuel for bone regeneration. *Macromol Biosci* **2015**, *15*, 1182-1197, doi:10.1002/mabi.201500100.
117. Müller, W.E.G.; Neufurth, M.; Tolba, E.; Wang, S.; Geurtsen, W.; Feng, Q.; Schröder, H.C.; Wang, X. A biomimetic approach to ameliorate dental hypersensitivity by amorphous polyphosphate microparticles. *Dent Mater* **2016**, *32*, 775-783, doi:10.1016/j.dental.2016.03.027.
118. Klimek, J. Moderne Wirkstoffe zur Kariesprophylaxe. *ZWP Online* **25th December 2012**.
119. Zhang, X.; Li, Y.; Sun, X.; Kishen, A.; Deng, X.; Yang, X.; Wang, H.; Cong, C.; Wang, Y.; Wu, M. Biomimetic remineralization of demineralized enamel with nano-complexes of phosphorylated chitosan and amorphous calcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med* **2014**, *25*, 2619-2628, doi:10.1007/s10856-014-5285-2.
120. Pratten, J.; Wills, K.; Barnett, P.; Wilson, M. *In vitro* studies of the effect of antiseptic-containing mouthwashes on the formation and viability of *Streptococcus sanguis* biofilms. *J Appl Microbiol* **1998**, *84*, 1149-1155, doi:10.1046/j.1365-2672.1998.00462.x.
121. Grunenwald, A.; Keyser, C.; Sautereau, A.M.; Crubézy, E.; Ludes, B.; Drouet, C. Revisiting carbonate quantification in apatite (Bio)minerals: a validated FTIR methodology. *J of Arch Sci* **2014**, *49*, 134-141, doi:10.1016/j.jas.2014.05.004.
122. Weiner, S.; Bar-Yosef, O. States of preservation of bones from prehistoric sites in the near east: a survey. *J of Archaeol Sci* **1990**, *17*, 187-196, doi:10.1016/0305-4403(90)90058-D.
123. Reyes-Gasga, J.; Martínez-Piñeiro, E.L.; Rodríguez-Álvarez, G.; Tiznado-Orozco, G.E.; García-García, R.; Brès, E.F. XRD and FTIR crystallinity indices in sound human tooth enamel and synthetic hydroxyapatite. *Mater Sci Eng : C* **2013**, *33*, 4568-4574, doi:10.1016/j.msec.2013.07.014.
124. Lewis, G.; Nyman, J.S. The use of nanoindentation for characterizing the properties of mineralized hard tissues: state-of-the art review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2008**, *87*, 286-301, doi:10.1002/jbm.b.31092.
125. Oliver, W.C.; Pharr, G.M. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J Mat Res* **1992**, *7*, 1564-1583, doi:10.1557/JMR.1992.1564.

126. Haikel, Y.; Frank, R.M.; Voegel, J.C. Scanning electron microscopy of the human enamel surface layer of incipient carious lesions. *Caries Res* **1983**, *17*, 1-13, doi:10.1159/000260643.
127. Lopes, C.d.C.A.; Limirio, P.H.J.O.; Novais, V.R.; Dechichi, P. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) application chemical characterization of enamel, dentin and bone. *Applied Spectroscopy Reviews* **2018**, *53*, 747-769, doi:10.1080/05704928.2018.1431923.
128. Li, X.; Pan, D.; Lin, S.Y.; Zhuang, Z.; Lin, Z. Facile in vitro hydroxyapatite remineralization of human enamel with remarkable hardness. 2013.
129. Shemesh, A. Crystallinity and diagenesis of sedimentary apatites. *Geochim et Cosmochim Acta* **1990**, *54*, 2433-2438, doi:10.1016/0016-7037(90)90230-1.
130. He, L.H.; Fujisawa, N.; Swain, M.V. Elastic modulus and stress-strain response of human enamel by nano-indentation. *Biomaterials* **2006**, *27*, 4388-4398, doi:10.1016/j.biomaterials.2006.03.045.
131. Cuy, J.L.; Mann, A.B.; Livi, K.J.; Teaford, M.F.; Weihs, T.P. Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. *Arch Oral Biol* **2002**, *47*, 281-291, doi:10.1016/s0003-9969(02)00006-7.
132. Al-Obaidi, R.; Salehi, H.; Desoutter, A.; Bonnet, L.; Etienne, P.; Terrer, E.; Jacquot, B.; Levallois, B.; Tassery, H.; Cuisinier, F.J.G. Chemical & nano-mechanical study of artificial human enamel subsurface lesions. *Sci Rep* **2018**, *8*, 4047, doi:10.1038/s41598-018-22459-7.
133. Brar, G.S.; Arora, A.S.; Khinda, V.I.S.; Kallar, S.; Arora, K. Topographic assessment of human enamel surface treated with different topical sodium fluoride agents: Scanning electron microscope consideration. *Indian J Dent Res* **2017**, *28*, 617-622, doi:10.4103/ijdr.IJDR\_675\_16.
134. LeGeros, R.Z. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci* **1991**, *15*, 1-201, doi 10.1159/isbn.978-3-318-04021-0.
135. El Feki, H.; Savariault, J.M.; Ben Salah, A. Structure refinements by the rietveld method of partially substituted hydroxyapatite:  $\text{Ca}_9\text{Na}_{0.5}(\text{PO}_4)_4.5(\text{CO}_3)_{1.5}(\text{OH})_2$ . *J of Alloys Compd* **1999**, *287*, 114-120, doi:10.1016/S0925-8388(99)00070-5.
136. Hallsworth, A.S.; Weatherell, J.A.; Robinson, C. Loss of carbonate during the first stages of enamel caries. *Caries Res* **1973**, *7*, 345-348, doi:10.1159/000259857.
137. Leventouri, T.; Chakoumakos, B.C.; Papanearchou, N.; Perdikatsis, V. Comparison of crystal structure parameters of natural and synthetic apatites from neutron powder diffraction. *J Mat Res* **2001**, *16*, 2600-2606, doi:10.1557/JMR.2001.0357.
138. Sa, Y.; Guo, Y.; Feng, X.; Wang, M.; Li, P.; Gao, Y.; Yang, X.; Jiang, T. Are different crystallinity-index-calculating methods of hydroxyapatite efficient and consistent? *New J Chem* **2017**, *41*, 5723-5731, doi:10.1039/C7NJ00803A.
139. Pleshko, N.; Boskey, A.; Mendelsohn, R. Novel infrared spectroscopic method for the determination of crystallinity of hydroxyapatite minerals. *Biophys J* **1991**, *60*, 786-793, doi:10.1016/S0006-3495(91)82113-0.
140. Seregin, P.; Kashkarov, V.; Lukin, A.; Ippolitov, Y.; Julian, R.; Doyle, S. Local study of fissure caries by fourier transform infrared microscopy and x-ray diffraction using synchrotron radiation. *J of Synchrotron Radiat* **2013**, *20*, 705-710, doi:10.1107/S0909049513019444.
141. Paschalis, E.P.; DiCarlo, E.; Betts, F.; Sherman, P.; Mendelsohn, R.; Boskey, A.L. FTIR microspectroscopic analysis of human osteonal bone. *Calcif Tissue Int* **1996**, *59*, 480-487, doi:10.1007/BF00369214.
142. Ten Cate, J.M. The effect of fluoride on enamel de- and remineralization. In *Hard Tissue Mineralization and Demineralization*; Springer Japan: Tokyo, 1992; pp. 115-126, doi: 10.1007/978-4-431-68183-0\_8.

143. Xu, C.; Reed, R.; Gorski, J.P.; Wang, Y.; Walker, M.P. The distribution of carbonate in enamel and its correlation with structure and mechanical properties. *J Mater Sci* **2012**, *47*, 8035-8043, doi:10.1007/s10853-012-6693-7.
144. Zhang, Y.-R.; Du, W.; Zhou, X.-D.; Yu, H.-Y. Review of research on the mechanical properties of the human tooth. *Int J of Oral Sci* **2014**, *6*, 61-69, doi:10.1038/ijos.2014.21.
145. Dai, Z.; Liu, M.; Ma, Y.; Cao, L.; Xu, H.; Zhang, K.Y.; Bai, Y. Effects of fluoride and calcium phosphate materials on remineralization of mild and severe white spot lesions. *BioMed Res Int* **2019**, *2019*, 1-13, doi:10.1155/2019/1271523.
146. Hausen, H.; Seppa, L.; Poutanen, R.; Niinimaa, A.; Lahti, S.; Kärkkäinen, S.; Pietilä, I. Noninvasive control of dental caries in children with active initial lesions. A randomized clinical trial. *Caries Res* **2007**, *41*, 384-391, doi:10.1159/000104797.
147. Arnadóttir, I.B.; Ketley, C.E.; Van Loveren, C.; Seppä, L.; Cochran, J.A.; Polido, M.; Athanossouli, T.; Holbrook, W.P.; O'Mullane, D.M. A european perspective on fluoride use in seven countries. *Community Dent Oral Epidemiol* **2004**, *32 Suppl 1*, 69-73, doi:10.1111/j.1600-0528.2004.00142.x.
148. Haugejorden, O.; Birkeland, J.M. Analysis of the ups and downs of caries experience among Norwegian children aged five years between 1997 and 2003. *Acta Odontol Scand* **2005**, *63*, 115-122, doi:10.1080/00016350510019784.
149. Larsen, M.J.; Richards, A. The influence of saliva on the formation of calcium fluoride-like material on human dental enamel. *Caries Res* **2001**, *35*, 57-60, doi:10.1159/000047432.
150. Mutschler, E. Arzneimittelwirkungen. 8. Aufl., . Stuttgart, W.V.m., Ed.; 2001.
151. Ahn, S.J.; Lee, S.J.; Kook, J.K.; Lim, B.S. Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. *Dent Mater* **2009**, *25*, 206-213, doi:10.1016/j.dental.2008.06.002.
152. Degrazia, F.W.; Leitune, V.C.; Garcia, I.M.; Arthur, R.A.; Samuel, S.M.; Collares, F.M. Effect of silver nanoparticles on the physicochemical and antimicrobial properties of an orthodontic adhesive. *J Appl Oral Sci* **2016**, *24*, 404-410, doi:10.1590/1678-775720160154.
153. Wang, X.; Wang, B.; Wang, Y. Antibacterial orthodontic cement to combat biofilm and white spot lesions. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* **2015**, *148*, 974-981, doi:10.1016/j.ajodo.2015.06.017.
154. Altmann, A.S.; Collares, F.M.; Leitune, V.C.; Arthur, R.A.; Takimi, A.S.; Samuel, S.M. *In vitro* antibacterial and remineralizing effect of adhesive containing triazine and niobium pentoxide phosphate inverted glass. *Clin Oral Investig* **2017**, *21*, 93-103, doi:10.1007/s00784-016-1754-y.
155. Degrazia, F.W.; Altmann, A.S.P.; Ferreira, C.J.; Arthur, R.A.; Leitune, V.C.B.; Samuel, S.M.W.; Collares, F.M. Evaluation of an antibacterial orthodontic adhesive incorporated with niobium-based bioglass: an *in situ* study. *Braz Oral Res* **2019**, *33*, e010, doi:10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0010.
156. Liu, Y.; Zhang, L.; Niu, L.N.; Yu, T.; Xu, H.H.K.; Weir, M.D.; Oates, T.W.; Tay, F.R.; Chen, J.H. Antibacterial and remineralizing orthodontic adhesive containing quaternary ammonium resin monomer and amorphous calcium phosphate nanoparticles. *J Dent* **2018**, *72*, 53-63, doi:10.1016/j.jdent.2018.03.004.
157. Jahanbin, A.; Farzanegan, F.; Atai, M.; Jamehdar, S.A.; Golfakhrabadi, P.; Shafae, H. A comparative assessment of enamel mineral content and *streptococcus mutans* population between conventional composites and composites containing cano amorphous calcium phosphate in fixed orthodontic patients: a split-mouth randomized clinical trial. *Eur J Orthod* **2017**, *39*, 43-51, doi:10.1093/ejo/cjw009.

## **Danksagung**

Ich danke - und - für die Betreuung bei der Umsetzung der Experimente und Analyse der Daten. Darüber hinaus danke ich dem gesamten Arbeitskreis von - für die wissenschaftlich inspirierende Arbeit, sowie für die angenehme Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft.

Zudem möchte ich mich bei - und - für die Unterstützung bedanken.

Mein allergrößter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinem Mann -, meiner Oma - und meinem Opa -, meinen Eltern - und -, meinen Schwiegereltern - und - und meinen besten Freunden.