

Aus der Abteilung für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin  
des CharitéCentrums 3 für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Randomisierte, doppelblinde In-situ-Studie zur Wirkung von  
zwei Speichelersatzmitteln auf gesunden Schmelz  
und künstliche Schmelzläsionen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae dentariae

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Olivia Wolf

aus Berlin

Datum der Promotion: 27.02.2015

Meinen lieben Eltern gewidmet

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Abstrakt</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>4</b>
<b>4</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	<b>5</b>
4.1	Zahnschmelz .....	5
4.1.1	Aufbau .....	5
4.1.2	Bovine Zahnhartsubstanzen .....	6
4.2	Kariesentstehung.....	7
4.2.1	Die Wirkung des pH-Wertes auf die Schmelzlöslichkeit .....	10
4.3	Fluoridwirkung auf den Zahnschmelz .....	11
4.4	Fluoridgehalt .....	13
4.5	Remineralisation .....	14
4.5.1	Kalziumphosphatverbindungen im Speichel.....	15
4.5.2	Sättigung einer Lösung.....	16
4.5.3	Einfluss des pH-Wertes auf die Sättigung einer Lösung .....	17
4.6	Bisherige Präventionsansätze und Therapiemöglichkeiten .....	18
4.7	Speichel .....	20
4.7.1	Alteration durch Radiatio .....	23
4.7.2	Strahlenkaries.....	25
4.8	Speichelersatzmittel.....	25
<b>5</b>	<b>Ziel der Arbeit und Arbeitshypothese</b> .....	<b>28</b>
<b>6</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
6.1	Ethikantrag und Fallzahlberechnung .....	29
6.2	Probanden .....	29
6.3	Studiendesign .....	31

---

6.4	Einschluss- und Ausschlusskriterien.....	32
6.5	Intervention .....	33
6.6	Studienmedikation .....	33
6.7	Gewinnung der Schmelzproben .....	36
6.8	Demineralisation und Sterilisation der Schmelzproben .....	38
6.9	Probeninsertion in den herausnehmbaren Zahnersatz.....	40
6.10	In-situ-Exposition .....	40
6.11	Testfeldgestaltung.....	41
6.12	Herstellung von Dünnschliffen .....	42
6.13	Mikroradiografische Auswertung (TMR) .....	44
6.14	Statistische Auswertung.....	47
<b>7</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
7.1.1	Hauptfragestellung.....	48
7.1.2	Nebenfragestellungen.....	51
7.2	Ergebnisse der Messungen des Speichersatzmittelverbrauches und der Speichelfließraten.....	56
<b>8</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>60</b>
8.1	Diskussion von Material und Methode.....	60
8.2	Diskussion der Ergebnisse .....	66
<b>9</b>	<b>Schlussfolgerungen.....</b>	<b>77</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>78</b>
<b>11</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>94</b>
11.1	Abkürzungsverzeichnis.....	94
<b>11.2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>95</b>
<b>11.3</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>96</b>
11.4	Liste der verwendeten Materialien.....	97
<b>11.5</b>	<b>Geräteliste .....</b>	<b>98</b>

---

<b>11.6</b>	<b>Bearbeitungsprogramme .....</b>	<b>99</b>
11.7	Votum der Ethikkommission .....	100
11.8	Einwilligungserklärung .....	103
11.9	Patienten-Information .....	105
11.10	Untersuchungsbogen (CRF).....	111
11.11	Eidesstattliche Versicherung.....	115
11.12	Lebenslauf .....	116
<b>11.13</b>	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>117</b>
11.14	Danksagung.....	118

## 1 Abstrakt

**Einleitung:** Die Hyposalivation ist eine chronische Nebenwirkung der Radiatio im Kopf-Hals-Bereich und führt zu einer foudroyanten Kariesinzidenz bei betroffenen Patienten. Die Hyposalivation wird häufig mit Hilfe von Speichelersatzmitteln therapiert, von denen Präparate wie das weit verbreitete Glandosane<sup>®</sup> in der Vergangenheit demineralisierende Eigenschaften auf die Zahnhartsubstanzen zeigten. *In vitro* ist es gelungen durch Modifikation des freiverkäuflichen Speichelersatzmittels Saliva natura, neben einem schützenden Effekt auf den Zahnschmelz, einen remineralisierenden Effekt bei bereits künstlich geschaffenen Schmelzläsionen zu erzielen.

Diese demineralisationsverhindernden und kurativen Eigenschaften des modifizierten Speichelersatzmittels Saliva natura sollten in der vorliegenden Studie *in situ* im Vergleich zu Glandosane<sup>®</sup> überprüft werden.

**Methodik:** Das Speichelersatzmittel Saliva natura wurde durch Zugabe von Kalziumphosphatverbindungen mit einer Sättigung von 1,9 für Oktakalziumphosphat (OKP) und 1,3 für Dikalziumphosphat (DKPD) und durch Zugabe von Fluorid (0,1 mM) modifiziert. Aus Rinderfrontzähnen wurden Schmelzproben präpariert. Nach der Sterilisation und Kontrollfeldgestaltung, wurden, neben gesunden Schmelzproben, bei der Hälfte der Proben *in vitro* künstliche Schmelzläsionen hergestellt. Je eine gesunde und eine Probe mit künstlichen Schmelzläsionen wurden in einem Versuchszeitraum von 7 Wochen (cross-over Design) in die Prothesen der Probanden (n = 15) eingebracht. Nach jeder Versuchsphase unter dem jeweiligen Speichelersatzmittel, wurden Dünnschliffe von 100 µm aus den Proben angefertigt. Der Effekt auf die Schmelzproben wurde durch die Untersuchungsparameter Mineralverlust (Vol% × µm) und Läsionstiefe (µm) mit Hilfe der transversalen Mikroradiografie (TMR) ausgewertet. Der Speichelersatzmittelverbrauch wurde erfasst. Die statistische Analyse erfolgte mit SPSS unter Anwendung des Wilcoxon-Tests. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgesetzt, die Ergebnisse der Hauptfragestellung der Bonferroni-Korrektur unterzogen. **Ergebnisse:** Nach siebenwöchiger Versuchsdauer zeigte sich an gesunden bovinen Schmelzoberflächen unter modifiziertem Saliva natura eine signifikante Demineralisation: eine Vergrößerung des Mineralverlusts (p = 0,012; Wilcoxon-Test) und der Läsionstiefe (p = 0,047; Wilcoxon-Test). Glandosane<sup>®</sup> verhielt sich über den Versuchszeitraum von 7 Wochen neutral gegenüber den gesunden

Schmelzoberflächen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Mineralverlust ( $p = 0,570$ ) und der Läsionstiefe ( $p = 0,910$ ). An den Proben mit künstlichen Schmelzläsionen zeigten sich nach siebenwöchiger Versuchsdauer unter modifiziertem Saliva natura (Mineralverlust  $p = 0,955$ ; Läsionstiefe  $p = 0,307$ ; Wilcoxon) und Glandosane<sup>®</sup> (Mineralverlust  $p = 0,955$ ; Läsionstiefe  $p = 0,670$ , Wilcoxon) keine signifikanten Unterschiede.

**Schlussfolgerung:** Die kurativen Effekte von modifiziertem Saliva natura konnten *in situ* nicht bestätigt werden. Eine Demineralisation gesunder Schmelzproben wurde durch modifiziertes Saliva natura nicht verhindert. Glandosane<sup>®</sup> zeigte ein neutrales Verhalten auf gesunde Schmelzproben. Ein Effekt auf künstliche Schmelzläsionen konnte für keines der beiden Speichellersatzmittel gefunden werden.

## 2 Abstract

**Statement of problem:** Hyposalivation is a chronic side effect of head and neck irradiation and often results in severe caries incidence. Hyposalivation is frequently treated with saliva substitutes. Some of the common prescribed saliva substitutes, such as the widely spread Glandosane<sup>®</sup>, showed demineralizing properties on enamel in the past. *In vitro*, it was possible to show a protective effect on sound bovine enamel as well as a curative effect on artificial enamel lesions by modification of the free available saliva substitute Saliva natura. This inhibition of demineralisation and curative effects of modified Saliva natura in comparison to Glandosane<sup>®</sup> is examined by this in situ investigation.

**Method:** Saliva natura has been modified by addition of fluoride (0,1 mM) and calcium phosphate up to a saturation of octacalcium phosphate (OCP) = 1,9 and dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) = 1,3, respectively. Bovine enamel specimens have been prepared. After sterilization and defining of specimens control areas, artificial enamel lesions has been prepared in half of the specimens. One specimen of each group (sound and with artificial enamel lesion) have been integrated into patients (n = 15) dentures for an examination period of 7 weeks (cross-over-design) under exposure to the particular saliva substitute. After both test periods differences in mineral loss (Vol% × µm) and lesion depth (µm), before and after exposure, have been evaluated based on microradiographs (TMR). The saliva substitute consumption has been measured.

**Results:** After the 7-week-exposure to modified Saliva natura sound bovine enamel specimens have shown a significant demineralization: an increase of mineral loss (p = 0,012; Wilcoxon-Test) and lesion depth (p = 0,047; Wilcoxon). Glandosane<sup>®</sup> has been neutral towards sound enamel during 7 weeks exposure time: no mineral loss (p = 0,570; Wilcoxon) and lesion depth (p = 0,910; Wilcoxon) have occurred. In specimens with artificial enamel lesions exposed to modified Saliva natura (mineral loss p = 0,955; lesion depth p = 0,307; Wilcoxon) and Glandosane<sup>®</sup> (mineral loss p = 0,955; lesion depth p = 0,670) significant difference has been observed.

**Conclusions:** No curative effects of modified Saliva natura in situ could be confirmed. A demineralizing effect on sound enamel could not be prevented by modified Saliva natura. Glandosane<sup>®</sup> has shown neutral properties towards sound enamel. Neither modified Saliva natura nor Glandosane<sup>®</sup> have an effect on artificial enamel lesion.

### 3 Einleitung

Hyposalivation kann durch verschiedene Syndrome, Diabetes, Medikamente, Infektionen, Funktionseinschränkungen oder durch tumortherapeutische Radiatio im Kopf-Hals-Bereich verursacht werden. Xerostomie, die subjektiv wahrgenommene Trockenheit der oralen Schleimhautoberflächen, und Hyposalivation sind nicht zwangsläufig kongruent [Taylor und Miller 1999]. Das betroffene Patientenkollektiv weist oftmals einen hohen Leidensdruck durch verschlechterte orale Funktionen auf. Betroffene beschreiben häufig eine Verminderung der Lebensqualität, nicht zuletzt durch eine erschwerte Teilnahme am sozialen Leben. Auswirkungen der Hyposalivation umfassen ein erhöhtes Schleimhautinfektionsrisiko und eine gesteigerte Vulnerabilität der Schleimhautoberfläche gegenüber mechanischer Belastung, wie das Tragen von herausnehmbarem Zahnersatz. Das Aussetzen bzw. die Verminderung der protektiven Wirkung des Speichels verursacht 15 mal so schnell kariöse Läsionen wie bei gesunden Kontrollpersonen [Imfeld und Lutz 1995]. Die eklatante Kariesprogression im Verlauf der Bestrahlungstherapie führt oft zu frühzeitigem Zahnverlust.

Speichelersatzmittel (SEM) stellen eine Möglichkeit dar die oralen Symptome und den daraus resultierenden Leidensdruck zu lindern. Einige der auf dem Markt erhältlichen Produkte zeigten demineralisierende Eigenschaften auf die Zahnhartsubstanz *in vitro* [Meyer-Lueckel *et al.* 2002; Meyer-Lueckel *et al.* 2006]. Die demineralisierende Eigenschaft wird der Untersättigung im Hinblick auf Kalziumhydroxylapatit und der Abwesenheit von Fluorid zugeschrieben [Kielbassa *et al.* 2001]. Um Schmelzläsionen zu verhindern und bestehende Läsionen womöglich zu remineralisieren, wurde bereits *in vitro* das mineralisierende Potential eines SEMs auf Basis pflanzlicher Muzine (Saliva natura) modifiziert, durch eine optimierte Konzentration an Kalzium-, Phosphat- und Fluoridionen [Tschoppe *et al.* 2009].

In dieser randomisierten doppelblinden In-situ-Studie wurde sowohl der Effekt dieses modifizierten SEMs (Saliva natura) auf bovine Zahnprobenkörper mit gesunder Schmelzoberfläche als auch künstlich erzeugten kariösen Läsionen untersucht. Als Vergleichsmedikation diente ein Speichelersatzmittel (Glandosane®) mit geringerem Kalzium- und Phosphatzusatz und fehlender Fluoridzugabe auf der Basis von Carboxymethylcellulose (CMC).

## 4 Literaturübersicht

### 4.1 Zahnschmelz

#### 4.1.1 Aufbau

Die äußere Hartgewebsschicht der natürlichen Zahnkrone, der Zahnschmelz, besteht aus hierarchisch organisierten anorganischen Kristallen, vorrangig basierend auf Kalziumphosphatverbindungen, die 87 % seines Volumens und 95 % seines Gewichts ausmachen [Simmer und Hu 2001]. Das Ca/P-Verhältnis im Trockengewicht wurde mit 2,0 und im molaren Verhältnis mit 1,62 angegeben [Patel und Brown]. Zahnschmelz besitzt weniger als 1% organische Substanz [Simmer und Hu]. Seine Dichte beträgt  $3,0 \text{ g cm}^{-3}$  [Elliott 1997]. Der Schmelzkristall als niedrige Organisationsebene weist in rasterelektronenmikroskopischer Darstellung im Querschnitt eine elongierte hexagonale Form auf [Marshall und Lawless 1981]. Dicken- und Weitenmessungen ausgereifter menschlicher Schmelzkristalle weisen Werte von 263 Å und 683 Å auf [Kerebel *et al.* 1979]. Die vielfach vermutete Proteinhülle um jeden Kristall konnte nicht abschließend bewiesen werden [Dong und Warshawsky 1995]. Der interkristalline Abstand beträgt näherungsweise 20 nm [Diekwisch *et al.* 1995].

Die Schmelzkristalle sind als nächsthöhere Organisationsstruktur, den Nanofibrillen, mit einem Durchmesser von 30-40 nm orientiert und verlaufen gebündelt als dickere Fibrillen in Längsrichtung mit einem Durchmesser von 80-130 nm [Cui und Ge 2007]. Die Fasern und Fibrillen bündeln sich parallel zueinander in primär zwei unterschiedlichen Orientierungen, so dass sich ein Prisma/Interprismatischer Bereich mit typischen Mustern im Querschnitt bildet. Die nächsthöhere Organisationseinheit, die Faser, verläuft von der Dentin-Schmelzgrenze zur Schmelzoberfläche [Daculsi *et al.* 1984] und besitzt einen Durchmesser von 800 nm [Cui und Ge 2007].

Der Kristall ist die strukturelle Einheit der Apatite. Die generelle chemische Formel für die Gruppe der Apatite ist  $A_5(XO_4)_3Z$  in einem hexagonalen Kristallsystem, in dem A z.B.  $Ca^{2+}$ ; X:  $P^{5+}$  und Z:  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $OH^-$ ,  $CO_3^{2-}$  sein können. Hydroxylapatit (HA) gilt als Prototyp des Zahnminerals und besitzt die stöchiometrische Formel  $Ca_5(PO_4)_3OH$  [Driessens 1982]. Die auch als Basiszelle bezeichnete kleinste Raumeinheit im Schmelz umfasst

10 Kalziumionen, 6 Phosphationen und 2 Hydroxylionen. Schmelzkristalle bestehen in der Breite aus etwa 30-40 Basiseinheiten.

Die Struktur und Chemie der Apatite ermöglichen zahlreiche Substitutionen [Young 1974]. Das Hydroxylapatit des Schmelzes ist nicht stöchiometrisch [Newesly 1969]. Schmelz unterschreitet den theoretischen Hydroxylionenanteil von Hydroxylapatit um 20-40% [Holcomb und Young 1980]. Es existiert eine post eruptive Schmelzreifung [Woltgens *et al.* 1981]. Zahnschmelz weist Variationen hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung [Weatherell *et al.* 1974], Dichte [Weidmann *et al.* 1967], als auch im Kristallinitätsgrad [Sakae 1988] auf. Diese Unterschiede treten interindividuell, intraindividuell und selbst innerhalb desselben Zahnes auf. Letztere überschreiten die Variation unter den Zähnen derselben Dentition [Theuns *et al.* 1986]. Die Härte des Schmelzes wird von seinem Mineralgehalt beeinflusst [Kodaka *et al.* 1992].

## Fluorideinbau

Fluoridionen können anstelle der OH<sup>-</sup>-Gruppen isomorph ins Kristallgitter eingebaut werden. Es entsteht Fluorapatit oder Fluorhydroxylapatit. Der Begriff Fluorapatit wird für ein Apatit mit der Komposition  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F}_p, \text{Z}_{1-p})$  verwendet, wenn  $p \geq 0,5$  ist. Besitzt Apatit einen Fluoridanteil von weniger als 0,5 im Vergleich zu OH<sup>-</sup>, wird das Apatit als fluoridiertes Hydroxylapatit bezeichnet. Die Substitution von Hydroxylgruppen durch Fluorid findet innerhalb von Ionenkanälen statt [Sakae 2006]. Die Kantenlänge der Basiszelle verringert sich dabei auf 9,37 Å. Diese Volumenverringerng erhöht die chemische Stabilität des Apatitgitters. Durchschnittlich werden weniger als 10% der OH<sup>-</sup>-Gruppen in der äußersten Schmelzschicht durch Fluorid ersetzt [Moreno *et al.* 1977]. Dieser Anteil sinkt mit zunehmender Tiefe in den Schmelz deutlich.

### 4.1.2 Bovine Zahnhartsubstanzen

Bei Untersuchungen zwischen bovinen und humanen Zahnhartsubstanzen wurde die Kompatibilität des Schmelzes untereinander hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung als sehr gut eingestuft [Esser *et al.* 1998]. Bovinem Schmelz als Substrat in intraoralen Kariesmodellen wird eine gute Reproduzierbarkeit beigemessen, besonders wenn die äußere Oberfläche um ca. 200 µm abgeschliffen wurde [Manning

und Edgar 1992]. Die chemische Zusammensetzung bovinen Schmelzes variiert weniger als die des humanen und seine Fluoridkonzentration ist niedriger [Mellberg und Loertscher 1974]. Die radiographische Dichte bovinen Schmelzes ist höher als die von humanem [Tanaka *et al.* 2008]. Bovine Schmelzkristalle besitzen einen 1,5 mal größeren Durchmesser als humane Schmelzkristalle [Arends und Jongebloed 1978] und eine größere Porosität. Diese strukturellen Eigenheiten erklären die relativ schnelleren Demineralisationsraten von bovinem Schmelz im Vergleich zu humanem Schmelz [Featherstone und Mellberg 1981] und ein verschiedenes Fluoridaufnahmeverhalten der beiden Schmelzarten [Mellberg und Loertscher 1974].

## 4.2 Kariesentstehung

Die Grundlage der Kariesentstehung stellt bis heute die von Miller 1890 beschriebene chemoparasitäre Theorie dar [Ring 2002]. Danach basiert die Ätiologie der Karies auf der Eigenschaft bestimmter Keime im oralen Milieu, mittels Metabolisierung niedrigvergärbare Kohlenhydrate, organische Säuren zu bilden, welche zur Demineralisation von Zahnhartsubstanzen führen. Diese Theorie wurde während der 1950er und 60er Jahre durch maßgebende Studien von Orland *et al.* [Orland 1950; Orland *et al.* 1954], Keyes und Fitzgerald [Tanzer 1995] weiterentwickelt. Dabei wurde ein enger kausaler Zusammenhang zwischen spezifischen Mikroorganismen wie Streptokokken, Laktobazillen und Aktinomyzeten in der Plaque und dem Vorhandensein dentaler Karies hergestellt. Die Bedeutung der Säurebildung, seine Beziehung zu verschiedenen Zuckern und dessen variable Kontaktzeit zu den Zähnen, wurde durch die Stephens Kurve von 1940 propagiert. Untersuchungen wie die bekannte Vipeholm Studie [Krasse 2001] und die Hopewood Studie [Harris 1963] bewiesen den Zusammenhang zwischen Nahrungszuckern, Quantität, Qualität und Frequenz der Aufnahme auf die Inzidenz und Prävalenz der Karies. Die langjährig geltende unspezifische und spezifische Plaquehypothese [Loesche 1979] wurden 1991 durch die ökologische Plaquehypothese abgelöst [Marsh 1994]. Hinreichend bekannt ist das Venn-Diagramm der Kariesgenese, das drei ineinandergreifende Kreise, die Hauptpfeiler, zeigt: Ernährung, Wirtsfaktoren und Plaque. König (1987) erweiterte diese Parameter um den Faktor Zeit zu einer Tetrade und erarbeitete damit in Grundzügen die bis heute allgemeingültige Theorie der Kariesentstehung. Diese erlebte bis zum heutigen Tag Ergänzungen [Clarkson 1999] durch Faktoren wie beispielsweise die

Speichelfließrate, Speichelzusammensetzung, pH-Wert und dessen Pufferkapazität, Dauer und Häufigkeit der Substratzufuhr, anatomische Besonderheiten und sozioökonomische sowie verhaltensbedingte Faktoren.

Die kariesassoziierten Auflösungsprozesse an der Zahnoberfläche entstehen durch Wechselwirkungen zwischen der Schmelzoberfläche und dem ihr aufgelagerten Biofilm. Die Bildung des Biofilms beginnt an der Pellicle (Zahnoberhäutchen). Diese bildet sich an der gereinigten Schmelzoberfläche durch die Adsorption von Speichelproteinen in wenigen Minuten. Die Pellicle besitzt protektive Eigenschaften hinsichtlich der Demineralisation von Schmelzoberflächen [Zahradnik *et al.* 1976]. Ihre Zusammensetzung unterscheidet sich in fluoridierten und nicht-fluoridierten Bereichen [Siqueira *et al.* 2012]. Die semipermeable Natur der Pellicle soll die Diffusion von Kalzium-, Phosphat- und Fluoridionen und somit Remineralisationsvorgänge ermöglichen [Hannig und Joiner 2006]. Die Konzentration von Kalzium und Phosphat in dentaler Plaque sind entscheidend im Hinblick auf die Kariesentstehung, da eine inverse Beziehung zwischen der Ionenkonzentration in der Plaquematrix [Ashley und Wilson 1977] bzw. Plaqueflüssigkeit und dem Kariesvorkommen besteht [Margolis und Moreno 1992].

Bei einer pH-Erniedrigung könnten diese Ionen an der Plaque-Schmelzgrenze abgegeben werden und die flüssige Phase in einem gesättigten Zustand belassen [Pearce 1998]. Es scheint eine Beziehung zwischen einer gesteigerten Konzentration von extrazellulären Polysacchariden und einer erniedrigten Konzentration an Kalzium, Phosphat und Fluorid zu geben [Aires *et al.* 2006]. Biofilme, die sich im alleinigen Beisein von Saccharose oder in Kombination mit Stärke bilden, weisen eine geringere Ionenkonzentration auf als solche, die in Abwesenheit von Zucker oder im alleinigen Beisein von Stärke entstehen. Erstgenannte können eine stärkere Schmelzdemineralisation verursachen [Ribeiro *et al.* 2005].

Hypothesiert wird auch ein Zusammenhang der Demineralisation mit der Proteinkomposition der Plaque. Ein Großteil des Kalziums ist proteingebunden [Gao *et al.* 2001]. Der genaue Mechanismus bleibt aufzuklären.

Kariesbildung korreliert direkt mit wiederholten Zyklen von Plaqueansäuerung. [Bradshaw und Marsh 1998]. Unter starken, prolongiert sauren Bedingungen erfolgt die Selektion für eine kariogene Flora. Dies steigert das Ausmaß des pH-Wert-Abfalls

infolge der Fermentation vorhandener Kohlenhydrate und fördert somit die Schmelzdemineralisation [Banas 2004].

*Streptokokkus mutans* (*S. mutans*) wird als ein wichtiger ätiologischer Akteur in der Bildung kariöser Läsionen dentaler Karies betrachtet. Seine alleinige Anwesenheit in dentaler Plaque ist aber nicht allein für das kariogene Potenzial von Biofilmen verantwortlich [Kuramitsu und Wang 2011]. Sein Anteil an der initialen Kolonisationspopulation beträgt nur 1% [Featherstone 2004]. In der erweiterten ökologischen Plaquehypothese kommt den Nicht-*mutans*-Bakterien die Hauptrolle für die Aufrechterhaltung der dynamischen Stabilität zwischen De- und Remineralisationsprozessen zu [Takahashi und Nyvad 2008]. Nicht-*mutans*-Bakterien sind die Hauptvertreter in „white spot Läsionen“ (Initialkaries) [Sansone *et al.* 1993]. *S. mutans* scheint mit fortgeschrittenen Kariesstadien assoziiert zu sein, und in kavitierten Läsionen trägt *S. mutans* zu 30% der Gesamtflora bei [Boue *et al.* 1987].

Karies ist vielmehr als Anhäufung zyklischer Episoden von De- und Remineralisation zu verstehen als ein unidirektionaler Demineralisationsprozess, wobei das Gleichgewicht in Richtung Demineralisation verschoben ist [Newbrun 2001].

Eine bevorzugte Herauslösung von Kalziumionen aus Hydroxylapatit [Ingram 1990], begleitet von einem schnellem Verlust von Magnesium und Karbonat während der ersten Stufen des natürlichen Kariesbildungsprozesses, wurde beobachtet [Hallsworth *et al.* 1972]. Die Auflösungserscheinungen beginnen an Gitterfehlstellen der Schmelzkristalloberfläche und involvieren mit weiterem Fortschreiten die Kristallzentren. Der kariöse Auflösungsprozess folgt dem Verlauf der kristallografischen Achsen des Apatits [Tohda *et al.* 1987]. In der Demineralisationszone werden die Kristalle überwiegend voneinander getrennt, und es kommt zur Ausbildung weiter interkristalliner Räume [Tohda *et al.* 1987]. Die herausgelösten Ionen diffundieren durch diese und wandern entsprechend ihrem Konzentrationsgradienten an die Schmelzoberfläche [Vogel *et al.* 1997]. Untersuchungen legen nahe, dass die Rate der Auflösung im Zahnmineral schneller ist als die Transportrate saurer Ionen in und/oder mineralischer Ionen aus der Läsion heraus. Dieser Prozess führt zur Ausbildung einer sogenannten pseudointakten Oberflächenschicht am Schmelz. Die Oberfläche der pseudointakten Oberflächenschicht ist ein Ergebnis der Demineralisationsbedingungen [Margolis und Moreno 1985] und ist durch eine größere Kristallinität der Kristalle gekennzeichnet [Aoba *et al.* 1981]. Die Demineralisation unterhalb der Oberflächenschicht ist

größtenteils diffusionskontrolliert, womit die Rate der Läsionsprogression möglicherweise von Faktoren abhängig ist, die den Diffusionsprozess bestimmen [Chow 2010].

#### 4.2.1 Die Wirkung des pH-Wertes auf die Schmelzlöslichkeit

Zum Verständnis der physiko-chemischen Prozesse in Demineralisations-/Remineralisationsprozessen wird in der Literatur der Einfluss des pH-Wertes auf die Schmelzlöslichkeit dargestellt. Nach Dawes existieren zwei Gründe für die Löslichkeit von Schmelz in Säure. Wasserstoffionen lösen Hydroxylionen um Wasser zu bilden [Dawes 2003]. Das Ionenprodukt des Wassers beträgt stets  $10^{-14}$  (mol/l). Wenn die Konzentration der  $H^+$ -Ionen steigt, muss die Konzentration der  $OH^-$ -Ionen reziprok sinken. Zum Zweiten kommt anorganisches Phosphat in oralen Flüssigkeiten in vier verschiedenen Formen vor:  $PO_4^{3-}$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $H_2PO_4^-$ ,  $H_3PO_4$ . Die Proportion ihres Auftretens ist pH-Wert-abhängig, bei fallendem pH-Wert zunehmend in genannter Reihenfolge. Ob sich ein Apatit unter den jeweils gegebenen Umständen auflöst oder nicht, ist vom Produkt der Ionenaktivitäten in der flüssigen Phase abhängig. Im Gleichgewichtszustand nimmt das Ionenaktivitätsprodukt ein Maximum an und wird als Löslichkeitsprodukt bezeichnet. Ist das Ionenaktivitätsprodukt geringer als das Löslichkeitsprodukt, ist die Lösung in Bezug auf das Salz untersättigt und das Salz neigt zur Auflösung. Die Kalzium- und Phosphatkonzentration der oralen Flüssigkeiten bestimmen den pH-Wert, bei dem die flüssige Phase in Bezug auf den Schmelzapatit gesättigt ist. Ungefähre Werte für das Kalzium- und Phosphationenvorkommen im Speichel sind 1-2 mmol/l bzw. 4-6 mmol/l. Die Kalzium- und Phosphatkonzentration ist inter- und intraindividuell variabel, u.a. abhängig von der Speichelfließrate und dem jeweiligen Sekretionsanteil der beteiligten Drüsen. Ein großer Teil der Kalzium- und Phosphationen ist an Speichelproteine gebunden oder tritt komplexiert auf und liegt somit nicht in frei aktiver Form vor. Entscheidend sind die Ionenaktivitäten, die mit Werten von 0,5 mmol/l für Kalzium und 2 mmol/l für Phosphat angegeben werden können. Je niedriger der pH-Wert ist, desto niedriger ist die Konzentration an  $PO_4^{3-}$ , die einzige Phosphatverbindung die zum Ionenprodukt von HA beiträgt. Somit bleibt bei Säuerung der Lösung die Kalziumkonzentration unbeeinflusst, aber die Konzentrationen von  $OH^-$  und  $PO_4^{3-}$  sind reduziert und somit auch das Ionenprodukt, oftmals zu einem

Wert, der unter dem des Löslichkeitsprodukts liegt. Der pH-Wert, bei dem der Speichel in Bezug auf Schmelzapatit gesättigt ist, wird als „kritischer pH-Wert“ bezeichnet.

Unterhalb des „kritischen pH-Wertes“ kommt es zur Auflösung von HA Kristallen. Für HA Kristalle beträgt dieser Wert 5,5-6 [Featherstone 2004].

Das Ionenaktivitätsprodukt beträgt  $10^{-117}$  für Hydroxylapatit und  $10^{-121}$  für Fluorapatit. Ist der kritische pH-Wert für Hydroxylapatit knapp unterschritten, bleibt der Speichel noch übersättigt in Bezug auf Fluorapatit.

In-vitro-Untersuchungen haben gezeigt, dass Schmelz bei Exposition zu einem anorganischen wässrigen Puffer von einem pH-Wert zwischen 4,0-5,0, der untersättigt in Bezug auf Hydroxyapatit und Fluorapatit ist, Mineralverluste erfährt, vergleichbar zu denen einer Erosion [Larsen 1973]. Im Speichel entspricht diese Situation einem pH-Wert unter 4,5. Bei Pufferlösungen, die untersättigt sind in Bezug auf Hydroxylapatit, aber übersättigt sind in Bezug auf Fluorapatit, entsteht eine kariesähnliche Läsion mit einer Demineralisation unterhalb der Schmelzoberfläche [Larsen 1975]. Diese Bedingungen herrschen im Speichel bei pH-Werten von 4,5-5,5. Verschwinden die kariogenen Umstände in der Plaque und der kritische pH-Wert von 5,5 wird wieder überschritten, sind die Flüssigkeiten (Läsion, Plaque) wieder näherungsweise gesättigt im Hinblick auf die Zahnhartsubstanz [Dawes 2003]. Der „kritische pH-Wert“ ist keine konstante Größe sondern abhängig von der Konzentration an Kalzium- und Phosphationen in einer Lösung. Je mehr Kalzium- und Phosphationen in einer Lösung vorliegen, desto niedriger liegt der „kritische pH-Wert“. Grundsätzlich erhöht sich die Löslichkeit von Apatit um ein Zehnfaches pro reduzierter Einheit des pH-Wertes [Featherstone 2004].

### 4.3 Fluoridwirkung auf den Zahnschmelz

Nach heutiger Auffassung existiert kein präeruptiver kariesprophylaktischer Effekt der Fluoride. Die primären kariesprotektiven Mechanismen des Fluorids sind posteruptiv durch topische Effekte an der Schnittstelle zwischen Mineraloberfläche und oraler Flüssigkeit [Thylstrup 1990]. Der kariostatische Effekt wird vornehmlich durch das kontinuierliche Vorliegen von Fluoridionen in der den Schmelz umgebenden Flüssigkeit hervorgerufen, als durch den Einbau von Fluoridionen in das Kristallgefüge des Schmelzes [Ogaard *et al.* 1988].

Fluorid ist in der Lage in die Plaque zu diffundieren. Ein so gebildetes Fluoridreservoir kann Fluorid wieder freigeben [Ekstrand und Oliveby 1999; Vogel *et al.* 2010]. Das Fluoridvorkommen in der Plaque ist von der Expositionszeit [Whitford *et al.* 2005] und Fluoridzusammensetzung abhängig [Attin und Hellwig 1996; Koo 2008].

Fluoride werden in der interkristallinen Flüssigkeit akkumuliert und treten mit der Kristalloberfläche des Zahnschmelzes in Wechselwirkung. Dabei finden zwei Arten von Fluorid- und Apatitinteraktionen statt: Bindung an die Kristalloberfläche als auch die Inkorporation in das Kristallgitter durch die Substitution von Hydroxylionen durch Fluoridionen [Fejerskov *et al.* 1981]. Es konnte gezeigt werden, dass das entstehende Fluorapatit aufgrund seines niedrigen Löslichkeitsproduktes ( $pK = 120,2^{15}$ ), im Vergleich zu HA ( $pK = 117,2^{15}$ ), bei sinkendem pH-Werten länger stabil bleibt und bei einem Anstieg des pH-Wertes als erstes Kristall wieder repräzipitiert. Der Schmelz erfährt eine verminderte Säurelöslichkeit. Fluoride hemmen die Demineralisation [ten Cate und Duijsters 1983] und fördern die Remineralisation [Fischer *et al.* 1995], indem sie die Löslichkeit präzipitierender fluoridierter Apatite herabsetzen und somit die Triebkraft für die Apatitbildung steigern [Moreno und Zahradnik 1974].

Bei der Betrachtung der Löslichkeitsisothermen für einige Kalzium-Phosphat-Verbindungen ist der pH-Bereich von speziellem Interesse, in dem das die Schmelzoberfläche umgebende Medium (Plaqueflüssigkeit) untersättigt ist im Hinblick auf Hydroxylapatit und übersättigt in Bezug auf Fluorapatit [Larsen 1975]. Diese Werte koinzidieren mit dem pH-Wert dentaler Plaque, wenn die Bakterien Säuren produzieren. In diesem Bereich löst sich Hydroxylapatit möglicherweise auf, während Fluorapatit präzipitieren kann.

Fluoride sind in der Lage, mit metabolischen Prozessen [Balzar Ekenback *et al.* 2001] und Wachstumsprozessen der Bakterien zu interagieren. Die inhibierenden Effekte auf die Virulenzfaktoren und die Zusammensetzung von *S. mutans*-Biofilmen konnten bei Konzentrationen von 10, 50 und 125 ppm  $F^-$  nachgewiesen werden [Pandit *et al.* 2011].

Als wichtiger Faktor bei der kariesinhibierenden Wirkung von Fluoriden gilt die Bildung von  $CaF_2$ . Menschlicher Speichel ist in der Regel in Bezug auf Kalzium übersättigt, so dass es bei der lokalen Applikation hoher Fluoridkonzentrationen zur oberflächlichen Auflösung von Hydroxylapatit und Bildung von Kalziumfluorid kommt [Nelson *et al.* 1984]. Dieser umfasst auch andere Bestandteile wie Phosphate und Proteine [Christoffersen *et al.* 1988]. Die Kalziumfluoridbildung ist abhängig von dem

verwendeten Fluorid: bei ionischem Fluorid von NaF oder NH<sub>4</sub>F bildet sich ein Kalziumfluoriddepot [Duschner und Uchtmann 1988]. CaF<sub>2</sub> löst sich in wässrigen Lösungen bei Kalziumkonzentrationen, die denen von Speichel und Plaqueflüssigkeit entsprechen, auf. Kalziumfluorid wurde im oralem Milieu als relativ stabil beobachtet [Saxegaard und Rolla 1989]. Diese Stabilität wird durch die Adsorption von Hydrogenphosphat-Ionen (HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) an der Oberfläche der CaF<sub>2</sub>-Kristalle bedingt [Saxegaard *et al.* 1988]. Das CaF<sub>2</sub> arbeitet als pH-gesteuertes Fluoridreservoir [Lagerlof *et al.* 1988]. Aufgrund der reduzierten HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Ionenkonzentration bei erniedrigtem pH-Wert werden F<sup>-</sup>-Ionen freigesetzt. Somit dient CaF<sub>2</sub> als Hauptquelle freier Fluoridionen während des kariösen Angriffes. Bei neutralem pH-Wert besitzt CaF<sub>2</sub> einen relativ großen Phosphatanteil, der leichter löslich ist als das phosphatärmere, bei niedrigem pH-Wert gebildete CaF<sub>2</sub>.

Die Steigerung der Fluoridkonzentration, Verlängerung der Expositionszeit und Verwendung einer Fluoridlösung mit niedrigem pH-Wert steigert die CaF<sub>2</sub>-Bildung [Ogaard 2001]. Die Umwandlung von CaF<sub>2</sub> in Fluorapatit konnte gezeigt werden [Chander *et al.* 1982]. Bei höheren Fluoridkonzentrationen sind Kalziumfluorid und Fluorapatit beide stabile Phasen, aber die Bildung von Kalziumfluorid ist die kinetisch begünstigte Form. Die CaF<sub>2</sub>-Bildung auf gesundem Zahnschmelz nach Anwendung von neutralen fluoridhaltigen Spüllösungen ist sehr gering [Harding *et al.* 1994]. Saure Zahnpasten mit einem pH-Wert von 5,5 und einem Fluoridgehalt von 250 ppm zeigten einen gleich guten klinischen Effekt wie neutrale Zahnpasten mit 1000 ppm Fluorid [Koch *et al.* 1982].

Andere Autoren [Vogel *et al.* 2010] konnten keine Kalziumfluoridablagerungen in Plaque nach Spülung mit einer Natriumfluorid-Spüllösung mit einem Fluoridanteil von 228 ppm nachweisen. Vermutet wird eine fehlende Bildung oder ein schneller Verlust aufgrund der niedrigen Kalziumkonzentration im Speichel. Zu untersuchen bleibt, ob ein Vorspülen mit Kalzium vor Fluoridapplikation ein ausgeprägteres CaF<sub>2</sub>-Depot bildet. Ein Modell für die mikrobielle Fluoridbindung existiert und wurde von Rose *et al.* beschrieben [Rose *et al.* 1996].

#### 4.4 Fluoridgehalt

Die Fluoridwirkung ist durch die Verfügbarkeit von Kalzium und Phosphationen beschränkt [Featherstone 2009]. Baseline-Fluoridkonzentrationen im Speichel nach

Anwendung von Zahnpasten oder Mundspüllösungen sinken nach einigen Stunden auf eine Baseline, die in einem Bereich von  $0,4 \pm 0,05 \mu\text{mol/l}$  angegeben werden [Duckworth *et al.* 1987]. Ein positiver Einfluss von Fluorid auf das Kristallwachstum konnte gezeigt werden [Eanes 1980]. Eine kariesprophylaktische Fluoridwirkung bei Fluoridkonzentrationen von 0,1 bzw. 0,2 ppm wurde gefunden [Amjad und Nancollas 1979; Borsboom *et al.* 1985]. Bei einem Fluoridvorkommen von 0,01 ppm konnte noch ein gesteigertes Kristallkeimwachstum gezeigt werden [Ingram und Morgan 1987]. Fluorid steigert die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Läsionsreparatur [Koulourides *et al.* 1974]. In vielen vorangegangenen Studien mit *in vitro* hergestellten Schmelzläsionen ließ das Vorhandensein geringer Fluoridkonzentrationen, um 1-2 ppm, den Gesamtmineralgehalt in Schmelzläsionen ansteigen [ten Cate und Duijsters 1982; Iijima und Koulourides 1989].

Untersuchungen zeigten Ergebnisse, nach denen die topische Applikation mit einer hochkonzentrierten Fluoridlösung eine höhere initiale, jedoch geringere subsequeunte Rate der Mineraldeposition erreichte [ten Cate *et al.* 1981]. Andere Autoren beschrieben die Wichtigkeit der Verwendung von niedrigen Fluoridkonzentrationen, um Mineralablagerung zu stimulieren [Wefel 1990]. Dieses Ergebnis wurde damit erklärt, dass die fluoridgeförderte Ablagerung vorrangig in der Oberflächenschicht erfolge, was zu einer Blockierung der Oberflächenporen führe. Zur Erzielung eines dauerhaften kariespräventiven Effekts müssen Fluoride in niedriger Konzentration kontinuierlich ein Leben lang zugeführt werden [Newbrun 2001]. Einige Autoren geben zum Erreichen eines kariesprotektiven Effekts für Patienten mit hohem Kariesrisiko einen therapeutischen Bereich von 0,1 ppm  $\text{F}^-$  im Speichel Tag und Nacht an [Featherstone 2009].

#### 4.5 Remineralisation

Demineralisation und Remineralisation als gegensätzliche Prozesse treten kontinuierlich, entweder simultan oder alternierend, in kariösen Läsionen auf. Cochrane *et al.* definieren Remineralisation als einen Prozess, bei dem der Zahn Kalzium- und Phosphationen aus einer äußeren Quelle erhält, die zur Förderung der Ionendeposition in Gitterfehlstellen demineralisierten Schmelzes beitragen, wobei ein Netto-Mineralgewinn erzeugt wird [Cochrane *et al.* 2010]. Remineralisation erfolgt durch die Restauration partiell aufgelöster Kristalle, Ablagerung neu gebildeter Kristalle

(überwiegend in erweiterten interkristallinen Räumen) und Wachstum überlebender Kristalle [Yanagisawa und Miake 2003].

In Untersuchungen von 1961 wurde bereits die Remineralisation von Schmelz durch kalziumphosphathaltige Lösungen *in vitro* beobachtet [Koulourides *et al.* 1961]. Die Rolle von Fluorid bei diesem Prozess wurde von Koulourides und Reed beschrieben [Koulourides und Reed 1964].

Bei der Remineralisation kommt es zu einer Umverteilung der mineralischen Phasen, indem der Anteil an stabilem Apatit im Schmelz erhöht wird und der Teil an leichter löslichen Kalziumphosphat-Phasen reduziert wird. Ein primär demineralisierter und anschließend remineralisierter Zahnschmelz ist dadurch etwas säureresistenter als unversehrter Zahnschmelz [Koulourides und Cameron 1980] und wird resistenter für weitere Demineralisation [Zero 1995]. Die Fähigkeit von gesundem Schmelz Fluorid aufzunehmen ist geringer als die von demineralisiertem Schmelz. Der Prozess der Remineralisation scheint diffusionslimitiert zu sein [Yamazaki und Margolis 2008]. Die Remineralisierung von tieferliegenden Schmelzläsionen benötigt einen beachtlichen Expositionszeitraum gegenüber Remineralisationslösungen [Featherstone 2004; Hicks *et al.* 2004].

#### **4.5.1 Kalziumphosphatverbindungen im Speichel**

Bei physiologischem pH-Wert ist der Gesamtspeichel im Hinblick auf die meisten festen Kalziumphasen übersättigt [Larsen und Pearce 2003]. Die vorhandenen Protein-Makromoleküle mindern die effektive Kalzium-Phosphat-Konzentration durch Bindung von Kalzium-Ionen [Schlesinger und Hay 1977]. Kalzium wird zusammen mit Proteinen in die Lumina der Speicheldrüsenacini sezerniert [Wallach und Schramm 1971]. Die Kalziumkonzentration im Speichel hängt von der Speichelfließrate ab [Lagerlof und Ekstrand 1982].

Bei einem kariogenen Angriff spielt das freie ionisierte Kalzium eine besondere Rolle. Der ionisierte Kalziumanteil beträgt ca. 50% und hängt stark vom pH-Wert des Speichels ab [Lagerlof und Lindqvist 1982]. Es besteht ein fester Zusammenhang zwischen der Konzentration von totalem und ionisiertem Kalzium im Speichel und in dentaler Plaque. Ein Fluss der Kalziumionen über die Plaque-Speichel-Grenze erfolgt entlang eines Diffusionsgradienten [Matsuo und Lagerlof 1991].

Der Kalziumgehalt von Schmelz beträgt ca. 30 mol/l. Um das verlorengegangene Mineral in demineralisiertem Schmelz mit Kalzium aus dem Speichel oder einer remineralisierenden Lösung (1-2 mmol/l) zu ersetzen, wäre es nötig  $10^4$  Volumen (Speichel/Lösung) zuzusetzen, um ein Volumen remineralisierten Schmelzes wiederherzustellen [Featherstone 2004]. Die Remineralisation des Schmelzes, unter Bildung von Kalziumverbindungen, wurde in der Vergangenheit untersucht. Brown entwickelte bereits 1957 ein Kalzifikationsmodell, in welchem er Oktakalziumphosphat (OKP) als Vorstufe für Hydroxylapatit (HA) postulierte. 1987 präsentierte er Daten, die seine Vermutung untermauerten: nach OKP-Präzipitation erfolgt eine irreversible Hydrolyse in ein Übergangsprodukt, Oktakalziumphosphathydrolysat (OKPH), das OHAp- und OKP-ähnliche chemische Bereiche aufweist [Brown *et al.* 1987]. Johnsson and Nancollas hingegen konnten in In-vivo-Kalzifikationen Brushit-Dikalziumphosphatdihydrat  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (DKPD) und OKP nicht beobachten und vermuten die Beteiligung anderer Vorstufen oder die Bildung einer initialen amorphen Kalziumphosphat-Phase (AKP), die von einer Umwandlung zu Apatit begleitet ist [Johnsson und Nancollas 1992].

#### 4.5.2 Sättigung einer Lösung

Das Gleichgewicht zwischen einem Feststoff und seinen Ionen in Lösung kann durch das Löslichkeitsprodukt charakterisiert werden. Bei einer gesättigten Lösung ist die Zahl der Ionen, die in Lösung gehen, gleich der Zahl der Ionen, die an der Kristalloberfläche auskristallisieren.

Da ein dynamisches Gleichgewicht vorliegt, kann für die Dissoziation das Massenwirkungsgesetz angewendet werden:

$$LP = \frac{(A) \times (B)}{(AB)}$$

Da die Konzentration der Ionen im Fließgleichgewicht von der Menge an ungelöstem Feststoff unabhängig ist, setzt man  $(AB) = 1$ .

Damit beschreibt das Löslichkeitsprodukt das Produkt der Ionenaktivitäten:

$$LP = (A) \times (B).$$

Ist das Löslichkeitsprodukt eines Salzes bekannt, ist dessen Konzentration in gesättigter Lösung ermittelbar. Für konzentrierte Lösungen müssen statt der

Konzentrationen die Aktivitäten der beteiligten Ionen eingesetzt werden, da die Wirksamkeit der Ionen durch interionische Wechselwirkungen vermindert wird.

Die Löslichkeitsisotherme von Schmelz sind zu denen von HA leicht verschoben [Shellis 1996]. HA ist ein hochgradig unlösliches Mineral, der gemessene Wert für das Löslichkeitsprodukt von HA ist sehr gering, in einem Bereich von  $10^{-117}$  [Dawes 2003]. Das LP beträgt für reines HA ( $LP_{HA}$ ) bei  $37\text{ °C}$   $7,94 \times 10^{-60} \text{ mol}^9/\text{l}^9$ . OKP ( $2,57 \times 10^{-12} \text{ mol}^9/\text{l}^9$ ) und DKPD ( $2,2 \times 10^{-7} \text{ mol}^9/\text{l}^9$ ) weisen diesbezüglich einen niedrigeren Wert auf. Das Ionenprodukt (IP) ist das Produkt der Stoffmengenkonzentrationen aller in einem Medium durch elektrolytische Dissoziation gelöster Ionen. Liegt eine gesättigte Lösung vor, so entspricht das IP dem Löslichkeitsprodukt ( $IP = LP_{HA}$ ). In diesem Fall entspricht die Menge der in Lösung gehenden Ionen den an HA bindenden Ionen, so dass ein Gleichgewicht zwischen De- und Remineralisation vorliegt. Ist das IP kleiner als das  $LP_{HA}$  ( $IP < LP_{HA}$ ), wird von einer ungesättigten Lösung in Bezug auf HA gesprochen. Das Gleichgewicht ist in diesem Fall in Richtung der Demineralisation verschoben. Ist das IP größer als das  $LP_{HA}$  ( $IP > LP_{HA}$ ), liegt eine übersättigte Lösung vor und es findet eine Remineralisation des HAs statt.

Unter physiologischen oralen Bedingungen (angenommen als pH-Wert von 7, Speichelkalziumkonzentration von  $0,76 \text{ mmol/l}$ ) besteht in Hinsicht auf HA eine Übersättigung [Lagerlof 1983]. Wenn die thermodynamischen Bedingungen ungünstig werden, wie es auftritt wenn der pH-Wert in der Mundhöhle sinkt, besteht eine Triebkraft in Richtung HA-Auflösung.

### 4.5.3 Einfluss des pH-Wertes auf die Sättigung einer Lösung

Da das  $LP_{HA}$  eine Konstante ist, kann die Konzentration eines jeden Ions variieren, vorausgesetzt ihr Produkt bleibt gleich. Das IP von  $H^+$  und  $OH^-$  in Wasser ist gleich  $10^{-14} (\text{mol/l})^2$ . Steigt in einer sauren Lösung der Anteil an  $H^+$ , reduziert sich der  $OH^-$ -Anteil reziprok. Anorganische Phosphatverbindungen liegen im Speichel in verschiedenen Formen vor. Ihr jeweiliger Anteil am Gesamtphosphatvorkommen ist abhängig vom pH-Wert. Je niedriger der pH-Wert ist, desto geringer ist die Konzentration an  $PO_4^{3-}$ , welches als einzige Phosphatverbindung zum Ionenprodukt von HA beiträgt. Wird eine Lösung sauer, ist die Kalziumkonzentration davon unbeeinflusst, die Phosphat- und

Hydroxylionenkonzentration jedoch erniedrigt, wodurch der Wert für das IP kleiner werden kann als das  $LP_{HA}$ .

#### 4.6 Bisherige Präventionsansätze und Therapiemöglichkeiten

Als Behandlungsmöglichkeiten von Hyposalivationspatienten stehen kausale und symptomatische Therapien zur Auswahl. Zu den kausalen Therapieansätzen zählen Fortschritte in der Röntgenabgabe. Die dreidimensionale Behandlungsplanung und winkelkonforme Dosisabgabe [Henson *et al.* 2001] im Rahmen der Radiotherapie sind Möglichkeiten die lokale Kontrolle der Bestrahlung zu verbessern. Die Intensitätsmodulierte Radiotherapie (IMRT) als Standardmethode bei Krebserkrankungen im Kopf- und Halsbereich kann die anfallende Bestrahlungsdosis verringern und somit auch das Auftreten von Hyposalivation [Murdoch-Kinch *et al.* 2008]. Dennoch tritt bei ca. 40% der Patienten eine Hyposalivation auf [Vergeer *et al.* 2009]. Neue Bestrahlungstechniken ermöglichen eine Dosisreduktion durch Verwendung geladener Teilchen wie Protonen, besonders für Krebs im Kopf-Hals-Bereich, bei bilateraler Nackenbestrahlung [van der Laan *et al.* 2012] und im Bereich des Nasopharynx [Steneker *et al.* 2006] und den Sinus paranasales [Lomax *et al.* 2003].

Die in der Literatur als vorteilhaft beschriebene operative Transposition der Glandula submandibularis außerhalb des Bestrahlungsfeldes [Jha *et al.* 2000] besitzt nur eine sehr limitierte Indikationsstellung. Der Bestrahlungsschutz durch Sauerstoffradikalfänger wie Amifostine führt bei systematischer Gabe während der Bestrahlungstherapie zu einer Verminderung der Hyposalivation [Wasserman *et al.* 2005], wobei ein signifikanter Patientenanteil weiterhin Hyposalivation erfährt [Jellema *et al.* 2006]. Es bestand um die Anwendung von Amifostine eine Kontroverse, da als unerwünschter Nebeneffekt auch der Schutz von Tumorgewebe beobachtet wurde [McChesney *et al.* 1986]. Tempol, ein stabiles Nitroxid, ahmt die Superoxiddismutase nach und agiert als freier Radikalfänger. Diverse Untersuchungen unterstützen die Weiterentwicklung und Bewertung in Versuchen am Menschen. Die Gabe von Insulin Wachstumsfaktor (IGF-1) oder Keratinozytenwachstumsfaktor (KGF) vor oder während der Bestrahlungstherapie wurde in Mäusen untersucht. Die Grundüberlegung besteht in der Unterdrückung der Apoptose und/oder einer Verbesserung des Überlebens und Wachstums von Azinuszellen nach der Bestrahlung [Avila *et al.* 2009]. Der KGF zeigte

eine Verminderung der bestrahlungsinduzierten Hyposalivation [Lombaert *et al.* 2008]. Die Gabe von Botulinumtoxin in die Submandibulardrüsen von Ratten reduzierte die durch Bestrahlung erwirkte Schädigung auf Zellebene [Teymoortash *et al.* 2009].

Zu den symptomatischen Therapieoptionen gehören Sialologa, bei denen gustatorische, taktile und pharmakologische unterschieden werden können. Kaugummi stellt eine Kombination aus taktilen und gustatorischen Stimuli dar.

Im Hinblick auf gustatorische Stimuli kommen besonders sauer schmeckende Substanzen, beispielsweise in Form von Bonbons, zur Anwendung, um die Speichelsekretion zu steigern [Senahayake *et al.* 1998]. Bitterschmeckende Substanzen steigern ebenfalls die Sekretion, wohingegen süß schmeckende Substanzen den Speichelfluss in geringerem Ausmaß stimulieren und den Eindruck der Mundtrockenheit noch verstärken können [Vissink *et al.* 2003]. Zu den pharmakologischen Sialologa gehören beispielsweise Pilocarpine, Anetholtrithione [Niedermeier *et al.* 1998] und Cevimeline [Petroni *et al.* 2002]. Der Effekt der Pilocarpine kann wohl überwiegend der Stimulation der kleinen Speicheldrüsen zugeschrieben werden, da sie eine höhere Strahlenresistenz und bessere Erholungseigenschaften im Vergleich zu serösen Speicheldrüsen zeigen [Niedermeier *et al.* 1998].

Die Wirkung von Akupunktur auf die Sekretion von Gesamtspeichel und die damit assoziierten Symptome zeigten sich über sechs Monate andauernd [Braga *et al.* 2008]. Eine darüber hinaus gehende Akupunktur kann diese Verbesserung bis zu drei Jahren aufrecht erhalten [O'Sullivan und Higginson 2010]. Zu den neueren Ansätzen zur Wiederherstellung der Speicheldrüsenfunktion zählen Gentherapie und Stammzelltherapie.

Überlegungen von Delporte *et al.* gehen dahin, bei überlebenden Duktuszellen einen Funktionswechsel hin zu wassersezernierenden Zellen zu erwirken [Delporte *et al.* 1997]. Dies geschieht durch das Einbringen von Wassertunnelproteinen, das menschliche Aquaporin-1 (hAQP1), in die Zellmembranen der Duktuszellen mittels Gentransfer [Preston und Agre 1991]. Nach mehreren Tierversuchen, u.a. am Minischwein [Gao *et al.* 2011], sind Studien am Menschen noch im Gange [Baum *et al.* 2010].

In Untersuchungen wurde eine Population von c-Kit+ Zellen entdeckt, welche die Eigenschaft besitzen, bestrahlungsbedingte Schädigungen in Speicheldrüsen von Mäusen wiederherzustellen [Lombaert *et al.* 2008].

Eine Veränderung der Geschmackswahrnehmung tritt in Folge von direkter Strahleneinwirkung auf die Geschmacksknospen und aufgrund von Speichelveränderungen auf [Mossmann *et al.* 1982]. In den meisten Fällen kehrt die Fähigkeit zur Geschmackswahrnehmung graduell zum normalen oder nahezu normalen Niveau innerhalb eines Jahres nach Strahlentherapie wieder zurück [Tomita und Osaki 1990]. Da Geschmacksverlust zu Gewichtsverlust führen kann, ist die Bedeutung von Ernährungsberatungen zu betonen [EisbruchLees 1999]. Zinkzusätze wurden bei der Verbesserung der Geschmacksschärfe als wirksam beobachtet [Ripamonti und Fulfaro 1998]. Die im Rahmen der Radiatio mögliche Mukositis [Dose 1995] und die Schwierigkeiten bei der Nahrungsaufnahme und dem Schlucken [Rhodus *et al.* 1995] können ebenfalls zu Ernährungsdefiziten führen.

#### 4.7 Speichel

Speichel besteht zu mehr als 99% aus Wasser und weniger als 1% aus festen Bestandteilen, hauptsächlich Elektrolyten und Proteinen. Die tägliche Speichelproduktion beträgt zwischen 0,5 und 1 Liter [Pedersen *et al.* 2002]. 90% der Speichelproduktion entfällt auf drei paarig angelegte Hauptdrüsen, der Glandula parotidea (Parotis), Gl. submandibularis und Gl. sublingualis. Daneben kommen in der Mundhöhle eine Reihe kleiner Speicheldrüsen vor, deren Beitrag zur Speichelproduktion um die 10% beträgt. Jeder Drüsentyp sezerniert eine Flüssigkeit mit einer charakteristischen Proteinzusammensetzung, sodass der Gesamtspeichel einer gemischten Sekretion entspricht. Der glandulär sezernierte Gesamtspeichel kann in Ruhespeichel und Reizspeichel eingeteilt werden. Die Ruhespeichelproduktion ist stimulationsunabhängig und zeichnet sich im Tagesverlauf durch einen zirkadianen Rhythmus aus, mit einem Sekretionsmaximum am Nachmittag und einem Minimum während des Schlafes [Dawes 1972]. Reizspeichel beschreibt den unter mastikatorischer, olfaktorischer und gustatorischer Reizeinwirkung sezernierten Speichel [Edgar 1990]. Die Speichelzusammensetzung variiert in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren wie der Stimulationsart, -dauer und -stärke der Sekretionsrate und Drüsenfunktion. Die Speichelproduktion als Antwort auf nervale Stimulation erfolgt

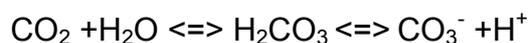
in zwei Schritten: die wasserpermeablen sekretorischen Endstücke (Azini) produzieren einen isotonischen Speichel mit einer Ionenzusammensetzung entsprechend der des Plasmas [Nauntofte 1992]. Dieser primäre Speichel wird durch Reabsorption von Salz in den hypotonischen Speichel umgewandelt.

In Abgrenzung zum glandulären Speichel umfasst der Begriff „whole saliva“ auch Beiträge nichtglandulärer Quellen wie gingivale Sulkusflüssigkeit, Epithelzellen und Mikroorganismen.

Die normale Fluoridkonzentration im Speichel beträgt 1  $\mu\text{mol/l}$ . Die Konzentration ist relativ unabhängig von der Fließrate [Dawes und Weatherell 1990]. Kalzium wird im stimulierten Speichel in größeren Mengen gefunden als im unstimulierten Speichel [Llena-Puy 2006]. Der pH-Wert beträgt zwischen 6,5-7,4. Die höchsten Messungen treten bei einem stimulierten Speichelfluss auf.

Speichel schützt die Zähne durch eine Anzahl von Mechanismen, die einerseits auf seiner flüssigen Charakteristik und andererseits auf seinen spezifischen Inhalten basieren [Amerongen und Veerman 2002]. Die Hauptrollen des Speichels bestehen in der Digestion, Geschmack und Bolusformation. Der Speichel verringert die mikrobielle Belastung in der Mundhöhle durch einen hohen Anteil an antimikrobiellen und immunmodulatorischen Proteinen, welche antibakterielle, antivirale und antifungale Eigenschaften besitzen.

Zu den zahnhartsubstanzprotektiven Funktionen des Speichels gehören die Puffersysteme, der Demineralisationsschutz, die Remineralisation und die Befeuchtung. Von den 3 Puffersystemen im menschlichen Speichel, Bikarbonat-Puffer, Phosphat-Puffer und Protein-Puffer [Lilienthal 1955], ist der Bikarbonat-Puffer der Wichtigste [Leung 1951]. Dieser besitzt die Möglichkeit den pH-Wert zu verändern, wenn sich  $\text{CO}_2$  aus dem Speichel verflüchtigen kann.



Fällt der pH-Wert des Speichels, ist das Gleichgewicht nach links verschoben [Holcomb und Young]. Die Mundhöhle stellt ein partiell geschlossenes System dar. Ein Großteil des Puffersystems (70%) geht während der Pufferung verloren [Izutsu 1981].

Ruhespeichel verfügt über ein geringeres Puffervermögen als Reizspeichel aufgrund eines geringen Bikarbonatanteils [Lilienthal 1955]. Bei hohen Speichelfließraten kommt  $\text{HCO}_3^-$  in höheren Konzentrationen vor (im Bereich des Plasmaspiegels). Unter

stimulierten Bedingungen agiert es als der generelle Puffer des Speichels. Bei abnehmender Speichelfließrate kommt der Verteilung an Phosphat-Puffer und Protein-Puffer eine steigende Bedeutung zu.

Eine Korrelation zwischen einer hohen Proteinkonzentration und einer hohen Pufferkapazität in einem pH-Bereich von 4,0 bis 5,0 wurde beschrieben [Bardow *et al.* 2000]. Andere Autoren beschrieben den Protein-Puffer ohne besondere Puffereigenschaften und erklärten seine Wirkung nur im Zusammenwirken mit anderen Speichelbestandteilen (CO<sub>2</sub>-bindende Eigenschaften der Proteine und Carbaminoproteine) [Izutsu und Madden 1978].

Die Gesamtspeichelsekretion wurde von Heintze *et al.* bei fehlender Stimulation mit  $0,37 \pm 0,65$  ml/min angegeben; stimuliert  $1,6 \pm 1,89$  ml/min für Männer und  $1,2 \pm 1,65$  ml/min für Frauen [Heintze *et al.* 1983]. Bardow *et al.* fanden keine Unterschiede bei den Speichelfließraten zwischen Männern und Frauen [Bardow *et al.* 2000].

Die Protein-Hauptbestandteile des parotiden Speichels sind Amylase (20%), Phosphoproteine wie Statherine (7%) und prolinreiche Proteine (60%). Die zwei letzteren sind die Hauptbestandteile der Protein-Pellicle an den Zahnoberflächen und spielen durch kalziumbindende Eigenschaften eine Rolle in der Steigerung der lokalen Kalzium- und Phosphatkonzentration auf der Oberfläche, die somit für eine Zahnremineralisation zur Verfügung stehen.

Speichelmuzine ermöglichen die Bildung eines lang anhaftenden Feuchtheitsfilms in der Mundhöhle. Ihr Vermögen, die Oberflächenspannung des Speichels herabzusetzen, verbessert die Adhäsion an der Mukosa und an der Zahnoberfläche [Nieuw Amerongen *et al.* 1987].

Konträr zur früher angenommenen altersbedingten Abnahme der Speichelfunktion konnte gezeigt werden, dass keine klinisch relevanten Abnahmen in unmedizierten Patienten auftreten [Ship und Baum 1990]. Die beobachtete physiologische Altersinvolution, wie die Abnahme des Azinuszellvolumen mit steigendem Alter, verringert die funktionelle Kapazität der Drüse [Scott *et al.* 1987]. Eine Funktionsaufrechterhaltung wird durch die große sekretorische Kapazität der Drüse ermöglicht. Der Hauptteil der Xerostomiefälle findet seine Ursache in Polypharmazie, systemischen Erkrankungen und Bestrahlung im Kopf-Hals-Bereich [Ship *et al.* 2002].

Aufgrund beschränkter epidemiologischer Studien ist die Prävalenz der Xerostomie und Hyposalivation schwierig festzusetzen. Aber mutmaßlich haben in etwa ein Drittel aller über 65jährigen Erfahrungen mit diesen Erscheinungen.

Das subjektive Empfinden der Mundtrockenheit korreliert nicht notwendigerweise mit objektiven Messungen wie der Sialometrie [Taylor und Miller 1999]. In einer Untersuchung wurde eine Korrelation zwischen der Speichelfließrate der palatinalen Drüsen unter  $6 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  und der Wahrnehmung der Mundtrockenheit gefunden [Niedermeier *et al.* 2000].

#### 4.7.1 Alteration durch Radiatio

Der Therapiestandard bei fortgeschrittenen extrakraniellen Hals- und Nackenkarzinomen besteht aus einer totalen Dosis von 50–70 Gray (Gy, 1 Gy = 100 rad). Diese wird in fraktionierten Dosen verabreicht, bei einer Dosis von ca. 10 Gy pro Woche über 5–7 Wochen. Dabei werden täglich 2,0 Gy an 5 aufeinanderfolgenden Tagen gegeben [Shiboski *et al.* 2007]. Generell wird eine unilaterale Technik verwendet, wodurch oftmals nur die ipsilaterale Glandula parotis im Strahlenfenster liegt [Marks *et al.* 1981]. Eine bilaterale Bestrahlungstechnik wird typischerweise bei Patienten verwendet, die Tumore des Oropharynx oder Nasopharynx haben oder bei unbekannter primärer Seite. Die Ausmaße der radiatioinduzierten Speicheldrüseninsulte sind abhängig vom Speicheldrüsenvolumen, das zum Bestrahlungsfeld exponiert ist und von der Bestrahlungsdosis [Mossman 1983]. Generell erleiden vollständig bestrahlte Parotisdrüsen bei einer Dosisexposition, die 50 Gy übersteigt, permanente Schädigungen, die mit einer Hypofunktion einhergehen und keine Genesung mit der Zeit zeigen [Franzen *et al.* 1992]. Einige Studien konnten bei Bestrahlungsdosen, die unter 52 Gy lagen, eine partielle Erholung der Speicheldrüsenfunktion zeigen [Funegard *et al.* 1994], wohingegen andere Studien wiederum permanente Funktionseinschränkungen nach vergleichbaren Bestrahlungsdosen zeigten [Liu *et al.* 1990].

Signifikante Verminderungen der Speichelfließraten konnten auch bei moderaten Dosen von (30–50 Gy) beobachtet werden [Wescott *et al.* 1978]. Die Speicheldrüsenfließrate kann auch mit relativ kleinen Dosen (10–15 Gy) reduziert sein. Eisbruch *et al.* propagierten einen Schwellenwert für unstimulierte (24 Gy) und stimulierte (26 Gy) Speichelfließraten der Parotis [Eisbruch *et al.* 2001]. Obwohl bekannt ist, dass die

Abnahme der Speichelfließrate in einer dosisabhängigen Weise geschieht, ist dieser Grenzbereich stets diskutabel [Franzen *et al.* 1992].

Aus klassischer Sicht erfolgt radiatioinduzierter Zelltod auf zwei Arten: Reproduktiver Zelltod und Interphasetod. Erstgenannter ist mit Zellzykluseigenschaften, klonogener Kapazität und Mitose assoziiert. Er erscheint nach einer latenten Periode von Zellteilungsversuchen. Der Interphasetod tritt unabhängig von der Zellteilung bereits bei geringer Strahlendosis auf. Unter physiologischen Bedingungen sind die serösen Azinuszellen funktionell ausdifferenzierte Zellen und befinden sich in der Interphase oder in der ausgedehnten G1 (oder G0) Phase des Zellzyklus [Berthrong 1986]. Mehrere Mechanismen der Radiosensitivität werden in der Literatur diskutiert. Der wahrscheinlichste Mechanismus basiert auf der Plasmamembranzerstörung sezernierender Zellen, in deren Folge die durch muskarinerge Rezeptoren gestützte Wassersekretion abnimmt. Ein späterer Schaden entsteht hauptsächlich durch den mitotischen Zelltod von Progenitorzellen, was zu einer verminderten Zellersatzkapazität führt und zu einer Zerstörung der extrazellulären Umgebung [Konings *et al.* 2005].

Innerhalb einer Woche nach Bestrahlungsbeginn nimmt die Speichelproduktion um 60-90% ab. Die Funktion kehrt später zurück, wenn die Maximaldosis unter 25 Gy bleibt [Shiboski *et al.* 2007]. Die Toleranzdosis für die submandibuläre/sublinguale Drüse ist mit der für die Gl. parotis vergleichbar [Burlage *et al.* 2001]. Nach einer initialen akuten Antwort auf die Bestrahlung ist in der Regel eine Erholungsphase zu beobachten, die von einer weiteren Phase funktioneller Verschlechterung gekennzeichnet ist [Vissink *et al.* 1991]. Patienten berichten oftmals von einer Verbesserung ihrer Xerostomie, obwohl die Speichelfließrate abnimmt oder vermindert bleibt [Mossman *et al.* 1982; Leslie und Dische 1994]. Möglicherweise adaptieren die Patienten in Bezug auf Ihre Wahrnehmung, oder die Speichelfließrate der kontralateralen Seite nimmt zu Kompensationszwecken zu [Eisbruch *et al.* 2001].

Radiatioinduzierte Zerstörung der mukösen palatinalen Zellen scheint weniger betont zu sein als die der Gl. parotis. Seröse Azinuszellen scheinen stärker radiosensitiv zu sein als der muköse Typ [Stephens *et al.* 1986] und sind radiatiosensibler als die Duktuszellen.

Die histopathologischen Veränderungen in bestrahlten Speicheldrüsen umfassen den Verlust seröser Azinuszellen, entzündlicher lymphozytärer Infiltration, Gangerweiterung, Fibrose und Atrophie [Radfar und Sirois 2003]. Späte histopathologische

Veränderungen und die späte funktionelle Antwort zwischen serösen und gemischten Drüsen ist vergleichbar [Valdez *et al.* 1993]. Ein Grenzwert der Speichelsekretionsrate, unter welchem ein Betroffener besonders anfällig gegenüber Karies ist, wurde nicht gefunden. Ruhespeichelfließraten unter 0,1 ml/min stellen möglicherweise einen Indikator für eine deutlich Abnahme von pH-Wert,  $\text{HCO}_3^-$  und Phosphat (gesamt) im Gesamtspeichel dar.

Für den Ersatz des geschädigten Drüsengewebes stehen bis zum heutigen Zeitpunkt keine ausgereiften regenerativen Strategien zur Verfügung.

#### 4.7.2 Strahlenkaries

Die Ursachen für die Entstehung von Strahlenkaries liegen in der Hyposalivation, Alteration der Speichelzusammensetzung, Verschiebung der oralen Flora in Richtung kariogene Bakterien und Ernährungsveränderungen. Hinsichtlich des Demineralisationsverhaltens besteht kein Einfluss der Bestrahlung auf die Zahnhartsubstanzen [Kielbassa *et al.* 1999].

Einige Autoren postulieren, dass eine nahezu komplette Kariesfreiheit in bestrahlten Patienten durch die tägliche Verwendung von Fluoriden in Kombination mit strikter Mundhygiene erreicht werden kann [Joyston-Bechal 1992].

#### 4.8 Speichelersatzmittel

Die Verwendung befeuchtender Mittel jeglicher Art wie beispielsweise Wasser, Tee und Mundspüllösungen ermöglichen nur eine geringe und kurzfristige Erleichterung bei Hyposalivation [van der Reijden *et al.* 1999]. Die Ursache liegt in der geringen Substantivität dieser Substanzen. Die Bestrebungen in der Entwicklung von Speichelersatzmitteln fokussierten daher auf die Verwendung diverser Verdickungsmittel. Ziel war es, sich den rheologischen, befeuchtenden und benetzenden Eigenschaften natürlichen Speichels maximal anzunähern [Vissink *et al.* 1986; Van der Reijden *et al.* 1994]. Seit diesen Anfängen wurde eine Vielzahl von Speichelersatzmitteln auf verschiedener Basis hergestellt: Carboxymethylcellulose (CMC), Natrium-Carboxymethylcellulose (Na-CMC), Carboxyethylcellulose (CEC), Hydroxyethylcellulose (HEC), tierisches Muzin, Leinsamenöl und -extrakten sowie Polyethylenoxid (PEO). Ein Großteil der kommerziellen Speichelersatzmittel fand eine

jeweils regionale Verbreitung. Studien zur Bewertung der Befeuchtungseigenschaften von verschiedenen Präparaten zeigen, dass sich diese oft nicht sehr voneinander unterscheiden. Im Vergleich zur Ausgangssituation wird die Hyposalivation generell durch alle Speichelersatzmittel verbessert. Die Bevorzugung einzelner Produkte zeigte sich in Untersuchungen individuell sehr unterschiedlich. Vermutet wird eine gute Handhabbarkeit als wichtiger Faktor für die Akzeptanz der Präparate [Momm *et al.* 2005]. Eine Korrelation zu unterschiedlichen Speichfließraten der Patienten wurde vermutet [van der Reijden *et al.* 1996], kann in der Literatur jedoch nicht bestätigt werden.

Im Vergleich zu zahlreichen Untersuchungen zur subjektiven Wirkung der Speichelersatzmittel sind in der zugänglichen Literatur nur wenige Studien zu den Auswirkungen der künstlichen Speichel auf die Zahnhartsubstanzen bekannt [Shannon und Edmonds 1978; Shannon *et al.* 1978; Vergo und Kadish 1981; Vissink *et al.* 1984; Joyston-Bechal und Kidd 1987; Johansson *et al.* 1994; Sweeney *et al.* 1997; Johansson *et al.* 2001]. Aus zahnmedizinischen Aspekten ist neben einem fehlenden Demineralisationseffekt ein Remineralisationseffekt erstrebenswert [Hatton *et al.* 1987; Kielbassa *et al.* 2001; Hahnel *et al.* 2009]. Es konnte gezeigt werden, dass kommerziell erhältliche Speichelersatzmittel ein nicht unbeachtliches demineralisierendes Potential auf die Zahnhartsubstanzen haben können [Joyston-Bechal und Kidd 1987; Kielbassa *et al.* 2001; Smith *et al.* 2001], darunter auch das im Großteil der deutschen Kliniken verbreitete Produkt Glandosane® [Meyer-Lueckel und Kielbassa 2002; Tschoppe *et al.* 2007]. Begründet wird dies mit seinem sauren pH-Wert von 5,3, dem geringen Kalzium- und Phosphatgehalt sowie dem Fehlen von Fluorid.

Bisher konnten die erwünschten remineralisierenden Effekte auf Zahnhartsubstanzen nur für ein kommerziell erhältliches Produkt (Oralube®, Orion Laboratories, Australien), welches auf dem europäischen Markt nicht erhältlich ist, aufgezeigt werden. Diese Wirkung wurde bei diesem Präparat auf den hohen Gehalt an Fluorid- bzw. Kalziumionen zurückgeführt. Hierdurch ist das Lösungsgleichgewicht dieser Ionen in Richtung des Hydroxylapatits verschoben. Eine weitere Steigerung der remineralisierenden Wirkung eines Speichelersatzmittels kann durch optimierte Konzentrationen an Kalzium-, Phosphat- und Fluoridionen ermöglicht werden. Die gewünschte Remineralisation von Schmelz konnte *in vitro* mit Leinsamen-, Muzin- und Carboxymethylcellulose-basierten experimentellen Lösungen erreicht werden [Meyer-

Lueckel und Kielbassa 2006; Meyer-Lueckel *et al.* 2006; Tschoppe *et al.* 2006; Tschoppe *et al.* 2006].

Das im Frühjahr 2006 auf dem deutschen Markt eingeführte Speichelersatzmittel Saliva natura (Fa. Medac, Hamburg, Deutschland), auf Basis pflanzlicher Muzine, zeigte in In-vitro-Versuchen ein neutrales Verhalten auf Schmelz [Tschoppe *et al.* 2007]. In Anlehnung an die strikten Zulassungskriterien für die Modifikation vorhandener Speichelersatzstoffe in Deutschland (German Act of Medical Devices), konnte ein höherer pH-Wert für Saliva natura (pH 5,98) nicht erzielt werden. Die Zugabe von Kalzium-, Phosphat-, und Fluoridionen zu einer Lösung mit saurem pH-Wert kann durch die Veränderung des Sättigungsgrades bezüglich Oktakalziumphosphat (OKP) und Hydroxylapatit (HA) zu einer Reduktion der demineralisierenden Wirkung führen [Meyer-Lueckel und Kielbassa 2006; Meyer-Lueckel *et al.* 2006].

In den nachfolgenden Untersuchungen wurde Saliva natura im Hinblick auf verschiedene OKP-Sättigungsgrade (1-3) modifiziert, um einen remineralisierenden Effekt zu erzielen. Die Ergebnisse zeigen bei einer experimentellen Lösung mit zweifacher OKP-Sättigung die höchste remineralisierende Wirkung in den Schmelzproben, die durch Sättigerungserhöhung der Lösungen nicht gesteigert werden konnte [Tschoppe *et al.* 2009]. Für die Berechnung der zugrunde liegenden Ionenkonzentrationen wurde IONPRODUCT [Shellis 1988] genutzt. Somit lassen sich die Sättigungsgrade im Hinblick auf die biologisch relevanten Kalziumphosphate während eines variierenden pH-Wertes und bei einer gegebenen Kalziumkonzentration bestimmen.

## 5 Ziel der Arbeit und Arbeitshypothese

Ziel dieser Studie war es, die Ergebnisse der vorangegangenen In-vitro-Untersuchungen *in situ* bei einem von Hyposalivation betroffenen Probandenkollektiv zu untersuchen. Dazu wurden das modifizierte Speichelersatzmittel Saliva natura (mit remineralisierenden Eigenschaften *in vitro*) und Glandosane<sup>®</sup> (mit demineralisierenden Eigenschaften *in vitro*) hinsichtlich ihrer Wirkung auf gesunden bovinen Schmelz und künstliche kariöse Schmelzläsionen untersucht.

Die primären Ziele dieser Studie waren die Messungen des Mineralverlustes und der Läsionstiefe von bovinen Schmelzproben nach einer In-situ-Exposition mithilfe der transversalen Mikroradiografie. Die Untersuchungsparameter waren der Mineralverlust ( $\text{Vol}\% \times \mu\text{m}$ ) sowie die Läsionstiefe ( $\mu\text{m}$ ) der Schmelzproben.

Die Hauptfragestellung befasste sich mit der Veränderung des Mineralgehaltes sowie der Läsionstiefe in den gesunden Schmelzproben nach einer Prüfphase von je 7 Wochen, in der das jeweilige Speichelersatzmittel im cross-over Design verwendet wurde. In den Nebenfragestellungen wurde die Wirkung der Speichelersatzmittel auf gesunde Schmelzproben nach einem Versuchszeitraum von 5 Wochen und auf künstliche kariöse Schmelzläsionen untersucht. Letztere simulierten das Vorhandensein kariöser Läsionen bei den Probanden und zielten neben dem möglichen kariespräventiven Effekt der Speichelersatzmittel auf einen möglicherweise kurativen Effekt, die Remineralisation bestehender Läsionen.

In der Nullhypothese wurde von keinen signifikanten Unterschieden an Mineralverlust/Läsionstiefe bei den gesunden Schmelzproben sowie künstlichen Kariesläsionen (jeweils verbundene Stichproben) zwischen der Anwendung von modifiziertem Saliva natura und Glandosane<sup>®</sup> ausgegangen.

In der Alternativhypothese wurden signifikante Unterschiede in Bezug auf die Auswertungsparameter Mineralverlust und Läsionstiefe in den verbundenen Stichproben, d.h. eine Demineralisation unter Verwendung von Glandosane<sup>®</sup>, angenommen. Bei modifiziertem Saliva natura wurde ein remineralisierendes Verhalten auf den Schmelz angenommen.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Ethikantrag und Fallzahlberechnung

Die vorliegende Studie orientiert sich am aktuellen Standard ärztlicher Ethik, beschrieben in der Deklaration von Helsinki (Version Seoul 2008). Vor Studienbeginn wurde ein Antrag auf zustimmende Bewertung einer klinischen Prüfung § 42 Abs. 1 Arzneimittelgesetz (AMG), § 7 Abs. 1 [Verordnung über die Anwendung der Guten Klinischen Praxis bei der Durchführung von klinischen Prüfungen von Arzneimitteln am Menschen (GCP-V)] bei der Ethikkommission des Landes Berlin (Landesamt für Gesundheit und Soziales; LaGeSo, Deutschland) zur Begutachtung des Prüfplanes, der Einwilligungserklärung (Anhang 11.8) und der Patienteninformation (Anhang, 11.9) eingereicht. Der Antrag auf Genehmigung einer klinischen Prüfung § 42 Abs. 2 Arzneimittelgesetz (AMG) wurde beim Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM, Bonn, Deutschland) unter der Vorlagennummer 4034842 gestellt. Die Studie wurde jeweils unter der EudraCT-Nr. 2008-005451-23 geführt. Die Erteilung eines positiven Votums zur Durchführung der Studie erfolgte durch beide Stellen.

Die Bestimmung der Fallzahl vor Studienbeginn erfolgte mittels nQuery Advisor (STATCON, Witzenhausen, Deutschland). Es wurde auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  getestet. Die Power des Tests sollte mindestens 0,8 betragen. Hieraus ergab sich eine minimale Fallzahl von  $n = 34$  Probanden (nQuery Advisor 3.0). Bei dieser Berechnung wurde in Anlehnung an die In-vitro-Untersuchungen von Tschoppe *et al.* (2009) von einem durchschnittlichen Mineralverlust von  $200 \text{ Vol\%} \times \mu\text{m}$ , mit einer Standardabweichung von  $400 \text{ Vol\%} \times \mu\text{m}$ , ausgegangen.

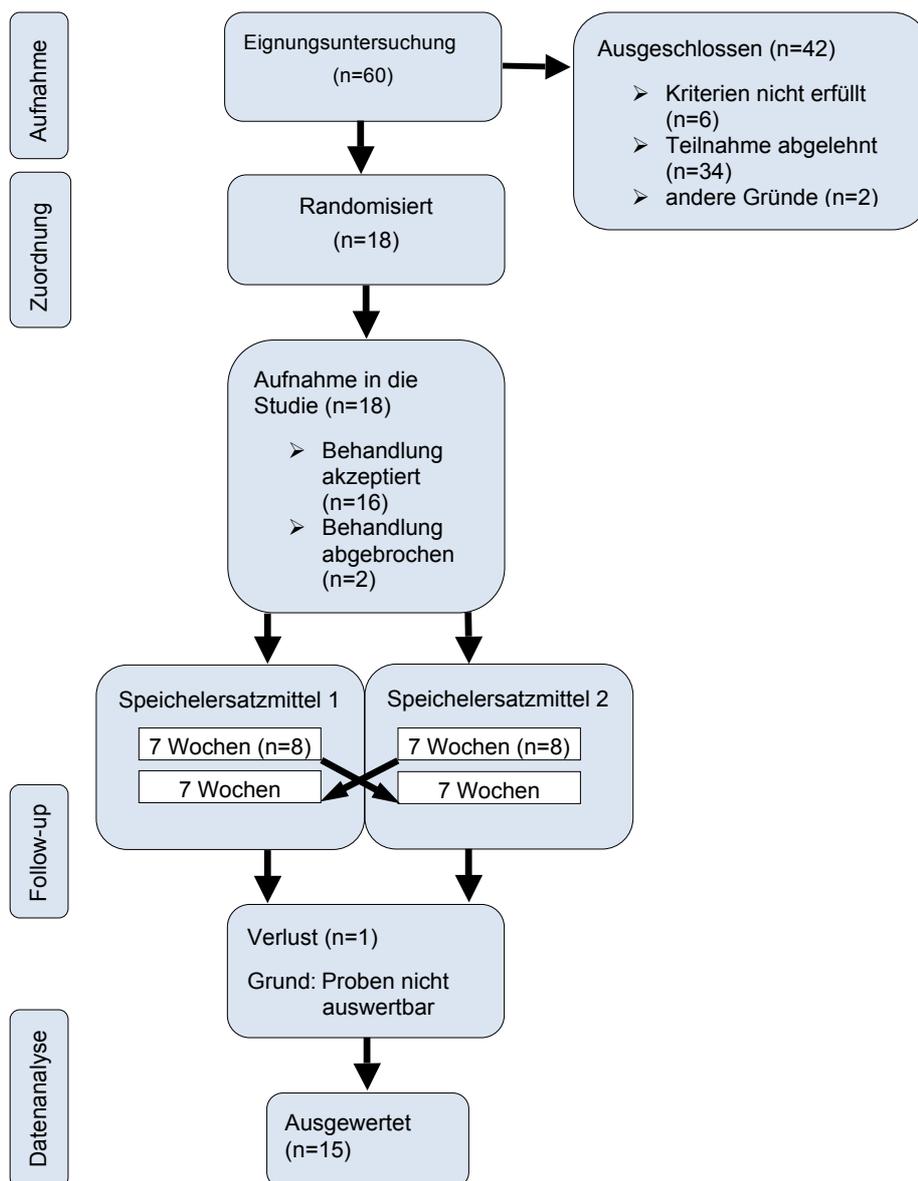
### 6.2 Probanden

Zur Studienteilnahme wurden 18 freiwillige Probanden, wohnhaft in Berlin, im Alter zwischen 43-74 Jahren ausgewählt, die eine unstimulierte Speichelfließrate von  $0,5 \text{ ml/min}$  ( $+ 0,12 \text{ ml/min}$ ) aufwiesen und mindestens in einem Kiefer einen herausnehmbaren Zahnersatz trugen. Als Probanden stellten sich vorrangig Patienten mit onkologischen Erkrankungen im Kopf-Hals-Bereich, nach Therapie in den Kliniken für Radioonkologie und Strahlentherapie des CharitéCentrum 14 für Tumormedizin-

Campus Benjamin Franklin (CBF) und Campus Virchow Klinikum (CVK), sowie im Vivantes-Klinikum Neukölln erfolgter Strahlentherapie, vor. Die Patientenrekrutierung erfolgte in Zusammenarbeit mit diesen Kliniken vorrangig durch Aushang und Auslage von Informationsmaterial, *bspw.* Plakaten und Informationsbroschüren sowie durch gemeinsame Teilnahme mit dem Studienarzt an den Patientensprechstunden (Klinik für Radioonkologie und Strahlentherapie des CBF und CCM). Interessierte Patienten nahmen in einer Eingangsuntersuchung an einem Screening teil. Unter Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien erfolgte der Ein- bzw. Ausschluss der Probanden in die/von der Studienteilnahme. Vor Beginn der Versuchsreihen erfolgte die schriftliche Einwilligung in die Studienteilnahme (siehe Einwilligungserklärung im Anhang, 11.8) durch jeden Patienten. Die Probanden wurden in einem Gespräch mit dem behandelnden Studienarzt über Wesen, Ziele, erwartete Vorteile und mögliche Risiken der Studie informiert. Eine Patienteninformation (siehe Patienteninformation im Anhang), die über den Sinn und Zweck der Studie aufklärte, wurde ausgehändigt. Diese enthielt zusätzlich Instruktionen hinsichtlich des Verhaltens während der Versuchsdurchführung. Das besondere Prothesenhandling während der Versuchsdauer wurde den Patienten demonstriert und eine schriftliche Anleitung ausgehändigt (siehe Anhang, 11.9). Vor der Einleitung von Studienmaßnahmen wurde den Patienten ausreichend Zeit und Gelegenheit gegeben (mind. 24 h) über ihre Studienteilnahme zu entscheiden und offene Fragen zu klären. Den Patienten war es jederzeit möglich, sich bei entstehenden Fragen und Problemen an die Studienärztin zu wenden und die Studienteilnahme ohne Angabe von Gründen zu beenden. Sämtliche patientenbezogenen Daten wurden in pseudonymisierter Form erfasst. Jeder Patient war durch eine Patientenummer, die bei der Registrierung zugewiesen wurde, unverwechselbar gekennzeichnet. Durch den Prüfarzt wurde eine vertrauliche Patientenliste geführt, in welcher die Kenndaten mit den vollen Patientennamen verbunden waren. Nach erfolgtem Einschluss des Patienten in die Studie wurde eine fortlaufende *Randomisierungsnummer* vergeben. Zu diesem Zweck wurde eine *Randomisierungsliste* geführt zu der nur der Studienhauptprüfer Zugang hatten. Das Prüfpräparat wurde bereits mit der entsprechenden *Randomisierungsnummer* von der Apotheke der Charité (Berlin, Deutschland) angefordert. Im Falle des Eintritts von Überempfindlichkeitsreaktion bei Anwendung des zu testenden Speichelersatzmittels, des Umstands therapeutischer Interventionen im Rahmen interkurrenter Erkrankungen, die durch den Prüfplan nicht zugelassen sind, andere signifikante Prüfplanverletzungen,

Kontaktverlust und Ortswechsel, sowie der persönliche Wunsch des Patienten, waren Kriterien für einen vorzeitigen Studienabbruch. Jede andere Situation, bei der nach Ansicht des Prüfarztes eine weitere Studienteilnahme nicht im Interesse des Patienten gewesen wäre, hätte ebenfalls zum vorzeitigen Abbruch der Studienteilnahme geführt.

### 6.3 Studiendesign



**Abb. 1** Flussdiagramm zum Ablauf der Studienphasen.

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine prospektive, vergleichende und randomisiert-kontrollierte In-situ-Studie der Phase II mit doppelblinder Art der Therapiezuordnung. Für die Zahl und Art der Vergleichsgruppen wurde ein cross-over Design gewählt (Abb. 9). Die Studienorganisation und Durchführung erfolgte unizentrisch in der Abteilung für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin des CharitéCentrums 3 für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin, Aßmannshauer Straße 4-6, 14197 Berlin.

#### 6.4 Einschluss- und Ausschlusskriterien

Die in der Tabelle aufgeführten Punkte stellen Kriterien für den Studieneinschluss sowie Studienausschluss dar.

**Tabelle I:** Kriterien für den Studieneinschluss/Studienausschluss

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patienten mit onkologischen Erkrankungen im Kopf-Hals-Bereich, bei denen eine Bestrahlungstherapie im Kopf-Hals-Bereich durchgeführt wurde</li> <li>• Männer und Frauen im Alter von 25 - 85 Jahren</li> <li>• unstimulierte Speichelfließrate <math>\leq</math> 0,5 ml/min (<math>\pm</math> 0,12 ml/ min)</li> <li>• durchgeführte Patientenaufklärung und schriftliche Einwilligung zur Teilnahme vor der ersten Studienmaßnahme</li> <li>• Minimale (geschätzte) Lebenserwartung &gt; 6 Monate</li> <li>• keine Parabenallergie</li> <li>• Kooperationsbereitschaft (Compliance) des Patienten</li> <li>• Erreichbarkeit des Patienten (geographische Nähe) für Behandlung und Follow-Up</li> <li>• keine Teilnahme an anderer Studie (3 Monate vor und während der Teilnahme)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schwangerschaft und Stillzeit</li> <li>• HIV-Infektion</li> <li>• akute Hepatitis B/C</li> <li>• fehlende Bereitschaft zur Speicherung und Weitergabe der persönlichen Krankheitsdaten im Rahmen des Prüfplans</li> <li>• keine schriftliche Einwilligung</li> <li>• Parabenallergie</li> <li>• gleichzeitige Teilnahme an einer anderen klinischen Studie</li> <li>• Personen, die aufgrund behördlicher oder gerichtlicher Anordnung in einer Anstalt untergebracht werden (§ 40 Abs. 1 S.3 Nr. 4 AMG)</li> <li>• Patienten, welche nachts nicht Ihre Prothese tragen</li> <li>• bekannte Überempfindlichkeiten gegen Inhaltsstoffe von Saliva natura und Glandosane® (Natriumbenzoat kann leichte Reizungen an Haut, Augen und Schleimhäuten auslösen)</li> </ul>

## 6.5 Intervention

Die zu Studienbeginn durchgeführte klinische Untersuchung jedes Patienten umfasste die Erhebung eines dentalen Befundes und anamnestischer Daten. Zu Beginn jeder Studienphase erfolgte die Ausgabe der jeweiligen Prüfmedikation sowie die Insertion von zwei bovinen Schmelzproben (Herstellung siehe 6.7, 6.8; Einbau siehe 6.9) in die Prothese, welche am Ende der Versuchsphase entfernt wurden. Zu Beginn und am Ende der jeweiligen Versuchsphase erfolgte die Messung der Ruhespeichelfließrate über einen Messzeitraum von 5 Minuten. Zwischen den beiden Versuchsphasen erfolgte eine einwöchige Wash-Out-Phase, in der die Probanden auf die Verwendung jeglicher Prüfmedikation verzichteten. Die Studienteilnahme des Patienten war am Ende des zweiten Behandlungszyklus abgeschlossen und umfasste insgesamt 15 Wochen. Die Datenerhebung erfolgte anhand von Prüfbögen (Dokumentationsbögen/Case Report Forms (CRF); siehe Anhang). Die Bögen wurden vom Prüfarzt ausgefüllt, datiert und unterschrieben der Studienzentrale (Abteilung für Zahnerhaltungskunde) zugeleitet. Nach Beendigung der In-situ-Exposition wurden im Labor Dünnschliffe der Schmelzproben hergestellt (Abb. 12), quantitativ mit der transversalen Mikroradiografie untersucht (siehe 6.13) und somit der Mineralverlust und die Läsionstiefe der bovinen Schmelzproben bestimmt.

## 6.6 Studienmedikation

Bei den verwendeten Prüfprodukten handelte es sich um das hinsichtlich der Kationen- und Anionenzugabe modifizierte Speichelersatzmittel Saliva natura (Medac, Wedel, Deutschland) sowie das kommerziell erhältliche Speichelersatzmittel Glandosane<sup>®</sup> (cell pharm, Bad Vilbel, Deutschland). Beide Prüfprodukte wurden durch die Apotheke der Charité bereitgestellt.

Das Prüfprodukt Glandosane<sup>®</sup> (cell pharm) auf Basis von Carboxymethylcellulose ist ein zugelassenes Arzneimittel (Zul. Nr.: 6072896.00.00, PZN 2699955). Als arzneilich wirksame Bestandteile enthalten 50 ml Glandosane<sup>®</sup> (cell pharm): 0,5075 g Carmellose-Natrium, 0,0609 g Kaliumchlorid, 0,0428 g Natriumchlorid, 0,0174 g Kaliummonohydrogenphosphat, 0,0074 g Calciumchlorid × 2H<sub>2</sub>O und 0,0026 g Magnesiumchlorid × 6H<sub>2</sub>O. Der Salz- und Ionengehalt ist in Tabelle III wiedergegeben. Das Medizinprodukt Saliva natura (Medac) setzt sich aus Extrakten der Yerba santa

(Eriodictyon crassifolium), Sorbitol, Xylitol, natürlichem Zitronenaroma, Ascorbinsäure, Natriumbenzoat, Natriumhydroxid und Zitronensäure zusammen. Die Modifikation von Saliva natura erfolgte durch die Apotheke der Charité durch die Zugabe von den entsprechenden Salzen und Natriumfluorid (Tabellen II und III).

In einem Herstellungsprozess wurden jeweils 25 Flaschen modifiziert (Tabelle II).

**Tabelle II:** Modifikation von Saliva natura

Zusatz zu 50 ml Saliva natura	Menge in mg
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	23,15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	22,85
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,62
NaF	0,21

**Tabelle III:** Konzentrationen der Ionen und die berechnete Sättigung der Inhaltsstoffe in Glandosane<sup>®</sup> und modifiziertem Saliva natura

Lösung	Sättigung				pH	Ionenkonzentration (mM)						
	DKPD	OKP	HA	CaF <sub>2</sub>		Ca	PO <sub>4</sub>	F	K	Cl	Na	Mg
Glandosane <sup>®</sup>	0.2	0.3	0.9	--	5.3	1.0	2.6	--	19.0	33.8	14.8	0.3
Saliva natura modifiziert	1.3	1.9	7.1	0.6	5.95	3.2	5.0	0.1	6.7	6.3	--	--

Abkürzungen: DKPD (Dikalziumphosphat-Dihydrat), OKP (Oktakalziumphosphat), HA (Hydroxylapatit), CaF<sub>2</sub> (Kalziumfluorid)

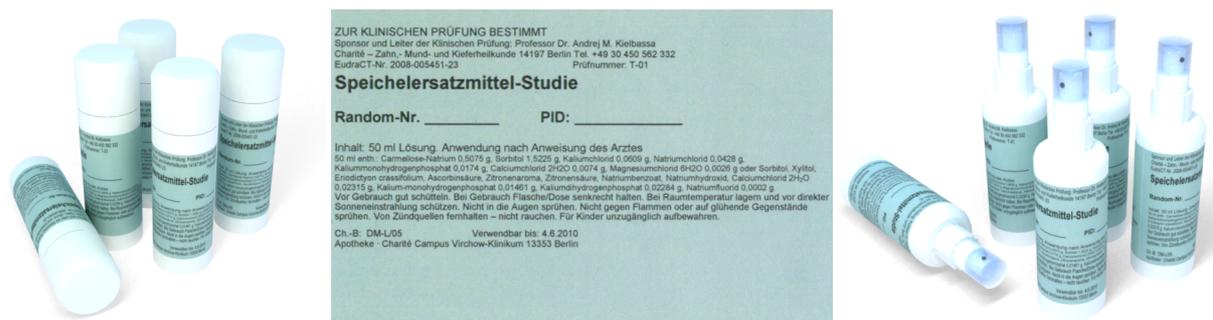
Die Herstellung erfolgte durch die Apotheke der Charité, in einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank unter Einhaltung der aseptischen Arbeitstechnik. Aus den Salzen wurden drei Stammlösungen (Tabelle IV) gefertigt und diese nacheinander den Flaschen zugesetzt.

**Tabelle IV:** Zusammensetzung der Stammlösungen

Stammlösung	Inhalt
1. Stammlösung (0,5 ml)	1,1575 g/ 25 ml CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O
2. Stammlösung (0,5 ml)	0,731 g/ 25 ml K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,1425 g/ 25 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
3. Stammlösung (0,05 ml)	0,1 M NaF-Lösung

Der Soll-pH-Wert der Prüfmedikation wurde mit 5,3-5,6 angegeben. Für die Verwendbarkeit beider Prüfprodukte wurde ein Haltbarkeitszeitraum von 7 Wochen festgelegt. Als Prüfpräparatbehältnisse für Glandosane<sup>®</sup> (cell pharm) wurden die Originalbehältnisse verwendet, die zur Gewährleistung der Verblindung durch Überlackieren der Spraydosen mit weißem Lack bearbeitet wurden. Das Volumen einer Flasche umfasste 50 ml. Die Aufbewahrung erfolgte im Prüfzentrum in den dafür vorgesehenen Medikamentenschränken. Jedes Prüfpräparat wurde durch die Apotheke der Charité mit einem Etikett versehen, welches entsprechend der Randomisierungsliste mit einem Zahlencode beschriftet wurde und zusätzlich Informationen über Verwendbarkeitsdauer-, Lagerungs-, Warn-, Anwendungs- und Aufbewahrungshinweise enthielt. Die Dosierung der Prüfmedikation durch den Patienten erfolgte bedarfsabhängig. Die Anwendung erfolgte durch Besprühen der Mund- und Rachenschleimhaut. Für die Produkte Glandosane<sup>®</sup> (cell pharm) und Saliva natura (Medac) werden von den Herstellern in den Fachinformationen, die bestimmungsgemäße Anwendung vorausgesetzt, keine Nebenwirkungen, Wechselwirkungen oder Gegenanzeigen angegeben. Unverträglichkeiten gegen die getesteten Prüfprodukte hätten bei Patienten mit Parabenallergie auftreten können, da beide Natriumbenzoat enthalten. Das Bestehen einer Parabenallergie wurde bei den Studienteilnehmern anamnestisch ausgeschlossen. Während der Versuchsreihen verwendeten die Probanden die fluoridfreie Zahnpasta Salviagalen (MADAUS, Köln, Deutschland). Diese enthält natürliche Wirkstoffe aus Fenchel, Thymian, Salbei, Pfefferminze, Kamille und Nelke. Die Packungsgröße umfasste 75 ml.

Die Dokumentation der Weitergabe der Prüfmedikation an den Patienten und die des Verbrauchs erfolgte schriftlich in den CRF-Bögen (siehe Anhang). Die Aufzeichnung über die Prüfmedikationszuteilung sowie den Ein- und Ausgang zwischen der Abteilung für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin und der Apotheke erfolgte durch den Prüfarzt. Der Ein- und Ausgang zwischen Studienärztin und Patienten erfolgte durch eine vom Prüfarzt beauftragte Zahnmedizinische Fachangestellte. Die Verblindung erfolgte durch die Apotheke der Charité. Die Sammlung unverbrauchter Flaschen und leerer Behältnisse erfolgte nach jeder Studienphase durch die Studienärztin. Nach Beendigung der Studie erfolgte die Vernichtung der Restbestände durch die Apotheke der Charité.



**Abb. 2** Verblindung und Etikettierung der Speichersatzmittel.

## 6.7 Gewinnung der Schmelzproben

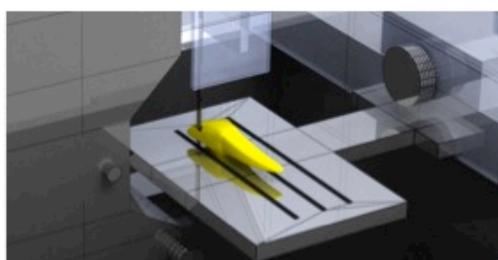
Für die Versuchsreihen wurden 540 mittlere sowie seitliche Frontzähne frisch geschlachteter Rinder verwendet (VION FOOD GROUP Hamburg, Anklam, Deutschland). Die extrahierten Zähne wurden gruppenweise in Gefrierbeuteln gesammelt und transportiert, wodurch die Zuordnung der Zähne zum Individuum (Rind) gewährleistet wurde. Das negative Testergebnis (BSE-Schnelltest) aller am Vortag entnommenen Proben wurde durch das zuständige Fleischhygieneamt (Landkreis Ostvorpommern, Deutschland) bestätigt. Das anhaftende Weichgewebe und der parodontale Faserapparat wurden vorsichtig unter Verwendung von Einmalskalpellen (Feather Disposable Scalpel No. 15; Feather Safety Razor, Osaka, Japan) entfernt. Die gereinigten Zähne eines Rindes wurden in je einem mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 % Spüllösung; Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) befülltem Zentrifugenröhrchen (Falcon-Röhrchen 50 ml; VWR, Darmstadt, Deutschland) bei Zimmertemperatur gelagert.



**Abb. 3** Lagerung der Zähne und Zahnproben eines Individuums/einer Gruppe.

Die Gruppeneinteilung erfolgte entsprechend der Individuenanzahl (die 4 extrahierten Zähne eines Rindes bildeten eine Gruppe). Die Benennung der Zähne erfolgte gemäß der Fédération Dentaire Internationale (FDI). Zunächst wurden die Wurzelspitzen mit einer 0,2 mm Bandsäge (EXAKT Trennschleifsystem 300 cl; EXAKT, Norderstedt, Deutschland) entfernt. Die Pulpen wurden über den apikalen Zugang mit Reamern und Hedströmfeilen (VDW, München, Deutschland) manuell entfernt. Es folgte die Trennung der Zahnkrone von der Wurzel unter erneuter Verwendung der Bandsäge (EXAKT). Zur Probengewinnung wurde zunächst ein Schnitt entlang der mesialen oder distalen Schmelzleiste durchgeführt und der Zahn anschließend unter frontaler Schnitfführung in einen ventralen sowie dorsalen Kronenteil getrennt. Der orale Anteil der Zahnkrone wurde verworfen. Aus der erhaltenen Vestibulärfläche wurden 1 oder 2 Proben durch Sägen unter ständiger Wasserkühlung gewonnen. Jede gewonnene Probe wurde in ein Falcon-Röhrchen (VWR) des zugehörigen Zahnes sortiert.

Die weitere Formgebung durch Begradigung der Schnittflächen und Parallelisierung der Probenkanten zueinander sowie die Schaffung einer ebenen Probenoberfläche erfolgte an einer Schleif- und Poliereinheit (Phoenix Alpha Poliermaschine; Buehler, Düsseldorf, Deutschland) mit zuvor gewässertem Siliziumcarbid-Nassschleifpapier (Hermes Schleifmittel, Hamburg, Deutschland) mit zunehmender Körnung (1200, 2500, 4000) unter permanenter Wasserkühlung. Bei diesem Bearbeitungsvorgang wurde die Schaffung einer Mindestdicke an Schmelzschicht von 1 mm berücksichtigt. Die Proben wiesen eine durchschnittliche Größe von  $5 \times 4 \times 3 \text{ mm}^3$  auf.



0,2 mm Bandsäge

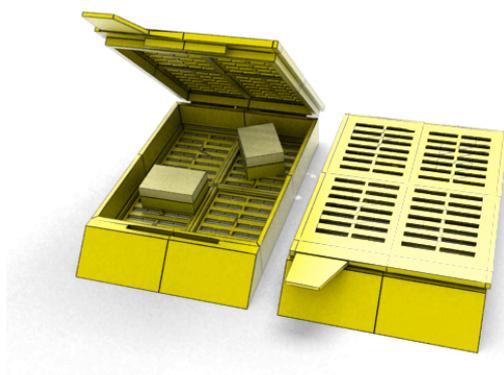
Herauspräparierte Proben aus der  
Fazialfläche der bovinen Zähne

**Abb. 4** Herauspräparieren der Schmelzproben aus den Fazialflächen der Zähne.

Die hergestellten Proben wurden nach tupfender Trocknung der Oberflächen mittels Zellstoffstücken (Pur-Zellin; Paul Hartmann, Heidenheim, Deutschland) makroskopisch betrachtet, und ungeeignete Proben wurden aussortiert. Kriterien, die zum Ausschluss von Proben von der Weiterverarbeitung führten, waren die Unterschreitung einer

Probenmindestgröße, Mindestschmelzdicke, das Vorhandensein unkorrigierbarer Schliffacetten, Oberflächensprünge, Verfärbungen und oberflächliche Demineralisationen. Der Ausschluss von Proben nach mikroskopischer Betrachtung (OLYMPUS SZH10 RESEARCH STEREO HIGH LIGHT 3000; Tokyo, Japan) bei 2-2,5facher Vergrößerung erfolgte nach denselben Kriterien.

Die Proben wurden in Vorbereitung zur Sterilisation in zuvor handgravierte Uni-Cassettes (Tissue Tek slotted cassette; Sakura Finetek, Staufen, Deutschland) sortiert. Die voruntersuchten Proben wurden im Deutschen Herzzentrum mit Ethylenoxid bei 55°C gassterilisiert (Charité-Campus Virchow Klinikum, EMEA/410/01 Rev.2) und anschließend für vier Wochen in steriler Kochsalzlösung aufbewahrt, um eventuell verbliebene Reste des Ethylenoxides auszuwaschen.

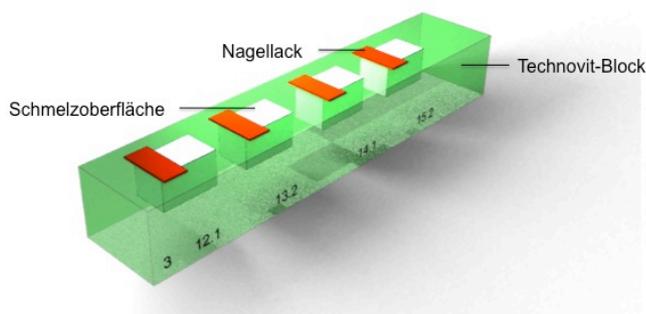


**Abb. 5** Tissue Tek Cassette mit Schmelzproben.

## 6.8 Demineralisation und Sterilisation der Schmelzproben

Die Hälfte aller verwendeten Schmelzproben wurde nach Abdeckung des Referenzfeldes mittels Nagellack demineralisiert (siehe Testfeldgestaltung, 6.11). Pro Zahn wurde eine Schmelzprobe demineralisiert. Dazu wurden die Schmelzproben in Gruppen von 4 Proben in Kunststoffblöcken eingebettet. Die Proben wurden längs und im Abstand von 2-3 mm voneinander, mit ihren Oberflächen auf den Boden ausgerichtet, in eine dafür angefertigte Silikonform gelegt und diese mit fließfähigem kaltpolymerisierenden Kunststoff aufgefüllt (Technovit 4071; Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland). Die ausgehärteten Blöcke wurden den Formen entnommen und ein Drittel der Probenoberfläche wurde über den Demineralisationsprozess hinweg durch Abdeckung mit Nagellack (Jet-Set; L'Oréal, Paris, Frankreich) und zusätzlich mit einer

Schicht dünnfließendem Composite (Tetric EvoFlow<sup>®</sup>; Ivoclar Vivadent, Ellwangen, Deutschland) vor der Demineralisationslösung geschützt (Kontrollbereich gesund).



**Abb. 6** Einbettung der Proben vor Einlegen in die Demineralisationslösung.

Alle Proben wurden zeitgleich in der Demineralisationslösung [Buskes *et al.* 1985] (Tab. V) gelagert und dort bei 37 °C im Wärmeschrank (Venticell; Planegg, Deutschland) für 14 Tage belassen.

**Tabelle V:** Zusammensetzung der Demineralisationslösung nach Buskes *et al.* (1985)

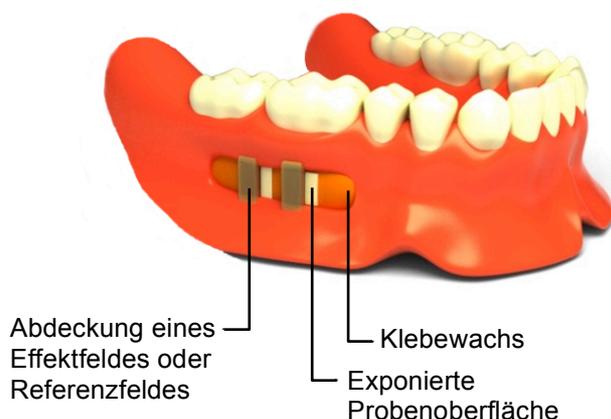
Inhaltsstoff	Konzentration in mmol/l		Menge
F <sup>-</sup>	0,1 M	Standardlösung	0,53 ml
Ca <sup>2+</sup>	2,2 mM	CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O	1616,6 mg
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	2,2 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1500 mg
CH <sub>3</sub> COOH	50 mM	Essigsäure	14,3 ml
KOH ad pH 5	10 M		ca. 23,5-24 ml

zusammen  
5 l

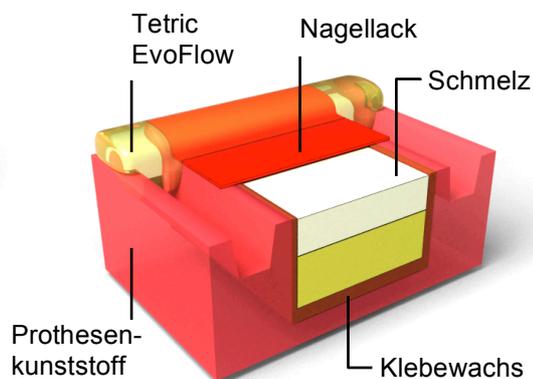
Für die genaue Mengenbestimmung der Inhaltsstoffe diente eine Analysewaage (Typ AG204; Mettler, Gießen, Deutschland). Der pH-Wert der Lösung wurde täglich überprüft (pH/Redox-/Temperatur-Messgerät GMH 3510; Greisinger, Regenstauf, Deutschland) und im Falle einer Abweichungen von einem Sollwert von pH 4,9 durch Zugabe geringer Mengen Kaliumhydrogenphosphat angehoben (und analog dazu durch Essigsäure abgesenkt). Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bis zum Einbringen in die Apparaturen in 0,9%-iger Kochsalzlösung.

## 6.9 Probeninsertion in den herausnehmbaren Zahnersatz

Die Proben wurden vor dem Einsetzen in die Patientenprothese mit Hilfe einer Bandsäge (EXAKT) und der Polier- und Schleifmaschine (Labopol 25; Struers, Willich, Deutschland) aus den Kunststoffblöcken gelöst. Die Auswahl der verwendeten Schmelzproben erfolgte nach den gegebenen Platzverhältnissen in der Patientenprothese. Im vestibulären Bereich des Prothesensattels wurden ebenfalls in Abhängigkeit von den jeweiligen Platzverhältnissen manuell Vertiefungen zur Probenaufnahme gefräst. Die Proben wurden allseitig unter Aussparung der Oberflächen mit Hilfe von Klebewachs (Supradent; Oppermann-Schwedler Chemisches Dentallabor, Bonn, Deutschland) in den Vertiefungen befestigt (Abb. 7). Die Probenoberflächen wurden entsprechend der Referenzfeldgestaltung (Abb. 10 und 11) mit Nagellack abgedeckt. Oberhalb und unterhalb der Fräsungsvertiefung wurden mittels Rosenbohrer kleine Unterschnitte geschaffen, die der Verankerung von fließfähigem Kunststoff (Tetric EvoFlow®; Ivoclar Vivadent, Deutschland) dienen, der über dem Nagellack des jeweiligen Referenzfeldes aufgetragen (Abb. 8) und mittels Halogen-Lampe (Curing Light XL 1500; 3M Dental Products, Neuss, Deutschland) polymerisiert wurde.



**Abb. 7** Schematische Darstellung der Probenanordnung in der Prothese.

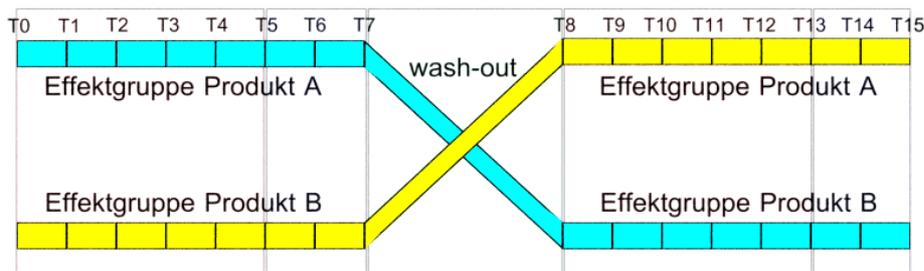


**Abb. 8** Detaillierte Darstellung der Probenbefestigung im Prothesenkunststoff.

## 6.10 In-situ-Exposition

Die Verwendung der Prüfprodukte erfolgte nach dem in Abbildung 9 dargestellten

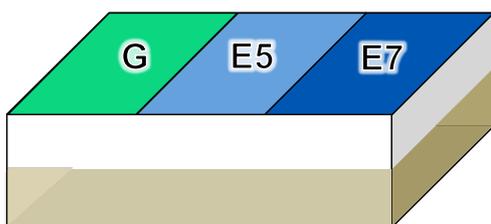
zeitlichen Verlauf.



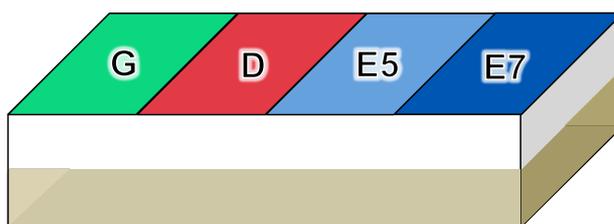
**Abb. 9** Zeitlicher Untersuchungsverlauf der beiden Effektgruppen.

### 6.11 Testfeldgestaltung

Vor der Probenexposition in der Mundhöhle erfolgte bei den gesunden sowie bei den künstlich demineralisierten Schmelzproben durch Abdeckung die Schaffung eines Referenzfeldes, welches bei der Auswertung als Kontrolle diente. Dieses Kontrollfeld umfasste bei den gesunden Proben (Kontrolle gesund, G; Abb. 10) ein Drittel der Probenlänge. Das Kontrollfeld der künstlich demineralisierten Proben wurde nach der Lagerung in der Demineralisationslösung um einen Anteil des demineralisierten Bereiches erweitert, so dass gesunder Schmelz (G) und demineralisierter Schmelz (D) als Kontrolle dienten (Abb. 11).



**Abb. 10** Schema Testfeldgestaltung der gesunden Schmelzoberfläche.



**Abb. 11** Schema Testfeldgestaltung mit künstlichen Schmelzläsionen.

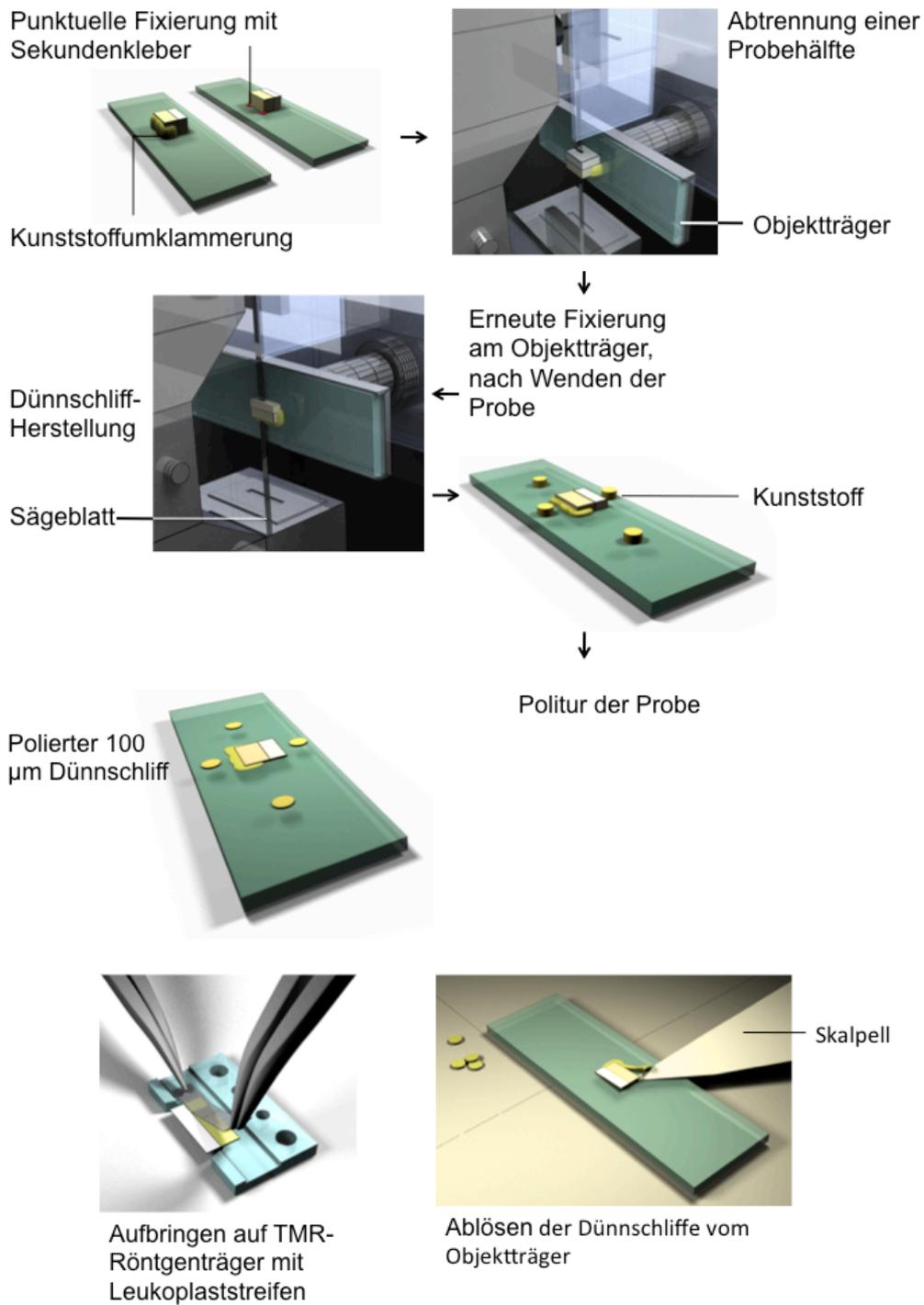
Die Schaffung des ersten Effektfeldes erfolgte bei allen Proben nach 5-wöchiger Expositionszeit (Effektfeld E5) durch Abdeckung mittels Nagellack und Tetric EvoFlow® (Ivoclar Vivadent). Die Erzeugung des zweiten Effektfeldes (E7) erfolgte in dem Probenbereich, der über die gesamte Expositionszeit in Kontakt mit der Mundhöhle stand und direkt neben dem ersten Effektfeld lag. Die Entnahme der Proben erfolgte nach den sieben Wochen einer vollständigen Versuchsphase. Für das Einbringen der

Schmelzproben in Versuchsphase II wurden die identischen Fräsungen in den Prothesensätteln verwendet, welche für den Zeitraum der Wash-out-Phase vorübergehend mit Klebewachs (Supradent; Oppermann-Schwedler) verschlossen wurden. Das Einbringen der Schmelzproben zu Beginn der zweiten Versuchsphase erfolgte analog zur Phase I.

## 6.12 Herstellung von Dünnschliffen

Nach Beendigung der In-situ-Exposition erfolgte die vorsichtige Entnahme der Proben aus den Patientenprothesen, wobei jede einzelne Probe in ein separates Falcon-Röhrchen (VWR) überführt wurde, dessen Beschriftung Auskunft über die Herkunft, Lage, Positionierung in der Prothese gab und die Zuordnung zur jeweiligen Versuchsphase garantierte. Die Proben wurden manuell von eventuell noch anhaftenden Klebewachsspuren gereinigt und anschließend mittels Cyanatkleber (Henry Schein, Melville, U.S.A.) einzeln auf je einen Plexiglas-Objektträger (Fa. diaplus, Oststeinbek, Deutschland) aufgeklebt, wobei darauf geachtet wurde, dass der Kleber nicht in den Bereich des Schmelzes gelangte. Anschließend wurden die Proben im Bereich des Dentins mit fließfähigem Composite (Tetric EvoFlow<sup>®</sup>; Ivoclar Vivadent) auf dem Objektträger gefasst. Im Folgenden wurde ein Längsschnitt von einem Drittel Probenbreite unter kontinuierlicher Wasserkühlung mittels Bandsäge (EXAKT) abgetrennt und gesondert aufbewahrt. Zur Schaffung einer planen Schmelzoberfläche, die im rechten Winkel zur Probenschnittfläche steht, wurde der Objektträger mit dem darauf verbliebenen Probenteil in die Haltevorrichtung der Exakt Schleifmaschine eingebracht und die Probenoberfläche mittels Siliziumcarbidschleifpapier mit zunehmender Körnung von 2500 bis 4000 (Hermes Schleifmittel, Hamburg, Deutschland) poliert. Der auf dem Objektträger verbliebene Probenanteil wurde vorsichtig unter Zuhilfenahme eines Skalpells abgelöst und die polierte Seitenfläche der Probe wurde erneut unter Verwendung von Cyanatkleber (Henry Schein) auf einem Objektträger fixiert. Unter Wasserkühlung erfolgte die Schnittbildung mit einer diamantierten Bandsäge (EXAKT), so dass ein planparalleler Schnitt von ca. 250 µm Dicke auf dem Objektträger verblieb. Symmetrisch um den Probenschnitt herum wurden 4 Composite-Tropfen (Tetric EvoFlow<sup>®</sup>; Ivoclar Vivadent) auf den Objektträger appliziert und durch einen zweiten Objektträger in der Höhe der Schnittdicke angepasst. Diese Vorgehensweise ermöglichte es, während des sich anschließenden Poliervorgangs

(EXAKT) eine konstante Dicke innerhalb eines Schnittes zu erzeugen. Schnitte mit einer genormten Enddicke von  $100\ \mu\text{m}$  (abweichend plus/minus  $10\ \mu\text{m}$ ) wurden somit erzeugt. Der beschriebene Herstellungsprozess der Schmelzdünnschliffe gewährleistete eine Schnittebenenbildung längs durch die Zentren der Proben.



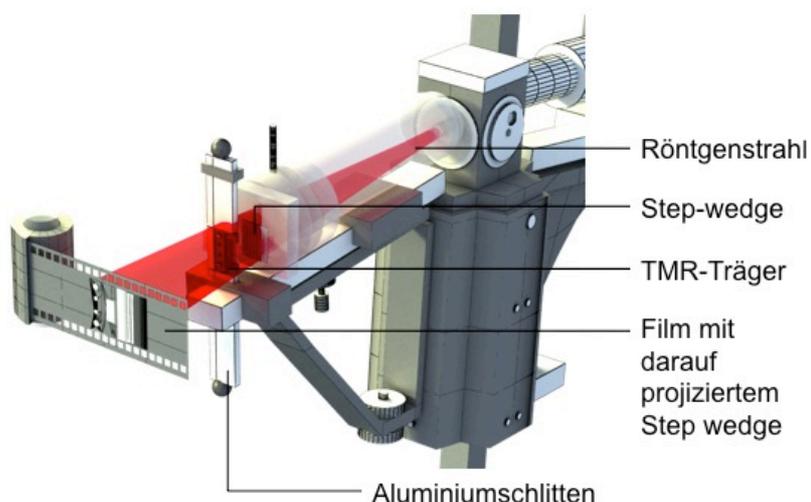
**Abb. 12** Herstellung der Dünnschliffe aus den Proben.

### 6.13 Mikroradiografische Auswertung (TMR)

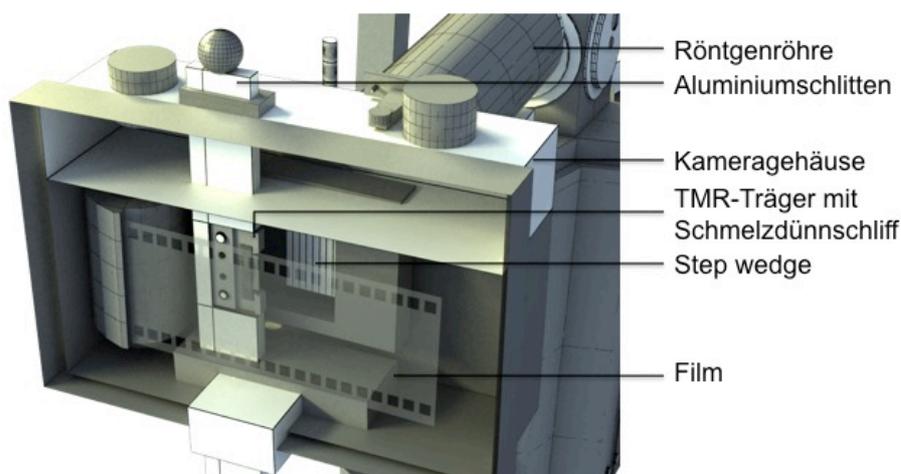
Die einheitliche Dicke der Schmelzdünnschliffe wurde durch Messung mit einer digitalen Mikrometermessschraube (Bügelmessschraube Digimatic; Mitutoyo, Kawasaki, Japan) kontrolliert. Anschließend erfolgte die Vorbereitung für die mikroradiografische Darstellung (TMR) der Schliffe. Dazu wurden die polierten Proben unter Zuhilfenahme von Einwegskalpellens aus der Kunststoffumklammerung gelöst, vorsichtig von den Objektträgern abgehoben und anschließend mit schmalen Leukofixstreifen (BSN medical GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland) auf speziellen Probenhaltern fixiert (TMR Probenhalter; Plano, Wetzlar, Deutschland). Jeder Dünnschliff erhielt einen Probenhalter. Die am Probenhalter befestigten Dünnschliffe wurden unverzüglich vor der Ablichtung vorsichtig tupfend mittels Zellstoffstücken (Pur-Zellin; Paul Hartmann, Heidenheim, Deutschland) getrocknet. Der Probenhalter mit dem daran befestigten Dünnschliff wurde anschließend in eine dafür vorgesehene Aufnahmevertiefung eines Aluminiumschlittens eingebracht, der als Einschubvorrichtung Bestandteil eines linsenlosen Fotoapparatgehäuses war. Der Schlitten ermöglichte die sichere Positionierung der Dünnschliffe in Relation zum im Kameragehäuse befindlichen Film sowie zu einer auf Höhe des Filmes befindlichen Eichterappe. Der auf dem Probenhalter befindliche Dünnschliff wurde gemeinsam mit der Aluminium-Eichterappe (step wedge) auf den Film projiziert. Die Aluminiumeichterappe bestand aus 10 unterschiedlich dicken Aluminiumfolien mit einer zum Probenhalter abnehmenden, jeweils definierten Schichtstärke, deren Strahlenabschwächungskoeffizienten mit Hydroxylapatit vergleichbar waren. Im Mikroradiogramm konnte jedem Grauwert ein definierter Mineralgehalt zugeordnet werden. Das Kameragehäuse war mit der Objektivseite am Röntgentubus des Röntgengenerators angekoppelt. Als Röntgenstrahler diente eine vertikal angebrachte Röntgenröhre (PW 1730; Phillips, Kassel, Deutschland). Die Röntgenstrahlenemission ging von einer Kupferanode mit Nickelfilterung aus. Der Wechsel der Dünnschliffe erfolgte bei geschlossen gehaltenem Kameragehäuse, durch Herausziehen des Aluminiumschlittens, Einsetzen des Probenhalters und Einschoben des Schlittens in das Kameragehäuse bis auf Anschlag. Die Aufnahmen erfolgten bei einer Röhrenspannung von 20 kV und einem Röhrenstrom von 20 mA und einer Belichtungszeit von 10 Sekunden. Ein hochempfindlicher, hochauflösender holografischer Film wurde verwendet (Motion Picture safety film fine grain positive film

71337; FUJIFILM Corporation, Tokio, Japan), der in einer lichtundurchlässigen Kassette auf eine handelsübliche Filmrolle manuell aufgezogen wurde. Die Filmrolle wurde in das Kameragehäuse eingelegt und die Kamera im Folgenden geschlossen.

Nach jeder erfolgten Aufnahme wurde der Film bei geschlossenem Kameragehäuse weitergekurbelt. Die abgelichteten Schlitze wurden anschließend vorsichtig mit einer Pinzette samt Leukofixstreifen vom Probenhalter gelöst und für je einen Patienten in einer Versuchsphase auf einen Objektträger geklebt und dieser in ein mit Wasser gefülltes Falcon-Röhrchen gebracht.



**Abb. 13** TMR-Gerät mit schematisiertem Röntgenstrahl.

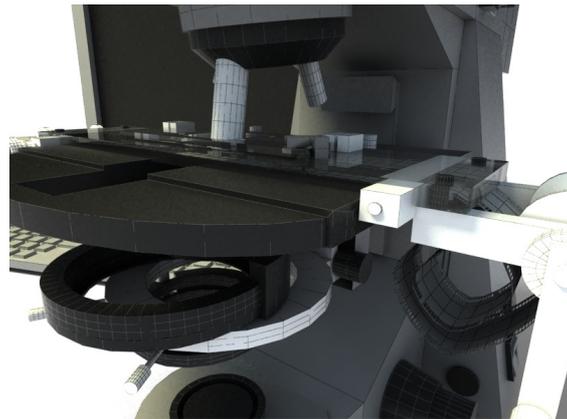


**Abb. 14** Detailansicht des Kameragehäuses.

Die entwickelten mikroradiografischen Filme wurden mit einem Durchlichtmikroskop (Durchlichtmikroskop 60318; Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und einer daran angeschlossenen Videokamera (CCD-Videokamera Modul XC 77CE; Sony, Tokio, Japan) untersucht (Abb. 15).



**Abb. 15** Stereomikroskop mit Filmhalterung.



**Abb. 16** Detaildarstellung der Filmhalterung.

Die Ermittlung der Läsionstiefe und des Mineralverlustes erfolgten mit dem Programm Transversal Micro Radiography (TMR für Windows Version 2.0.27.2; Inspektor Research System, Amsterdam, Niederlande). Nach Fokussierung des zu messenden Bereiches erfolgte zunächst die Adjustierung der Lichtintensität. Vor Messbeginn wurde für jede Probe eine Kalibrierung durchgeführt. Hierfür wurde mit der Software ein Schmelzbereich von durchschnittlich  $300 \times 300 \mu\text{m}^2$  aus dem Kontrollfeld (G, Abb.10 und 11) ausgewählt und mit verschiedenen Graustufen des step wedge verglichen, um den Grauton des Schmelzes im Kontrollbereich (G) festzulegen. Der Mineralgehalt von gesundem Schmelz wurde bei 80 Vol% festgesetzt. Die Mineralverlust- und Läsionstiefenmessungen wurden entsprechend der Testfeldgestaltung bei den gesunden Proben (Abb. 10) in drei und bei den Proben mit *in vitro* erzeugtem Läsionsbereich (D, Abb. 11) in vier ausgewählten Bereichen durchgeführt. Die Distanz in  $\mu\text{m}$  von der Probenoberfläche bis zu einem Schmelzbereich mit 95% des gesunden Mineralgehaltes wurde als Läsionstiefe definiert. Die Messung begann ab 20 Vol%. Der Mineralverlust wurde in  $\text{Vol}\% \times \mu\text{m}$  angegeben und entsprach dem Unterschied

zwischen der Mineraleichte des Kontrollfeldes (G) und des jeweils gemessenen Effektfeldes (D, E5, E7).

#### **6.14 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem computergestützten Statistikprogramm (PASW 18; SPSS München, Deutschland). Nach In-situ-Exposition wurden die Schmelzproben hinsichtlich der Mineralverluste in Vol%  $\times$   $\mu\text{m}$  und der Läsionstiefe in  $\mu\text{m}$  untersucht. Es erfolgte eine multiple Testung der verbundenen Stichprobenpaare zu den Zeitpunkten  $t = 0$  (G oder G und D),  $t = 5$  (E5) und  $t = 7$  (E7) Wochen innerhalb einer Prüfmedikationsgruppe (Glandosane<sup>®</sup>/modifiziertes Saliva natura). Die Mediane der Parameter Mineralverlust und Läsionstiefe wurden mit Hilfe des Rangsummentestes nach Wilcoxon verglichen. Die Ergebnisse der Hauptfragestellung wurden der Bonferroni-Korrektur unterzogen, das Signifikanzniveau  $\alpha = 5\%$  (p-Wert) durch vier dividiert. Für die Nebenfragestellungen wurde ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 5\%$  festgelegt.

## 7 Ergebnisse

16 Probanden durchliefen die beiden Versuchsarme bis zum Ende. 2 Probanden brachen vor Abschluss des Versuchszeitraumes die Studienteilnahme aufgrund Ihrer Krebserkrankung ab. Die Proben eines weiteren Probanden konnten wegen unsachgemäßen Umgangs (massive Putzdefekte auf den Probenoberflächen) nicht ausgewertet werden. Das Verhältnis von Männern zu Frauen unter den Studienteilnehmern betrug 9:6. Der Mittelwert des Patientenalters lag bei 66,27 (SD 8,89) Jahren.

### 7.1 Ergebnisse der TMR-Untersuchung

#### 7.1.1 Hauptfragestellung

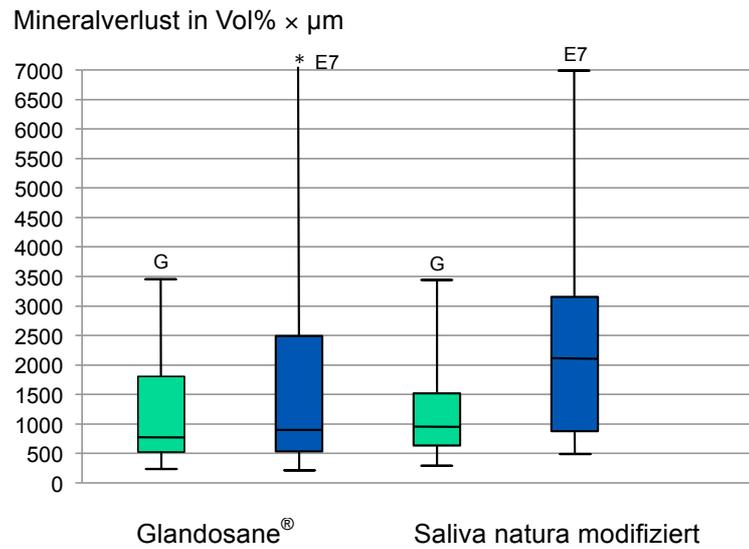
##### **Ergebnisse der TMR-Analyse gesunder Schmelzproben nach 7 Wochen unter Anwendung von Speichelersatzmitteln**

Die Messwerte der untersuchten Parameter Läsionstiefe und Mineralverlust zeigten innerhalb der untersuchten Stichproben keine Normalverteilung (Mineralverlust:  $p = 0,100$ ; Läsionstiefe:  $p = 0,399$ ; Kolmogorov-Smirnov-Test).

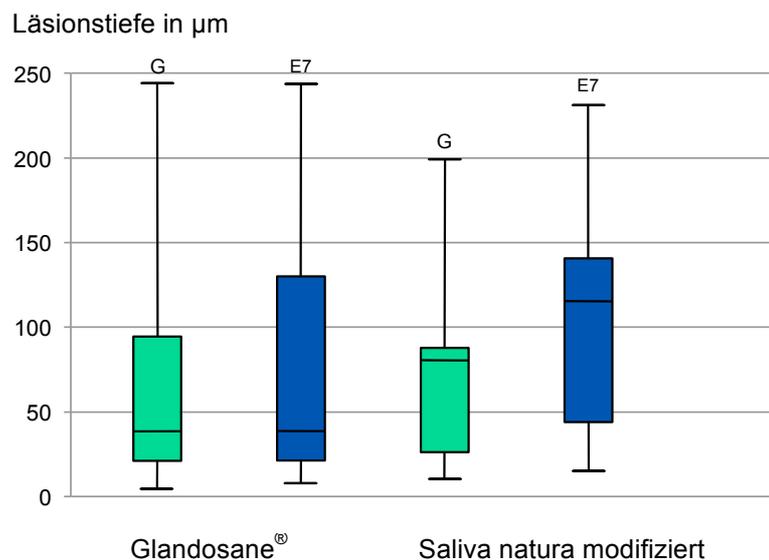
Unter Verwendung von Glandosane<sup>®</sup> zeigte sich über den Versuchszeitraum von 7 Wochen kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Mineralverlust ( $p = 0,570$ ; Wilcoxon-Test) und die Läsionstiefe ( $p = 0,910$ ) gegenüber den Ausgangswerten.

In der Vergleichsgruppe, unter Anwendung von modifiziertem Saliva natura, zeigte sich nach sieben Wochen eine Demineralisation gesunder Schmelzoberflächen. Ein signifikant größerer Mineralverlust ( $p = 0,012$ ; Wilcoxon-Test) und eine signifikante Vergrößerung der Läsionstiefe ( $p = 0,047$ ) im Vergleich zu den Ausgangswerten konnten gezeigt werden (Abb.17 und 18).

Die Messwerte der Mineralverluste und Läsionstiefen der Hauptfragestellung sind in Tabelle VI dargestellt.



**Abb. 17** Boxplots der Veränderungen des Mineralverlusts nach 7 Wochen Versuchsdauer (E7 dunkelblaue Farbe) unter Glandosane® und modifiziertem Saliva natura im Vergleich zu den Kontrollfeldern (G, grüne Farbe); der Maximalwert für E7 (\*) unter Glandosane® ist nicht in der Darstellung enthalten.

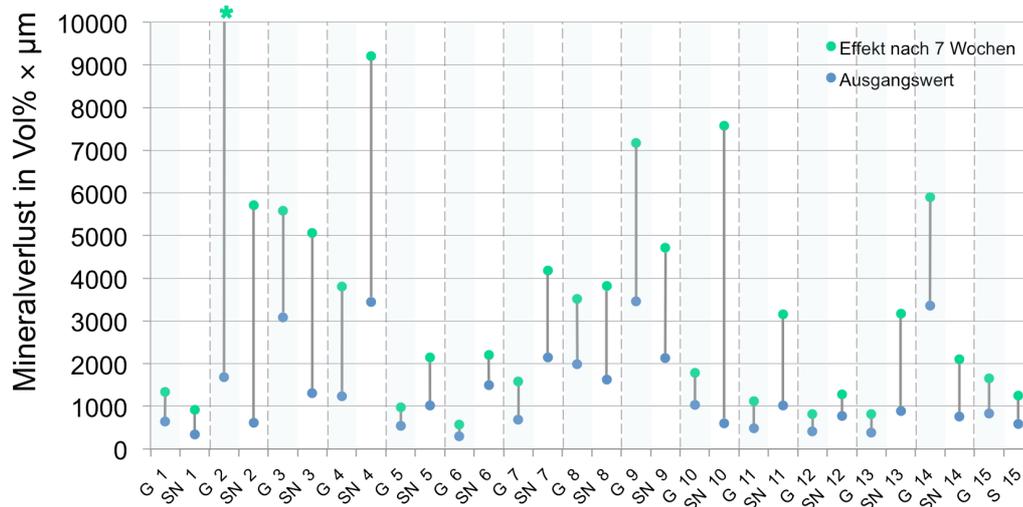


**Abb. 18** Boxplots der Veränderungen der Läsionstiefe nach 7 Wochen Versuchsdauer (E7, dunkelblaue Farbe) unter Glandosane® und modifiziertem Saliva natura im Vergleich zu den Kontrollfeldern (G, grüne Farbe).

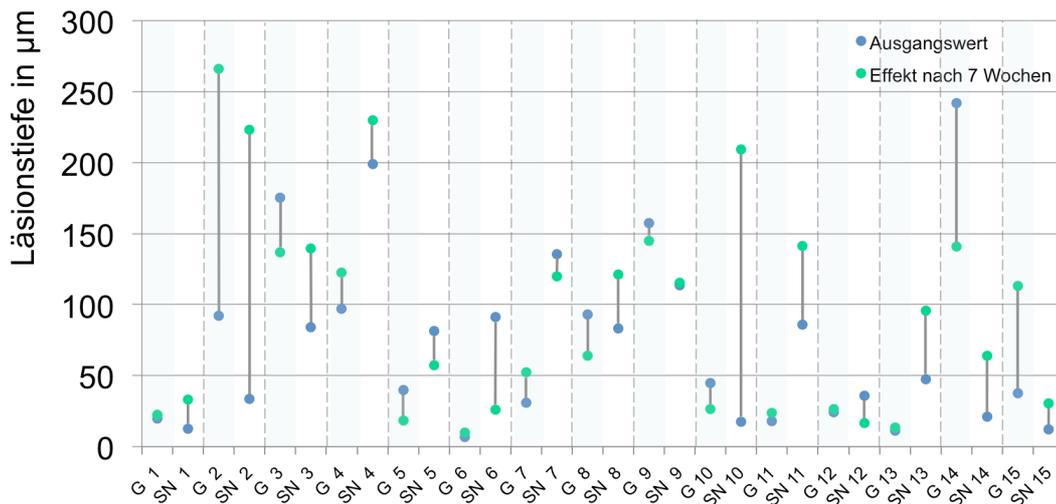
**Tabelle VI:** Veränderung der Mineralverluste und Läsionstiefen nach 7 Wochen Versuchsdauer unter Glandosane® und modifiziertem Saliva natura

Testfeld		G (gesund)		E7 (Effektfeld nach 7 Wochen)		
		Mineralverlust (Vol% × µm)	Läsionstiefe (µm)	Mineralverlust (Vol% × µm)	Läsionstiefe (µm)	
Speichersatzmittel	Glandosane®	MW	1341,39	72,65	2574,40	78,73
		Median	829,10	39,80	901,70	52,20
		St.AW	1123,21	70,11	4711,84	73,20
	Saliva natura modifiziert	MW	1250,24	70,29	2518,77	108,17
		Median	1015,50	81,20	2145,40	115,40
		St.AW	818,94	52,67	2017,61	71,80

Es wurden große Streuungen im Bezug auf den Mineralverlust (Abb. 19) und die Läsionstiefe (Abb. 20) innerhalb eines Patienten zwischen beiden Speichersatzmitteln festgestellt, wie auch große Messunterschiede zwischen den einzelnen Probanden unter Verwendung desselben Speichersatzmittels (Abb. 19 und 20).



**Abb. 19** Veränderung des Mineralverlusts in Vol% × µm zwischen gesunder Probenoberfläche (Ausgangswert, blaue Punkte) und Probenoberfläche nach 7 Wochen (grüne Punkte) für Glandosane® (G) und Saliva natura modifiziert (SN) für den jeweiligen Probanden (1-15); der Wert bei Proband 2 (\*) liegt außerhalb der angegebenen Skalierung.



**Abb. 20** Veränderung der Läsionstiefen in  $\mu\text{m}$  zwischen gesunder Probenoberfläche (blaue Punkte) und Probenoberfläche nach 7 Wochen (grüne Punkte) für Glandosane<sup>®</sup> (G) und Saliva natura modifiziert (SN) für den jeweiligen Probanden (1-15).

### 7.1.2 Nebenfragestellungen

#### Ergebnisse der TMR-Analyse gesunder Schmelzproben nach 5 Wochen unter Anwendung von Speichelersatzmitteln

Die Messwerte der untersuchten Parameter Läsionstiefe und Mineralverlust zeigten innerhalb der untersuchten Stichproben keine Normalverteilung (Mineralverlust:  $p = 0,244$ ; Läsionstiefe:  $p = 0,379$ ; Kolmogorov-Smirnov-Test).

Unter beiden Speichelersatzmitteln zeigte sich eine signifikante Zunahme des Mineralverlustes nach 5 Wochen ( $p = 0,012$  für Glandosane<sup>®</sup>;  $p = 0,027$  für Saliva natura modifiziert; Wilcoxon-Test), siehe Abbildung 21. Die Läsionstiefe verhielt sich nicht analog zum Mineralverlust. Hier zeigte sich unter Glandosane<sup>®</sup> kein signifikanter Unterschied in der Läsionstiefe ( $p = 0,061$ ), wohingegen in der Gruppe mit modifiziertem Saliva natura eine signifikante Vergrößerung der Läsionstiefe zu beobachten war ( $p = 0,031$ ).

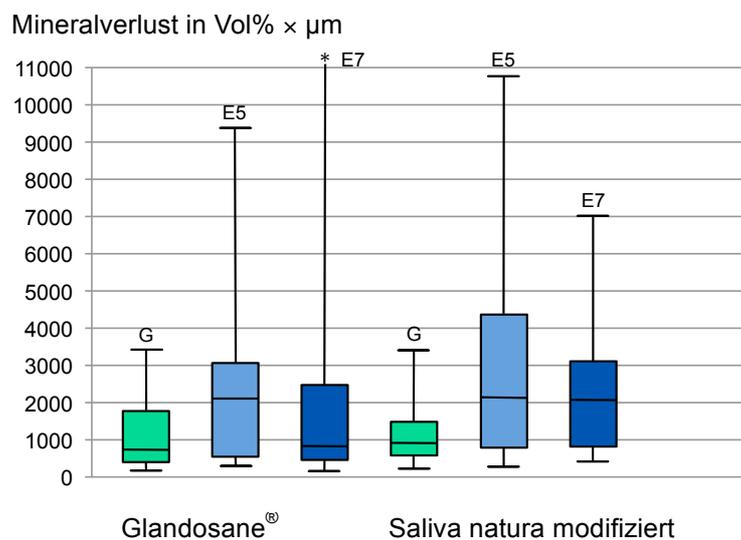
Der Mineralverlust entwickelte sich für die letzten beiden Wochen des Versuchsarmes für beide Speichelersatzmittel verschieden. Unter Glandosane<sup>®</sup> war ein signifikanter Mineralgewinn zu beobachten ( $p = 0,031$ ), der annähernd das Ausgangsniveau (G) der Untersuchung erreichte.

Unter modifiziertem Saliva natura veränderte sich der Mineralverlust zwischen Woche 5 und 7 nicht signifikant ( $p = 0,460$ ), die Demineralisation blieb unverändert.

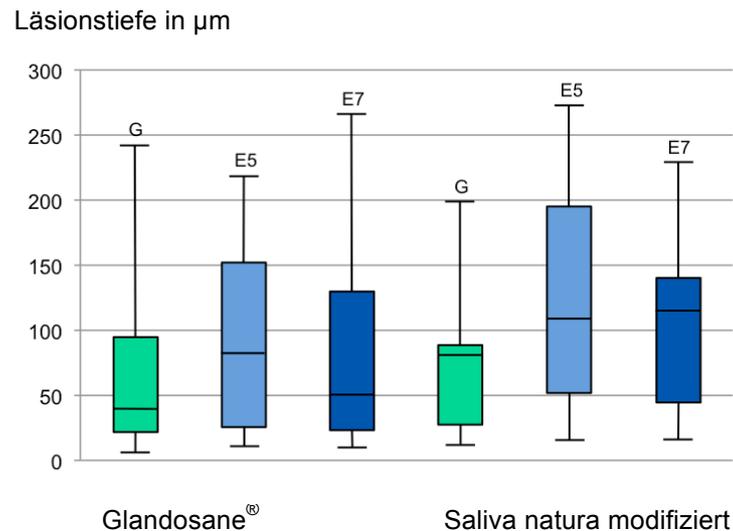
Die Ergebnisse der Läsionstiefen im selben Versuchszeitraum von 2 Wochen (E5-E7) verhielten sich analog zum Mineralverlust. Unter Glandosane® zeigte sich eine signifikante Verringerung der Läsionstiefe ( $p = 0,044$ ). In der Gruppe mit modifiziertem Saliva natura zeigt sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,140$ ).

**Tabelle VII:** Mineralverluste und Läsionstiefen nach 5 und 7 Wochen Versuchsdauer unter Glandosane® und modifiziertem Saliva natura

Testfeld		E5 (5 Wochen)		E7 (7 Wochen)		
		Mineralverlust (Vol% × μm)	Läsionstiefe (μm)	Mineralverlust (Vol% × μm)	Läsionstiefe (μm)	
Speichersatzmittel	Glandosane®	MW	2445,05	93,52	2574,40	78,73
		Median	2169,70	82,40	901,70	52,20
		St.AW	2431,02	73,90	4711,84	73,20
	Saliva natura modifiziert	MW	3060,97	128,91	2518,77	108,17
		Median	2201,90	109,50	2145,40	115,40
		St.AW	2895,56	90,70	2017,61	71,80



**Abb. 21** Boxplots der Veränderungen des Mineralverlustes nach 5 (E5, hellblaue Farbe) und 7 Wochen (E7, dunkelblaue Farbe) Versuchsdauer unter Glandosane® und modifiziertem Saliva natura im Vergleich zu den Kontrollfeldern (G, grüne Farbe); der Wert bei E7(\*) für Glandosane® liegt außerhalb der angegebenen Skalierung.



**Abb. 22** Boxplots der Veränderungen der Läsionstiefen nach 5 (E5, hellblaue Farbe) und 7 Wochen (E7, dunkelblaue Farbe) Versuchsdauer unter Glandosane® und modifiziertem Saliva natura im Vergleich zu den Kontrollfeldern (G, grüne Farbe).

### Ergebnisse der TMR-Analyse von Schmelzproben mit künstlichen Kariesläsionen

Die Messwerte der untersuchten Parameter Läsionstiefe und Mineralverlust zeigten innerhalb der untersuchten Stichproben keine Normalverteilung, siehe Tabelle VIII.

**Tabelle VIII:** Signifikanzen der Untersuchung auf Normalverteilung der Messwerte innerhalb der Untersuchten Gruppen (Kolmogorov-Smirnov-Test)

Testfeld	Signifikanz (p)	
	E5	E7
Mineralverlust (Vol% × µm)	0,509	0,456
Läsionstiefe (µm)	0,583	0,258

Die Ergebnisse für die Mineralverluste und Läsionstiefen der jeweiligen Kontroll- und Effektfelder sind in Tabelle IX dargestellt.

Der Vergleich des Mineralverlustes gesunder Schmelzproben (G) zu den *in vitro* demineralisierten (D) zeigt in beiden Medikationsgruppen einen hoch signifikanten Mineralverlust ( $p = 0,001$ ) und eine hoch signifikante Erhöhung der Läsionstiefe ( $p = 0,001$ ), siehe Abbildungen 23 und 24.

Beide Speichelerersatzmittel zeigten nach 5 (E5) und 7 (E7) Wochen keinen signifikanten

Einfluss auf den Mineralverlust und die Läsionstiefen der Probenbereiche mit künstlichen Schmelzläsionen (D).

Unter Glandosane<sup>®</sup> kam es zwischen Woche 5 (E5) und 7 (E7) zu einer signifikanten Verringerung des Mineralverlustes ( $p = 0,031$ ) und der Läsionstiefe ( $p = 0,334$ ), wobei der Ausgangswert für den Mineralverlust (D) unterschritten wurde. Der Ausgangswert (D) für die Läsionstiefe wurde fast wieder erreicht, siehe Tabelle IX und X).

**Tabelle IX:** Signifikanzen der Veränderungen des Mineralverlusts und der Läsionstiefen von Schmelzproben mit künstlichen Kariesläsionen

Testfeld	Messparameter	Signifikanz (p)	
		Glandosane <sup>®</sup>	Saliva natura modifiziert
D – E5	Mineralverlust (Vol% × $\mu\text{m}$ )	0,100	0,211
	Läsionstiefe ( $\mu\text{m}$ )	0,053	0,112
D – E7	Mineralverlust (Vol% × $\mu\text{m}$ )	0,955	0,955
	Läsionstiefe ( $\mu\text{m}$ )	0,670	0,307
E5 – E7	Mineralverlust (Vol% × $\mu\text{m}$ )	0,031	0,334
	Läsionstiefe ( $\mu\text{m}$ )	0,047	0,427

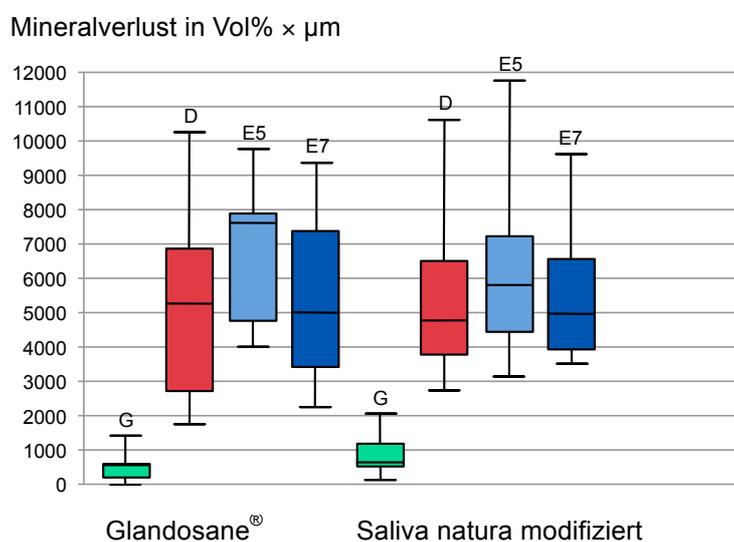
**Tabelle X:** Veränderungen des Mineralverlusts (Vol% ×  $\mu\text{m}$ ) und der Läsionstiefen ( $\mu\text{m}$ ) von Schmelzproben mit künstlichen Kariesläsionen unter der Verwendung von Glandosane<sup>®</sup>

Testfeld	Parameter	Glandosane <sup>®</sup>		
		MW	Median	St.AW
G	Mineralverlust (Vol% × $\mu\text{m}$ )	602,34	646,60	341,77
	Läsionstiefe ( $\mu$ )	26,83	18,00	19,14
D	Mineralverlust (Vol% × $\mu\text{m}$ )	5364,97	5288,20	2528,92
	Läsionstiefe ( $\mu$ )	155,27	149,00	50,38
E5	Mineralverlust (Vol% × $\mu\text{m}$ )	6538,36	7574,60	1946,15
	Läsionstiefe ( $\mu$ )	190,83	200,80	46,13
E7	Mineralverlust (Vol% × $\mu\text{m}$ )	5436,97	5018,60	2365,00
	Läsionstiefe ( $\mu$ )	172,77	152,50	60,10

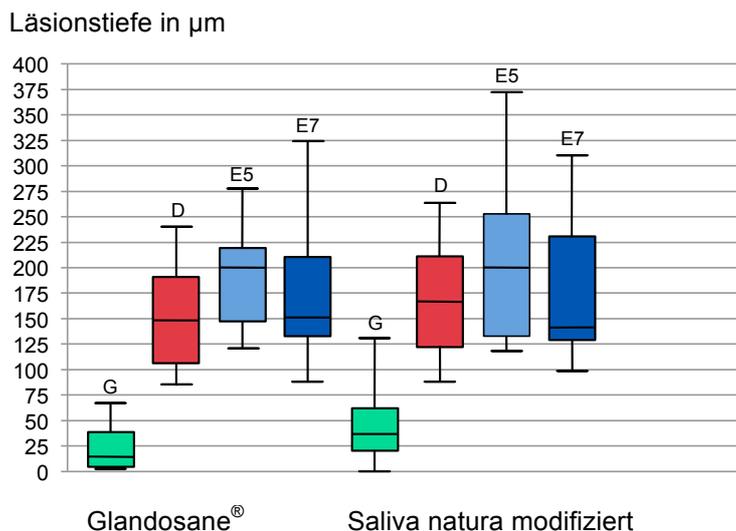
**Tabelle XI:** Veränderungen des Mineralverlusts (Vol% × μm) und der Läsionstiefen (μm) von Schmelzproben mit künstlichen Kariesläsionen unter der Verwendung von modifiziertem Saliva natura

**Saliva natura modifiziert**

Testfeld	Parameter	MW	Median	St.AW
G	Mineralverlust (Vol% × μm)	938,587	755,00	550,01
	Läsionstiefe (μ)	47,433	40,10	34,19
D	Mineralverlust (Vol% × μm)	5277,74	4799,70	2053,91
	Läsionstiefe (μ)	166,94	166,90	53,71
E5	Mineralverlust (Vol% × μm)	6137,64	5812,10	2189,62
	Läsionstiefe (μ)	200,63	200,70	73,77
E7	Mineralverlust (Vol% × μm)	5660,81	4984,40	1920,85
	Läsionstiefe (μ)	180,48	142,20	65,75



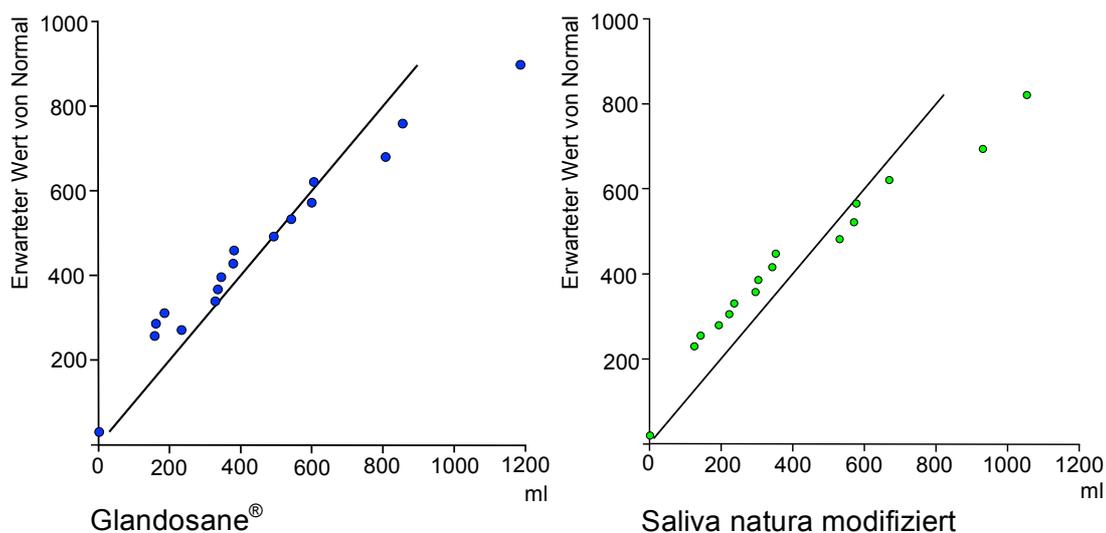
**Abb. 23** Boxplots der Veränderungen der Mineralverluste nach In-vitro-Demineralisation (D, rote Farbe), 5 (E5, hellblaue Farbe) und 7 Wochen (E7, dunkelblaue Farbe) Versuchsdauer im Vergleich zu den Kontrollfeldern (G, grüne Farbe) unter Glandosane® und modifiziertem Saliva natura.



**Abb. 24** Boxplots der Veränderungen der Läsionstiefen nach In-vitro-Demineralisation (D, rote Farbe), 5 (E5, hellblaue Farbe) und 7 Wochen (E7, dunkelblaue Farbe) Versuchsdauer im Vergleich zu den Kontrollfeldern (G, grüne Farbe) unter Glandosane® und modifiziertem Saliva natura.

## 7.2 Ergebnisse der Messungen des Speichersatzmittelverbrauchs und der Speichelfließraten

Die Verwendung der Speichersatzmittel zeigte in beiden Gruppen keine Normalerteilung ( $p > 0,05$ ; Shapiro-Wilk-Test), siehe Abbildung 25.



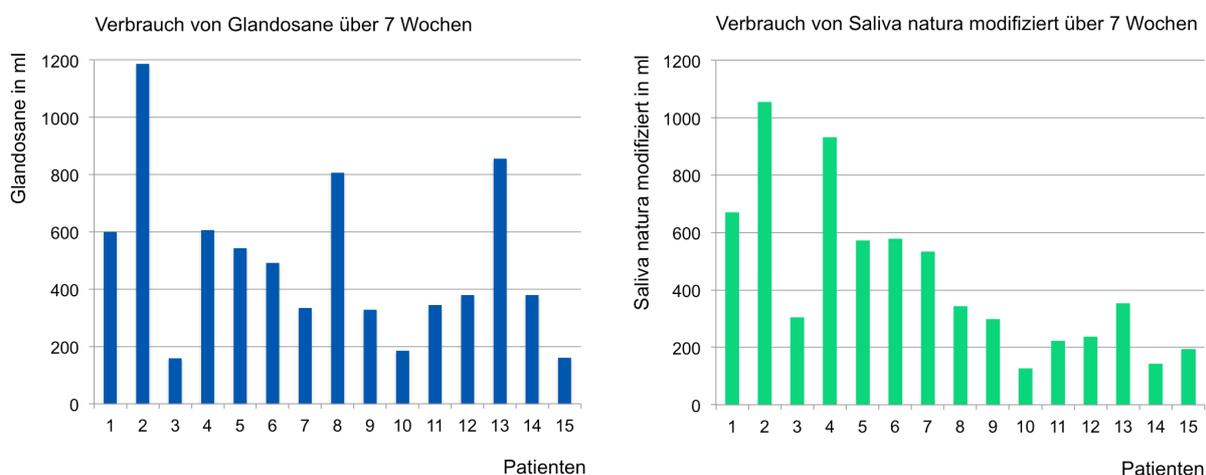
**Abb. 25** QQ-Diagramme des Verbrauchs an Glandosane® (links) und modifiziertem Saliva natura (rechts) über 7 Wochen in ml.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen des Speichelersatzmittelverbrauchs sind in Tabelle XII dargestellt.

**Tabelle XII:** Mittelwerte, Standardabweichungen und Medianwerte des Speichelersatzmittelverbrauchs aller Patienten in ml

	Mittelwert (ml)	Standardabweichung (ml)	Median (ml)
Glandosane®	490,77	287,24	379,97
Saliva natura mod.	436,19	281,00	342,52

Insgesamt wurde mehr Speichelersatzmittel vom Typ Glandosane® verwendet als modifiziertes Saliva natura (Abb. 26).



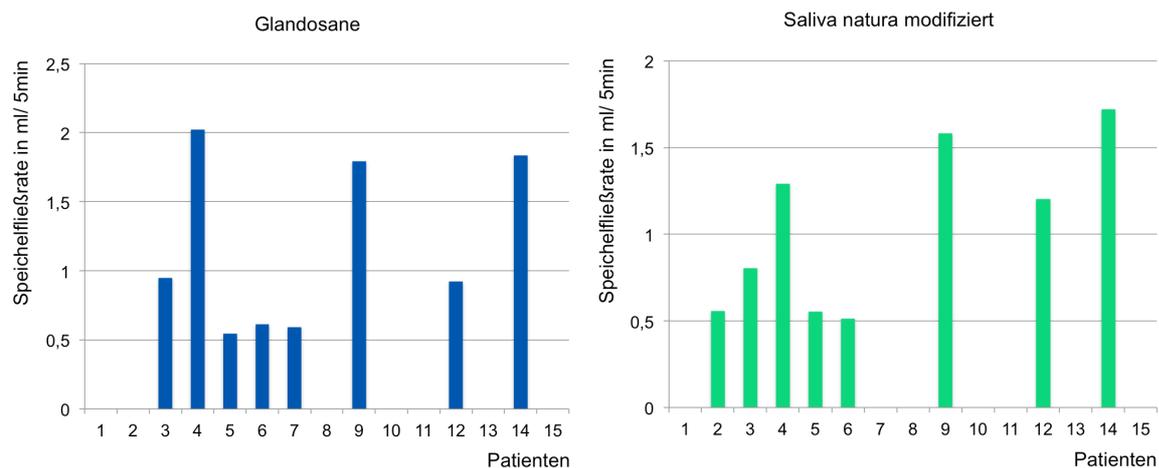
**Abb. 26** Verbrauch von Glandosane® (links) und modifiziertem Saliva natura (rechts) für den Versuchszeitraum von 7 Wochen für Patienten 1-15 in ml.

Ein Zusammenhang zwischen der Speichelfliessrate (Abb. 27) und dem Verbrauch an Speichelersatzmittel (Abb. 26) lässt sich aus den Daten nicht erkennen. Ein Vergleich der Rangkorrelationskoeffizienten für Glandosane® ( $r_s = -0,14$ ; Spearman-Analyse) und modifiziertes Saliva natura ( $r_s = 0,086$ ; Spearman-Analyse) mit dem kritischen Wert für den Korrelationskoeffizienten ( $r_s = 0,525$ ,  $\alpha = 5\%$ ,  $n = 15$ ) zeigt eine fehlende Korrelation.

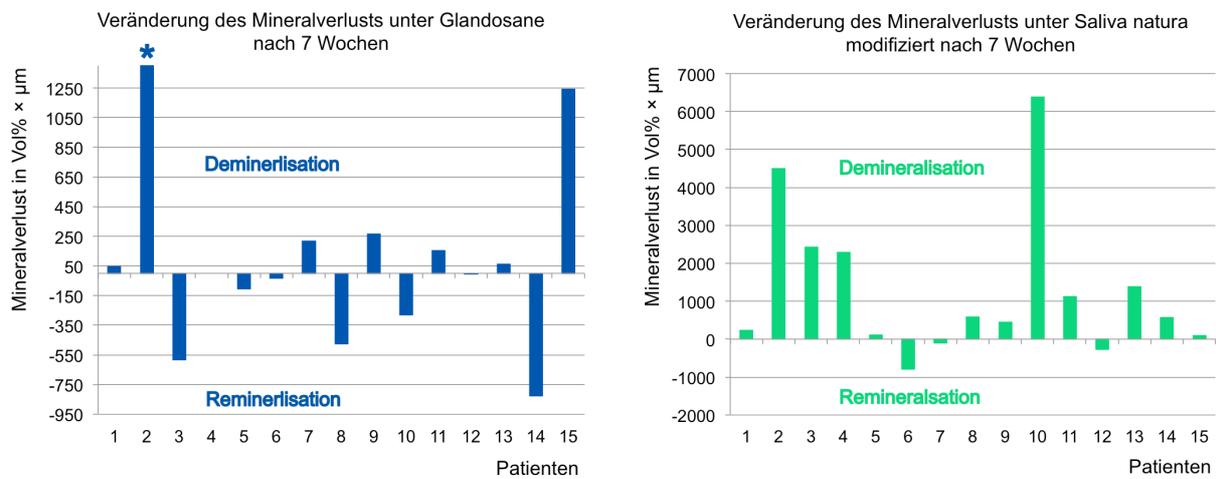
Ein Zusammenhang zwischen den De- und Remineralisationsergebnissen (Abb. 28 und 29) und der Menge an verwendetem Speichersatzmittel konnte in dieser Untersuchung nicht festgestellt werden, siehe Tabelle XIII.

**Tabelle XIII:** p-Werte einer untersuchten Korrelation zwischen Speichersatzmittelverbrauch und den Messwerten des Mineralverlusts und der Läsionstiefen nach 7 Wochen Versuchszeitraum in gesunden Schmelzproben und Proben mit künstlichen Schmelzläsionen (Spearman-Analyse)

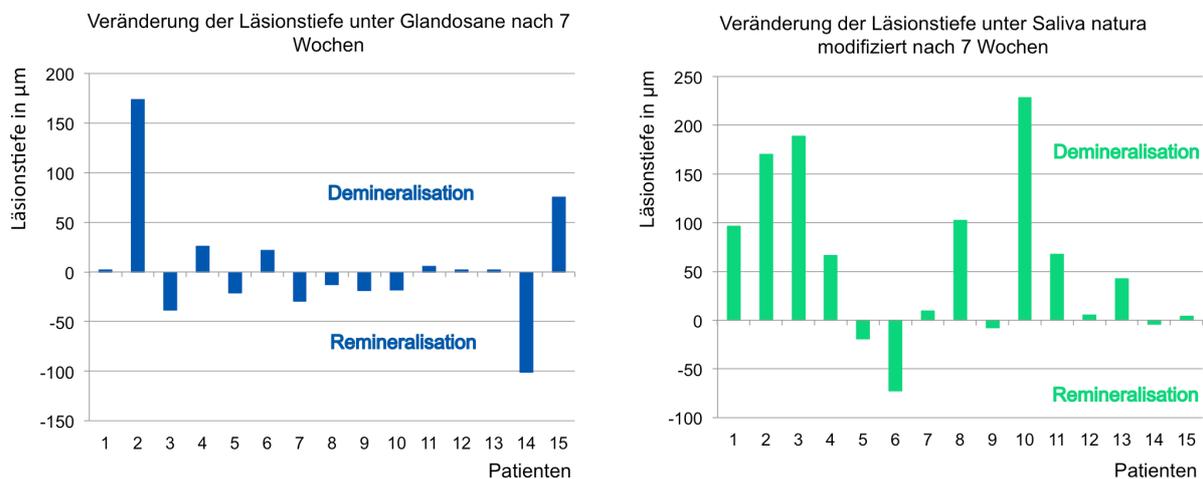
	Gesunde Schmelzproben		Proben mit künstlichen Schmelzläsionen	
	Mineralgehalt (Vol% × μm)	Läsionstiefe (μm)	Mineralgehalt (Vol% × μm)	Läsionstiefe (μm)
<b>Verbrauch</b> Glandosane®	p = 0,454	p = 0,352	p = 1,950	p = 1,634
Saliva natura mod.	p = 0,436	p = 0,372	p = 1,122	p = 1,604



**Abb. 27** Durchschnittliche Speichelfließrate in ml/5min während des Versuchszeitraums von 7 Wochen unter Glandosane® (links) und modifiziertem Saliva natura (rechts) für Patienten 1-15.



**Abb. 28** zeigt die relativen Mineralveränderungen in Vol% × μm nach siebenwöchiger Anwendung von Glandosane® (links) und modifiziertem Saliva natura (rechts) im Vergleich zur Ausgangssituation für Patienten 1-15. Ein Mineralverlustwert mit negativem Vorzeichen entspricht einer Remineralisation. Der Messwert von Patient 2 (\*) ist in dieser Skalierung nicht abgebildet.



**Abb. 29** zeigt die relative Veränderung der Läsionstiefen in μm nach siebenwöchiger Anwendung von Glandosane® (links) und modifiziertem Saliva natura (rechts) im Vergleich zur Ausgangssituation für Patienten 1-15. Ein Läsionstiefenwert mit negativem Vorzeichen entspricht einer Remineralisation.

## **8 Diskussion**

### **8.1 Diskussion von Material und Methode**

#### **Bovine Zahnhartsubstanzen**

Das verwendete bovine Zahnmaterial stammte von frisch geschlachteten Tieren eines Umkreises. Das ermöglichte die Verwendung von Zahnhartsubstanz ähnlichen Alters unter vergleichbaren Umweltbedingungen. Durch die Verwendung von Rinderzähnen mit einer im Gegensatz zu humanen Zähnen geringeren biologischen Streuung war eine vergleichbare Reaktion auf die Speichelersatzmittel zu erwarten. Humane Zähne erlauben die Untersuchung an einem klinisch relevanten Substrat, bringen jedoch auch Probleme mit sich. Sie sind oftmals schwierig in ausreichender Quantität und adäquater Qualität zu beschaffen, da viele v.a. aufgrund ausgeprägter kariöser Läsionen und anderer Defekte extrahiert werden [Mellberg 1992]. Darüber hinaus kann es eine Herausforderung darstellen, die Herkunft und das Alter der Zähne zu kontrollieren, was zu größeren Variationen in den Versuchsergebnissen führen kann [Zero 1995]. Die relativ kleine und gebogene Oberfläche humaner Zähne kann eine Einschränkung für die Herstellung von Schmelzproben bedeuten, welche eine plane Oberfläche erfordern [Zero 1995]. Das Bewusstsein für Infektionsrisiken [Rueggeberg 1991] und ethische Überlegungen [Skene 2002] ist gestiegen. Daher wurden in der zahnmedizinischen Forschung alternative Substrate vorgeschlagen und genutzt. Bovine Zähne sind aufgrund ihrer vergleichbaren chemischen Zusammensetzung, der einfacheren Verfügbarkeit und Größe als Substituent für humane Zahnhartsubstanzen in In-situ-Versuchen geeignet. Die Bildung von Läsionskörpern in bovinem Schmelz ist mit der im humanen vergleichbar [Lippert und Lynch 2014]. Boviner Schmelz wird im Vergleich zu humanem Schmelz als ein poröseres Material angesehen. Daher ist es womöglich empfindlicher gegenüber beschleunigter Demineralisation. Ein schnelleres Erzielen von Effekten an der Schmelzoberfläche in In-situ-Versuchen verkürzt womöglich die Versuchsdauer.

### Probenherstellung/ Testfeldgestaltung

Um eine größtmögliche Vergleichbarkeit der Zahnhartsubstanzen zu gewährleisten, wurden alle Schmelzproben aus den Labialflächen der Rinderfrontzähne gewonnen. Die Probenoberflächen wurden durch Parallelisierung und Politur mit Schleifpapier eingeebnet, wodurch eine Standardisierung der Oberflächen erreicht wurde. Größere Demineralisationsvorgänge bei beschliffener Schmelzoberfläche im Vergleich zur unbeschiffenen wurden in der Literatur beschrieben [Macpherson *et al.* 1991]. Erklärt wurde dies mit den großvolumigeren Kristallen und der höheren Fluoridkonzentration in den oberflächlichen Schichten des Schmelzes im Vergleich zu den innen liegenden Anteilen [Weatherell *et al.* 1973]. Die Ausprägung künstlich erzeugter Läsionen bei bearbeiteter Schmelzoberfläche im Vergleich zur unbehandelten Probenoberfläche zeigte keine signifikanten Unterschiede [Featherstone und Mellberg 1981]. Eine Einebnung der Schmelzoberflächen gewährleistet, dass bei den Messungen der Gewebedichte die Oberflächen keinen reliefbedingten Schwankungen unterliegen [Mellberg 1992].

Bei vielen Patienten tritt Initialkaries auf, welche in dieser Untersuchung durch die *in vitro* erzeugten Demineralisationen simuliert wurde. Zwei Schmelzproben, davon eine gesunde und eine *in vitro* demineralisierte, gewonnen aus einem bovinen Zahn, wurden in die herausnehmbare Patientenprothese während einer Versuchsphase eingebettet. Diese Vorgehensweise gewährleistet die Zuordnung: ein Tier/ein Proband.

Um die Wirkung der Studienmedikation nach einem Versuchszeitraum von jeweils 5 und 7 Wochen auf die Probenoberflächen zu untersuchen, erfolgte die Testfeldgestaltung wie bereits beschrieben. Durch die Abdeckung der jeweiligen Testfelder mit säureresistentem Nagellack und der zusätzlichen Befestigung mit dünnfließendem Composite, wurden die gesunden sowie *in vitro* demineralisierten Bereiche während des Versuchszeitraumes bis zur mikroradiografischen Analyse geschützt. Diese Methode ermöglichte die Bildung charakteristischer Testfelder. Die Entstehung mehrerer noch auswertbarer Testfelder auf der Probenoberfläche erforderte eine Minimumprobengröße. Da die Proben nicht an natürlichen Zahnoberflächen des Patienten befestigt werden konnten, wurde herausnehmbarer Zahnersatz verwendet. In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich, dass die Patientenakzeptanz gegenüber Konstruktionen, welche lediglich für die Befestigung der Untersuchungsproben dienen sollten, sehr gering war. Das lag vor allem an den seitens der Patienten vermuteten

Eigenschaften solcher Konstruktionen, die Mundhöhle einzuengen, die mastikatorische Leistung herabzusetzen und somit wohl zu oralem Unwohlsein zu führen. Daher nahm kein vollständig bezahnter Patient teil. Der Großteil der Studienteilnehmer trug herausnehmbaren Zahnersatz in Form von Teilprothesen und eine kleinere Gruppe Totalprothesen. Die Basisausdehnung der Patientenprothesen war maßgeblich für die Anordnung und Positionierung der Proben und stellte sich daher bei jedem Patienten individuell dar. Anders als in vorangegangenen In-vitro-Studien wurden die mit Nagellack abgedeckten Probenoberflächen zusätzlich mit dünnfließendem Composite geschützt, um ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischen Einflüssen während der Versuchsphase zu erhöhen. Die zusätzliche Fixierung hat sich in nahezu allen Fällen als erfolgreich herausgestellt. Während mastikatorischer Belastung wäre es denkbar, dass der an den Prothesenkörpern auftretende Belastungsdruck auf die Testfeldbereiche übertragen wurde und es folglich zur Ausbildung von Mikrospalten kam, die mit dem bloßen Auge nicht erkennbar waren und im Folgenden eine Reaktion der Probenoberfläche unter der Schutzschicht zuließen.

Die Verwendung der „Ein-Schnitt“-Technik aus den Schmelzproben wurde in der Literatur kritisch hinterfragt. Diskutiert wird eine mögliche Aktefaktbildung, die schwer auszuschließen ist. Einige Autoren geben für Proben in „Mehr-Schnitt“-Technik, aus denen 5-6 Bereiche mikroradiographiert wurden, eine biologische Streuung bei Läsionstiefe und Mineralverlust zwischen 15 - 20% an [Arends und ten Bosch 1992]. Diese mögliche Streuung konnte in der verwendeten Methodik nicht berücksichtigt werden. Die Abmessungen der verwendeten Schmelzproben wurden durch die Platzverhältnisse in den Prothesen wesentlich bestimmt. Die Größe der verwendeten Proben ermöglichte keine Mehrschnitttechnik. Um verfälschende Einflüsse (seitliche Demineralisation des Probenkörpers, im Spaltraum zwischen Klebewachs und Probenkörper) zu minimieren, wurden die Schnitte für die TMR aus der Mitte der Probenkörper entnommen.

### **Auswertung mittels TMR**

Die Intention des vorliegenden In-situ-Untersuchungsmodells war es, den natürlichen Kariesprozess nachzuahmen, um so innerhalb eines kurzen Zeitraumes klinisch relevante Ergebnisse zu erhalten. Das In-situ-Modell ermöglicht einen Verzicht einer Röntgenexposition für die Patienten, wie es bei einer Approximalraumkaries in der

klinischen Untersuchung nötig ist. Problematisch bei klinischen Studien ist die Bewertung von Glattflächenkaries, die bei Hyposalivationspatienten häufig vertreten ist. Zur Verfügung stehen hier vor allem visuelle Bewertungskriterien, deren Interpretation individuell verschieden sein kann. Im Gegensatz dazu offeriert die transversale Mikroradiografie (TMR) genaue Messwerte. Allgemein sind viele Versuchsmethoden vorhanden, um Läsionen in Rinderschmelz zu untersuchen. Diese beinhalten die TMR [Tschope *et al.* 2007], polarisierte Mikroskopie [Crabb und Darling 1956], Mikrohärtemessungen [Buchalla *et al.* 2008], elektrische kariologische Untersuchungen [Petersson und Kambara 2004], optische Kohärenztomografie [Holtzman *et al.* 2010] und scannende Elektronenmikroskopie [Attin *et al.* 1997]. Mit der Ausnahme von TMR, weisen alle genannten Methoden Genauigkeitsdefizite bei der Ermittlung der Parameter Mineralverlust und Läsionstiefe auf. Im Gegensatz dazu erlaubt die Verwendung von TMR ein direktes Messen der longitudinalen Mineralverteilung in Form eines Profils in einer Schmelzläsion. TMR ist als Goldstandard etabliert und zur Messung der Mineralgehaltveränderung über einen Zeitraum anerkannt. Eine ähnliche Technik, die Transversale Wellenlängenunabhängige Mikroradiografie (T-WIM) könnte eine mögliche Alternative darstellen [Thomas *et al.* 2006]. T-WIM bietet die Möglichkeit kariöse Läsionen während des Versuchszeitraumes zu beobachten (Monitoring), ohne die Notwendigkeit der Herstellung dünner Probenschnitte. Bei der TMR ist die Herstellung von Schnitten notwendig. Diese Schnittherstellung kann auf ein Mindestmaß (eine einzige Vorgehensweise) reduziert werden und gewährleistet dennoch eine Kontrolle der Probenoberflächen in Anlehnung an das bestehende Testfelddesign. Die Proben, die in der Studie Verwendung fanden, waren bezüglich ihrer Größe nicht komplett normiert. Die Größe wurde vielmehr durch die individuellen Prothesenverhältnisse bestimmt. Bei der Analyse mit T-WIM führt die Verwendung von Proben, die keine normierten Abmaße aufweisen, zu variierenden Film-zu-Objekt oder Quelle-zu-Film Abständen. Nichtvergleichbare Ergebnisse können resultieren [Anderson *et al.* 1998].

Bei TMR als Analyseverfahren ist kritisch zu bemerken, dass zwar ein resultierender Mineralgewinn in den initialen Läsionen dargestellt werden kann, dabei aber der Beweis fehlt, dass es sich tatsächlich um HAP handelt und nicht um eine Ablagerung anderer Kalzium-Phosphat-Verbindungen (OKP, DKPD und amorphes Kalziumphosphat). Dieser Nachteil könnte zukünftig von zusätzlichen Analysemethoden, wie der Infrarotspektroskopie oder Röntgendiffraktion, ausgeglichen werden.

## Studiendesign

Während es mit dem vorliegenden Studiendesign lediglich mehrere Wochen dauert um Ergebnisse zu erbringen, benötigen klinische Kariesuntersuchungen möglicherweise mehr Zeit, um signifikante Ergebnisse zu erbringen. Der Kurzzeit-Charakter dieser In-situ-Studie umgeht viele der ethischen Probleme, die mit Studien an Menschen im Zusammenhang stehen. Der Studientyp trägt zu einer Belastungsminimierung des Patienten bei und macht den technischen Aufwand der Untersuchung durchführbar und stellt nicht zuletzt einen günstigeren Kostenfaktor dar.

Obwohl viele Patienten einen hohen Leidensdruck aufgrund der Hyposalivation aufwiesen, war ihre Bereitschaft zur Teilnahme an Langzeituntersuchungen begrenzt. Diese Beobachtung könnte zum Teil mit dem Grad der psychischen Belastung vor dem Hintergrund der zuvor erfolgten Krebstherapie erklärt werden.

Da Fluoride in herkömmlichen Nahrungsmitteln wie Salz, Fisch und auch Mineralwasser vorkommen, bedurfte die Durchführung der Studie den Verzicht auf einige Nahrungsmittel im Sinne einer fluoridfreien Ernährung.

Diese Anpassung wurde nur für den kurzen In-situ-Zeitraum festgesetzt und stellt daher womöglich eine geringere persönliche Belastung im Vergleich zu einer Langzeitstudie dar. Zusammengefasst entspricht ein In-situ-Modell möglicherweise mehr den Patientenbedürfnissen, die immer vor dem Hintergrund langgestreckter Krebstherapien gesehen werden müssen. Oft sind In-situ-Modelle durch eine reduzierte Teilnehmerzahl gekennzeichnet. Diese Begrenzung resultiert aus dem mangelnden Vorhandensein von Studienteilnehmern, welche die Einschlusskriterien erfüllen. Weitere limitierende Faktoren beziehen sich auf die Logistik im Zusammenhang mit Studienteilnehmern, Aufwand der Probenherstellung und der Analyse mittels TMR. Ein repräsentatives Versuchsergebnis ist generell abhängig von der Teilnehmercompliance [Zero 1995]. Herausforderung und möglicher Erfolg dieser In-situ-Studie waren von der Fähigkeit bestimmt, die klinische Relevanz aufrechtzuhalten, während die Variation kontrolliert wurde. Die Quellen der experimentellen Variation, welche unter Kontrolle waren, umfassen das Design des Modells, die Präparation der Schmelzproben, TMR als analytische Technik und das Studienprotokoll.

Ein ähnliches Patientenverhalten während jeder Versuchsphase wurde angenommen. Die unterschiedliche Menge an konsumiertem Speichelersatzmittel zwischen den zwei Versuchsphasen derselben Patienten lässt diese Annahme in Bezug

auf die Anwendung des Speichersatzmittels nicht bestehen. Die Akzeptanz gegenüber dem jeweiligen Speichersatzmittel war wahrscheinlich größtenteils durch den Geschmack bestimmt und führte bei unangenehmem Geschmack womöglich zu einer Abnahme des täglichen Applikationsintervalls und einem geringeren Gesamtverbrauch. Die verwendete Darreichungsform der Speichersatzmittel in Form von Spray sollte die Applikation vereinfachen und die Einnahmehäufigkeit sowie die Akzeptanz steigern [Momm und Lutterbach 2005].

Das doppelblinde Design garantierte, dass weder die Studienteilnehmer noch die Untersucher Kenntnis von der Anwendungsreihenfolge, bis zum Abschluss der Mikroradiografie und der entsprechenden statistischen Analyse hatten. Die Erwartungen der Untersucher und der Studienteilnehmer beeinflussten die Ergebnisse nicht.

Patienten, die unter Hyposalivation leiden, weisen lange Demineralisationsphasen auf, welche mit kurzen aber häufigen Phasen der Speichersatzmittelanwendung alternieren. Die in vorherigen In-vitro-Studien angewandten Verfahren simulierten einen extremen Kontakt zwischen den Speichersatzmitteln und den Proben während der Versuchsphase über fünf Wochen [Tschoppe *et al.* 2008]. Diese Umstände können nicht für diese Versuche angenommen werden [Tschoppe *et al.* 2007]. Die Probanden verwendeten Speichersatzmittel bei Bedarf. Daher konnte von keiner Maximaldosis (wie bei der Lagerung im Speichersatzmittel *in vitro*) ausgegangen werden. Aufgrund der geringeren Kontaktzeit der Speichersatzmittel zu den Schmelzproben *in situ*, wurde hier im Vergleich zu *in vitro* ein längerer Versuchszeitraum von 7 Wochen gewählt.

Obwohl die Datenlage in der Literatur im Hinblick auf die Speichersatzmittelakzeptanz extrem variiert, linderten alle verwendeten Speichersatzmittel die Beschwerden, die durch Hyposalivation entstehen [Hahnel *et al.* 2009].

Es ist wichtig herauszustellen, dass anders als in den In-vitro-Versuchen, *in vivo* nicht von einer absoluten Abwesenheit oraler Flüssigkeiten ausgegangen werden kann. Ein variierendes Speichelvorkommen mit einer individuellen Zusammensetzung [Jensen *et al.* 2003] und unterschiedlichen pH-Werten stellen eine Erklärung für die Abweichung von den *in vitro* erzeugten Ergebnissen dar. Die Ernährung kann das Auftreten von Erosionen an den Probenoberflächen begünstigt haben. Um den Einfluss der Ernährung zu minimieren, erhielten die Patienten eine Ernährungsberatung und wurden

gebeten auf erosionsfördernde Lebensmittel zu verzichten. Variationen in der Patientenernährung könnten dennoch zur Ausbildung von Erosionen und einem damit verbundenen Mineralverlust an der Schmelzoberfläche geführt haben.

## 8.2 Diskussion der Ergebnisse

Die angestrebte Fallzahl wurde nicht erreicht. Die Gewinnung von Probanden zu dieser Studie erwies sich als schwierig. Trotz eines häufig bekundeten hohen Leidensdruckes aufgrund der Hyposalivation, war die Bereitschaft zur Teilnahme an dieser Untersuchung gering. Der zeitliche Aufwand, der Fahrtweg zur Zahnklinik sowie damit anfallende Fahrtkosten (sekundär) neben anderen nötigen Arztbesuchen, führten nach Aussage vieler Betroffener zur Nichtteilnahme. Auch andere Autoren beobachteten bei einem Patientenkollektiv, das Bestrahlungstherapie erhielt, eine begrenzte Mitarbeit im Rahmen zahnärztlichen Monitorings [Toljanic *et al.* 2002]. Die Durchführung bei einer größeren Probandengruppe wäre wünschenswert.

Die Ergebnisse der vorangegangenen In-vitro-Untersuchungen [Tschoppe *et al.* 2007; Tschoppe *et al.* 2009] konnten durch diese klinische Untersuchung nicht bestätigt werden. Die Nullhypothese kann hinsichtlich des Fehlens eines Unterschieds im Mineralverlust und der Läsionstiefe zwischen Glandosane<sup>®</sup> und modifiziertem Saliva natura nach 7 wöchiger Exposition im Vergleich zu gesunder Schmelzoberfläche nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse stützen die Annahme eines messbaren Unterschieds, jedoch in anderer Weise als in der Alternativhypothese formuliert: Die gefundenen Unterschiede zeigen anders als durch die vorhergehenden Untersuchungen erwartet, einen Mineralverlust und eine Läsionstiefenerhöhung durch modifiziertes Saliva natura nach siebenwöchiger Anwendung an gesunder Schmelzoberfläche.

An den *in vitro* demineralisierten Proben ist es unter beiden Speichelersatzmitteln nach 5 Wochen zu einer weiteren Demineralisation gekommen. Nach weiteren 2 Wochen ist es zur Remineralisation (insgesamt 7 Wochen) gekommen, in der Glandosane<sup>®</sup>-Gruppe stärker ausgeprägt. In diesen Schmelzproben war auch die *in vitro* erzeugte Demineralisation ausgeprägter. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte die durch stärkere Demineralisation an der Oberfläche erzeugte höhere Porosität und vergrößerte Oberfläche sein, welche die Remineralisation erleichtert haben könnte. In der Literatur wird eine lineare Beziehung zwischen der Remineralisationsrate und steigendem Mineralverlust-Ausgangswert beschrieben [Strang *et al.* 1987].

Die Veränderungen der Läsionstiefen verliefen nach einem ähnlichen Muster wie die des Mineralverlustes. Differenzen im Verlauf von Mineralverlust und dazugehörigen Läsionstiefen lassen sich mit Veränderungen der Probenoberfläche erklären: bei Verlust der pseudointakten Oberfläche durch erosive Einflüsse kann sich im Verhältnis zur Läsionstiefe ein größerer Mineralverlust zeigen.

Die geringe Probenanzahl und starke Streuung innerhalb der Ergebnisse machen einen Vergleich zu den Ergebnissen der vorausgegangenen In-vitro-Versuche sehr schwierig. Eine sichere Aussage über das Verhalten der untersuchten Speichersatzmittel an bovinen Schmelzproben unter klinischen Bedingungen ist aufgrund der geringen Datenlage nicht möglich.

Die Einflussfaktoren, die zu Variationen der Ergebnisse geführt haben können, sind zahlreich. Sie reichen von der Studiendurchführung durch den Probanden, variablen individuellen biologischen Einflussfaktoren bis hin zu den Messwerterhebungen bei der Auswertung der Untersuchung.

Eine generelle Abnahme der Probandenmotivation in der zweiten Versuchsphase lässt sich anhand des Vergleichs des Speichersatzmittelverbrauches der jeweiligen Patienten zwischen beiden Versuchsphasen nicht erkennen. Der Speichersatzmittelverbrauch, der im Mittel für beide Prüfmedikationen unter 500 ml über 7 Wochen Versuchszeitraum betrug, verdeutlicht den wahrscheinlich geringen Einfluss, den die Speichersatzmittel auf die Probenoberflächen hatten. Die Kontaktzeit des Restspeichels eines Patienten mit einer Ruhespeichelfließrate von 2,02 ml/5 min (höchster gemessener Wert, siehe Abbildung 27) hätte rein rechnerisch nach weniger als einem Tag dasselbe mögliche Kontaktvolumen zu den Schmelzproben wie 500 ml Speichersatzmittel einer Versuchsphase. Selbst bei dem Vorhandensein prolongierter Befeuchtungseigenschaften des Speichersatzmittels auf der Schmelzoberfläche ist der Wirkeinfluss der Speichersatzmittel über einen Zeitraum von 7 Wochen gering. Um so größer wird ein möglicher Einfluss der Ernährung auf die Veränderungen der Mineralisationseffekte an den Probenoberflächen. Dieser könnte als schwerwiegend betrachtet werden, ähnelten oder überwogen die Kontaktzeiten von Nahrung und Getränken an der Probenoberflächen denen der Speichersatzmittel.

Eine unsachgemäße Lagerung der Prothesen während der Durchführung der oralen Mundhygiene trotz Instruktion könnte zur Schädigung wie Austrocknung, Kontakt zu mineralisationsbeeinflussenden Agentien oder Beschädigung der Probenoberflächen durch unerwünschte Mitbearbeitung durch Mundhygienehilfsmittel von Probenkörpern geführt haben. Die Proben eines Probanden waren aufgrund massiver Mitbearbeitung bei Durchführung der Prothesenhygiene nicht auswertbar (drop out). Einige der untersuchten Proben wiesen im Durchlichtmikroskop leichte Veränderungen der Oberfläche im Sinne eines Oberflächenverlusts auf. Diese werden wahrscheinlich durch erosive Einflüsse durch die Ernährung oder abrasive Einflüsse im Rahmen einer unsachgemäßen Prothesenreinigung entstanden sein. Ein Oberflächenverlust der ungeschützten Testbereiche der Proben durch Erosion wird in der TMR-Analyse zu erhöhten Messwerten für den Mineralverlustwert geführt haben [Meyer-Lueckel *et al.* 2007]. Die Messung und Bewertung der Demineralisation an den Schmelzprobenoberflächen kann somit überlagert sein und sich in einem verzerrten Ergebnis ausdrücken, welches sich gerade bei der begrenzten Probandenzahl dieser Untersuchung zeigte.

Auch der Applikation des Speichelersatzmittels ist Bedeutung beizumessen. Die Sprühhichtung könnte einen Einfluss haben. Darüber hinaus ist vorstellbar, dass sich Speichelersatzmittel vorzugsweise im Bereich des Unterkiefers sammelte und dort zu prolongierten Kontaktzeiten gegenüber den in Oberkieferprothesen eingebrachten Schmelzproben führte. Ein Einfluss der Schmelzprobenposition in der Mundhöhle auf die Remineralisation wurde in der Literatur beschrieben. Proben im Bereich der Prämolaren erfuhren eine geringere Demineralisation im Vergleich zu Proben im Molarenbereich [Zaura *et al.* 2005].

Eine geringe, dennoch vorhandene, Restaktivität der Speicheldrüsen führt zu unterschiedlichen Beimengung natürlichen Speichels zu den Speichelersatzmitteln und könnte somit verschiedene Effekte auf die Probenoberfläche bewirkt haben. Die Lage der Proben zu den Speicheldrüsenausführungsgängen könnte eine Rolle gespielt haben. Die Varianz der Speichelzusammensetzung nach der Bestrahlungstherapie ist nicht vorhersehbar. Die variablen Lokalisationen des Krebses bringen ein unterschiedliches Bestrahlungsfenster mit sich. Somit werden die jeweiligen Speicheldrüsen unterschiedlich stark durch die Radiatio beeinflusst, womit auch die Speichelzusammensetzung des Patientenkollektivs variieren dürfte.

Einige organische Speichelbestandteile haben einen signifikanten Einfluss auf die spontane Präzipitation von kalziumfluoridhaltigen Lösungen [Gron und Hay 1976]. Es wurde mehrfach diskutiert, dass ein Ausbleiben von Remineralisationen durch das Vorhandensein von Remineralisationsinhibitoren wie Statherin [Schlesinger und Hay 1977] oder saure prolinreiche Proteine im Speichel begünstigt wird. Bei Patienten mit einem Restspeichelvorkommen könnten solche Faktoren einen stärkeren Einfluss gewinnen.

Die in *in situ* vorkommende Pellicle könnte die Remineralisation beeinflusst haben. Ein verschlechtertes Remineralisationsvermögen von verwendeten Remineralisationslösungen beim Vorliegen einer Pellicle an demineralisiertem Schmelz wurde in der Literatur beschrieben [Zahradnik 1979]. Vermutet wird eine Beeinflussung des Ionentransportes durch die Pellicle [Zahradnik *et al.* 1976]. Eine Verbesserung der Remineralisation wurde in In-vitro-Studien durch die Entfernung der Proteine (Pellicle, Schmelzproteine) durch die Verwendung von Natriumhypochlorid erzielt [Robinson *et al.* 1990].

Bei Remineralisationslösungen, die eine schnelle oberflächliche Mineralpräzipitation aufweisen (stark übersättigte), soll die Pellicle eine Tiefenremineralisation begünstigen [Zahradnik 1979]. Dodds und Edgar beobachteten, dass die Anwesenheit oder Abwesenheit von Plaque über der Läsion keinen Effekt auf das Ausmaß der Remineralisation durch das Spülen mit fluoridhaltigen Lösungen hatte [Dodds und Edgar 1991]. Die Autoren verwendeten jedoch Fluoridkonzentrationen von 500 ppm, eine höhere Konzentration als in dieser Untersuchung verwendet wurde. Die in dieser Untersuchung im modifizierten Saliva natura verwendete Fluoridmenge von 0,1 mM entspricht 3,8 ppm.

Ein verändertes Reaktionsverhalten durch eine Bearbeitung der Proben vor Versuchsdurchführung wurde in der Literatur diskutiert. Eine erhöhte Säureempfindlichkeit des Schmelzes durch dessen Bearbeitung wie das Teilen wurde beobachtet [ten Cate und Exterkate 1986]. Im Vergleich zu großen Einzelproben ging von kleinen 25% mehr Mineral verloren. Weitere Untersuchungen bestätigten diese Beobachtungen [Mellberg *et al.* 1986]. Begründet wurde dies mit einer möglichen Zerstörung im prismatischen Bereich durch das Sägen und einer möglichen Diffusion aus dem Randbereich der Proben [ten Cate und Exterkate 1986]. Die hier verwendeten Proben wurden den individuellen Verhältnissen der Probandenprothesen angepasst,

weshalb Größenunterschiede zwischen den Proben auftraten. Die Dünnschliffe der Proben wurden aus den Zentren der Proben entnommen, um den genannten Effekt vom Rand der Probe zu vermeiden.

Eine Demineralisationsreduktion an gesunden Schmelzoberflächen mithilfe von Remineralisationslösungen konnte *in vitro* gezeigt werden, unter einer Zugabe von Fluorid (0,08 ppm) und Kalziumphosphatverbindungen mit Sättigungsgraden, die denen in der Plaqueflüssigkeit nach einer Saccharoseexposition ähneln. Durch Zugabe einer Konzentration von 0,19 ppm und größer konnte die Demineralisation inhibiert werden [Yamazaki und Margolis 2008]. Beim Vorhandensein selbst einer kleinen Menge an Fluorid (0,03 - 0,08 ppm) innerhalb des Biofilms, Speichels und künstlichen Mineralisationsmedien, überwiegt die Remineralisation vor der Demineralisation [Featherstone 1999; Hicks und Flaitz 2007].

Für gesunden Schmelz sind geringere Fluoridkonzentrationen nötig um eine Demineralisation zu verhindern. Die Fluoridkonzentration und somit die Triebkraft der Remineralisation an der intakten Oberfläche erfährt kaum Verringerung durch einen sehr geringen Diffusionsanteil des Fluorids in die intakte Schmelzoberfläche. Um die Demineralisation initialer Läsionen zu verhindern, sind signifikant höhere Fluoridkonzentrationen nötig. Einige Autoren beobachteten, dass bei einer demineralisierenden Lösung unter Zugabe von 1 ppm Fluorid die Demineralisation initialer Läsionen weiter fortschritt, wohingegen bei gesunder Schmelzoberfläche geringe Konzentrationen um 0,19 ppm, bei denselben demineralisierenden Konditionen, eine Demineralisation verhindern konnten [Yamazaki *et al.* 2007]. Initiale Läsionen sind deutlich poröser als gesunder Schmelz, stellen eine größere Oberfläche dar und bieten eine größere Penetration von Ionen der Lösung. Eine geringe Fluoridkonzentration wird in der äußeren porösen Schicht demineralisierten Schmelzes durch die Präzipitation von fluoridiertem Hydroxylapatit eventuell kritisch reduziert. Eine Demineralisation des inneren Schmelzes neben einer Remineralisation in den äußeren porösen Schichten ist möglich. Dawes und Weatherell beschrieben, dass Fluorid bei Konzentrationen von weniger als 4 mmol/l in oralen Flüssigkeiten nur leichte Reaktionen mit dem Zahnmineral eingeht, um Fluorhydroxylapatit zu bilden. Bei höheren Konzentrationen bildet sich Kalziumfluorid [Dawes und Weatherell 1990]. Trotz geringer Löslichkeit im Speichel wird der Auflösungsprozess durch die Oberflächenanlagerung von Speichelphosphaten und Pyrophosphaten bis zu einer Woche oder länger verzögert.

Die Clearancerate von exogenem Fluorid aus dem Speichel kann verlängert werden durch die Ablagerung von  $\text{CaF}_2$  an der Zahnoberfläche und seine allmähliche Auflösung, wenn die initialen Fluoridkonzentrationen hoch sind. Der Fluoridzusatz bei modifiziertem Saliva natura betrug 0,1 mM. Dies entspricht  $10^{-4}$  mmol/l. Die Wirkung von Kalziumfluorid als Depot ist wie bei Glandosane<sup>®</sup> (da kein Fluoridzusatz) durch die Verwendung des modifizierten Saliva naturas womöglich nicht erfolgt. Die Wirkung des beigesetzten Fluorids wäre somit von der Kontaktzeit der Probenoberflächen mit dem Speichelersatzmittel und dessen Clearancerate von der Probenoberfläche allein abhängig gewesen.

Die Clearancerate für Fluorid ist nicht konstant über die Mundhöhle verteilt sondern zeigt beachtliche Seitenspezifität. Generell ist die Speichelclearance bei gesunden Patienten lingual sehr viel schneller als bukkal. Dies ist bedingt durch das Vorhandensein größerer Speichelsekretionsdrüsen durch die Speichelhauptdrüsen, während bukkal vorwiegend kleine muköse Drüsen vorhanden sind [Dawes und Weatherell 1990]. Fast unmittelbar nach dem Spülen variieren die Fluoridkonzentrationen erheblich von Ort zu Ort im Mund. Dies ist mit Variationen in der Fluoridclearancerate zu erklären, welche von der anatomischen Lage der Speicheldrüsenausführungsgänge, Speichelsekretionsrate und anderen individuellen Variationen bezüglich der Okklusion und der Anatomie der Mundhöhle beeinflusst wird. In vielen Untersuchten war die Clearance im Unterkiefer schneller als zum Beispiel im Oberkiefer vestibulum [Weatherell *et al.* 1988]. In der Literatur werden größere interindividuelle Unterschiede in der Fluoridclearance als bei einem Individuum an unterschiedlichen Messtagen beschrieben [Weatherell *et al.* 1986; Ten Cate *et al.* 1988]. Somit bestehen erhebliche Variationen in der Fluoridclearance und Fluoridkonzentration durch die gesamte Mundhöhle [Weatherell *et al.* 1988]. Die speichelbedingte Clearance wird bei dem hier untersuchten Patientenkollektiv mit Hyposalivation eine sehr untergeordnete Rolle spielen. Im Hinblick auf eine kurze Kontaktzeit des Fluorids mit den Schmelzoberflächen spielen initiale Reaktionen bis zur Clearance des Fluorids durch Schleimhautbewegungen und Verschlucken möglicherweise eine besondere Rolle.

Eine Schwächung der Anfangsrate des Kristallwachstums bei der Remineralisation durch einen inhibierenden Effekt von Fluorid durch Fehlpassungen von Fluorapatitkristallen bei der Bildung des Hydroxylapatitgitters wird in der Literatur

diskutiert und könnte hier womöglich aufgrund der kurzen Kontaktzeit einen Einfluss haben [Amjad und Nancollas 1979].

Es wurde beobachtet, dass eine geringer übersättigte Remineralisationslösung zu einer besseren Remineralisation im Vergleich zu einer stärker übersättigten Lösung führt, welche vorrangig die äußeren Schmelzbereiche remineralisiert [Silverstone *et al.* 1981]. Die vorausgehende Studie konnte bei einer OKP-Sättigung von 2 und 1,4 für DKPD die besten Remineralisationsergebnisse erreichen [Tschoppe *et al.* 2009]. Eine weitere Steigerung der OKP-Sättigung auf 3 konnte keine Verbesserung der Remineralisation bewirken. Auch andere Autoren beobachteten eine optimale Remineralisation von Kariesläsionen durch eine relativ niedrige Kalzium- und Phosphatkonzentration (1 - 2 mmol/l) [Garcia-Godoy und Hicks 2008]. Dass auch bei einer starken Übersättigung an Kalziumphosphatverbindungen kein größerer Vorteil zu erzielen ist, lässt sich womöglich damit erklären, dass bei hohen Kalziumkonzentrationen die zur Verfügung stehenden Fluoride gebunden werden [Chow *et al.* 1992]. Die vermutlich entstehenden Kalziumfluoridpräparate und andere Kalzium-Phosphat-Komplexe sind durch ihre Inaktivität, vor allem bei einem hohen pH-Wert von 6,0, für Diffusionsvorgänge an der Grenzfläche von Flüssigkeit und Zahnhartsubstanzen nicht verfügbar [Schemehorn *et al.* 1999]. Eine leichte Übersättigung ist demzufolge ausreichend.

Hohe Kalzium- und Phosphatkonzentrationen führen zu einer raschen Präzipitation an der Schmelzoberfläche. Dieser Prozess verschließt Poren, die einen Zugang zu demineralisierten Bereichen ermöglichen, und limitiert somit die Remineralisation der darunterliegenden Bereiche [Garcia-Godoy und Hicks 2008]. Die Konzentration von Kalzium und Phosphaten an der voranschreitenden Demineralisationsfront, also in Schmelzläsionen unterhalb der pseudointakten Oberflächenschicht, beträgt ungefähr 0,1 mmol/l. Die Triebkraft für die Remineralisation besteht durch einen Konzentrationsgradienten vom 30fachen für lösliches Kalzium und Phosphat zwischen der Oberfläche und der Schmelzläsion unter der Oberfläche [Garcia-Godoy und Hicks 2008]. Remineralisationsprozesse benötigen daher Zeit und ein entsprechendes remineralisierendes Volumen, das in dieser Studie unter Berücksichtigung des Speichelersatzmittelverbrauchs wahrscheinlich nicht zur Verfügung stand.

Die Erhöhung des pH-Wertes eines bereits zugelassenen Produktes ist gemäß den Vorgaben des Deutschen Medizinproduktegesetzes nur nach strenger Bemessung der Kriterien erlaubt. In der Literatur wird beschrieben, dass selbst Lösungen mit einem niedrigen pH-Wert oder einem großen Anteil an titrierbaren Säuren keine Demineralisation an Zahnhartgeweben erzeugen, wenn eine entsprechende Sättigung in Hinblick auf Schmelzapatite vorhanden ist, welche zu einer verringerten Löslichkeit des Zahnapatits führt [Aoba 2004]. Es besteht wohl kein einheitlicher Konsens über die Verwendung neutraler oder saurer Fluoridpräparate. Saure Präparate zeigen den Vorteil einer erhöhten Fluoridaufnahme, beherbergen aber die Möglichkeit zu mukosaler Beeinträchtigung [Beumer *et al.* 1979]. Neutrale Remineralisationslösungen besitzen eine höhere Triebkraft zur Präzipitation. Dennoch weisen saure Remineralisationslösungen, die untersättigt in Bezug auf Schmelz, aber übersättigt im Hinblick auf Fluorapatit sind, eine verbesserte Remineralisation auf [Yamazaki und Margolis 2008]. Es konnte gezeigt werden, dass eine angesäuerte kalzifizierende Lösung (pH 5,0) zu einer signifikanten Reduktion der Läsionstiefe im Schmelz im Vergleich zu einer neutralen Lösung führte (pH 7,0) [Flaitz und Hicks 1994]. Es wird generell angenommen, dass die Remineralisation von Läsionskörpern diffusionskontrolliert ist [Yamazaki *et al.* 2007]. Die verbesserten Remineralisationseigenschaften, trotz der geringeren Triebkraft der sauren Lösung, werden durch ein Aufrechterhalten von Diffusionskanälen in der Schmelzoberfläche durch Schmelzauflösung erklärt [Yamazaki und Margolis 2008]. Eine verbesserte Penetration von Ionen in die Tiefe der Läsion wird somit erleichtert. Dies korreliert mit Beobachtungen bei denen durch eine Vorbehandlung von kariesähnlichen Läsionen mit Säureätzung eine darauffolgende Remineralisation durch eine neutrale Remineralisationslösung *in vitro* erzeugt wurde [Al-Khateeb *et al.* 2000].

Eine geringere Restspeichelfließrate ist mit einer Erniedrigung des pH-Wertes assoziiert [Wolff und Kleinberg 1998]. Die pH-Werte wurden in dieser Untersuchung nicht erhoben. Die Ausmaße dieses Einflusses lassen sich nicht einschätzen. Eine pH-Erniedrigung könnte zu einer Verringerung der Phosphat- und Hydroxylionenkonzentration geführt haben, die in Folge mit einer Verkleinerung des Ionenproduktes gegenüber dem Löslichkeitsproduktes einhergegangen sein kann, und somit zu Auflösungserscheinungen des Schmelzapatites geführt hat.

In der Literatur wird eine präferierte Verwendung muzinhaltiger Speichersatzmittel gegenüber CMC-basierten beschrieben [Hatton *et al.* 1987]. Die rheologischen Eigenschaften muzinhaltiger Speichersatzmittel sind mit denen des Gesamtspeichels vergleichbar, während die Eigenschaften von CMC-basierten Speichersatzmitteln anders sind [Vissink *et al.* 1984]. In dieser Untersuchung lag der Verbrauch an Glandosane<sup>®</sup> leicht über dem von modifiziertem Saliva natura. Eine Erklärung dafür könnte der Geschmack sein. Saliva natura enthält im Gegensatz zu Glandosane<sup>®</sup> Sorbitol und Xylitol. Während Sorbitol über keine aktiven antikariogenen Eigenschaften verfügt, werden Xylitol solche Eigenschaften zugesprochen [Mickenautsch und Yengopal 2012].

In Laborversuchen wurde eine Reduktion dentaler Plaque [Topitsoglou *et al.* 1983] und eine Wachstumsinhibition von *Streptokokkus mutans* beobachtet [Vadeboncoeur *et al.* 1983]. Die Zugabe von Xylitol zu Fluoriden wird in der Literatur als möglicherweise vorteilhaft in der Kariesprävention betrachtet [Makinen 2010].

Für Patienten, deren Mundhöhlen besonders trocken waren, wurden vergleichsweise kurze subjektive und objektive Effekte bezüglich der Befeuchtung der Mundschleimhaut beobachtet [Olsson und Axell 1991]. Dies wurde mit einer Störung der Mukosaoberfläche, die mit verminderter Retention oder gesteigerter Absorption einhergeht, begründet. In einem In-vitro-Modell wurde gezeigt, dass Speichel eine Barrierefunktion gegen die freie Penetration von Wasser durch die Mukosa besitzt [Adams 1975]. Die fehlende Korrelation des Speichersatzmittelverbrauchs zu den gemessenen Speichelfließraten könnte an einer subjektiv unterschiedlichen Wahrnehmung der Hyposalivation liegen, wie bereits in der Literatur beschrieben [Taylor und Miller 1999]. Die zusätzliche frequentierte Anwendung anderer Befeuchtungshilfen wie zum Beispiel Wasser ist nicht auszuschließen und könnte den Effekt der Speichersatzmittel beeinträchtigt haben.

Koulourides vermutet, dass Zahnhartsubstanz, die einen Härteverlust von unter 150 KHN erreicht, nicht wieder remineralisiert werden kann [Koulourides *et al.* 1961]. Greene und Newbrun vermuten, durch Erweiterung des Computer-Simulationsmodells von ten Cate, dass Läsionen nicht mehr als um 80% des herausgelösten Mineralanteils wieder vollständig remineralisiert werden können [Greene und Newbrun 1986].

Von einigen Autoren wurde schon seit einiger Zeit gefordert, ein Speichersatzmittel mit antimikrobieller Wirksamkeit gegen karies- und

parodontalpathogene Keime zu entwickeln [Guijarro Guijarro *et al.* 2001]. Einige Speichelersatzmittel wurden entwickelt, die Proteine, Enzyme und Kohlenhydrate enthalten, welche antimikrobielle Eigenschaften besitzen, wie Lysozyme, Laktoferrin, Laktoperoxidase und seine Substrate Thiozyanat und Hydrogenperoxid [Tenovuo 2002]. Für Saliva natura konnte kein signifikanter Einfluss auf das Adhäsionsverhalten von *Streptokokkus mutans* an den Schmelz gefunden werden [Hahnel *et al.* 2008].

In die Mundhygienesituation der Patienten wurde durch die Studienteilnahme nicht eingegriffen. Die Mundhygienesituationen der jeweiligen Patienten waren untereinander möglicherweise nicht vergleichbar, nicht zuletzt durch die unterschiedlichen Restbezahlungen. In einer Untersuchung an Patienten mit inadäquater Mundhygiene war die tägliche Anwendung einer 0,05%igen NaF-Mundspülung oder das wöchentliche Auftragen eines neutralen 15%igen NaF-Gels ineffektiv [Jansma *et al.* 1989]. Möglicherweise kann es eine Fluoridtherapie nicht vollständig mit einer hohen bakteriellen Herausforderung in der Mundhöhle aufnehmen [Featherstone 2009]. Die Kombination von oralen Hygienemaßnahmen, der täglichen lokalen Fluoridapplikation und einer saccharosearmen Ernährung stellte sich in einer Untersuchung als 63 mal effektiver in der Kariesprävention dar als orale Mundhygienemaßnahmen allein [Dreizen *et al.* 1977].

Die Untersuchung von möglichen Einflussfaktoren wie der pH-Wert des Restspeichels, die Lage der Proben zu den Speicheldrüsenausführungsgängen, die Positionierung der Proben in der Mundhöhle und ernährungsanamnestische Daten könnten die Ergebnisse solcher Untersuchungen differenzierter beurteilbar machen. Diese stellen aber auch einen vermehrten Studienaufwand dar und können die Einschlusskriterien für potentielle Studienteilnehmer weiter einengen, wodurch das Erreichen einer genügenden Fallzahl noch zunehmend erschwert sein könnte.

Untersuchungen mit dieser Problemstellung sind wichtig für Patienten, die unter Hyposalivation leiden. Diese stellen eine relativ wenig beachtete Gruppe dar, die durch einen oftmals hohen Leidensdruck gekennzeichnet ist. Da erkrankte Zähne einen potentiellen Infektionsweg in den Knochen darstellen, liegt eine Durchsanierung der Patienten vor Beginn der Strahlentherapie nahe [YoungHayward *et al.* 1969]. Diese erfolgt oftmals rigoros und geht nicht selten mit einer Entfernung nicht zeitnah und nicht mit guter Prognose versorgbarer Zähne einher. Durch die zusätzliche Belastung der Mukosa durch großflächigen Zahnersatz nach Zahnverlust, kommt dem Erhalt der

---

bestehenden Dentition eine besondere Bedeutung zu. Untersuchungen wie diese, mit dem Ziel, die zahnprotektiven Eigenschaften natürlichen Speichels zu simulieren, um Zahnschädigungen entgegenzuwirken, und somit langfristig den Zahnerhalt zu fördern, könnten bei Erfolg zur Weiterentwicklung hilfreicher Präparate für die Lebensqualitätsverbesserung dieser Patientengruppe beitragen.

## 9 Schlussfolgerungen

Die kurativen Effekte von modifiziertem Saliva natura konnten *in situ* nicht bestätigt werden. Eine Demineralisation gesunder Schmelproben konnte durch modifiziertes Saliva natura nicht verhindert werden. Nach siebenwöchiger Versuchsdauer zeigte sich an gesunden bovinen Schmelzoberflächen unter modifiziertem Saliva natura eine signifikante Demineralisation: eine Vergrößerung des Mineralverlusts ( $p = 0,012$ ; Wilcoxon-Test) und der Läsionstiefe ( $p = 0,047$ ; Wilcoxon-Test). Glandosane<sup>®</sup> verhielt sich über den Versuchszeitraum von 7 Wochen neutral gegenüber der gesunden Schmelzoberfläche. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Mineralverlust ( $p = 0,570$  Wilcoxon-Test) und der Läsionstiefe ( $p = 0,910$ ). An den Proben mit künstlichen Schmelzläsionen zeigten sich nach siebenwöchiger Versuchsdauer unter modifiziertem Saliva natura (Mineralverlust  $p = 0,955$ ; Läsionstiefe  $p = 0,307$ ; Wilcoxon) und Glandosane<sup>®</sup> (Mineralverlust  $p = 0,955$ ; Läsionstiefe  $p = 0,670$ , Wilcoxon) keine signifikanten Effekte.

Als problematisch stellte sich die Kontrolle von zusätzlichen Einflussfaktoren auf die Remin- und Demineralisationseigenschaften der untersuchten Speichlersatzmittel dar. Die intra- sowie interindividuellen Unterschiede in der Mundhöhle haben bei dieser kleinen Versuchsgruppen zu überproportional großen Einflüssen geführt, was sich in der großen Streuung der Ergebniswerte widerspiegelte. Der geringe Verbrauch an Speichlersatzmitteln über den Versuchszeitraum limitierte den Einfluss der verwendeten Mittel auf das Demineralisations- und Remineralisationsverhalten an den Probenoberflächen. Ein Zusammenhang zwischen den De- und Remineralisationsergebnissen und der Menge an verwendetem Speichlersatzmittel konnte in dieser Untersuchung nicht festgestellt werden. Ebenso wenig konnte ein Zusammenhang zwischen der Speichelfliessrate und dem Verbrauch an Speichlersatzmittel gefunden werden.

## 10 Literaturverzeichnis

1. Taylor SE, Miller EG. Preemptive pharmacologic intervention in radiation-induced salivary dysfunction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;221:14-26.
2. Imfeld T, Lutz F. The subjective evaluation of oral health in 40- to 69-year-old subjects. A representative survey of 600 persons in German- and French-speaking Switzerland. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 1995;105:1272-1283.
3. Meyer-Lueckel H, Schulte-Monting J, Kielbassa AM. The effect of commercially available saliva substitutes on predemineralized bovine dentin in vitro. *Oral Dis* 2002;8:192-198.
4. Meyer-Lueckel H, Tschoppe P, Kielbassa AM. Linseed based saliva substitutes and their effect on mineral dissolution of predemineralized bovine dentin in vitro. *J Dent* 2006;34:751-756.
5. Kielbassa AM, Shohadai SP, Schulte-Monting J. Effect of saliva substitutes on mineral content of demineralized and sound dental enamel. *Support Care Cancer* 2001;9:40-47.
6. Tschoppe P, Kielbassa AM, Toll R, Meyer-Lueckel H. Modification of the mineralizing capacity of a saliva substitute (*Saliva natura*) on enamel in vitro. *Laryngorhinootologie* 2009;88:717-722.
7. Simmer JP, Hu JC. Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry. *J Dent Educ* 2001;65:896-905.
8. Patel PR, Brown WE. Thermodynamic solubility product of human tooth enamel: powdered sample. *J Dent Res* 1975;54:728-736.
9. Elliott JC. Structure, crystal chemistry and density of enamel apatites. *Ciba Found Symp* 1997;205:54-67; discussion 67-72.
10. Marshall AF, Lawless KR. TEM study of the central dark line in enamel crystallites. *J Dent Res* 1981;60:1773-1782.
11. Kerebel B, Daculsi G, Kerebel LM. Ultrastructural studies of enamel crystallites. *J Dent Res* 1979;58:844-851.
12. Dong W, Warshawsky H. Failure to demonstrate a protein coat on enamel crystallites by morphological means. *Arch Oral Biol* 1995;40:321-330.
13. Diekwisch TG, Berman BJ, Gentner S, Slavkin HC. Initial enamel crystals are not spatially associated with mineralized dentine. *Cell Tissue Res* 1995;279:149-167.
14. Cui FZ, Ge J. New observations of the hierarchical structure of human enamel, from nanoscale to microscale. *J Tissue Eng Regen Med* 2007;1:185-191.
15. Daculsi G, Menanteau J, Kerebel LM, Mitre D. Length and shape of enamel crystals. *Calcif Tissue Int* 1984;36:550-555.
16. Driessens FC. Mineral aspects of dentistry. *Monogr Oral Sci* 1982;10:1-215.

17. Young RA. Implications of atomic substitutions and other structural details in apatites. *J Dent Res* 1974;53:193-203.
18. Newesly H. Problem of non-stoichiometry in biological calcium phosphates. *Dtsch. Zahnärztliche Z.* 1969;484-485.
19. Holcomb DW, Young RA. Thermal decomposition of human tooth enamel. *Calcif Tissue Int* 1980;31:189-201.
20. Wolfgens JH, Bervoets TJ, Witjes F, Driessens FC. Changes in the composition of the enamel of human premolar teeth shortly after eruption. *Arch Oral Biol* 1981;26:717-719.
21. Weatherell JA, Robinson C, Hallsworth AS. Variations in the chemical composition of human enamel. *J Dent Res* 1974;53:180-192.
22. Weidmann SM, Weatherell JA, Hamm SM. Variations of enamel density in sections of human teeth. *Arch Oral Biol* 1967;12:85-97.
23. Sakae T. X-ray diffraction and thermal studies of crystals from the outer and inner layers of human dental enamel. *Arch Oral Biol* 1988;33:707-713.
24. Theuns HM, Driessens FC, van Dijk JW, Groeneveld A. Experimental evidence for a gradient in the solubility and in the rate of dissolution of human enamel. *Caries Res* 1986;20:24-31.
25. Kodaka T, Debari K, Yamada M, Kuroiwa M. Correlation between microhardness and mineral content in sound human enamel (short communication). *Caries Res* 1992;26:139-141.
26. Sakae T. variations in dental enamel crystallites and micro-structure. *Journal of Oral Biosciences* 2006;48:85-93.
27. Moreno EC, Kresak M, Zahradnik RT. Physicochemical aspects of fluoride-apatite systems relevant to the study of dental caries. *Caries Res* 1977;11 Suppl 1:142-171.
28. Esser M, Tinschert J, Marx R. Materialkennwerte der Zahnhartsubstanz des Rindes in Vergleich zur humanen Zahnhartsubstanz. *Dtsch Zahnärztl Z* 1998;53:713-717.
29. Manning RH, Edgar WM. Intra-oral models for studying de- and remineralization in man: methodology and measurement. *J Dent Res* 1992;71 895-900.
30. Mellberg JR, Loertscher KL. Comparison of in vitro fluoride uptake by human and bovine enamel from acidulated phosphate-fluoride solutions. *J Dent Res* 1974;53:64-67.
31. Tanaka JL, Medici Filho E, Salgado JA, Salgado MA, Moraes LC, Moraes ME, Castilho JC. Comparative analysis of human and bovine teeth: radiographic density. *Braz Oral Res* 2008;22:346-351.
32. Arends J, Jongebloed WL. Crystallites dimensions of enamel. *J Biol Buccale* 1978;6:161-171.
33. Featherstone JD, Mellberg JR. Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. *Caries Res* 1981;15:109-114.
34. Ring ME. W. D. Miller. The pioneer who laid the foundation for modern dental research. *N Y State Dent J* 2002;68:34-37.

35. Orland FJ. An evaluation of bacteria and antibiotics in the dental caries process. *Mil Surg* 1950;106:345-347.
36. Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Wagner M, Gordon HA, Luckey TD. Use of the germfree animal technic in the study of experimental dental caries. I. Basic observations on rats reared free of all microorganisms. *J Dent Res* 1954;33:147-174.
37. Tanzer JM. Dental caries is a transmissible infectious disease: the Keyes and Fitzgerald revolution. *J Dent Res* 1995;74:1536-1542.
38. Krasse B. The Vipeholm Dental Caries Study: recollections and reflections 50 years later. *J Dent Res* 2001;80:1785-1788.
39. Harris R. Biology of the children of Hopewood House, Bowral, Australia. 4. Observations on dental-caries experience extending over five years (1957-61). *J Dent Res* 1963;42:1387-1399.
40. Loesche WJ. Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. *J Dent Res* 1979;58:2404-2412.
41. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994;8:263-271.
42. Clarkson BH. Introduction to cariology. *Dent Clin North Am* 1999;43:569-578, v.
43. Zahradnik RT, Moreno EC, Burke EJ. Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. *J Dent Res* 1976;55:664-670.
44. Siqueira WL, Bakkal M, Xiao Y, Sutton JN, Mendes FM. Quantitative proteomic analysis of the effect of fluoride on the acquired enamel pellicle. *PLoS One* 2012;7:e42204.
45. Hannig M, Joiner A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci* 2006;19:29-64.
46. Ashley FP, Wilson RF. Dental plaque and caries. A 3-year longitudinal study in children. *Br Dent J* 1977;142:85-91.
47. Margolis HC, Moreno EC. Composition of pooled plaque fluid from caries-free and caries-positive individuals following sucrose exposure. *J Dent Res* 1992;71:1776-1784.
48. Pearce E. Plaque minerals and dental caries. *N Z Dent J* 1998;94:12-15.
49. Aires CP, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization. *Caries Res* 2006;40:28-32.
50. Ribeiro CC, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Rosalen PL, Cury JA. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. *Br J Nutr* 2005;94:44-50.
51. Gao XJ, Fan Y, Kent RL, Jr., Van Houte J, Margolis HC. Association of caries activity with the composition of dental plaque fluid. *J Dent Res* 2001;80:1834-1839.
52. Bradshaw DJ, Marsh PD. Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro. *Caries Res* 1998;32:456-462.
53. Banas JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci* 2004;9:1267-1277.

54. Kuramitsu HK, Wang BY. The whole is greater than the sum of its parts: dental plaque bacterial interactions can affect the virulence properties of cariogenic *Streptococcus mutans*. *Am J Dent* 2011;24:153-154.
55. Featherstone JD. The continuum of dental caries-evidence for a dynamic disease process. *J Dent Res* 2004;83 Spec No C:C39-42.
56. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res* 2008;42:409-418.
57. Sansone C, Van Houte J, Joshipura K, Kent R, Margolis HC. The association of mutans streptococci and non-mutans streptococci capable of acidogenesis at a low pH with dental caries on enamel and root surfaces. *J Dent Res* 1993;72:508-516.
58. Boue D, Armau E, Tiraby G. A bacteriological study of rampant caries in children. *J Dent Res* 1987;66:23-28.
59. Newbrun E. Topical fluorides in caries prevention and management: a North American perspective. *J Dent Educ* 2001;65:1078-1083.
60. Ingram GS. Chemical events during tooth dissolution. *J Dent Res* 1990;69 Spec No:581-586; discussion 634-586.
61. Hallsworth AS, Robinson C, Weatherbell JA. Mineral and magnesium distribution within the approximal carious lesion of dental enamel. *Caries Res* 1972;6:156-168.
62. Tohda H, Takuma S, Tanaka N. Intracrystalline structure of enamel crystals affected by caries. *J Dent Res* 1987;66:1647-1653.
63. Vogel GL, Mao Y, Carey CM, Chow LC. Changes in the permselectivity of human teeth during caries attack. *J Dent Res* 1997;76:673-681.
64. Margolis HC, Moreno EC. Kinetic and thermodynamic aspects of enamel demineralization. *Caries Res* 1985;19:22-35.
65. Aoba T, Moriwaki Y, Doi Y, Ozkazaki M, Takahashi J, Yagi T. The intact surface layer in natural enamel caries and acid-dissolved hydroxyapatite pellets. An X-ray diffraction study. *J Oral Pathol* 1981;10:32-39.
66. Chow LC. Diffusion of ions between two solutions saturated with respect to hydroxyapatite: A possible mechanism for subsurface demineralization of teeth. *J Res Natl Inst Stand Technol* 2010;115:217-224.
67. Dawes C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *J Can Dent Assoc* 2003;69:722-724.
68. Featherstone JD. The caries balance: the basis for caries management by risk assessment. *Oral Health Prev Dent* 2004;2 Suppl 1:259-264.
69. Larsen MJ. Dissolution of enamel. *Scand J Dent Res* 1973;81:518-522.
70. Larsen MJ. Degrees of saturation with respect to apatites in parotid saliva at various pH values. *Scand J Dent Res* 1975;83:7-12.
71. Thylstrup A. Clinical evidence of the role of pre-eruptive fluoride in caries prevention. *J Dent Res* 1990;69 Spec No:742-750; discussion 820-743.

72. Ogaard B, Rolla G, Ruben J, Dijkman T, Arends J. Microradiographic study of demineralization of shark enamel in a human caries model. *Scand J Dent Res* 1988;96:209-211.
73. Ekstrand J, Oliveby A. Fluoride in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 1999;57:330-333.
74. Vogel GL, Tenuta LM, Schumacher GE, Chow LC. No calcium-fluoride-like deposits detected in plaque shortly after a sodium fluoride mouthrinse. *Caries Res* 2010;44:108-115.
75. Whitford GM, Buzalaf MA, Bijella MF, Waller JL. Plaque fluoride concentrations in a community without water fluoridation: effects of calcium and use of a fluoride or placebo dentifrice. *Caries Res* 2005;39:100-107.
76. Attin T, Hellwig E. Salivary fluoride content after toothbrushing with a sodium fluoride and an amine fluoride dentifrice followed by different mouthrinsing procedures. *J Clin Dent* 1996;7:6-8.
77. Koo H. Strategies to enhance the biological effects of fluoride on dental biofilms. *Adv Dent Res* 2008;20:17-21.
78. Fejerskov O, Thylstrup A, Larsen MJ. Rational use of fluorides in caries prevention. A concept based on possible cariostatic mechanisms. *Acta Odontol Scand* 1981;39:241-249.
79. ten Cate JM, Duijsters PP. Influence of fluoride in solution on tooth demineralization. II. Microradiographic data. *Caries Res* 1983;17:513-519.
80. Fischer C, Lussi A, Hotz P. The cariostatic mechanisms of action of fluorides. A review. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 1995;105:311-317.
81. Moreno EC, Zahradnik RT. Chemistry of enamel subsurface demineralization in vitro. *J Dent Res* 1974;53:226-235.
82. Balzar Ekenback S, Linder LE, Sund ML, Lonnie H. Effect of fluoride on glucose incorporation and metabolism in biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *Eur J Oral Sci* 2001;109:182-186.
83. Pandit S, Kim JE, Jung KH, Chang KW, Jeon JG. Effect of sodium fluoride on the virulence factors and composition of *Streptococcus mutans* biofilms. *Arch Oral Biol* 2011;56:643-649.
84. Nelson DG, Jongebloed WL, Arends J. Crystallographic structure of enamel surfaces treated with topical fluoride agents: TEM and XRD considerations. *J Dent Res* 1984;63:6-12.
85. Christoffersen J, Christoffersen MR, Kibaczyc W, Perdok WG. Kinetics of dissolution and growth of calcium fluoride and effects of phosphate. *Acta Odontol Scand* 1988;46:325-336.
86. Duschner H, Uchtmann H. Effect of sodium fluoride, stannous fluoride, amine hydrofluoride and sodium monofluorophosphate on the formation of precipitates adhering to bovine enamel. *Caries Res* 1988;22:65-71.
87. Saxegaard E, Rolla G. Kinetics of acquisition and loss of calcium fluoride by enamel in vivo. *Caries Res* 1989;23:406-411.
88. Saxegaard E, Lagerlof F, Rolla G. Dissolution of calcium fluoride in human saliva. *Acta Odontol Scand* 1988;46:355-359.
89. Lagerlof F, Saxegaard E, Barkvoll P, Rolla G. Effects of inorganic orthophosphate and pyrophosphate on dissolution of calcium fluoride in water. *J Dent Res* 1988;67:447-449.

90. Ogaard B. CaF<sub>2</sub> formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. *Caries Res* 2001;35 Suppl 1:40-44.
91. Chander S, Chiao CC, Fuerstenau DW. Transformation of calcium fluoride for caries prevention. *J Dent Res* 1982;61:403-407.
92. Harding AM, Zero DT, Featherstone JD, McCormack SM, Shields CP, Proskin HM. Calcium fluoride formation on sound enamel using fluoride solutions with and without lactate. *Caries Res* 1994;28:1-8.
93. Koch G, Petersson LG, Kling E, Kling L. Effect of 250 and 1000 ppm fluoride dentifrice on caries. A three-year clinical study. *Swed Dent J* 1982;6:233-238.
94. Rose RK, Shellis RP, Lee AR. The role of cation bridging in microbial fluoride binding. *Caries Res* 1996;30:458-464.
95. Featherstone JD. Remineralization, the natural caries repair process--the need for new approaches. *Adv Dent Res* 2009;21:4-7.
96. Duckworth RM, Morgan SN, Murray AM. Fluoride in saliva and plaque following use of fluoride-containing mouthwashes. *J Dent Res* 1987;66:1730-1734.
97. Eanes ED. The influence of fluoride on the seeded growth of apatite from stable supersaturated solutions at pH 7.4. *J Dent Res* 1980;59:144-150.
98. Amjad Z, Nancollas GH. Effect of fluoride on the growth of hydroxyapatite and human dental enamel. *Caries Res* 1979;13:250-258.
99. Borsboom PC, vd Mei HC, Arends J. Enamel lesion formation with and without 0.12 ppm F in solution. *Caries Res* 1985;19:396-402.
100. Ingram GS, Morgan SN. Oral fluoride levels and ambient fluoride intake. *Caries Res* 1987;21:179 [abstract].
101. Koulourides T, Phantumvanit P, Munksgaard EC, Housch T. An intraoral model used for studies of fluoride incorporation in enamel. *J Oral Pathol* 1974;3:185-196.
102. ten Cate JM, Duijsters PP. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res* 1982;16:201-210.
103. Iijima Y, Koulourides T. Fluoride incorporation into and retention in remineralized enamel. *J Dent Res* 1989;68:1289-1292.
104. ten Cate JM, Jongebloed WL, Arends J. Remineralization of artificial enamel lesions in vitro. IV. Influence of fluorides and diphosphonates on short- and long-term remineralization. *Caries Res* 1981;15:60-69.
105. Wefel JS. Effects of fluoride on caries development and progression using intra-oral models. *J Dent Res* 1990;69 Spec No:626-633; discussion 634-626.
106. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res* 2010;89:1187-1197.
107. Yanagisawa T, Miake Y. High-resolution electron microscopy of enamel-crystal demineralization and remineralization in carious lesions. *J Electron Microsc (Tokyo)* 2003;52:605-613.

108. Koulourides T, Cueto H, Pigman W. Rehardening of softened enamel surfaces of human teeth by solutions of calcium phosphates. *Nature* 1961;189:226-227.
109. Koulourides T, Reed JL, Jr. effects of calcium, phosphate and fluoride ions on the rate of softening and dissolution of tooth enamel *Arch Oral Biol* 1964;9:585-594.
110. Koulourides T, Cameron B. Enamel remineralization as a factor in the pathogenesis of dental caries. *J Oral Pathol* 1980;9:255-269.
111. Zero DT. In situ caries models. *Adv Dent Res* 1995;9:214-230; discussion 231-214.
112. Yamazaki H, Margolis HC. Enhanced enamel remineralization under acidic conditions in vitro. *J Dent Res* 2008;87:569-574.
113. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries enamel structure and the caries process in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 2). *J Clin Pediatr Dent* 2004;28:119-124.
114. Larsen MJ, Pearce EI. Saturation of human saliva with respect to calcium salts. *Arch Oral Biol* 2003;48:317-322.
115. Schlesinger DH, Hay DI. Complete covalent structure of statherin, a tyrosine-rich acidic peptide which inhibits calcium phosphate precipitation from human parotid saliva. *J Biol Chem* 1977;252:1689-1695.
116. Wallach D, Schramm M. Calcium and the exportable protein in rat parotid gland. Parallel subcellular distribution and concomitant secretion. *Eur J Biochem* 1971;21:433-437.
117. Lagerlof F, Ekstrand J. The effect of flow rate on the ionized calcium concentration of human parotid saliva. *Caries Res* 1982;16:123-128.
118. Lagerlof F, Lindqvist L. A method for determining concentrations of calcium complexes in human parotid saliva by gel filtration. *Arch Oral Biol* 1982;27:735-738.
119. Matsuo S, Lagerlof F. Relationship between total and ionized calcium concentrations in human whole saliva and dental plaque fluid. *Arch Oral Biol* 1991;36:525-527.
120. Brown WE, Eidelman N, Tomazic B. Octacalcium phosphate as a precursor in biomineral formation. *Adv Dent Res* 1987;1:306-313.
121. Johnsson MS, Nancollas GH. The role of brushite and octacalcium phosphate in apatite formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1992;3:61-82.
122. Shellis RP. A scanning electron-microscopic study of solubility variations in human enamel and dentine. *Arch Oral Biol* 1996;41:473-484.
123. Lagerlof F. Effects of flow rate and pH on calcium phosphate saturation in human parotid saliva. *Caries Res* 1983;17:403-411.
124. Henson BS, Inglehart MR, Eisbruch A, Ship JA. Preserved salivary output and xerostomia-related quality of life in head and neck cancer patients receiving parotid-sparing radiotherapy. *Oral Oncol* 2001;37:84-93.
125. Murdoch-Kinch CA, Kim HM, Vineberg KA, Ship JA, Eisbruch A. Dose-effect relationships for the submandibular salivary glands and implications for their sparing by intensity modulated radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;72:373-382.

126. Vergeer MR, Doornaert PA, Rietveld DH, Leemans CR, Slotman BJ, Langendijk JA. Intensity-modulated radiotherapy reduces radiation-induced morbidity and improves health-related quality of life: results of a nonrandomized prospective study using a standardized follow-up program. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009;74:1-8.
127. van der Laan HP, van de Water TA, van Herpt HE, Christianen ME, Bijl HP, Korevaar EW, Rasch CR, van 't Veld AA, van der Schaaf A, Schilstra C, Langendijk JA. The potential of intensity-modulated proton radiotherapy to reduce swallowing dysfunction in the treatment of head and neck cancer: A planning comparative study. *Acta Oncol* 2012;52(3):561-569.
128. Steneker M, Lomax A, Schneider U. Intensity modulated photon and proton therapy for the treatment of head and neck tumors. *Radiother Oncol* 2006;80:263-267.
129. Lomax AJ, Goitein M, Adams J. Intensity modulation in radiotherapy: photons versus protons in the paranasal sinus. *Radiother Oncol* 2003;66:11-18.
130. Jha N, Seikaly H, McGaw T, Coulter L. Submandibular salivary gland transfer prevents radiation-induced xerostomia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;46:7-11.
131. Wasserman TH, Brizel DM, Henke M, Monnier A, Eschwege F, Sauer R, Strnad V. Influence of intravenous amifostine on xerostomia, tumor control, and survival after radiotherapy for head-and-neck cancer: 2-year follow-up of a prospective, randomized, phase III trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;63:985-990.
132. Jellema AP, Slotman BJ, Muller MJ, Leemans CR, Smeele LE, Hoekman K, Aaronson NK, Langendijk JA. Radiotherapy alone, versus radiotherapy with amifostine 3 times weekly, versus radiotherapy with amifostine 5 times weekly: A prospective randomized study in squamous cell head and neck cancer. *Cancer* 2006;107:544-553.
133. McChesney SL, Gillette EL, Dewhirst MW, Withrow SJ. Influence of WR 2721 on radiation response of canine soft tissue sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986;12:1957-1963.
134. Avila JL, Grundmann O, Burd R, Limesand KH. Radiation-induced salivary gland dysfunction results from p53-dependent apoptosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009;73:523-529.
135. Lombaert IM, Brunsting JF, Wierenga PK, Kampinga HH, de Haan G, Coppes RP. Keratinocyte growth factor prevents radiation damage to salivary glands by expansion of the stem/progenitor pool. *Stem Cells* 2008;26:2595-2601.
136. Teymoortash A, Muller F, Juricko J, Bieker M, Mandic R, Librizzi D, Hoffken H, Pfestroff A, Werner JA. Botulinum toxin prevents radiotherapy-induced salivary gland damage. *Oral Oncol* 2009;45:737-739.
137. Senahayake F, Piggott K, Hamilton-Miller JM. A pilot study of Salix SST (saliva-stimulating lozenges) in post-irradiation xerostomia. *Curr Med Res Opin* 1998;14:155-159.
138. Vissink A, Burlage FR, Spijkervet FK, Jansma J, Coppes RP. Prevention and treatment of the consequences of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:213-225.
139. Niedermeier W, Matthaeus C, Meyer C, Staar S, Muller RP, Schulze HJ. Radiation-induced hyposalivation and its treatment with oral pilocarpine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;86:541-549.

140. Petrone D, Condemi JJ, Fife R, Gluck O, Cohen S, Dalgin P. A double-blind, randomized, placebo-controlled study of cevimeline in Sjogren's syndrome patients with xerostomia and keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum* 2002;46:748-754.
141. Braga FP, Sugaya NN, Hirota SK, Weinfeld I, Magalhaes MH, Migliari DA. The effect of acupuncture on salivary flow rates in patients with radiation-induced xerostomia. *Minerva Stomatol* 2008;57:343-348.
142. O'Sullivan EM, Higginson IJ. Clinical effectiveness and safety of acupuncture in the treatment of irradiation-induced xerostomia in patients with head and neck cancer: a systematic review. *Acupunct Med* 2010;28:191-199.
143. Delporte C, O'Connell BC, He X, Lancaster HE, O'Connell AC, Agre P, Baum BJ. Increased fluid secretion after adenoviral-mediated transfer of the aquaporin-1 cDNA to irradiated rat salivary glands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3268-3273.
144. Preston GM, Agre P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:11110-11114.
145. Gao R, Yan X, Zheng C, Goldsmith CM, Afione S, Hai B, Xu J, Zhou J, Zhang C, Chiorini JA, Baum BJ, Wang S. AAV2-mediated transfer of the human aquaporin-1 cDNA restores fluid secretion from irradiated miniature pig parotid glands. *Gene Ther* 2011;18:38-42.
146. Baum BJ, Zheng C, Alevizos I, Cotrim AP, Liu S, McCullagh L, Goldsmith CM, McDermott N, Chiorini JA, Nikolov NP, Illei GG. Development of a gene transfer-based treatment for radiation-induced salivary hypofunction. *Oral Oncol* 2010;46:4-8.
147. Lombaert IM, Brunsting JF, Wierenga PK, Faber H, Stokman MA, Kok T, Visser WH, Kampinga HH, de Haan G, Coppes RP. Rescue of salivary gland function after stem cell transplantation in irradiated glands. *PLoS One* 2008;3:e2063.
148. Mossman K, Shatzman A, Chencharick J. Long-term effects of radiotherapy on taste and salivary function in man. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982;8:991-997.
149. Tomita Y, Osaki T. Gustatory impairment and salivary gland pathophysiology in relation to oral cancer treatment. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1990;19:299-304.
150. Lees J. Incidence of weight loss in head and neck cancer patients on commencing radiotherapy treatment at a regional oncology centre. *Eur J Cancer Care (Engl)* 1999;8:133-136.
151. Ripamonti C, Fulfaro F. Taste alterations in cancer patients. *J Pain Symptom Manage* 1998;16:349-351.
152. Dose AM. The symptom experience of mucositis, stomatitis, and xerostomia. *Semin Oncol Nurs* 1995;11:248-255.
153. Rhodus NL, Moller K, Colby S, Bereuter J. Dysphagia in patients with three different etiologies of salivary gland dysfunction. *Ear Nose Throat J* 1995;74:39-42.
154. Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB, Nauntofte B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis* 2002;8:117-129.
155. Dawes C. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *J Physiol* 1972;220:529-545.

156. Edgar WM. Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. *Br Dent J* 1990;169:96-98.
157. Nauntofte B. Regulation of electrolyte and fluid secretion in salivary acinar cells. *Am J Physiol* 1992;263:G823-837.
158. Dawes C, Weatherell JA. Kinetics of fluoride in the oral fluids. *J Dent Res* 1990;69 Spec No:638-644; discussion 682-633.
159. Llana-Puy C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11:E449-455.
160. Amerongen AV, Veerman EC. Saliva-the defender of the oral cavity. *Oral Dis* 2002;8:12-22.
161. Lilienthal B. An analysis of the buffer systems in saliva. *J Dent Res* 1955;34:516-530.
162. Leung SW. A demonstration of the importance of bicarbonate as a salivary buffer. *J Dent Res* 1951;30:403-414.
163. Izutsu KT. Theory and Measurement of the buffer value of bicarbonate in saliva. *J Theor Biol* 1981;90:397-403.
164. Lilienthal B. Buffering systems in the mouth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1955;8:828-841.
165. Bardow A, Moe D, Nyvad B, Nauntofte B. The buffer capacity and buffer systems of human whole saliva measured without loss of CO<sub>2</sub>. *Arch Oral Biol* 2000;45:1-12.
166. Izutsu KT, Madden PR. Evidence for the presence of carbamino compounds in human saliva. *J Dent Res* 1978;57:319-325.
167. Heintze U, Birkhed D, Bjorn H. Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva as a function of age and sex. *Swed Dent J* 1983;7:227-238.
168. Nieuw Amerongen AV, Oderkerk CH, Driessen AA. Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. *Caries Res* 1987;21:297-309.
169. Ship JA, Baum BJ. Is reduced salivary flow normal in old people? *Lancet* 1990;336:1507.
170. Scott J, Flower EA, Burns J. A quantitative study of histological changes in the human parotid gland occurring with adult age. *J Oral Pathol* 1987;16:505-510.
171. Ship JA, Pillemer SR, Baum BJ. Xerostomia and the geriatric patient. *J Am Geriatr Soc* 2002;50:535-543.
172. Niedermeier W, Huber M, Fischer D, Beier K, Muller N, Schuler R, Brinninger A, Fartasch M, Diepgen T, Matthaeus C, Meyer C, Hector MP. Significance of saliva for the denture-wearing population. *Gerodontology* 2000;17:104-118.
173. Shiboski CH, Hodgson TA, Ship JA, Schiodt M. Management of salivary hypofunction during and after radiotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103 Suppl:S66 e61-19.
174. Marks JE, Davis CC, Gottsman VL, Purdy JE, Lee F. The effects of radiation of parotid salivary function. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1981;7:1013-1019.

175. Mossman KL. Quantitative radiation dose-response relationships for normal tissues in man. II. Response of the salivary glands during radiotherapy. *Radiat Res* 1983;95:392-398.
176. Franzen L, Funegard U, Ericson T, Henriksson R. Parotid gland function during and following radiotherapy of malignancies in the head and neck. A consecutive study of salivary flow and patient discomfort. *Eur J Cancer* 1992;28:457-462.
177. Funegard U, Franzen L, Ericson T, Henriksson R. Parotid saliva composition during and after irradiation of head and neck cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1994;30B:230-233.
178. Liu RP, Fleming TJ, Toth BB, Keene HJ. Salivary flow rates in patients with head and neck cancer 0.5 to 25 years after radiotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990;70:724-729.
179. Wescott WB, Mira JG, Starcke EN, Shannon IL, Thornby JI. Alterations in whole saliva flow rate induced by fractionated radiotherapy. *AJR Am J Roentgenol* 1978;130:145-149.
180. Eisbruch A, Kim HM, Terrell JE, Marsh LH, Dawson LA, Ship JA. Xerostomia and its predictors following parotid-sparing irradiation of head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;50:695-704.
181. Berthrong M. Pathologic changes secondary to radiation. *World J Surg* 1986;10:155-170.
182. Konings AW, Coppes RP, Vissink A. On the mechanism of salivary gland radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;62:1187-1194.
183. Burlage FR, Coppes RP, Meertens H, Stokman MA, Vissink A. Parotid and submandibular/sublingual salivary flow during high dose radiotherapy. *Radiother Oncol* 2001;61:271-274.
184. Vissink A, Kalicharan D, EJ SG, Jongebloed WL, Ligeon EE, Nieuwenhuis P, Konings AW. Acute irradiation effects on morphology and function of rat submandibular glands. *J Oral Pathol Med* 1991;20:449-456.
185. Leslie MD, Dische S. The early changes in salivary gland function during and after radiotherapy given for head and neck cancer. *Radiother Oncol* 1994;30:26-32.
186. Stephens LC, King GK, Peters LJ, Ang KK, Schultheiss TE, Jardine JH. Unique radiosensitivity of serous cells in rhesus monkey submandibular glands. *Am J Pathol* 1986;124:479-487.
187. Radfar L, Sirois DA. Structural and functional injury in minipig salivary glands following fractionated exposure to 70 Gy of ionizing radiation: an animal model for human radiation-induced salivary gland injury. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96:267-274.
188. Valdez IH, Atkinson JC, Ship JA, Fox PC. Major salivary gland function in patients with radiation-induced xerostomia: flow rates and sialochemistry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993;25:41-47.
189. Kielbassa AM, Wrbas KT, Schulte-Monting J, Hellwig E. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. *Arch Oral Biol* 1999;44:243-251.
190. Joyston-Bechal S. Prevention of dental diseases following radiotherapy and chemotherapy. *Int Dent J* 1992;42:47-53.

191. van der Reijden WA, Vissink A, Veerman E, Amerongen A. Treatment of oral dryness related complaints (xerostomia) in Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1999;58:465-474.
192. Vissink A, De Jong HP, Busscher HJ, Arends J, Gravenmade EJ. Wetting properties of human saliva and saliva substitutes. *J Dent Res* 1986;65:1121-1124.
193. Van der Reijden WA, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Rheological properties of commercially available polysaccharides with potential use in saliva substitutes. *Biorheology* 1994;31:631-642.
194. Momm F, Volegova-Neher NJ, Schulte-Monting J, Guttenberger R. Different saliva substitutes for treatment of xerostomia following radiotherapy. A prospective crossover study. *Strahlenther Onkol* 2005;181:231-236.
195. van der Reijden WA, van der Kwaak H, Vissink A, Veerman EC, Amerongen AV. Treatment of xerostomia with polymer-based saliva substitutes in patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1996;39:57-63.
196. Shannon IL, Edmonds EJ. Effect of fluoride concentration on rehardening of enamel by a saliva substitute. *Int Dent J* 1978;28:421-426.
197. Shannon IL, Trodahl JN, Starcke EN. Remineralization of enamel by a saliva substitute designed for use by irradiated patients. *Cancer* 1978;41:1746-1750.
198. Vergo CT, Kadish SP. Dentures as artificial saliva reservoirs in the irradiated edentulous patient with xerostomia. A pilot study. *Oral Surg* 1981;51:229-232.
199. Vissink A, s'Gravenmade EJ, Panders AK, Olthef A, Vermey A, Huisman MC, Visch LL. Artificial saliva reservoirs. *J Prosthet Dent* 1984;52:710-715.
200. Joyston-Bechal S, Kidd EA. The effect of three commercially available saliva substitutes on enamel in vitro. *Br Dent J* 1987;163:187-190.
201. Johansson G, Andersson G, Attstrom R, Glantz PO, Larsson K. The effect of Salinum on the symptoms of dry mouth: a pilot study. *Gerodontology* 1994;11:46-49.
202. Sweeney MP, Bagg J, Baxter WP, Aitchison TC. Clinical trial of a mucin-containing oral spray for treatment of xerostomia in hospice patients. *Palliat Med* 1997;11:225-232.
203. Johansson G, Andersson G, Edwardsson S, Bjorn AL, Manthorpe R, Attstrom R. Effects of mouthrinses with linseed extract Salinum without/with chlorhexidine on oral conditions in patients with Sjogren's syndrome. A double-blind crossover investigation. *Gerodontology* 2001;18:87-94.
204. Hatton MN, Levine MJ, Margarone JE, Aguirre A. Lubrication and viscosity features of human saliva and commercially available saliva substitutes. *J Oral Maxillofac Surg* 1987;45:496-499.
205. Hahnel S, Behr M, Handel G, Burgers R. Saliva substitutes for the treatment of radiation-induced xerostomia-a review. *Support Care Cancer* 2009;17:1331-1343.
206. Smith G, Smith AJ, Shaw L, Shaw MJ. Artificial saliva substitutes and mineral dissolution. *J Oral Rehabil* 2001;28:728-731.
207. Meyer-Lueckel H, Kielbassa AM. Use of saliva substitutes in patients with xerostomia. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2002;112:1037-1058.

208. Tschoppe P, Meyer-Lueckel H, Toll R, Kielbassa AM. In vitro analysis of a new saliva substitute (Saliva natura) on enamel and dentin. *Laryngorhinootologie* 2007;86:723-727.
209. Meyer-Lueckel H, Kielbassa AM. Influence of calcium phosphates added to mucin-based saliva substitutes on bovine dentin. *Quintessence Int* 2006;37:537-544.
210. Meyer-Lueckel H, Tschoppe P, Kielbassa AM. Effect of various Ca(2+)/PO concentrations of linseed-based saliva substitutes on enamel in vitro. *J Oral Rehabil* 2006;33:760-766.
211. Tschoppe P, Meyer-Lueckel H, Kielbassa AM. Remineralization of predemineralized bovine enamel by CMC-based saliva substitutes. *Caries Res* 2006;40:338.
212. Tschoppe P, Meyer-Lueckel H, Kielbassa AM. Einfluss von CMC Lösungen mit unterschiedlichen  $\text{Ca}_2^+$ - und  $\text{PO}_4^{3-}$ -Zugaben auf Dentin in vitro. Autoreferate-Band der Deutschen Gesellschaft für Zahnerhaltung 2006;74.
213. Tschoppe P, Meyer-lueckel H, Toll R, Kielbassa AM. In-vitro-Studie zur Untersuchung eines neuen Speichelersatzmittels (Saliva natura<sup>®</sup>) auf Schmelz und Dentin. *Laryngo-rhino-otol* 2007;86:1-5.
214. Meyer-Luckel H, Kielbassa AM. Influence of calcium phosphates added to mucin-based saliva substitutes on bovine dentin. *Quintessence Int* 2006;37:537-544.
215. Meyer-Lueckel H, Tschoppe P, Kielbassa AM. Effect of various  $\text{Ca}_2^+/\text{PO}_4^{3-}$  concentrations of linseed-based saliva substitutes on enamel in vitro. *J Oral Rehabil* 2006;33:760-766.
216. Tschoppe P, Kielbassa AM, Meyer-Lueckel H. Evaluation of the remineralizing capacities of modified saliva substitutes in vitro. *Arch Oral Biol* 2009;54:810-816.
217. Shellis RP. A microcomputer program to evaluate the saturation of complex solutions with respect to biominerals. *Comput Appl Biosci* 1988;4:373-379.
218. Buskes JA, Christoffersen J, Arends J. Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions. A new technique with applications. *Caries Res* 1985;19:490-496.
219. Mellberg JR. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. *J Dent Res* 1992;71 Spec No:913-919.
220. Rueggeberg FA. Substrate for adhesion testing to tooth structure - review of the literature. *Dent Mater* 1991;7:2-10.
221. Skene L. Ownership of human tissue and the law. *Nat Rev Genet* 2002;3:145-148.
222. Lippert F, Lynch RJ. Comparison of Knoop and Vickers surface microhardness and transverse microradiography for the study of early caries lesion formation in human and bovine enamel. *Arch Oral Biol* 2014;59:704-710.
223. Macpherson LM, Damato FA, MacFarlane TW, Strang R, Stephen KW. Variation in the susceptibility of enamel to an in vitro demineralization system (short communication). *Caries Res* 1991;25:143-145.
224. Weatherell JA, Hallsworth AS, Robinson C. The effect of tooth wear on the distribution of fluoride in the enamel surface of human teeth. *Arch Oral Biol* 1973;18:1175-1189.

225. Arends J, ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res* 1992;71 Spec No:924-928.
226. Crabb HS, Darling AI. X-ray absorption studies of human dental enamel. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1956;9:995-1009.
227. Buchalla W, Imfeld T, Attin T, Swain MV, Schmidlin PR. Relationship between nano-hardness and mineral content of artificial carious enamel lesions. *Caries Res* 2008;42:157-163.
228. Petersson LG, Kambara M. Remineralisation study of artificial root caries lesions after fluoride treatment. An in vitro study using electric caries monitor and transversal micro-radiography. *Gerodontology* 2004;21:85-92.
229. Holtzman JS, Osann K, Pharar J, Lee K, Ahn YC, Tucker T, Sabet S, Chen Z, Gukasyan R, Wilder-Smith P. Ability of optical coherence tomography to detect caries beneath commonly used dental sealants. *Lasers Surg Med* 2010;42:752-759.
230. Attin T, Koidl U, Buchalla W, Schaller HG, Kielbassa AM, Hellwig E. Correlation of microhardness and wear in differently eroded bovine dental enamel. *Arch Oral Biol* 1997;42:243-250.
231. Thomas RZ, Ruben JL, de Vries J, ten Bosch JJ, Huysmans MC. Transversal wavelength-independent microradiography, a method for monitoring caries lesions over time, validated with transversal microradiography. *Caries Res* 2006;40:281-291.
232. Anderson P, Levinkind M, Elliot JC. Scanning microradiographic studies of rates of in vitro demineralization in human and bovine dental enamel. *Arch Oral Biol* 1998;43:649-656.
233. Momm F, Lutterbach J. Postradiotherapy quality of life for head-and-neck cancer patients is independent of xerostomia: in regard to Ringash et al. (*Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;61:1403-1407). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;63:969; author reply 969-970.
234. Tschoppe P, Meyer-Lueckel H, Kielbassa AM. Effect of carboxymethylcellulose-based saliva substitutes on predemineralised dentin evaluated by microradiography. *Arch Oral Biol* 2008;53:250-256.
235. Jensen SB, Pedersen AM, Reibel J, Nauntofte B. Xerostomia and hypofunction of the salivary glands in cancer therapy. *Support Care Cancer* 2003;11:207-225.
236. Toljanic JA, Heshmati RH, Bedard JF. Dental follow-up compliance in a population of irradiated head and neck cancer patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93:35-38.
237. Strang R, Damato FA, Creanor SL, Stephen KW. The effect of baseline lesion mineral loss on in situ remineralization. *J Dent Res* 1987;66:1644-1646.
238. Meyer-Lueckel H, Paris S, Kielbassa AM. Surface layer erosion of natural caries lesions with phosphoric and hydrochloric acid gels in preparation for resin infiltration. *Caries Res* 2007;41:223-230.
239. Zaura E, van Loveren C, ten Cate JM. Efficacy of fluoride toothpaste in preventing demineralization of smooth dentin surfaces and narrow grooves in situ under frequent exposures to sucrose or bananas. *Caries Res* 2005;39:116-122.

240. Gron P, Hay DI. Inhibition of calcium phosphate precipitation by human salivary secretions. *Arch Oral Biol* 1976;21:201-205.
241. Zahradnik RT. Modification by salivary pellicles of in vitro enamel remineralization. *J Dent Res* 1979;58:2066-2073.
242. Robinson C, Hallsworth AS, Shore RC, Kirkham J. Effect of surface zone deproteinisation on the access of mineral ions into subsurface carious lesions of human enamel. *Caries Res* 1990;24:226-230.
243. Dodds MW, Edgar WM. Interactions between fluoride and plaque in the remineralization of enamel caries-like lesions. *Am J Dent* 1991;4:111-114.
244. ten Cate JM, Exterkate RA. Use of the single-section technique in caries research. *Caries Res* 1986;20:525-528.
245. Mellberg JR, Castrovince LA, Rotsides ID. In vivo remineralization by a monofluorophosphate dentifrice as determined with a thin-section sandwich method. *J Dent Res* 1986;65:1078-1083.
246. Featherstone JD. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999;27:31-40.
247. Hicks J, Flaitz C. Role of remineralizing fluid in in vitro enamel caries formation and progression. *Quintessence Int* 2007;38:313-319.
248. Yamazaki H, Litman A, Margolis HC. Effect of fluoride on artificial caries lesion progression and repair in human enamel: regulation of mineral deposition and dissolution under in vivo-like conditions. *Arch Oral Biol* 2007;52:110-120.
249. Weatherell JA, Strong M, Ralph JP, Robinson C. Availability of fluoride at different sites in the buccal sulcus. *Caries Res* 1988;22:129-133.
250. Weatherell JA, Strong M, Robinson C, Ralph JP. Fluoride distribution in the mouth after fluoride rinsing. *Caries Res* 1986;20:111-119.
251. Ten Cate JM, Exterkate RA, Rempt HE. Intra-oral retention of fluoride by bovine enamel from amine fluoride toothpaste and 0.4% amine fluoride liquid application. *J Dent Res* 1988;67:491-495.
252. Silverstone LM, Wefel JS, Zimmerman BF, Clarkson BH, Featherstone MJ. Remineralization of natural and artificial lesions in human dental enamel in vitro. Effect of calcium concentration of the calcifying fluid. *Caries Res* 1981;15:138-157.
253. Garcia-Godoy F, Hicks MJ. Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *J Am Dent Assoc* 2008;139 Suppl:25S-34S.
254. Chow LC, Takagi S, Shih S. Effect of a two-solution fluoride mouthrinse on remineralization of enamel lesions in vitro. *J Dent Res* 1992;71:443-447.
255. Schemehorn BR, Orban JC, Wood GD, Fischer GM, Winston AE. Remineralization by fluoride enhanced with calcium and phosphate ingredients. *J Clin Dent* 1999;10:13-16.
256. Aoba T. Solubility properties of human tooth mineral and pathogenesis of dental caries. *Oral Dis* 2004;10:249-257.

257. Beumer J, 3rd, Curtis T, Harrison RE. Radiation therapy of the oral cavity: sequelae and management, part 1. *Head Neck Surg* 1979;1:301-312.
258. Flaitz CM, Hicks MJ. Role of the acid-etch technique in remineralization of caries-like lesions of enamel: a polarized light and scanning electron microscopic study. *ASDC J Dent Child* 1994;61:21-28.
259. Al-Khateeb S, Exterkate R, Angmar-Mansson B, ten Cate JM. Effect of acid-etching on remineralization of enamel white spot lesions. *Acta Odontol Scand* 2000;58:31-36.
260. Wolff M, Kleinberg I. Oral mucosal wetness in hypo- and normosalivators. *Arch Oral Biol* 1998;43:455-462.
261. Vissink A, Waterman HA, s-Gravenmade EJ, Panders AK, Vermey A. Rheological properties of saliva substitutes containing mucin, carboxymethylcellulose or polyethylenoxide. *J Oral Pathol* 1984;13:22-28.
262. Mickenautsch S, Yengopal V. Anticariogenic effect of xylitol versus fluoride—a quantitative systematic review of clinical trials. *Int Dent J* 2012;62:6-20.
263. Topitsoglou V, Birkhed D, Larsson LA, Frostell G. Effect of chewing gums containing xylitol, sorbitol or a mixture of xylitol and sorbitol on plaque formation, pH changes and acid production in human dental plaque. *Caries Res* 1983;17:369-378.
264. Vadeboncoeur C, Trahan L, Mouton C, Mayrand D. Effect of xylitol on the growth and glycolysis of acidogenic oral bacteria. *J Dent Res* 1983;62:882-884.
265. Makinen KK. Sugar alcohols, caries incidence, and remineralization of caries lesions: a literature review. *Int J Dent* 2010;2010:981072.
266. Olsson H, Axell T. Objective and subjective efficacy of saliva substitutes containing mucin and carboxymethylcellulose. *Scand J Dent Res* 1991;99:316-319.
267. Adams D. The mucus barrier and absorption through the oral mucosa. *J Dent Res* 1975;54 Spec No B:B19-26.
268. Greene WM, Newbrun E. A theoretical study of in vivo lesion repair using a controlled-release device. *J Dent Res* 1986;65:1169-1172.
269. Guijarro Guijarro B, Lopez Sanchez AF, Hernandez Vallejo G. Treatment of xerostomia. A review. *Med Oral* 2001;6:7-18.
270. Tenovuo J. Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety. *Oral Dis* 2002;8:23-29.
271. Hahnel S, Rosentritt M, Handel G, Burgers R. Influence of saliva substitute films on initial *Streptococcus mutans* adhesion to enamel and dental substrata. *J Dent* 2008;36:977-983.
272. Jansma J, Vissink A, Gravenmade EJ, Visch LL, Fidler V, Retief DH. In vivo study on the prevention of postradiation caries. *Caries Res* 1989;23:172-178.
273. Dreizen S, Brown LR, Daly TE, Drane JB. Prevention of xerostomia-related dental caries in irradiated cancer patients. *J Dent Res* 1977;56:99-104.
274. Hayward JR, Kerr DA, Jesse RH, Castigliano SG, Lampe I, Ingle JI. The management of teeth related to the treatment of oral cancer. *CA Cancer J Clin* 1969;19:98-106.

## 11 Anhang

### 11.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AKP	Amorphes Kalziumphosphat
AMG	Arzneimittelgesetz
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
CBF	Klinikum Benjamin Franklin
CCM	Charité Campus Mitte
CEC	Caboxyethylcellulose
CMC	Carboxymethylcellulose
CVK	Charité Virchow Klinikum
DKPD	Dikalziumphosphatdihydrat
FAP	Fluorapatit
FDI	World Dental Federation
G	Glandosane
Gl.	Glandula
G0	Ruhephase in der Interphase des Zellzyklus
G1	Phase in der Zell-Interphase
HA	Hydroxylapatit
hAQP1	Humanes Aquaporin 1
HEC	Hydroxyethylcellulose
IGF-1	Insulinlike growth factor 1
IMRT	Intensitäts modulierte Radiotherapie
IP	Ionenprodukt
KGF	Keratinozyten Wachstumsfaktor
LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LP	Löslichkeitsprodukt
OKP	Oktakalziumphosphat
OKPH	Oktakalziumphosphathydrolysat
PEO	Polyethylenoxid
S.	Streptokokkus
SEM	Speichelersatzmittel
SN	Saliva natura
Tab.	Tabelle
TKP	Trikalziumphosphat
TMR	Transversale Mikroradiografie
Zul.Nr.	Zulassungsnummer

## 11.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1</b>	Flussdiagramm zum Ablauf der Studienphasen .....	32
<b>Abb. 2</b>	Verblindung und Etikettierung der Speichelersatzmittel.....	37
<b>Abb. 3</b>	Lagerung der Zähne und Zahnproben eines Individuums/ einer Gruppe .....	37
<b>Abb. 4</b>	Herauspräparieren der Schmelzproben aus den Fazialflächen der Zähne.....	38
<b>Abb. 5</b>	Tissue Tek Cassette mit Schmelzproben .....	39
<b>Abb. 6</b>	Einbettung der Proben vor Einlegen in die Demineralisationslösung .....	40
<b>Abb. 7</b>	Schematische Darstellung der Probenanordnung in der Prothese .....	41
<b>Abb. 8</b>	Detaillierte Darstellung der Probenbefestigung im Prothesenkunststoff..	41
<b>Abb. 9</b>	Zeitlicher Untersuchungsverlauf der beiden Effektgruppen .....	42
<b>Abb. 10</b>	Schema Testfeldgestaltung der gesunden Schmelzoberfläche .....	42
<b>Abb. 11</b>	Schema Testfeldgestaltung mit künstlichen Schmelzläsionen .....	42
<b>Abb. 12</b>	Herstellung der Dünnschliffe aus den Proben .....	44
<b>Abb. 13</b>	TMR-Gerät mit schematisiertem Röntgenstrahl.....	46
<b>Abb. 14</b>	Detailansicht des Kameragehäuses .....	46
<b>Abb. 15</b>	Stereomikroskop mit Filmhalterung .....	47
<b>Abb. 16</b>	Detaildarstellung der Filmhalterung .....	47
<b>Abb. 17</b>	Boxplots der Veränderungen des Mineralverlusts nach 7 Wochen Versuchsdauer unter Glandosane <sup>®</sup> und modifiziertem Saliva natura im Vergleich zu den Kontrollfeldern .....	50
<b>Abb. 18</b>	Boxplots der Veränderungen der Läsionstiefe nach 7 Wochen Versuchsdauer unter Glandosane <sup>®</sup> und modifiziertem Saliva natura im Vergleich zu den Kontrollfeldern .....	50
<b>Abb. 19</b>	Veränderung des Mineralverlusts in Vol% × µm zwischen gesunder Probenoberfläche und Probenoberfläche nach 7 Wochen für Glandosane <sup>®</sup> (G) und Saliva natura modifiziert (SN) für den jeweiligen Probanden (1-15) .....	51
<b>Abb. 20</b>	Veränderung der Läsionstiefen in µm zwischen gesunder Probenoberfläche und Probenoberfläche nach 7 Wochen für Glandosane <sup>®</sup> (G) und Saliva natura modifiziert (SN) für den jeweiligen Probanden (1-15) .....	52
<b>Abb. 21</b>	Boxplots der Veränderungen des Mineralverlustes nach 5 und 7 Wochen Versuchsdauer unter Glandosane <sup>®</sup> und modifiziertem Saliva natura im Vergleich zu den Kontrollfeldern .....	53
<b>Abb. 22</b>	Boxplots der Veränderungen der Läsionstiefen nach 5 und 7 Wochen Versuchsdauer unter Glandosane <sup>®</sup> und modifiziertem	

	Saliva natura im Vergleich zu den Kontrollfeldern .....	54
<b>Abb. 23</b>	Boxplots der Veränderungen der Mineralverluste nach In-vitro-Demineralisation 5 und 7 Wochen Versuchsdauer im Vergleich zu den Kontrollfeldern unter Glandosane® und modifiziertem Saliva natura.....	56
<b>Abb. 24</b>	Boxplots der Veränderungen der Läsionstiefen nach In-vitro-Demineralisation, 5 und 7 Wochen Versuchsdauer im Vergleich zu den Kontrollfeldern unter Glandosane® und modifiziertem Saliva natura.....	57
<b>Abb. 25</b>	QQ-Diagramme des Verbrauchs an Glandosane® und modifiziertem Saliva natura über 7 Wochen in ml .....	57
<b>Abb. 26</b>	Verbrauch von Glandosane® und modifiziertem Saliva natura für den Versuchszeitraum von 7 Wochen für Patienten 1-15 in ml .....	58
<b>Abb. 27</b>	Durchschnittliche Speichelfliessrate in ml/5min während des Versuchszeitraums von 7 Wochen unter Glandosane® und modifiziertem Saliva natura für Patienten 1-15 .....	59
<b>Abb. 28</b>	zeigt die relativen Mineralveränderungen in Vol% × µm nach siebenwöchiger Anwendung von Glandosane® und modifiziertem Saliva natura im Vergleich zur Ausgangssituation für Patienten 1-15.....	60
<b>Abb. 29</b>	zeigt die relative Veränderung der Läsionstiefen in µm nach siebenwöchiger Anwendung von Glandosane® (links) und modifiziertem Saliva natura (rechts) im Vergleich zur Ausgangssituation für Patienten 1-15 .....	60

### 11.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle I:</b>	Kriterien für den Studieneinschluss/Studienausschluss .....	33
<b>Tabelle II:</b>	Modifikation von Saliva natura .....	35
<b>Tabelle III:</b>	Konzentrationen der Ionen und die berechnete Sättigung der Inhaltsstoffe in Glandosane® und modifiziertem Saliva natura .....	35
<b>Tabelle IV:</b>	Zusammensetzung der Stammlösungen .....	35
<b>Tabelle V:</b>	Zusammensetzung der Demineralisationslösung nach Buskes et al.....	40
<b>Tabelle VI:</b>	Veränderung der Mineralverluste und Läsionstiefen nach 7 Wochen Versuchsdauer unter Glandosane® und modifiziertem Saliva natura .....	51
<b>Tabelle VII:</b>	Mineralverluste und Läsionstiefen nach 5 und 7 Wochen Versuchsdauer unter Glandosane® und modifiziertem Saliva natura .....	53
<b>Tabelle VIII:</b>	Signifikanzen der Untersuchung auf Normalverteilung der Messwerte innerhalb der Untersuchten Gruppen (Kolmogorov-Smirnov-Test).....	54
<b>Tabelle IX:</b>	Signifikanzen der Veränderungen des Mineralverlusts und der	

	Läsionstiefen von Schmelzproben mit künstlichen Kariesläsionen.....	55
<b>Tabelle X:</b>	Veränderungen des Mineralverlusts (Vol% × µm) und der Läsionstiefen (µm) von Schmelzproben mit künstlichen Kariesläsionen unter der Verwendung von Glandosane® .....	55
<b>Tabelle XI:</b>	Veränderungen des Mineralverlusts (Vol% × µm) und der Läsionstiefen (µm) von Schmelzproben mit künstlichen Kariesläsionen unter der Verwendung von modifiziertem Saliva natura .....	56
<b>Tabelle XII:</b>	Mittelwerte, Standardabweichungen und Medianwerte des Speichersatzmittelverbrauchs aller Patienten in ml .....	58
<b>Tabelle XIII:</b>	p-Werte einer untersuchten Korrelation zwischen Speichersatzmittelverbrauch und den Messwerten des Mineralverlusts und der Läsionstiefen nach 7 Wochen Versuchszeitraum in gesunden Schmelzproben und Proben mit künstlichen Schmelzläsionen (Spearman-Analyse).....	59

#### 11.4 Liste der verwendeten Materialien

Alkoholtorch	BUFFALO DENTAL CO. INC, Syosset, NY, USA
Befestigungskunststoff	Tetric EvoFlow®; Ivoclar Vivadent GmbH, Ellwangen, Deutschland
Cyanoacrylatkleber	Henry Schein INC, Melville NY, USA
Destilliertes Wasser	Ampuwa; Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Edding 140S	Edding AG, Ahrensburg, Deutschland
Einbettkunststoff	Technovit 4071; Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland
Einmalhandschuhe	Latex Examination Gloves Powderfree; Charité, TERANG NUSA, Kota Bharu, Malaysia
Einmalskalpelle	Feather Disposable Scalpel No. 15; FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka Japan
Etylenglycol, 99%ig	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Falcon-Röhrchen	Zentrifugenröhrchen mit Stehrand, 50 ml; Fa. VWR, Darmstadt, Deutschland
Fotofilm	Motion Picture safety film Fuji fine grain positive film 71337; Fujifilm Holdings Corporation, Tokio, Japan
Gefrierbeutel	Toppitz, Melitta Unternehmensgruppe Bentz KG, Minden, Deutschland
Hedströmfeilen	VDW GmbH München, Deutschland
Klebeband	Leukofix; BSN medical GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland
Klebewachs	Supradent; Chemisches Dentallabor Oppermann-Schwedler, Bonn, Deutschland

Kochsalzlösung	NaCl 0,9%; Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Lack	Jet-Set Diamant; L'Oréal, Frankreich
Objektträger	Plexiglas-Objektträger (25x75x2 mm); Fa. diaplus, Oststeinbek, Deutschland
Pinselhalter	Ivoclar Vivadent, Ellwangen, Deutschland
Sterilisationsboxen	UNI-CASSETTES Tissue-Tek III; Sakura Finetek BV Zoeterwoude, Niederlande
Reamer	VDW GmbH München, Deutschland
Schleifpapier	SiC Schleifpapier für Metallografie nass oder trocken, Durchmesser 25 mm, P 1200; P 2500; P 4000; BUEHLER, Deutschland
Spiritus	Favorit; ALSCHU-Chemie GmbH, 67368 Westheim, Deutschland
TMR-Probenhalter	Fa. Plano, Wetzlar, Deutschland
Vaseline	weißes Vaseline Lichtenstein; Winthrop Arzneimittel GmbH, Fürstenfeldbruck, Deutschland
Zelletten	Pur-Zellin; Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland

### 11.5 Geräteliste

Brut-/Wärmeschrank	Venticell 404; MMM Medcenter GmbH, Planegg, Deutschland
Bügel-Messschraube	Digimatic MDC-Lite; Fa. Mitutoyo, Kawasaki, Japan
Halogenlampe	Curing Light XL 1500; 3M Dental Products, Neuss, Deutschland
Kamera	CCD-Videokamera Modul XC 77 CE; Sony, Japan
Mikroskop	Durchlichtmikroskop Axioskop 2; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
pH-Meter	GMH 3530 (GMH 3510); GHM Messtechnik GmbH Standort Greisinger, Regenstauf, Deutschland
Röntgen	Röntgenstrahlengenerator PW 1730/10; Philips, Eindhoven, Niederlande
Säge	EXAKT Trennschleifsystem 300 CL; Fa. EXAKT Vertriebs GmbH, Norderstedt, Deutschland
Schleifgerät (Dünnschliffe)	EXAKT Mikroschleifsystem 400 CS; Fa. EXAKT Vertriebs GmbH, Norderstedt, Deutschland
Schleifgerät (Probenherstellung)	Labo Pol 25; Struers GmbH, Ballerup, Dänemark
Waage	Sartorius Excellence E 2000 D; Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

---

## 11.6 Bearbeitungsprogramme

Auswertungssoftware      Transversal Microradiography (TMR für Windows, Version 2.0.27.2); Inspektor Research, Amsterdam, Niederlande

Statistiksoftware:      IBM- SPSS Statistics Version 20

## 11.7 Votum der Ethikkommission

### Landesamt für Gesundheit und Soziales Ethik-Kommission des Landes Berlin



Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin  
Postfach 310929, 10630 Berlin (Postanschrift)

vorab per Fax: 450562932

Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Abt. Zahnerhaltungskunde und Parodontologie  
z.H. Herrn Prof. Dr. Kielbassa  
Aßmannshäuser Str. 4-6  
14197 Berlin



Geschäftszeichen (bitte immer angeben)  
ZS EK 13 546/08

Dienstgebäude:  
Sächsische Str. 28  
10707 Berlin

Bearbeiter/in:  
Frau Gutsche  
Zimmer: 143

Telefon: 030 9(0)12 - 7638

Telefax: 030 9(0)28 - 3383

E-Mailadresse:  
susan-isabelle.gutsche@lageso.berlin.de

(nicht für Dokumente mit elektronischer Signatur)

Datum: 14.01.2009

Nachrichtlich an:

- Bundesinstitut f. Arzneimittel u. Medizinprodukte

**Klinische Prüfung eines Arzneimittels:** Antrag auf zustimmende Bewertung einer klinischen Prüfung, § 42 Abs. 1 Arzneimittelgesetz (AMG), § 7 Abs. 1 Verordnung über die Anwendung der Guten Klinischen Praxis bei der Durchführung von klinischen Prüfungen von Arzneimitteln am Menschen (GCP-V).

<b>Antrag vom:</b>	<b>30.10.08</b>
<b>Eingang Antrag(vollständig):</b>	<b>20.11.08</b>
<b>Sponsor:</b>	<b>Charité – Universitätsmedizin Berlin</b>
<b>Hauptprüfer:</b>	<b>Prof. Dr. A. Kielbassa</b>
<b>Zuständige Ethik-Kommission:</b>	<b>Land Berlin</b>
<b>EudraCT-Nummer:</b>	<b>2008-005451-23</b>
<b>Prüfplancode:</b>	<b>T-01</b>

**Titel der klinischen Prüfung: Vergleichende, randomisierte, kontrollierte und doppelblinde In-situ-Studie zur Wirkung von zwei Speichelersatzmitteln auf Schmelz und Dentin**

Verkehrsverbindungen: U3 Fehrbelliner Platz U7 Fehrbelliner Platz Fahrstuhl vorhanden Bus 101, 104, 115,	Sprechzeiten nach telefonischer Vereinbarung	Zahlungen bitte bargeldlos an die Landeshauptkasse Klosterstr. 59 10179 Berlin	Geldinstitut Postbank Berlin Berliner Bank AG Landesbank Berlin Deutsche Bundesbank Filiale Berlin	Kontonummer: 58100 9 919 260 800 0990 007 800 10 001 520	Bankleitzahl 100 100 10 100 200 00 100 500 00 100 000 00
--	--	--	--	--	--

Haltestelle  
Fehrbelliner Platz  
Internetadresse: <http://www.lageso.berlin.de>

## Klinische Prüfung



BfArM

Bundesinstitut für Arzneimittel  
und Medizinprodukte

BfArM • Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3 • D-53175 Bonn

CharitéCentrum 3 für Zahn-,  
Mund- und Kieferheilkunde  
Herrn Prof. Dr. Andrej M.  
Kielbassa  
Aßmannshauer Straße 4-6  
14197 Berlin

Postanschrift:  
Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3  
D-53175 Bonn  
<http://www.bfarm.de>  
Telefon: (0228) 207-4318  
(0228) 99307-4318  
Telefax: (0228) 207-5207  
(0228) 99307-5207  
e-mail: [klinpruefung@bfarm.de](mailto:klinpruefung@bfarm.de)

**Nachrichtlich:**  
Landesbehörde Berlin  
Ethikkommission Landesamt für Gesundheit  
und Soziales, Berlin

per Fax: 030 450 562 932  
Ihre Zeichen und Nachricht vom

Gesch.Z.: Bitte bei Antwort angeben

(0228) 99307-

Bonn,

26.11.2008  
11.01.2009  
11.05.2009

61-3910-4034842

4318

12. MAI 2009

**Betr.: Antrag auf Genehmigung einer klinischen Prüfung § 42 Abs. 2 AMG,  
Inhaltliche Prüfung der Antragsunterlagen gemäß § 9 Abs. 1 GCP-V**

Eingangsdatum BfArM	:	04.12.2008	
Mängelschreiben	:	12.12.2008	
Eingang nach Formalprüfung	:	23.01.2009	
Eingang nach Bescheid	:	14.05.2009	
EudraCT-Nummer	:	2008-005451-23	
Vorlage-Nummer	:	4034842	
Sponsor	:	Charité- Universitätsmedizin Berlin Centrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde	
Legal representative Sponsor	:	/.	
Prüfplancode des Sponsors	:	T-01	
Protokollversion	:	Version 1.0 v. 30.10.2008 + Version 1 v. 11.05.2009	
IMP Nummer	PR01	:	
		:	Mucin aus Eriodictyon crassifolium, Spray zur Anwend. in d. Mundhöhle (Salvia natura, Medizinprodukt), mit Zusatz von Calciumchlorid- Dihydrat 463,05 mg/l, Kaliumdihydrogenphosphat 456,96 mg/l, Dikaliumhydrogenphosphat 292,32 mg/l, Natriumfluorid 4,20 mg/l
IMP Nummer	PR02	:	
		:	K-Monohydrogenphosphat 0.0174 g, Carmellose-Na 0.5075 g, Sorbitol 1.5225 g, KCl 0.0609 g, NaCl 0.0428 g, MgCl-Hexahydrat 0.0026 g, Calciumchlorid-Dihydrat 0.0074 g, Spray zur Anwendung in der Mundhöhle (Glandosane, Zul.-Nr.: 6072896.00.00)

**Titel der klinischen Prüfung** :  
Vergleichende, randomisierte, kontrollierte und doppelblinde In-situ-Studie zur Wirkung von  
zwei Speichelersatzmitteln auf Schmelz und Dentin.

**Leiter/in der klinischen Prüfung gemäß § 40 Abs. 1 Nr. 5 AMG:**  
Prof. Dr. Andrej M. Kielbassa, Berlin



## Bescheid

Nach Durchsicht der bei uns am 14.05.2009 eingegangenen von Ihnen nachgereichten Unterlagen wurden alle in unserem Bescheid vom 20.02.2009 benannten Gründe für den Einspruch gegenstandslos. Die Durchführung der oben genannten klinischen Prüfung wird genehmigt.

Rechtsbehelfsbelehrung: Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, 53175 Bonn, schriftlich oder zur Niederschrift einzulegen.

Die Unterlagen werden unter der o. g. Vorlagennummer verwahrt. Bitte geben Sie die Vorlage-Nr. und den Code des Prüfplans stets im weiteren Schriftverkehr zur o.g. klinischen Prüfung an und verwenden Sie als Postanschrift:

Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Fachregistratur Z 14.2.06,  
Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, **D-53175 Bonn**,  
Tel. +49 (0)228-207-4318, Fax +49 (0)228-207-5207

**Hinweis:** Wir weisen Sie darauf hin, dass entsprechend § 67 (1) AMG der Sponsor vor dem Beginn der klinischen Prüfung u. a. der Bundesoberbehörde sämtliche Prüfer (soweit erforderlich auch mit Angabe der Stellung als Hauptprüfer oder Leiter der klinischen Prüfung) und Prüfzentren anzuzeigen hat. Sollten die angegebenen Prüfzentren von denen im ursprünglich an die Bundesoberbehörde gestellten Antragsformular abweichen, ist dieses korrigiert als XML- und PDF-Datei nachzureichen. Für die Anzeige des Endes einer klinischen Prüfung benutzen Sie bitte das Formular Annex 3 der Leitlinie ENTR/CT1.

Sollten Prüfzentren während der Studie ab- oder angemeldet werden, ist nach positivem Votum der zuständigen Ethik-Kommission der Bundesoberbehörde zusätzlich ein aktualisiertes Antragsformular des Antrags auf Genehmigung einer klinischen Prüfung gemäß § 7 GCP-V als XML- (ausführliche Version) und PDF-Datei vorzulegen.

Mit freundlichen Grüßen  
im Auftrag

  
Dr. Christian Steffen

## 11.8 Einwilligungserklärung



### CharitéCentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

Prof. Dr. A. M. Kielbassa | Zahnerhaltungskunde und Parodontologie  
CharitéCentrum 3 | Aßmannshauser Straße 4-6 | 14197 Berlin



**Zahnerhaltungskunde und Parodontologie**  
Aßmannshauser Straße 4-6  
D-14197 Berlin

Direktor: Prof. Dr. Andrej M. Kielbassa

Unser Zeichen: PT/Einwilligungserklärung Se In-Situ-Studie.doc

Tel. 00 49 (0) 30 450 562 332  
00 49 (0) 30 450 662 327 (OA Dr. P. Tschoppe)  
Fax 00 49 (0) 30 450 562 932

andrej.kielbassa@charite.de  
peter.tschoppe@charite.de  
www.charite.de/zahnerhaltung  
www.charite.de/parodontologie

23. April 2014

### Einwilligungserklärung

**Studientitel: Vergleichende, randomisierte, kontrollierte und doppelblinde In-situ-Studie zur Wirkung von zwei Speichelersatzmitteln auf Schmelz und Dentin**

Studiencode: **T 01**  
EudraCT Nummer: **2008-005451-23**  
Version 01/ Datum: **23.04.2014**

Patient: \_\_\_\_\_ Patient - ID.: \_\_\_\_\_  
(Name, Vorname)

*Bitte lesen Sie das Patienten-Informationsblatt und die Einwilligungserklärung sorgfältig durch.  
Bitte fragen Sie bei allen Unklarheiten oder wenn Sie weitere Informationen wünschen.*

Ich bin durch den behandelnden Arzt mündlich und schriftlich über Ziel, Dauer, Ablauf, Nutzen, Risiken und Nebenwirkungen der klinischen Prüfung aufgeklärt worden. Ich hatte ausreichend Gelegenheit Fragen zu stellen. Diese wurden mir vom aufklärenden Arzt verständlich beantwortet. Außerdem habe ich Kopien der schriftlichen Patienteninformation und der Patienteneinwilligung erhalten. Ich hatte genügend Zeit, um meine Entscheidung zur Teilnahme an dieser klinischen Prüfung frei zu treffen.

Ich weiß, dass meine Teilnahme an der klinischen Prüfung völlig freiwillig ist und dass ich diese Einwilligung jederzeit und ohne Angabe von Gründen widerrufen kann, ohne dass mir daraus Nachteile für meine weitere Behandlung entstehen. Sollte ich die klinische Prüfung wegen einer etwaigen Nebenwirkung der Studienmedikamente abbrechen, werde ich dies dem behandelnden Arzt mitteilen.

Über die Versicherungsobligationen einer Patientenversicherung gemäß Arzneimittelgesetz § 40 Absatz 3 wurde ich informiert.

Falls ich gegen eine der von mir gemäß dem Versicherungsvertrag zu erfüllenden Obliegenheiten vorsätzlich oder grob fahrlässig verstoße, kann dies zum Verlust des Versicherungsschutzes führen. Die Versicherungsbedingungen wurden mir vom Prüfarzt ausgehändigt.

### **Datenschutzerklärung**

Mir ist bekannt, dass bei dieser klinischen Prüfung personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde, über mich erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Angaben über meine Gesundheit erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor der Teilnahme an der klinischen Prüfung folgende freiwillig abgegebene Einwilligungserklärung voraus, d.h. ohne die nachfolgende Einwilligung kann ich nicht an der klinischen Prüfung teilnehmen.

### Einwilligungserklärung zum Datenschutz (Arzneimittelgesetz)

1) Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser klinischen Prüfung mich betreffende personenbezogene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit, erhoben und in Papierform und auf elektronischen Datenträgern (Institution/Ort der Aufzeichnung siehe Briefkopf) aufgezeichnet werden. Soweit erforderlich, dürfen die erhobenen Daten pseudonymisiert (verschlüsselt) weitergegeben werden:

a) an den Sponsor (*Charité - Universitätsmedizin Berlin, CharitéCentrum 3, Abteilung für Zahnerhaltung und Parodontologie, Direktor: Prof. Dr. Kielbassa*) zum Zwecke der wissenschaftlichen Auswertung,

b) im Falle eines Antrags auf Zulassung: an den Antragsteller und die für die Zulassung zuständige Behörde (*Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte*),

c) im Falle unerwünschter Ereignisse: an den Sponsor (*Charité - Universitätsmedizin Berlin, CharitéCentrum 3, Abteilung für Zahnerhaltung und Parodontologie, Direktor: Prof. Dr. Kielbassa*), an die jeweils zuständige Ethik-Kommission und die zuständige Bundesoberbehörde (*Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte*), sowie von dieser an die Europäische Datenbank.

2) Außerdem erkläre ich mich damit einverstanden, dass autorisierte und zur Verschwiegenheit verpflichtete Beauftragte des Sponsors sowie die zuständigen inländischen und ausländischen Überwachungsbehörden in meine beim Prüfarzt vorhandenen personenbezogenen Daten, insbesondere meine Gesundheitsdaten, Einsicht nehmen, soweit dies für die Überprüfung der ordnungsgemäßen Durchführung der Studie notwendig ist. Für diese Maßnahme entbinde ich den Prüfarzt von der ärztlichen Schweigepflicht.

3) Die Einwilligung zur Erhebung und Verarbeitung meiner personenbezogenen Daten, insbesondere der Angaben über meine Gesundheit, ist unwiderruflich. Ich bin bereits darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit die Teilnahme an der klinischen Prüfung beenden kann. Im Fall eines solchen Widerrufs meiner Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, erkläre ich mich damit einverstanden, dass die bis zu diesem Zeitpunkt gespeicherten Daten ohne Namensnennung weiterhin verwendet werden dürfen, soweit dies erforderlich ist, um

a) Wirkungen des zu prüfenden Arzneimittels festzustellen,

b) sicherzustellen, dass meine schutzwürdigen Interessen nicht beeinträchtigt werden,

c) der Pflicht zur Vorlage vollständiger Zulassungsunterlagen zu genügen.

4) Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Daten nach Beendigung oder Abbruch der Prüfung mindestens zehn Jahre aufbewahrt werden, wie es die Vorschriften über die klinische Prüfung von Arzneimitteln bestimmen. Danach werden meine personenbezogenen Daten gelöscht, soweit nicht gesetzliche oder satzungsmäßige Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.

5) Ich bin über folgende gesetzliche Regelung informiert: Falls ich meine Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, widerrufe, müssen alle Stellen, die meine personenbezogenen Daten, insbesondere Gesundheitsdaten, gespeichert haben, unverzüglich prüfen, inwieweit die gespeicherten Daten für die in Nr. 3 a) bis c) genannten Zwecke noch erforderlich sind. Nicht mehr benötigte Daten sind unverzüglich zu löschen.

Ich bin vom Arzt mündlich aufgeklärt worden und habe die schriftliche Patienteninformation gelesen und verstanden.

Ich willige in die Teilnahme an der Studie ein.

---

Ort, Datum

Unterschrift des Patienten

---

Der Patient wurde von mir über Ziel, Dauer, Ablauf, Nutzen, Risiken und Nebenwirkungen der klinischen Prüfung mündlich und schriftlich aufgeklärt. Aufgetretene Fragen wurden von mir verständlich und ausreichend beantwortet. Der Patient hat ohne Zwang seine Einwilligung erteilt. Eine Kopie der schriftlichen Patienteninformation und dieser Patienteneinwilligung habe ich dem Patienten ausgehändigt.

---

Ort, Datum

Unterschrift des Prüfarztes

## 11.9 Patienten-Information



### CharitéCentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

Prof. Dr. A. M. Kielbassa | Zahnerhaltungskunde und Parodontologie  
CharitéCentrum 3 | Aßmannshauer Straße 4-6 | 14197 Berlin



**Zahnerhaltungskunde und Parodontologie**  
**Aßmannshauer Straße 4-6**  
**D-14197 Berlin**

Direktor: Prof. Dr. Andrej M. Kielbassa

Unser Zeichen: PT/Patienteninformation Se In-Situ-Studie  
1.korr.doc

Tel. 00 49 (0) 30 450 562 332  
00 49 (0) 30 450 662 327 (OA Dr. P. Tschoppe)  
Fax 00 49 (0) 30 450 562 932

andrej.kielbassa@charite.de  
peter.tschoppe@charite.de  
www.charite.de/zahnerhaltung  
www.charite.de/parodontologie

### Patienten-Information

Studientitel: Vergleichende, randomisierte, kontrollierte und doppelblinde In-situ-Studie zur  
Wirkung von zwei Speichelersatzmitteln auf Schmelz und Dentin

Studiencode: **T 01**

EudraCT Nummer: **2008-005451-23**

Sponsor: Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Charité Centrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
Aßmannshauer Str. 4-6  
14197 Berlin

Prüfer  
Prof. Dr. Andrej M. Kielbassa  
Dr. Peter Tschoppe

Patient: \_\_\_\_\_  
(Name, Vorname)

Patient - ID: \_\_\_\_\_

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wie Sie wissen, leiden Sie an einer Mundtrockenheit. Diese Patienteninformation beschreibt Ihnen womit sich diese Studie beschäftigt.

#### Einladung zur Teilnahme

Wir möchten Ihnen anbieten, an einem Forschungsprojekt teilzunehmen, bei dem sowohl die objektiven als auch die subjektiven Wirkungen von Speichelersatzmittel untersucht werden sollen. Diese klinische Studie wird an einem Zentrum in Deutschland (Abteilung für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie, CharitéCentrum 3 für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Charité - Campus Benjamin Franklin) durchgeführt. Insgesamt werden 36 Patienten teilnehmen.

### Zweck der Studie

Der Zweck der Studie ist es, die Wirkung von zwei Speicheleratzmitteln auf die Zähne, zu untersuchen. Daneben wird auch die Wirksamkeit der Speicheleratzmittel hinsichtlich der Erleichterung des Symptoms der Mundtrockenheit untersucht.

### Mögliche Vorteile Ihrer Teilnahme

Der Nutzen der Studienteilnahme liegt in einer möglicherweise erfolgreichen Behandlung Ihrer Mundtrockenheit.

Schließlich tragen Sie durch Ihre Teilnahme an der Studie dazu bei, dass das Wissen über Ihre Symptome vertieft wird und die Behandlung zukünftiger Patienten verbessert werden kann.

### Alternativen zur Teilnahme

Wenn Sie sich nicht zur Teilnahme entschließen können, erhalten Sie in jedem Fall eine Behandlung, die dem aktuellen Wissensstand entspricht.

Diese entspricht einer Aufklärung über die Folgen und Risiken der Mundtrockenheit und der Empfehlung der Nutzung eines Speicheleratzmittels und der regelmäßigen Kontrolle Ihrer Zähne bei Ihrer/m Zahnärztin.

### Vergleich zweier Therapiemöglichkeiten

In dieser Studie werden zwei Therapiemöglichkeiten verglichen. Die Patienten erhalten bei Einwilligung in die Studie einen Patientencode und nach dem Zufallsprinzip (durch so genannte Randomisation) wird die Reihenfolge der Speicheleratzmittelausgabe zugeteilt, um später möglichst unverfälschte Schlussfolgerungen ziehen zu können. Sowohl Sie als auch Ihr Arzt wissen nicht, welches Speicheleratzmittel Sie in der jeweiligen Studienphase bekommen (doppelblinde Studie).

### Vorgesehene Behandlung

Sie erhalten zwei kommerziell erhältliche Speicheleratzmittel für jeweils 7 Wochen. Zwischen den 2 Studienphasen erhalten Sie eine Woche lang kein Speicheleratzmittel um die Wirkung des jeweils nächsten folgenden Speicheleratzmittels nicht zu verfälschen (Wash-Out). Die Einnahme erfolgt je nach Bedarf und unterliegt keiner Maximaldosis. Vor und nach jeder Studienphase wird die subjektive Wirkung des Speicheleratzmittels anhand eines Fragebogens erhoben.

Um die objektive Wirkung der Speicheleratzmittel zu überprüfen, werden Rinderzahnproben in ihre Prothese eingearbeitet, die zuvor sterilisiert wurden. Zur Fixierung der Proben im Mund wird Ihre Ober- bzw. Unterkieferprothese verwendet. An der Außenfläche der Ober- bzw. Unterkieferprothesen, in der Region der Prämolaren und Molaren, werden vier Vertiefungen pro Seite zur Aufnahme der Proben eingeschliffen. Mit Klebewachs werden die Probenkörper in diesen Mulden befestigt und so gesichert, dass ein Verschlucken oder Veratmen nicht möglich ist.

### Bekannte Nebenwirkungen der Behandlung

Für beide Produkte werden von den Herstellern in den Fachinformationen bzw. Gebrauchsanweisungen keine Nebenwirkungen (bei bestimmungsmäßiger Anwendung), Wechselwirkungen oder Gegenanzeigen angegeben. Besondere Vorsicht ist bei beiden Produkten erforderlich, da diese Natriumbenzoat enthalten. Natriumbenzoat kann leichte Reizungen an Haut, Augen und Schleimhäuten auslösen.

### Behandlung der Nebenwirkungen

Sollten Nebenwirkungen (Schleimhautrötungen) auftreten, verwenden Sie das Speicheleratzmittel nicht mehr und informieren bitte Ihren Studienarzt.

### Vorgesehene Untersuchungen

Im Rahmen der Studie sind regelmäßige Untersuchungen zur Kontrolle der Verträglichkeit und zur Kontrolle des Studienerfolges vorgesehen. Vor Beginn und am Ende der Behandlung wird bei Ihnen die Speichelflussrate bestimmt und eine ausführliche Anamnese erhoben.

Anschließend gliedert sich diese Studie in zwei Abschnitte zu jeweils 7 Wochen. Zu Beginn und am Ende eines jeden Abschnitts bekommen Sie einen Fragebogen, welchen Sie bitte wahrheitsgemäß ausfüllen. Darüber hinaus werden die Zahnproben in jedem Studienabschnitt gegen Neue

ausgetauscht. Im Falle einer Beschädigung Ihrer Prothese wird erfolgt eine fachgerechte Versorgung durch die Zahnklinik.

#### Risiken und Nebenwirkungen der Untersuchungen

Die Bestimmung der Speichelflussrate ist eine nicht-invasive Methode, um die Menge des Speichels zu bestimmen, und ist mit keinem Risiko bzw. keiner Nebenwirkung verbunden. Sofern keine Unverträglichkeiten (nur bei Patienten mit Parabenallergie) gegen die zu testenden Speichelersatzmittel bei den Patienten vorliegen, unterliegen die Patienten keinen weiteren vorhersehbaren Risiken.

#### Angaben zur Lebensqualität

Um zu untersuchen, wie sich die Behandlung auf Ihr körperliches und seelisches Befinden und Ihre Leistungsfähigkeit auswirkt, bitten wir Sie, den dafür entwickelten Fragebogen zur Lebensqualität vor und nach der jeder Behandlung gewissenhaft auszufüllen.

#### Dauer der Teilnahme

Insgesamt werden Sie im Rahmen der Studie 15 Wochen lang behandelt.

#### Worauf Sie achten müssen

Wir bitten Sie, auf stark fluoridhaltige Nahrungsmittel (Tee, Fisch, Mineralwasser > 0,3 mg/l Fluorid) während der gesamten Studiendauer zu verzichten.

Zu Beginn jeder Studienphase werden Zahnproben in Ihrer Prothese befestigt, die Sie während der Studie bitte Tag und Nacht tragen. Selbstverständlich kann die Prothese an den betreffenden Stellen *vorsichtig* mit dem Speichelersatzmittel gereinigt werden, jedoch dürfen die Zahnproben nicht mit der Zahnbürste gereinigt werden. Während aller zusätzlichen *Zeiten, wenn die Prothesen nicht im Munde sind*, achten Sie bitte auf eine feuchte Lagerung (Taschentuch mit Speichelersatzmittel befeuchten).

Zur Standardisierung der häuslichen Mundhygiene erhalten Sie eine Zahnpasta gestellt (Salviagalen Fluoridfrei; Madaus, Köln, Deutschland). Bitte verwenden Sie darüber hinaus keinerlei fluoridhaltigen Präparate oder Mundspülungen mit antimikrobiell wirksamen Substanzen (z. B.: Elmex, Meridol, Chlorhexamed, Colgate Plax, Parodontax, Odol, Listerine etc.).

Frauen müssen, weil ungeborene Nachkommen nicht vom Versicherungsschutz erfasst werden, eine sichere Kontrazeption durchführen. Als sichere Methoden der Kontrazeption gelten diejenigen Methoden mit einer geringen Fehlerrate (unter 1 % pro Jahr), sofern Sie korrekt und regelmäßig angewendet werden (z. Bsp.: Hormonimplantate, hormonelle Injektionsmittel, orale Kontrazeptiva, sexuelle Abstinenz, Vasektomie). Die in dieser Studie verwendeten Speichelersatzmittel zeigen jedoch keine bekannten Wechselwirkungen mit Kontrazeptiva.

Für die Zeit der Teilnahme an dieser Untersuchung dürfen Sie an keiner anderen klinischen Studie teilnehmen.

#### Abbruch der Therapie / Studienteilnahme durch Ihren Arzt

Die Therapie wird abgebrochen, falls schwere Nebenwirkungen auftreten sollten. Ihr Arzt wird dann das weitere Behandlungsverfahren mit Ihnen absprechen. Andere Gründe für einen Abbruch der Behandlung / Studienteilnahme durch Ihren Arzt sind mangelnde Kooperationsbereitschaft oder Compliance. Es sind keine weiteren Untersuchungen, bei einem eventuellen (vorzeitigen) Ende der Teilnahme an der klinischen Prüfung beim Teilnehmer oder seinen Proben vorgesehen.

#### Neue Erkenntnisse

Sollten im Verlauf der Studie neuere wissenschaftliche Erkenntnisse bekannt werden, die eine bessere Behandlung bzw. weniger Nebenwirkungen versprechen, werden Sie über diesen Sachverhalt informiert.

#### Versicherung

Für den Fall, dass Sie als Folge dieser Untersuchung eine Gesundheitsschädigung erleiden, wurde bei der HDI-Gerling Industrie Versicherung Gruppe, Am Schönenkamp 45, 40599 Düsseldorf; Tel.: 0211-74825404, Fax: 0211-7482465, Vers.-Nr.: 70-5644584-4) eine Patientenversicherung

abgeschlossen. Die Versicherung leistet für studienbedingte Schäden einen Ausgleich von maximal 500.000,00 €.

Folgende Ausschlüsse vom Versicherungsschutz bestehen:

- (1) Gesundheitsschädigungen eines Versicherten, wenn er an einer Krankheit leidet, zu deren Behebung das zu prüfende Arzneimittel angewendet werden soll, und soweit diese Gesundheitsschädigungen
  - a) durch mit Sicherheit eintretende und dem Versicherten bekannt gemachte Wirkungen/Ereignisse verursacht worden sind und
  - b) über ein nach den Erkenntnissen der medizinischen Wissenschaft vertretbares Maß nicht hinausgehen.
- (2) Gesundheitsschädigungen und Verschlimmerungen bereits bestehender Gesundheitsschädigungen, die auch dann eingetreten wären oder fortbeständen, wenn der Versicherte nicht an der klinischen Prüfung teilgenommen hätte;
- (3) Gesundheitsschädigungen, soweit sie eingetreten sind, weil der Versicherte vorsätzlich den ausdrücklichen Anweisungen der Personen, die mit der Durchführung der klinischen Prüfung beauftragt sind, zuwidergehandelt hat.

Um den Versicherungsschutz nicht zu verlieren, dürfen Sie sich einer anderen medizinischen Behandlung nur nach Rücksprache mit dem für diese klinische Studie verantwortlichen Arzt unterziehen. Notfälle sind hiervon ausgenommen. Notfälle sind nachträglich dem Prüfarzt zu melden.

Besteht der Verdacht, dass eine Gesundheitsschädigung als Folge dieser klinischen Studie eingetreten sein könnte, so müssen Sie dies der Versicherung unverzüglich anzeigen. In einem solchen Fall müssen Sie auch Ihren behandelnden Arzt sofort informieren und alles Zweckmäßige tun, um die Ursachen festzustellen bzw. den Schaden zu mindern.

Eine Kopie der Versicherungsbestätigung und der Versicherungsbedingungen wird Ihnen mit dieser Patienteninformation ausgehändigt.

#### Kosten

Mit der Teilnahme an dieser Untersuchung entstehen Ihnen keine Kosten. Fahrtkosten für die Wahrnehmung studienbedingter Termine können leider nicht erstattet werden.

#### Aufklärung über den Datenschutz

*Durch Ihre Unterschrift auf der Einwilligungserklärung erklären Sie sich damit einverstanden, dass der Prüfer und seine Mitarbeiter Ihre personenbezogenen Daten zum Zweck der o.g. Arzneimittelprüfung erheben und verarbeiten dürfen. Personenbezogene Daten sind z. B. Ihr Geburtsdatum, Ihr Geschlecht, Daten zu Ihrer physischen und psychischen Gesundheit oder andere persönliche Daten, die während Ihrer Teilnahme an der Studie oder bei Folgeuntersuchungen erhoben wurden.*

*Der Prüfer wird Ihre personenbezogenen Daten für Zwecke der Verwaltung und Durchführung der Studie sowie für Zwecke der Forschung und statistischen Auswertung verwenden.*

*Alle Ihre persönlichen Daten, die sich beim Prüfer befinden, können vom Leiter der Studie sowie von Zulassungsbehörden, der unabhängigen Ethikkommission oder anderen Überwachungsbehörden eingesehen werden. Zweck dieser Prüfungen ist, sicherzustellen, dass die Studie ordnungsgemäß durchgeführt wird und/oder die Qualität Ihrer studienbezogenen Daten gewährleistet ist.*

*Im Fall, dass schwerwiegende unerwünschte Ereignisse aufgetreten sind, werden diese in pseudonymisierter Form an die beteiligten Prüfer weitergegeben. Verdachtsfälle unerwarteter schwerwiegender Nebenwirkungen werden der zuständigen Ethikkommission, der zuständigen Bundesoberbehörde sowie von dieser an die bei der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) geführte Europäische Datenbank zur Registrierung von Arzneimittelprüfungen (EudraCT) gemeldet. Die zuständigen Bundesoberbehörden der Mitgliedsstaaten der Europäischen Union haben neben der Europäischen Arzneimittelagentur und der Europäischen Kommission Zugriff auf die in diese*

*Datenbank eingegebenen Daten. Wenn Sie mit dieser Weitergabe nicht einverstanden sein sollten, können Sie an dieser Studie nicht teilnehmen.*

*Ihr Einverständnis zur Verarbeitung Ihrer studienbezogenen Daten ist zeitlich unbefristet und nicht widerrufbar.*

*Im Falle des Widerrufs Ihrer Einwilligung zur Studienteilnahme dürfen die bis dahin gespeicherten Daten weiterhin verwendet werden, soweit dies erforderlich ist, um*

- a) Wirkungen des zu prüfenden Arzneimittels festzustellen,*
- b) sicherzustellen, dass Ihre schutzwürdigen Interessen nicht beeinträchtigt werden,*
- c) der Pflicht zur Vorlage vollständiger Zulassungsunterlagen bei der zuständigen Bundesoberbehörde zu genügen.*

*In diesem Fall haben die verantwortlichen Stellen zu prüfen, inwieweit die gespeicherten Daten für die vorgenannten Zwecke a)-c) noch erforderlich sein können. Nicht mehr benötigte Daten werden unverzüglich gelöscht. Im Übrigen werden die erhobenen personenbezogenen Daten nach Ablauf von 10 Jahren gelöscht, sofern nicht gesetzliche, satzungsmäßige oder vertragliche Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.*

*Sie haben das Recht auf Auskunft über alle beim Studienarzt oder dem Hauptprüfer der Studie vorhandenen personenbezogenen Daten über Sie. Sie haben auch Anrecht auf Korrektur eventueller Ungenauigkeiten in Ihren personenbezogenen Daten. Wenn Sie eine Anfrage machen wollen, wenden Sie sich bitte an Ihren Studienarzt. Dieser wird Kontakt mit dem Hauptprüfer der Studie aufnehmen und Ihnen die Information über Ihre gespeicherten Daten zur Verfügung stellen.*

*Bitte beachten Sie, dass die Ergebnisse der Studie in der medizinischen Fachliteratur veröffentlicht werden können, wobei Ihre Identität jedoch anonym bleibt. Für die Verarbeitung Ihrer studienbezogenen Daten durch den Leiter der Studie ist dieser selbst verantwortlich.*

#### Ansprechpartner für weitergehende Fragen

Sie haben die Möglichkeit, jederzeit weitere Fragen zu stellen und mit dem verantwortlichen Arzt über den Fortgang der Therapie zu sprechen.

Als Kontaktperson steht Ihnen Herr OA Dr. Peter Tschoppe (030 450 662 327) von Montag bis Freitag in der Zeit von 9 bis 17 Uhr zur Verfügung.

Sie können sich bei Fragen zur Teilnahme an dieser klinischen Arzneimittelprüfung auch an das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte  
Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3  
D-53175 Bonn

Tel.: +49 (0)228 -99-307-30 (Zentrale)

Fax: +49 (0)228 -99-307-5207

wenden.

#### Freiwilligkeit der Teilnahme

Sie nehmen an dieser Studie freiwillig teil und können jederzeit ohne Angabe von Gründen von der Zusage zur Teilnahme zurücktreten, ohne dass Ihnen hieraus Nachteile für Ihre Behandlung erwachsen.

Falls Sie keine weiteren Fragen haben und sich zur Teilnahme an dieser Studie entschlossen haben, unterzeichnen Sie bitte die beiliegende Einwilligungserklärung und fügen Sie das Datum Ihrer Einwilligung ein.

Sie erhalten diese Patienteninformation und eine Kopie der unterschriebenen Einwilligungserklärung.

## MERKBLATT ZUM UMGANG MIT DER PROTHESE WÄHREND DER STUDIENTEILNAHME

Um die Studienergebnisse nicht zu verfälschen, bitten wir Sie folgende Regeln zu beachten:

- Die Prothesen dürfen nicht trocken gelagert werden (hierfür ist eine Prothesenaufbewahrungsbox für Sie bereitgestellt)
- Verwendung der Prothesenaufbewahrungsbox:
  - Während der Mundhygienedurchführung (Zähneputzen)
  - die Prothese wird in einem mit Speichelersatzmittel befeuchtetem Papiertaschentuch eingewickelt und in die Aufbewahrungsbox gelegt (bitte füllen Sie kein Wasser in die Aufbewahrungsbox)
- Prothesenreinigung:
  - verwenden Sie fluoridfreie Zahnpasten / nur die Ihnen mitgegebene Zahnpasta
  - verwenden Sie keine Fluoridhaltigen Mundspüllösungen oder Gelees
  - die Proben dürfen auf KEINEN FALL mit der Zahnbürste o.ä. gereinigt werden
  - reinigen Sie die Prothese vorsichtig unter fließend klarem Wasser mit den weichen Fingerkuppen (starke Verunreinigungen zwischen den Prothesenzähnen, z.B. nach Mahlzeiten können mit der Zahnbürste ohne Zusatz von Reinigungsmitteln entfernt werden- dabei NICHT die Proben putzen)
- Speichelersatzmittel:
  - verwenden Sie das Speichelersatzmittel wenn möglich regelmäßig
  - sollte die Menge des Ihnen mitgegebenen Speichelersatzmittels für die Veruchsphase nicht ausreichen, melden Sie sich bitte bei uns, wir stellen Ihnen weiteres Speichelersatzmittel zur Verfügung

**11.10 Untersuchungsbogen (CRF)**

CharitéCentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

Prof. Dr. A. M. Kielbassa | Zahnerhaltungskunde und Parodontologie  
CharitéCentrum 3 | Alßmannshäuser Straße 4-6 | 14197 Berlin



Zahnerhaltungskunde und Parodontologie  
Alßmannshäuser Straße 4-6  
D-14197 Berlin

Direktor: Prof. Dr. Andrej M. Kielbassa

Unser Zeichen: PT/veränderter Begleitbogen In-situ-Studie T-01.doc

Tel. 00 49 (0) 30 450 562 332  
00 49 (0) 30 450 662 327 (OA Dr. P. Tschoppe)  
Fax 00 49 (0) 30 450 562 932

andrej.kielbassa@charite.de  
peter.tschoppe@charite.de  
www.charite.de/zahnerhaltung  
www.charite.de/parodontologie

Studiencode: **T 01**

EudraCT Nummer: **2008-005451-23**

Vergleichende, randomisierte, kontrollierte und  
doppelblinde In-situ-Studie zur Wirkung von zwei  
Speichelersatzmitteln auf Schmelz

**Untersuchungsbogen (CRF)**

Klinischer Untersucher: \_\_\_\_\_

Probanden-Nr.: \_\_\_\_\_

<b>Visit 1 (T 0)      Aufnahmedatum:</b>
--

- Aufklärung des Patienten über die Studie und Aushändigen der Patienteninformation
- Aushändigung der Einwilligungserklärung
- Abklären der Ein-/Ausschlusskriterien
- Zuteilung des Randomisierungsumschlages mit dem jeweiligen Patientencode
- Bestimmung der Speichelfliessrate

**Anamnese:**

**Geburtsjahr:** \_\_\_\_\_

**Geschlecht:**      männlich      
                          weiblich     

**Zahnstatus: OK:** Prothese     Teilprothese     Vollbezahnt   
                          **UK:** Prothese     Teilprothese     Vollbezahnt

**Behandlung der Mundtrockenheit bisher:**

- Wasser, Tee, Saft
- Kaugummi
- Mundspüllösung; wenn ja, welches Produkt: \_\_\_\_\_
- Drops, Süßwaren
- Öl
- Speichelersatzmittel; wenn ja, welches Produkt: \_\_\_\_\_
- nichts

**Allgemeinerkrankungen:**

---



---

**Medikamente:**

---



---



---

1. Messung Speichelfliessrate

**Speichelfliessrate:** \_\_\_\_\_ ml/5 min    \_\_\_\_\_ ml/min

<b>Visit 2 (T 1)      Datum:</b>
----------------------------------

- Ausgabe des Speichelersatzmittels (siehe Randomisierungsumschlag für den betreffenden Patienten)
- Bestimmung der Speichelfliessrate
- Einbetten der Zahnproben in die Prothesen (2 Schmelzproben)

Speichelfliessrate: \_\_\_\_\_ ml/min

Wie viele ml des Speichelersatzmittels werden ausgegeben? \_\_\_\_\_ ml

<b>Visit 3 (T 2)      Datum:</b>
----------------------------------

- Rücknahme des Speichelersatzmittels
- Entfernen der Zahnproben aus den Prothesen
- 1-wöchige Wash-Out-Phase

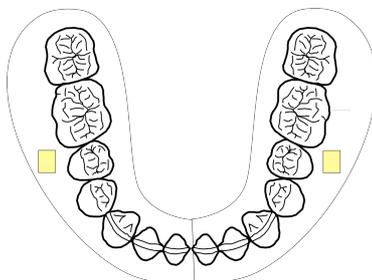
Wie viele ml des Speichelersatzmittels werden zurückgegeben? \_\_\_\_\_ ml

Wie viele ml des Speichelersatzmittels wurden somit verbraucht? \_\_\_\_\_ ml

Zahnproben:

gesunde Schmelzprobe: \_\_\_\_\_

demineralisierte Schmelzprobe: \_\_\_\_\_



**Dokumentation von S/AEs**

Die Dokumentation umfasst die Art des Ereignisses, Beginn, Dauer, Ausprägung/Schweregrad und Kausalität.

<b>Visit 4 (T 3)      Datum:</b>
----------------------------------

- Ausgabe des Speichersatzmittels (siehe Randomisierungsumschlag für den betreffenden Patienten)
- Bestimmung der Speichelflussrate
- Einbetten der neuen Zahnproben in die Prothesen

Speichelflussrate: \_\_\_\_\_ ml/min

Wie viele ml des Speichersatzmittels werden ausgegeben? \_\_\_\_\_ ml

<b>Visit 5 (T 4)      Datum:</b>
----------------------------------

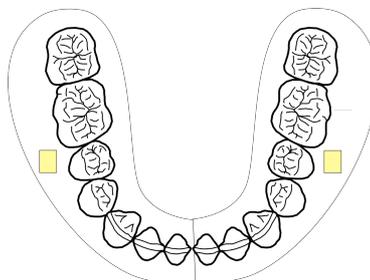
- Rücknahme des Speichersatzmittels
- Entfernen der Zahnproben aus den Prothesen

Wie viele ml des Speichersatzmittels werden zurückgegeben? \_\_\_\_\_ ml

Wie viele ml des Speichersatzmittels wurden somit verbraucht? \_\_\_\_\_ ml

Zahnproben:

gesunde Schmelzprobe: \_\_\_\_\_  
 demineralisierte Schmelzprobe: \_\_\_\_\_



**Dokumentation von S/AEs**

Die Dokumentation umfasst die Art des Ereignisses, Beginn, Dauer, Ausprägung/Schweregrad und Kausalität.

---



---

### 11.11 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Olivia Wolf, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [randomisierte, doppelblinde In-situ-Studie zur Wirkung von zwei Speichelersatzmitteln auf gesunden Schmelz und künstliche Schmelzläsionen] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

**11.12 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

### 11.13 Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Olivia Wolf hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: **Tschoppe P**, Wolf O, Eichhorn M, Martus P, Kielbassa A. M. Design of a randomized controlled double-blind crossover clinical trial to assess the effects of saliva substitutes on bovine enamel and dentin *in situ*. BMC Oral Health 2011;11:13.

Der Beitrag zu dieser Publikation umfasst große Teile der inhaltlichen Erarbeitung wie Literaturrecherche und Textformulierungen sowie der Teilnahme an der Untersuchung durch Patientenrekrutierung, Versuchsdurchführung und Datenerfassung.

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Datum:

---

Unterschrift

#### **11.14 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Priv. Doz. Dr. Peter Tschoppe für die Überlassung des Themas, für seine wertvollen Ratschläge und Hilfeleistungen und seine Geduld bei der Durchführung und auf dem Weg zur Vollendung dieser Arbeit. Darüber hinaus bedanke ich mich bei meinem ehemaligen Chef, Prof. Dr. Andrej Kielbassa für die Unterstützung, Motivation und die vielen Anregungen zur Erarbeitung dieses Themas durch bereichernde Diskussionen.

Außerdem danke ich Herrn Rainer Toll und Annette Steinke für ihre Anleitung und Hilfestellung bei der Vorbereitung und Auswertung der Versuchsproben. Desweiteren danke ich Herrn Dr. Lenz für die statistische Beratung.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinen Eltern für die Motivation und die liebevolle und unermüdliche Unterstützung und Nachsicht während der gesamten Zeit bedanken.