

Aus der Abteilung für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Sekundärkariesinhibition in einem biofilmbasierten
In-vitro-Kariesmodell**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Franziska Schneider
geboren in Berlin

Gutachter:

1. Priv.-Doz. Dr. Rainer Seemann
2. Prof. Dr. med. dent. A. Lussi
3. Prof. Dr. P.-G. Jost-Brinkmann

Datum der Promotion: 21.11.2008

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
2. Literaturübersicht	11
2.1 Karies	11
2.1.1 Definition der Karies	11
2.1.2 Ätiologie der Karies	11
2.1.3 Plaque	13
2.1.4 Kariogene Mikroorganismen (Mutans-Streptokokken)	17
2.1.5 Sekundärkaries	19
2.2 Fluoride	21
2.2.1 Applikationsformen	21
2.2.2 Wirkungsweise von Fluoriden	24
2.2.3 Toxizität	26
2.3 Dentin	28
2.3.1 Aufbau	28
2.3.2 Dentinkaries	29
2.3.3 Probleme der Dentinadhäsion	31
2.3.4 Mikromechanische Verankerung	32
3. Ziele und Fragestellung	34
4. Material und Methode	36
4.1 Auswahl und Herstellung der Proben	36
4.1.1 Methodik	37
4.1.2 Thermocycling	39
4.1.3 Sterilisation der Proben	39

4.2 Aufbau des In-vitro-Kariesmodells	40
4.2.1 Reaktionskammer	41
4.2.2 Medien	43
4.2.3 Keime	45
4.3 Erzeugung kariöser Läsionen	46
4.4 Anfertigung der Zahnschliffe	48
4.5 Funktionsprinzip des CLSM	49
4.6 Ausmessung der Demineralisation	51
4.7 Statistische Aufbereitung der Daten	53
5. Ergebnisse	54
5.1 Plaquewachstum und Bildung kariöser Läsionen	54
5.1.1 Primärkaries	54
5.1.2 Sekundärkaries	56
5.2 Ergebnisübersicht	57
5.2.1 Fläche der Sekundärkaries	57
5.2.2 Fläche der Primärkaries	59
5.2.3 Randspalttiefe	61
5.2.4 Aggregierte Daten	63
6. Diskussion	69
6.1 Diskussion der Ergebnisse	69
6.2 Diskussion von Material und Methode	74
6.2.1 In-vitro-Untersuchung	74
6.2.2 Auswahl der Zähne	75
6.2.3 Kavitätenpräparation	75
6.2.4 Fülltechnik und Polymerisation	76
6.2.5 Möglicher Einfluss des verwendeten Dentinadhäsivs	76

6.2.6 Füllungsmaterial	77
6.2.7 <i>Dentin-Versiegelungsliquid</i> (Humanchemie GmbH)	77
6.2.8 Ausarbeitung und Politur	79
6.2.9 Feuchtlagerung	79
6.2.10 Thermische Wechselbelastung	80
6.2.11 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	80
7. Schlussfolgerungen	82
8. Zusammenfassung	83
9. Summary	85
10. Literaturverzeichnis	87
11. Anhang	96
11.1 Abkürzungs- und Produkteverzeichnis	96
11.2 Danksagung	98
11.3 Curriculum vitae	99
11.4 Erklärung	100

1. Einleitung

In der Anwendung restaurativer Werkstoffe kam es in den letzten 2 Jahrzehnten zu offensichtlichen Veränderungen. Die ästhetischen Anforderungen der Patienten rückten immer mehr in den Vordergrund und selbst die zahnfarbene Versorgung von Seitenzahnkavitäten gewann stetig an Bedeutung (Burke und Qualtrough, 1994). Zudem wurde die Bevölkerung durch Diskussionen um mögliche gesundheitliche Schäden von Amalgam stark verunsichert, sodass dessen Anwendung von vielen Patienten zunehmend abgelehnt wird (Hickel et al., 1998; Mackert und Wahl, 2004).

Bei der Materialentwicklung wurden in den letzten Jahren bezüglich der Haltbarkeit von Kompositfüllungen enorme Fortschritte gemacht. Gleichzeitig konnten die negativen Auswirkungen der Polymerisationsschrumpfung weiter minimiert werden (Frankenberger, 2002). Die Münchener Poliklinik für Zahnerhaltung hat 25 klinische Studien zwischen 1988 und 2002 zur Überlebenszeit und zu den Verlustursachen von Klasse-I- und Klasse-II-Kompositfüllungen zusammengefasst (Manhart, 2003). Hiernach ist die Sekundärkariesbildung durch Randspalten und Füllungsfrakturen die am häufigsten beobachtete Ursache für einen vorzeitigen Füllungsverlust.

Der Ersatz von Füllungen nimmt etwa 60% der Behandlungszeit von Zahnärzten in Anspruch (Wilson et al., 1997), wobei Sekundärkaries die Hauptursache darstellt (Kidd et al., 1992; Manhart, 2003; Mjör, 1997; Mjör und Gordan, 2002; Oliveira et al., 1999). Laut einer schwedischen retrospektiven Analyse von 2609 auszutauschenden Kompositfüllungen mussten etwa 33% der Füllungen nach einer diagnostizierten Sekundärkaries ersetzt werden (Mjör, 1996).

Obwohl die Sekundärkaries weitestgehend das therapeutische Handeln der Zahnärzte bestimmt und jährlich enorme Kosten im Gesundheitswesen verursacht, ist sie nur unzureichend untersucht (Mjör und Toffenetti, 2000; Noack, 2004). Nicht zuletzt sind ethische Bedenken ausschlaggebend für die Zurückhaltung in der Forschung auf diesem Gebiet.

Vor diesem Hintergrund gewinnt die Anwendung von potenziell kariespräventiv wirksamen Mitteln nach der Kavitätenpräparation und damit die Reduzierung von Kariesrezidiven oder Sekundärkaries zunehmend an Bedeutung.

Ziel dieser Arbeit war es daher, ein fluoridhaltiges Produkt zu testen, das vor dem Legen einer Kompositfüllung direkt in die Kavität appliziert wird und nachhaltig die Sekundärkariesentstehung verhindern soll. Es sollte ferner untersucht werden, ob selbst bei vorhandenem Randspalt eine Hemmung der Demineralisation durch das Produkt *Dentin-Versiegelungsliquid* (Humanchemie GmbH, Alfeld/Leine, Deutschland) stattfindet und ob die Applikation des Fluorides den Verbund zwischen Zahnhartsubstanz und Kompositfüllung beeinflusst.

Die Untersuchung erfolgte in einer künstlichen Mundhöhle, die den Hauptfaktoren der Kariesentstehung *Wirt, Substrat, Bakterien* und *Zeit* Rechnung trägt (Seemann et al., 2005a).

2. Literaturübersicht

2.1 Karies

2.1.1 Definition der Karies

Das lateinische Wort „Caries“ ist ein allgemein-pathologischer Begriff für die eitrige Einschmelzung von Knochen und bedeutet „Morschsein“ oder „Fäulnis“. Die Zahnkaries hingegen ist ein dynamischer, multifaktorieller Prozess der Demineralisation von Schmelz und Dentin, der progredient fortschreitend zu irreversiblen Zahnhartsubstanzverlust führt (Arends, 1969; König, 1971). Karies ist die häufigste Erkrankung der Zahnhartgewebe und kann genau wie andere Erkrankungen auch durch Phasen der Stagnation, Remission und Progression gekennzeichnet sein (Klimek und Hellwig, 1999).

2.1.2 Ätiologie der Karies

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts befasste sich *Miller* mit der „Entstehung der Karies“. Er veröffentlichte seine Erkenntnisse in dem Buch „Die Mikroorganismen der Mundhöhle“, in dem er sich der Frage zuwendet: *„Wodurch wird die Zahncaries erzeugt? Die Zahncaries ist ein chemisch-parasitärer Vorgang, bestehend aus zwei deutlich ausgeprägten Stadien, der Entkalkung resp. Erweichung des Gewebes und der Auflösung des erweichten Rückstandes. ... Nachdem wir die Gärungsvorgänge im Munde besprochen haben, ist die Quelle der zur Erweichung des Gewebes nöthigen Säuren nicht schwer zu bestimmen. Es sind vorzugsweise die in den Cariesheerden steckengebliebenen stärke- und zuckerhaltigen Speisereste, welche durch Gärung Säure bilden“* (Miller, 1892).

Obwohl seine These des „chemisch-parasitären Vorgangs“ (Miller, 1892) bis weit in das 20. Jahrhundert nicht anerkannt wurde, stellt sie die derzeitige Grundlage der Kariestheorie dar. Denn auch heute gilt, dass die von kariogenen Mikroorganismen

freigesetzten organischen Säuren zur Demineralisation der Zahnhartgewebe führen (Sanderink, 2005). *Orland* et al. belegten die chemisch-parasitäre Theorie von *Miller*, indem sie 1954 in einem Experiment bewiesen, dass Karies bei keimfrei gezüchteten Ratten trotz kohlenhydratreicher Diät nicht auftritt (Orland et al., 1954).

Ein Modell der Ätiologie wurde erst 70 Jahre nach *Miller* durch weitere Tierversuche an Ratten und Hamstern von *Keyes* entwickelt und zeigt das Zusammenspiel von „Zahn“, „Mikroorganismen“ und „Substrat für die Mikroorganismen“, das für die Entstehung von Karies nötig ist (Keyes, 1960; Keyes, 1968).

Das heutige Verständnis der Kariesätiologie wurde lediglich durch *König* 1987 um den Faktor „Zeit“ ergänzt (König, 1987), denn eine Zerstörung der Zahnhartsubstanzen entsteht erst nach häufigen bzw. lang anhaltenden Säureangriffen (Abbildung 2-1-2) und ist damit genauso obligat für die Kariesentstehung wie die drei durch *Keyes* ermittelten Faktoren.

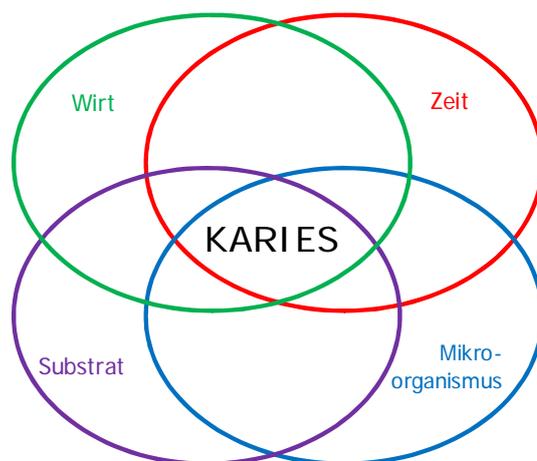


Abb. 2-1-2: schematische Darstellung der Karies-Ätiologie [nach (König, 1987)]

Für die Entwicklung kariöser Läsionen sind also nicht allein die genetischen Faktoren, sondern vielmehr die lokalen Einflüsse im Mundraum entscheidend. Um dieses Modell zu belegen, wurden zahlreiche Tierexperimente (Fitzgerald, 1968; Stephan, 1966) und epidemiologische Studien (Newbrun, 1982; Sheiham, 1983) durchgeführt, die zeigten, dass das Auftreten von Karies in direktem Zusammenhang mit der nahrungsbedingten Aufnahme niedermolekularer Kohlenhydrate steht. Außerdem wiesen *Gustafsson* und

Mitarbeiter in der aus ethischer Sicht verwerflichen *Vipeholm-Studie* (Gustafsson et al., 1954) nach, dass insbesondere die Frequenz der Nahrungsaufnahme für die Entstehung von Karies bestimmend ist. Auch die Konsistenz des Zuckers beeinflusst das kariogene Potenzial. *König & Mühlemann* zeigten 1967, dass die Kariogenität des Zuckers ansteigt, je klebriger und feinkörniger dieser ist (König und Mühlemann, 1967). Durch das entstehende Nahrungsreservoir für kariogene Mikroorganismen wird der Säureangriff auf die Zähne verlängert (Imfeld, 1983; Stephan, 1966).

Axelsson & Lindhe wiesen darauf hin, dass Karies ohne das Auftreten eines strukturierten Biofilms, der so genannten Plaque, nicht in Erscheinung tritt (Axelsson und Lindhe, 1978). Im Übrigen ist neben dem Alter der Plaque auch deren Zusammensetzung für das kariogene Potenzial ausschlaggebend (Sanderink, 2005).

2.1.3 Plaque

Plaque ist einer der ätiologischen Faktoren für die Entwicklung von Karies, ohne deren Metaboliten es nicht zur Demineralisation der Zahnhartsubstanzen kommen würde (Theilade und Theilade, 1976). Plaque ist definiert als eine auf den Zahnoberflächen haftende, strukturierte Bakterienaggregation, die in eine organische Matrix eingebettet ist. Diese Matrix macht 20 – 40% des gesamten Plaquevolumens aus und enthält die von den Mikroorganismen gebildeten extrazellulären Polysaccharide, die den Bakterien Schutz bieten und als Nahrungsspeicher dienen (Sanderink, 2005).

Das Vorkommen von Mikroorganismen im Zahnbelag wurde erstmals 1683 von *van Leeuwenhoeck* beschrieben (Smit und Heniger, 1975), der in einem Brief an die Royal Society of London bereits von „tausenden lebenden Tierchen“ berichtete, die er unter seinem Mikroskop erkennen konnte.

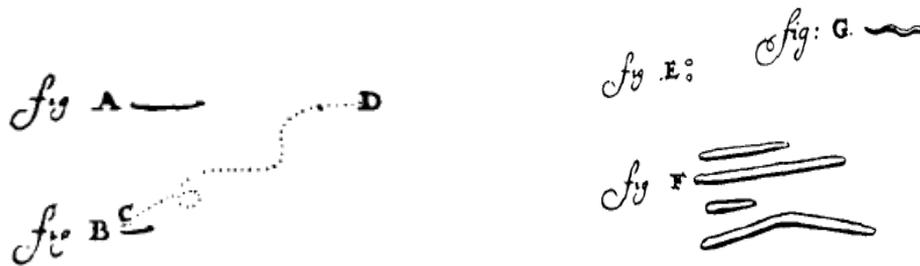


Abbildung 2-1-3-1: Zeichnungen von Abraham de Blois (1694) zu Leeuwenhoeck's Beschreibungen der Zahnbelagsbakterien [nach (Smit und Heniger, 1975)]

Der Begriff „Plaque“ selbst wurde dann von *Miller* als *gelatinous microbic plaques* erstmals beschrieben (Miller, 1892).

Dentale Plaque wird heutzutage als Biofilm betrachtet. Biofilme werden als räumlich organisierte Gemeinschaften von Mikroorganismen definiert, die mit einer Oberfläche verbunden und in eine extrazelluläre Matrix eingebettet sind (Sanderink, 2005).

Die Adhäsion zur Zahnoberfläche findet über das *Pellikel* (Meckel, 1965) statt, einer dünnen, zellfreien Glycoproteinschicht, die sich auf allen Zahnoberflächen innerhalb von Sekunden nach einer gründlichen Zahnreinigung bildet (Sanderink, 2005). Dafür verantwortlich ist der so genannte *Stern-layer* oder *hydration layer*, der sich aufgrund der negativ geladenen Apatitkristalle zu 90% aus positiv geladenen Kalziumionen und zu 10% aus Phosphationen zusammensetzt (Arends und Jongebloed, 1977). An die positiv geladenen Ca^{2+} -Ionen lagern sich nun eine Reihe organischer Komponenten aus dem Speichel, überwiegend Glycoproteine, aber auch Enzyme, Proteine und Lipide an (Abbildung 2-1-3-2) (Hannig et al., 2005; Hannig und Bossmann, 1989a; Hannig und Bossmann, 1989b). An der Reifung des Pellikels sind noch weitere Bindungsmechanismen wie van der Waals Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, kovalente Bindungen, Ionenbindungen, Ion-Dipol-Interaktionen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und hydrophobe Wechselwirkungen beteiligt (Pruitt, 1977).

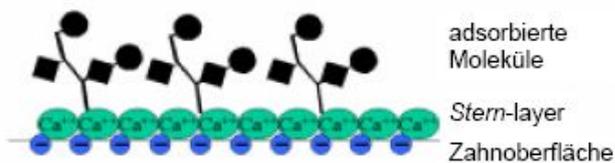


Abbildung 2-1-3-2: Pellikelbildung [nach (Seemann, 2002)]

Die initiale Adhäsion grampositiver Streptokokken, v. a. *Streptococcus sanguis* und *S. oralis* und in geringerem Umfang auch *S. mitis* und *S. salivarius*, findet innerhalb kürzester Zeit über bakterielle Adhäsine statt. Die besondere Ausstattung von *S. mitis* und *S. sanguis* mit pellicelbindenden Adhäsinen erklärt ihre Rolle als Pionierkeim in der Besiedlung der Zahnoberflächen (Sanderink, 2005). Es kommt zur festen Bindung der Mikroorganismen an die komplementären Rezeptoren im Pellicel (Abbildung 2-1-3-3) (Jenkinson und Lamont, 1997; Whittaker et al., 1996).

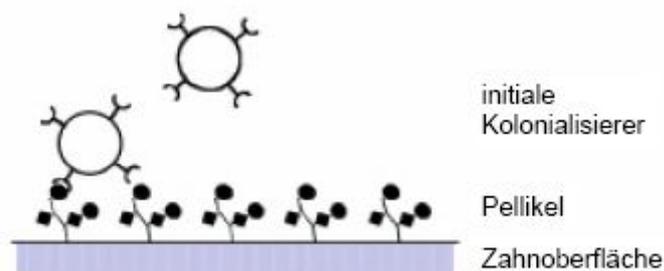


Abbildung 2-1-3-3: Bakterielle Adhäsion [nach (Seemann, 2002)]

Es folgen grampositive Stäbchenbakterien, v. a. die *Actinomyces*-Arten *A. viscosus* und *A. naeslundii*.

Nach etwa 24 – 72 Stunden steigt dann der Anteil grampositiver Kokken, v. a. *Veillonella parvula* und *V. alcalescens*, erheblich an. Mit der Zeit nehmen auch die grampositiven und gramnegativen Stäbchen zu, sodass die grampositiven Kokken nur noch etwas über 50% der Mikroflora ausmachen (Theilade et al., 1982; Theilade, 1984). Die weitere Plaquereifung erfolgt in mehreren Stadien. Am dritten und vierten Tag

überwiegen die Fusobakterien und Filamente (Listgarten, 1994; Socransky et al., 1977; Theilade et al., 1982). Eine besondere Rolle beim Plaquewachstum spielt das gramnegative, obligat anaerobe Stäbchen *Fusobacterium nucleatum*, das wie die Streptokokken fähig ist, am Pellikelprotein *Statherin* zu haften und sich zusätzlich an sämtlichen bisher bekannten oralen Mikroorganismen über Koaggregation zu binden. Koaggregation bedeutet Haftung genetisch unterschiedlicher Bakterienarten aneinander, während man bei Koadhäsion von der Haftung genetisch identischer Bakterienarten spricht.

Vom fünften bis neunten Tag siedeln sich zusätzlich Spirillen und Spirochäten an. Der Plaque-Biofilm ist nach 10 – 14 Tagen ausgereift. Die mikrobielle Zusammensetzung verändert sich in dieser Zeit kontinuierlich, wobei v. a. die *Actinomyces spp.* anteilig zunehmen (Sanderink, 2005).

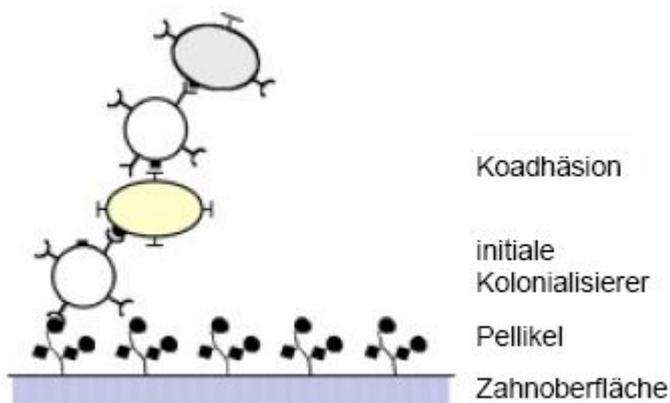


Abbildung 2-1-3-4: Plaquereifung [nach (Seemann, 2002)]

Die Bakterien synthetisieren eine Matrix aus extrazellulären Polysacchariden (= EPS), welche aus Dextran, Mutan (= Glucane) und Lävan (= Fructan) bestehen. Lävan ist ein Homopolymer der Fructose und wird durch die Fructosyltransferase ebenfalls aus Saccharose synthetisiert. Es stellt ein Nahrungsreservoir für die Mikroorganismen dar. Dextran und Mutan sind verzweigte Homopolymere der Glucose und werden über die Glucosyltransferasen aus Saccharose gewonnen. Sie bilden verzweigte Netzwerke, die hochgradig viskös sind und fest an der Zahnoberfläche haften (König, 1987). Die

bakterielle Adhärenz ist also von einer anfänglich reversiblen, lockeren Bindung in eine irreversible, konsolidierende übergegangen. Die Plaque ist daher nur noch mechanisch im Rahmen einer Zahnreinigung entfernbar (Gibbons und van Houte, 1975).

Aus dem Abbau niedermolekularer Kohlenhydrate ergeben sich große Mengen organischer Säuren, wie beispielsweise Acetat, Formiat, Propionat, Lactat und Butyrat, wobei Lactat am stärksten apatitauflösend und damit auch am stärksten kariogen ist.

Durch die Dissoziation der organischen Säuren werden Wasserstoffionen freigesetzt, die bis zu einem pH-Wert von 5 durch den Bikarbonat- und Phosphatpuffer des Speichels neutralisiert werden können. Sinkt der pH-Wert weiter, verbinden sich die Wasserstoffionen mit den Phosphatgruppen des Schmelzes. Dabei wird Kalzium freigegeben, was schließlich zur Auflösung des Apatitkristallgefüges führt (Fischer et al., 1995).

2.1.4 Kariogene Mikroorganismen (*Mutans-Streptokokken*)

Viele Studien befassten sich mit der bakteriellen Zusammensetzung auf kariös veränderten Zahnoberflächen, um die kariesverursachenden Bakterienspezies zu identifizieren. Diese Studien belegten, dass kariogene Mikroorganismen sowohl durch einen azidogenen als auch azidurischen Charakter gekennzeichnet sind. Eine besondere Rolle spielen in diesem Zusammenhang *Laktobazillen* und *Mutans-Streptokokken* (*S. mutans* und *S. sobrinus*) (Bowden, 1990; Loesche, 1986).

Mutans-Streptokokken, *Laktobazillen* und *Aktinomyzeten* werden heute mit unterschiedlichen Kariesformen in Verbindung gebracht. Während insbesondere *Mutans-Streptokokken* für die koronale Kariesinitiation und -progression und *Aktinomyzeten* für die Auslösung der Wurzelkaries verantwortlich gemacht werden, werden *Laktobazillen* als Indikator des Zuckerkonsums angesehen. Sie sind daher für die Kariesprogression und Auslösung der Sekundärkaries von großer Bedeutung (Botha et al., 2001; Loesche, 1986).

Mutans-Streptokokken wurden erstmals 1924 mit der Kariesentstehung assoziiert. Sie verdanken ihren Namen *Clarke*, der sie damals aus kariösen Läsionen isolierte und sie aufgrund ihrer ovalen Form für Mutanten der runden *Streptokokken* hielt (Clarke, 1924). Heute ist bekannt, dass sie ihr Aussehen je nach metabolischem Aktivierungsgrad von der Kokken- zur Stäbchenform ändern können (Sanderink, 2005).

Die Neubeschreibung durch *Clarke* wurde lange Zeit angezweifelt. Erst durch zahlreiche, z. T. gnotobiotische Tierexperimente (Fitzgerald und Keyes, 1960; Keyes, 1968; Krasse, 1966; Orland et al., 1955; Orland et al., 1954) konnten dem Keim seine besonders kariogenen Eigenschaften nachgewiesen werden. Als Typusstamm wurde *S. mutans* durch *Sims* (1961) in der Nationalen Stammsammlung Englands in London als NCTC 10449 hinterlegt. Es erfolgte dann eine Unterteilung des ursprünglichen *S. mutans* unter immunologischen, biologischen und serologischen Aspekten in 7 Serotypen (a-g). Diese kariogenen *Mutans*-Spezies wurden unter dem Begriff *Mutans*-Streptokokken zusammengefasst. Unter ihnen sind nur die beiden Arten *S. mutans* und *S. sobrinus* humanpathogen. *S. rattus* (Serotyp b), *S. ferus*, *S. macacae*, *S. downei* (Serotyp h) und *S. cricetus* (Serotyp a) kommen bei Tieren vor (Marsh und Martin, 2003).

S. mutans kann die Serotypen c, e und f besitzen. Serotyp c kommt mit 70 – 100% am häufigsten von allen kultivierbaren Bakterienspezies in der menschlichen Mundhöhle vor. Seine Kariogenität wird besonders durch die Vielzahl der Virulenzfaktoren bestimmt. So ist *S. mutans* in der Lage, eine Matrix aus unlöslichen extrazellulären Polysacchariden („Mutane“ bzw. Glucane) um sich herum aufzubauen und in Zeiten der Nahrungskarenz, Fructane als Energielieferant unter Säurebildung zu metabolisieren (vergleiche Kapitel 2.1.3). Saccharose wird zudem durch *S. mutans* schneller als durch andere Bakterien fermentiert. Durch den pH-Abfall verschafft sich *S. mutans* einen weiteren Selektionsvorteil, da er im Vergleich zu anderen oralen Keimen besonders säuretolerant ist und seine Zuckertransportsysteme selbst bei einem pH < 4 funktionsfähig bleiben. Der stärkste Säurebildner unter den *Mutans*-Streptokokken ist *S. sobrinus*.

Mutans-Streptokokken können sich nicht auf Schleimhäuten etablieren, sodass die Adhäsion an pellicelbedeckten Zahnoberflächen für sie von essenzieller Bedeutung ist (Sanderink, 2005). Bei Kleinkindern kann *S. mutans* somit erst mit dem Durchbruch der Zähne eine ökologische Nische besetzen. *Caufield* et al. bestimmten im Median den 26. Lebensmonat (19. – 31. Lebensmonat) als *window of infectivity* (Infektionsfenster) für die Übertragung der kariogenen Keime von der Mutter auf das Kind (Caufield et al., 1993). *Straetemans* und Mitarbeiter zeigten in einer weiteren Untersuchung, dass eine Infektion auch noch nach diesem Zeitraum stattfindet (Straetemans et al., 1998). Je früher und je mehr *S. mutans* jedoch die Zahnoberflächen besiedeln, desto größer ist die Gefahr der Kariesentstehung (Köhler et al., 1988; Loesche, 1985). Bei der

Übertragung spielt insbesondere die Menge der Streptokokken-Keimzahlen im Speichel der Mutter eine Rolle, daher ist eine Primärprimärprophylaxe stets anzustreben (Duchin und van Houte, 1978; Köhler und Bratthall, 1978).

Die völlige Eliminierung von *Mutans*-Streptokokken aus der Mundhöhle ist jedoch bis heute nicht möglich. Obwohl sie äußerst sensibel auf Chlorhexidin (CHX) reagieren, tritt nach der Anwendung eine Rekolonisation aus vorhandenen Interdentalräumen, Fissuren, Randspalten und Initialläsionen ein (Emilson, 1981; Kristoffersson und Bratthall, 1982; Maltz et al., 1981; Schaeken et al., 1986).

2.1.5 Sekundärkaries

Unter Sekundärkaries versteht man das Entstehen einer kariösen Läsion im Randbereich von zahnärztlichen Restaurationen (Mjör und Toffenetti, 2000). Die multifaktoriellen Ursachen der Sekundärkaries gleichen denen der Primärkaries. Ein Unterschied zwischen Primär- und Sekundärkaries lässt sich weder makroskopisch noch histologisch feststellen, wenn man von der Lage am Füllungsrand und den damit verbundenen Bedingungen des Randspaltes absieht. Die bakterielle Besiedlung in den Randspalten zwischen Restauration und Zahnhartsubstanz entspricht der einer Glattflächen- bzw. Wurzelkaries (Noack, 2004). Bei einer reinen Dentinkaries, wie man sie häufig am zervikalen Kronenrand findet, entspricht die Bakterienflora der einer Wurzelkaries. Die Besiedlung mit *Mutans*-Streptokokken ist besonders hoch, wobei zusätzlich v. a. *Actinomyces* (*A. naeslundii*) identifiziert wurden (Gonzalez-Cabezas und Li, 1999).

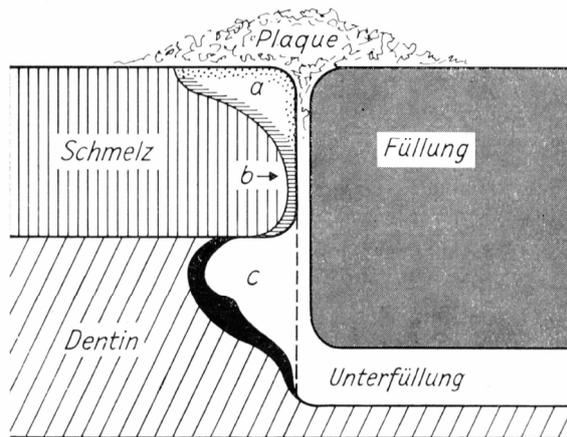


Abbildung 2-1-5: Sekundärkaries [nach (Kröncke, 1981)]

Bei der Sekundärkaries (Abbildung 2-1-5) unterscheidet man eine *äußere* (a) von einer *inneren Läsion* (b und c). Die äußere Läsion entwickelt sich unter einer Plaqueschicht an der Schmelzoberfläche. Es ist bekannt, dass sowohl die Qualität des Füllungsrandes als auch die Mundhygiene einen entscheidenden Einfluss auf das Entstehen einer sekundären Karies haben. *Eriksen* und *Goldberg* zeigten in unabhängigen Querschnittstudien, dass zwar das Sekundärkariesrisiko bei abnehmender Randqualität steigt, jedoch ein signifikant höheres Risiko mit einer schlechten Plaquekontrolle und allgemein erhöhtem Kariesrisiko korreliert (Eriksen et al., 1986; Goldberg et al., 1981). Daher ist ein auf den einzelnen Patienten abgestimmtes Prophylaxeprogramm erforderlich, um eine ursächliche Behandlung und Vorbeugung von Karies zu erzielen (Axelsson und Lindhe, 1978).

Es wird ferner diskutiert, inwieweit die Passgenauigkeit zahnärztlicher Restaurationen die innere Kavitätenwandläsion beeinflusst und mögliche antibakterielle Eigenschaften von Füllungsmaterialien die Sekundärkariesentstehung inhibieren. Man weiß aus zahlreichen Untersuchungen, dass Glasionomierzement durch seine Fluoridfreisetzung Sekundärkaries im Vergleich zu Kompositen reduziert (Davidson, 1998; Forss und Seppä, 1990; Han et al., 2002b; Hotz, 1979). Man versucht daher heute durch die Zugabe von Fluoriden zu Adhäsivsystemen, Kompositen und Kompomeren diese positive Wirkung auch bei den hochwertigeren Füllungsmaterialien zu erzielen, denn der häufigste Grund für den Verlust von Kompositfüllungen stellt die Bildung von Sekundärkaries durch Randspalten dar (Manhart, 2003).

2.2 Fluoride

Fluoride kommen als natürlicher Bestandteil unserer Umwelt sowohl in tierischer als auch pflanzlicher Nahrung vor. Daher ist nach Aussagen der *American Academy of Allergy* kein allergisches Potenzial vorhanden. Eine allergische Reaktion tritt dosisunabhängig auf und wäre bereits vor einer lokalen oder systemischen Applikation durch den Zahnarzt eingetreten.

Fluoride zeigen eine besonders hohe Affinität zu knöchernem Gewebe und wirken dort als Kristallisationskeim bei der Bildung von Apatit, dem wichtigsten anorganischen Bestandteil von Knochen und Zähnen (Zimmer et al., 2000). Durchschnittlich liegt der Fluoridgehalt menschlicher Zähne bei ca. 0,13%. Die charakteristischen Fluoridverteilungskurven zeigen, dass die Fluoridkonzentration im Schmelz von der Schmelz-Dentin-Grenze zur Oberfläche hin zunimmt. Im Dentin hingegen ist der Fluoridgehalt an der Dentinoberfläche, also der Schmelz-Dentin-Grenze, niedriger als nahe der Pulpa (Schroeder, 1992).

2.2.1 Applikationsformen

Bereits 1823 wurden Fluoride als Kariostatikum von *Hahnemann* empfohlen (Zimmer et al., 2000). Heute spielen Fluoridierungsmaßnahmen eine zentrale Rolle bei der Kariesprophylaxe und erklären den Kariesrückgang in den Industrieländern um 50% (Bratthall et al., 1996). Prinzipiell unterscheidet man die lokale von der systemischen Applikation, wobei es sich meist um eine gemischte Anwendung handelt, da die lokal angewendeten Fluoride durch Verschlucken eine geringe systemische Wirkung besitzen. Vice versa kommt das zugeführte fluoridierte Speisesalz oder Trinkwasser zunächst mit den Zähnen in Kontakt, bevor es systemisch resorbiert wird. Außerdem führt die systemische Anwendung auch stets zu einer Erhöhung der Fluoridkonzentration im Speichel (Macpherson und Stephen, 2001), der bereits mit Konzentrationen von 0,02 ppm eine kariesprophylaktische Wirkung besitzt (ten Cate und Duijsters, 1983).

Die systemische Applikation von Fluoriden erfolgt v. a. durch Tabletten, über die Trinkwasserfluoridierung und über die Verwendung von fluoridiertem Speisesalz im

Haushalt. Es sollte stets nur eine Applikationsform Anwendung finden, um eine Überdosierung zu vermeiden.

Schon 1925 stellten *McKay* und *Black* die Zusammenhänge zwischen einem erhöhten Trinkwasserfluoridgehalt (0,7 – 1 ppm), dem Auftreten von Mottling und einem reduzierten Kariesbefall fest. *Dean* bestätigte 1938 diese Untersuchungen und fand heraus, dass bei einem Fluoridgehalt des Trinkwassers von 0,6 ppm eine Kariesreduktion von 50% im Vergleich zu Gebieten mit 0,2 ppm vorlag (*Dean*, 1938). Daraus schlussfolgerte man anfänglich, dass der präeruptive Einbau von Fluorid in die Apatite der Zahnhartsubstanz kariesprotektiv wirkt (*Hellwig*, 1999). Diese These konnte durch Beobachtungen an Haifischzähnen, die zu 100% aus Fluorapatit (30000 ppm) bestehen, widerlegt werden. *Øgaard* und *Rølla* fanden in einem Versuch heraus, dass die Läsionstiefen der Haifischzähne bei einem kariösen Angriff denen der menschlichen Zähne ähneln, denn selbst reines Fluorapatit demineralisiert bei einem pH-Wert von 4,5 (*Øgaard et al.*, 1988).

Heute weiß man, dass die entscheidende kariesprotektive Wirkung der Fluoride bei topischer Anwendung erzielt wird. Werden Fluoridlösungen in Konzentrationen über 100 ppm auf die plaquefreien Schmelzoberflächen appliziert, lösen sie die äußerste Kristallschicht oberflächlich auf und bilden mit den freiwerdenden Kalzium- und Phosphationen eine Deckschicht (*Schroeder*, 1992), das so genannte *labile Fluoridreservoir*. Im Rasterelektronenmikroskop stellen sich je nach Fluoridverbindung und -konzentration, Einwirkzeit und pH-Wert kugelförmige, etwa 2 – 20 nm große Globuli dar (*Petzold et al.*, 2000), die Schichtstärken von bis zu 2 µm erreichen können (*Nelson et al.*, 1983). Diese geben kontinuierlich Fluorid in die Mundhöhle ab, sodass stets eine kariesprotektive Konzentration von freien Fluoriden aufrechterhalten bleibt (*Cismak et al.*, 2001) und so das Gleichgewicht zwischen De- und Remineralisation zugunsten der Remineralisation verschoben wird (Abbildung 2-2-1). Diese Wirkung der Fluoride ist abhängig von der Dosis und dem pH-Wert der Umgebung. *Dijkman et al.* zeigten, dass selbst 3 Monate nach Duraphat®-Applikation immer noch Kalziumfluoridglobuli auf der Schmelzoberfläche vorhanden waren (*Dijkman et al.*, 1983).

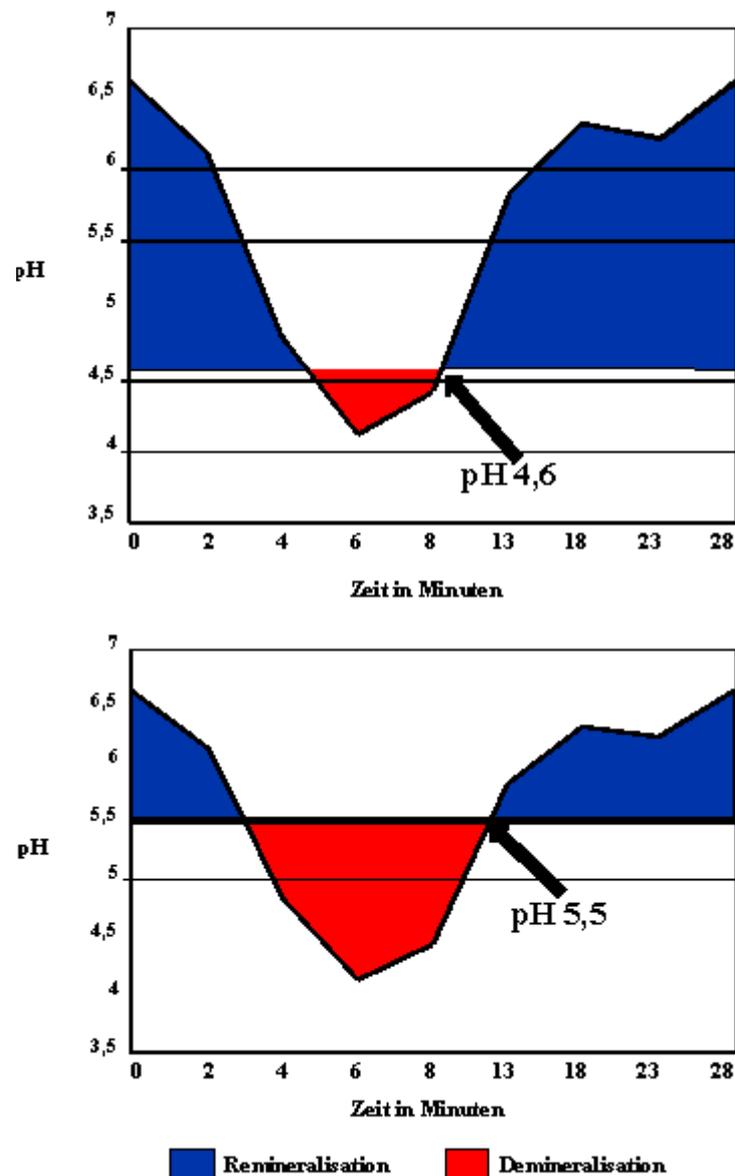


Abbildung 2-2-1: Fluorapatit demineralisiert erst bei einem pH-Wert von 4,6, während Hydroxylapatit bereits bei einem pH-Wert von 5,5 demineralisiert. Bei Anwesenheit von ausreichend Fluorid kann bei einem pH-Wert von 4,6 bereits eine Remineralisation stattfinden. Die Phase der Demineralisation (rote Fläche) bleibt insgesamt geringer [nach (Zimmer et al., 2000)]

Bei Fluoridkonzentrationen ab 1 ppm im Speichel oder in der Plaque beginnt die Hemmung der Demineralisation (Kaiser et al., 2006). Bei Fluoridkonzentrationen über 5 ppm fällt der Kalzium-Output signifikant ab. Dieser korreliert mit der Menge an gelöstem Schmelz, sodass es zu einer deutlichen Demineralisationshemmung kommt (Fischer et al., 1995). Durch das andauernde Vorhandensein von 10 ppm Fluorid kann ein Mineralverlust selbst bei Vorliegen eines pH-Wertes von 4,0 fast komplett gehemmt

werden (ten Cate und Duijsters, 1983). Daher empfiehlt die Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK) die regelmäßige lokale Applikation von Fluoriden (Gülzow et al., 2002). Die tägliche Fluoridierung durch den Einsatz von fluoridhaltigen Zahnpasten ist die am häufigsten angewandte und einfachste Methode der lokalen Fluoridapplikation (Bratthall et al., 1996; Rølla et al., 1991; Volpe, 1983). Je nach dem gewünschten Ziel der Anwendung ist Fluorid in unterschiedlich hohen Dosierungen in Zahnpasten, Spüllösungen, Gelees, Polierpasten, Touchierlösungen und Lacken erhältlich.

2.2.2 Wirkungsweise von Fluoriden

Neben diesen kariesprotektiven Eigenschaften ist Fluorid aber auch in der Lage, so genannte *white spots* zu remineralisieren. Durch die porösere Struktur des demineralisierten Schmelzes kommt es zu einer Vergrößerung der Oberfläche und damit auch zur Vergrößerung der Kontaktfläche, die der Penetration des Fluorids zur Verfügung steht. Die Bildung des labilen Fluoridreservoirs ist auf demineralisiertem Zahnschmelz ebenfalls stärker ausgeprägt. Zusätzlich ändert Fluorid die Oberflächenenergie des Schmelzes derart, dass die Adhäsion der Bakterien durch physikochemische Vorgänge reduziert ist (Streckfuss et al., 1980). Das wiederum unterstreicht, wie viel wichtiger das Vorhandensein von freiem Fluorid in der Umgebung der Zähne im Vergleich zu dem höheren Fluoridgehalt im Schmelzkristall ist.

Ähnlich verhält es sich mit der kariesprotektiven Wirkweise von Fluoriden im Dentin. Das menschliche Dentin besteht aus einem System röhrenförmiger Kanäle (Tubuli) mit einem Durchmesser von etwa 1 µm (Abb. 2-2-2a). Bei der Behandlung mit fluoridhaltigen Präparaten kommt es zur Reaktion zwischen den Hydroxylapatit-Kristallen des Dentins und dem Fluorid der Produkte (Cismak et al., 2001). Wie bereits unter 2.2.1 beschrieben, bilden sich kugelförmige Präzipitate, die je nach Behandlungsbedingungen in ihrer Größe und Schichtstärke variieren. Sie dringen in die Tubuli ein und verschließen die Tubulusöffnungen (Abb. 2-2-2b, Abb. 2-2-2c).

Diese Niederschläge bestehen zu etwa 50% aus Fluorid und enthalten zudem Kalzium und Spuren von Phosphat. Bei einem kariogenem Angriff werden geringe Mengen des Fluorids aus den fluoridhaltigen Globuli gelöst und sorgen so für niedrige, aber

ausreichend hohe Fluoridkonzentrationen auf der Dentinoberfläche, um den Zahn vor Karies zu schützen (Cismak et al., 2001).

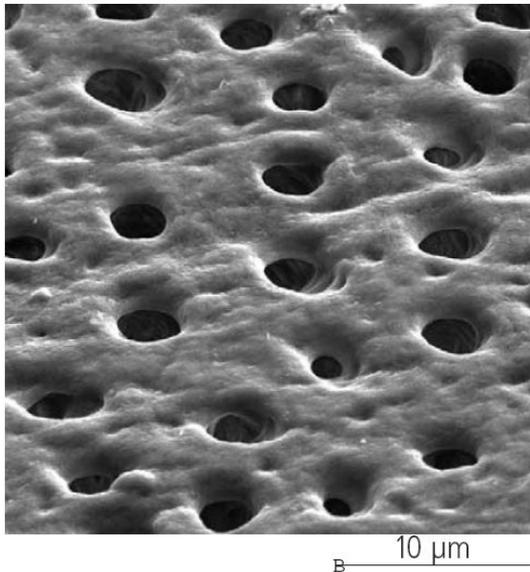


Abbildung 2-2-2a:
Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme der Dentinoberfläche, dargestellt sind die Eingänge der Dentintubuli [nach (Cismak et al., 2001)]

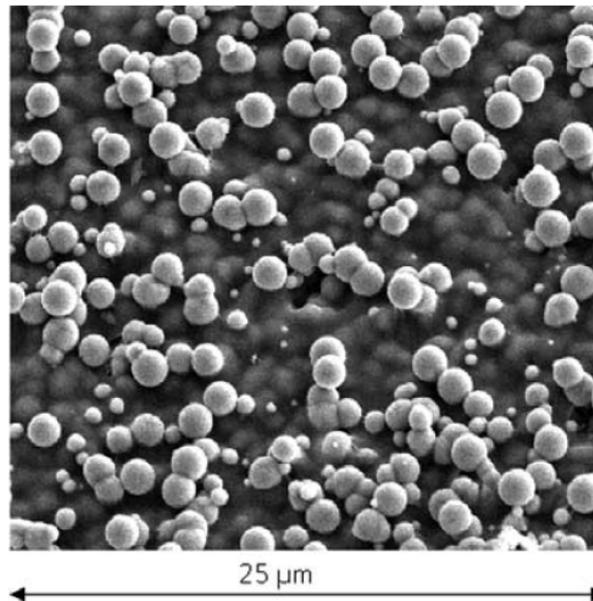


Abbildung 2-2-2b:
REM-Darstellung einer fluoridbehandelten Dentin-oberfläche mit Verschluss der Tubuli durch die fluoridhaltigen Globuli [nach (Cismak et al., 2001)]

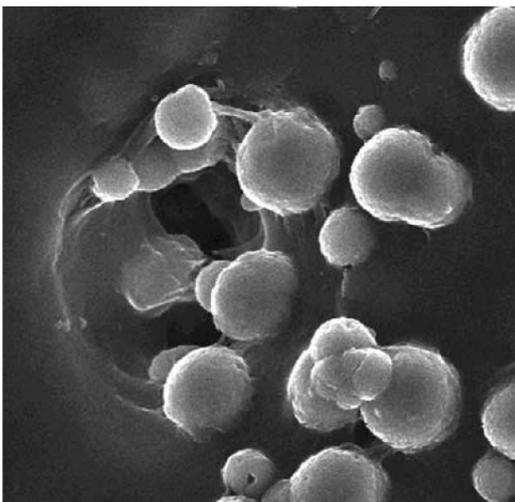


Abbildung 2-2-2c:
REM-Aufnahme einer Tubulusöffnung mit Einlagerung und Verengung durch die Globuli nach Fluoridbehandlung [nach (Cismak et al., 2001)]

Fluoride können sich nicht nur in der Zahnhartsubstanz und im Speichel, sondern auch in der Plaque anreichern. Dort beeinflussen sie die Adhärenz, das Wachstum und den Stoffwechsel der Plaquebakterien. Für *Streptococcus mutans* konnte gezeigt werden, dass Fluorid in Form von Flusssäure über passive Diffusionsvorgänge in das Bakterium eindringt und dort zu Übersäuerung führt. Dies wiederum setzt verschiedene Enzyme außer Kraft, die für die Energiegewinnung des Bakteriums und für die Bildung von Lactat verantwortlich sind (Steinke et al., 1983). Klinisch scheint diese Wirkung jedoch vernachlässigbar gering zu sein, da handelsübliche Fluoridierungsmittel in vivo offenbar keine plaquehemmende Wirkung besitzen. Dafür sind nach Einschätzungen von *van Loveren* eher die metallischen oder organischen Kationen, wie beispielsweise Zinn- oder Aminverbindungen, verantwortlich (van Loveren, 2001). Diese wirken antibakteriell, während die am häufigsten genutzten Verbindungen Natriumfluorid und Natrium-Mono-Fluorphosphat nicht über diese Eigenschaft verfügen. Natriumfluoride wirken sogar in hohen Konzentrationen nur bakteriostatisch, während Aminfluoride bereits in niedrigeren Konzentrationen bakterizide Eigenschaften besitzen, da die aliphatischen Amine die Zellwand der Bakterien schädigen (Gehring, 1983). Die Wirkungen der Fluoride und der Aminkomponente summieren sich, wodurch die Energiegewinnung von *S. mutans* noch effektiver gehemmt wird (Steinke et al., 1983).

2.2.3 Toxizität

Die therapeutische Breite für Fluorid ist mit einem Faktor von etwa 100 sehr hoch im Vergleich zu anderen Stoffen, wie z. B. Kochsalz, das eine therapeutische Breite von nur 20 besitzt. *Smith* et al. berichteten 1960 zum ersten Mal von der sicheren toxischen Fluoriddosis (CTD = certainly toxic dose) mit 32 – 64 mg Fluorid pro kg Körpergewicht (Smith et al., 1960), was einer Menge von 5 – 10 g Natriumfluorid für eine 70 kg schwere Person entspricht. Viel bedeutsamer ist jedoch die Angabe der wahrscheinlich toxischen Dosis (PTD = probably toxic dose) mit 5 mg pro kg Körpergewicht, bei der mit toxischen Erscheinungen gerechnet werden muss. Bei sachgerechter Anwendung der fluoridhaltigen Prophylaxepreparate wird diese Dosis nicht erreicht. Viel wahrscheinlicher ist die Entwicklung einer Dentalfluorose bei einer länger andauernden systemischen Überdosierung. Diese entsteht während der frühen Schmelzbildung und

Schmelzreifung (Zimmer et al., 2003). Vom so genannten *Mottling* kann aber auch das Dentin betroffen sein.

Thylstrup und *Fejerskov* unterscheiden zehn Schweregrade der Dentalfluorose (Thylstrup und Fejerskov, 1978). Bei den milden Erscheinungsformen handelt es sich um ein rein ästhetisches Problem, welches sich als weiße, unregelmäßig mineralisierte Flecken auf der Schmelzoberfläche darstellt. Diese Bereiche sind weniger kariesanfällig. Bei stärkerer Ausprägung der Fluorose, die nur in Gebieten mit hohem Fluoridgehalt im Trinkwasser beobachtet wird, kann man das Auftreten von opaken und braunen Flecken bis hin zu Hypoplasien feststellen. Die Zähne sind dann weniger abrasionsfest. Eine Knochenfluorose kann durch den Gebrauch von Oralprophylaktika nicht entstehen. Erst bei einer täglichen Aufnahme von 10 mg Fluorid, z. B. in Gebieten mit extrem hohem Fluoridgehalt im Trinkwasser, über einen Zeitraum von mindestens zehn Jahren können Zeichen einer skelettalen Fluorose auftreten (Whitford, 1996).

Es lässt sich nur schwer ein Grenzwert für das Entstehen einer Dentalfluorose festlegen. Die tatsächlich aufgenommene Fluoridmenge jedes einzelnen Patienten zu bestimmen, ist unmöglich. Die Empfehlungen der Fachgesellschaften gehen daher einen Kompromiss ein, der eine effektive Kariesprophylaxe darstellt, jedoch nicht das Risiko einer leichten Dentalfluorose als rein kosmetisches Problem ausschließen kann (Gülzow et al., 2002; Zimmer et al., 2003). In Deutschland tritt Mottling aufgrund des allgemein niedrigen Fluoridgehaltes im Trinkwasser selten auf. Nach Abwägung von Risiken und Nutzen der Fluoridanwendung empfiehlt sich der in Abbildung 2-2-3 dargestellte Fluoridfahrplan.

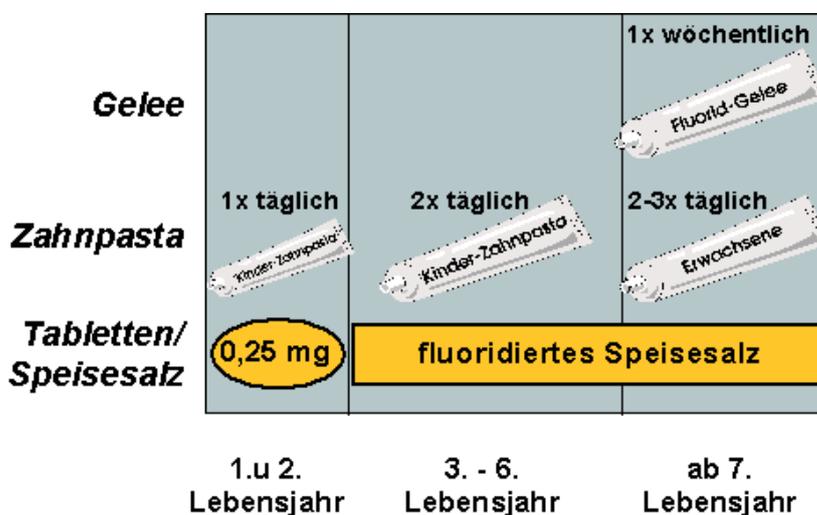


Abbildung 2-2-3: Fluoridfahrplan [nach (Zimmer et al., 2000)]

2.3 Dentin

2.3.1 Aufbau

Das Dentin macht den größten Anteil des menschlichen Zahnes aus und ist im Gegensatz zum Schmelz ein weniger stark mineralisiertes, vitales Gewebe. Die Vitalität des Dentins äußert sich in der Fähigkeit der Schmerzwahrnehmung und der funktionellen Anpassung durch die Odontoblasten (Schroeder, 1992). Nach Schroeder ähnelt Dentin in seiner chemischen Zusammensetzung sehr dem Knochen und dem Wurzelzement. Es besteht zu 45 Vol.-% aus mineralisierter Hartschubstanz, zu 30 Vol.-% aus organischer Matrix und zu 25 Vol.-% aus Wasser (Schroeder, 1992). Die organische Matrix setzt sich zu über 90% aus Kollagen zusammen. Der Mineralanteil enthält vorwiegend Phosphat und Kalzium in Form von Hydroxylapatitkristallen. Anders als beim Schmelz liegen diese Kristalle ungeordnet vor und sind zufällig in der organischen Matrix des Dentins verteilt.

Die Kristalle sind etwa 60 – 70 nm lang, 3 – 4 nm breit und haben einen Durchmesser von 20 – 35 nm und sind somit kleiner als Schmelzkristallite. Im peritubulären Dentin, welches die Dentinkanäle mit den darin enthaltenen Odontoblastenfortsätzen umgibt, erscheinen die hexagonal geformten Hydroxylapatitkristalle als kleinste Plättchen. Aufgrund seiner Struktur ist Dentin härter als Knochen, jedoch trotz allem sehr elastisch und permeabel (Schroeder, 1992). Die hohe Permeabilität ist auf die Dentinkanäle zurückzuführen, in denen die Odontoblastenfortsätze verlaufen. Je nach Lokalisation und Alter des Zahnes variieren der Durchmesser und die Dichte der Dentinkanäle. Die Dichte der Kanäle pro mm² ist in Abbildung 2-3-1 dargestellt. Pulpennah beträgt der Durchmesser zwischen 3 – 5 µm, pulpenfern etwa 1 µm. Die Dentinkanälchen besitzen dabei einen s-förmigen Verlauf im Kronendentin, während sie im Wurzelndentin eher gerade verlaufen. Die Odontoblastenfortsätze füllen die Dentinkanälchen jedoch nicht vollständig aus, sodass im so genannten *periodontoblastischen Raum* zwischen Kanalwand und Zellmembran Gewebsflüssigkeit und organische Strukturelemente vorkommen, die das Dentin physiologisch unterhalten. Da die Odontoblasten lebenslang in der Lage sind, peritubuläres Dentin zu sezernieren, können die Tubuli vollständig mit mineralisiertem Material obliteriert sein (Schroeder, 1992).

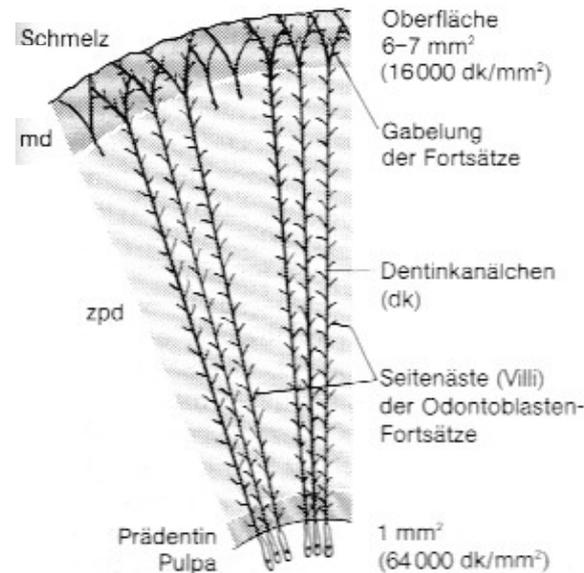


Abb. 2-3-1: Dargestellt sind die Odontoblastenfortsätze mit ihren Seitenästen im Manteldentin (md) und im zirkumpulpalen Dentin (zpd) sowie die Dichte der Dentinkanäle (dk) an der Schmelz-Dentin-Grenze und nahe der Pulpa pro mm². [nach (Schroeder, 1992)]

Das intertubuläre Dentin trennt die Dentinkanäle voneinander. Es ist weniger dicht mineralisiert, enthält zu 50% kollagene Fasern und repräsentiert den größten Teil des Dentins.

2.3.2 Dentinkaries

Schon bevor sich im Schmelz eine Kavität gebildet hat, reagiert die Dentin-Pulpa-Einheit auf den kariösen Reiz. Durch die Schmelzläsion diffundieren bakterielle Toxine und Enzyme in das Dentin. An der Pulpa-Dentin-Grenze entsteht daraufhin *Tertiärdentin*, um den Abstand zwischen der Pulpa und dem kariösen Geschehen zu vergrößern und so die Pulpa zu schützen. Je nach Progressionstempo der Karies bilden sich im Dentin bestimmte histologische Zonen. Von zentral nach peripher sind dies: die Zone normalen Dentins, die *Zone der Sklerose*, die „dead tracts“ und an der Schmelz-Dentin-Grenze die *Demineralisationszone* (Abbildung 2-3-2a). Die Zone der Sklerose kommt durch Ausfällung von Kalzium-Phosphat-Salzen zustande, sodass die Kanäle vollständig obliteriert sind. Sklerotisches Dentin ist somit stärker mineralisiert und härter. Es dient dazu, die Diffusion von Säuren, Toxinen und proteolytischen Enzymen sowie

die Invasion von Bakterien aufzuhalten. Die „dead tracts“ stellen Bereiche dar, in denen die Odontoblastenfortsätze zerstört sind (Klimek und Hellwig, 1999).

Die Dentinkaries breitet sich unterminierend entlang der Schmelz-Dentin-Grenze aus und folgt dann den Dentintubuli in Richtung Pulpa. Sie schreitet wesentlich schneller voran als im Schmelz, da der kritische pH-Wert höher ist und die Struktur des Dentins viel poröser. Sobald es zur Kavitätenbildung im Schmelz gekommen ist, dringen Mikroorganismen in die Dentintubuli ein (Abbildung 2-3-2 b).

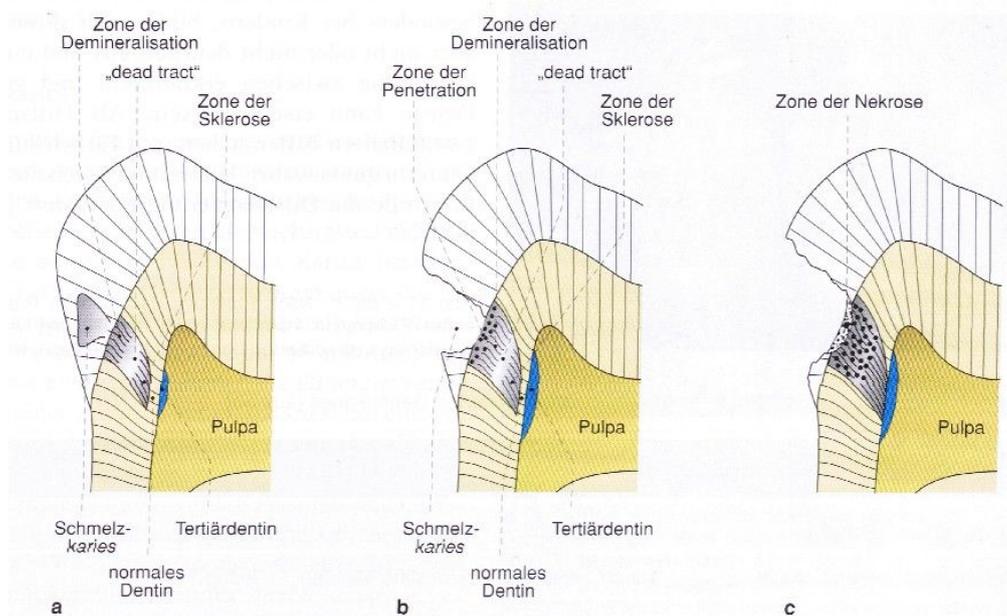


Abbildung 2-3-2 Kariesprogression im Dentin nach [(Klimek und Hellwig, 1999)]

Im fortgeschrittenen Stadium ist das Dentin zerfallen und verflüssigt. Man spricht nun von der *Zone der Nekrose* (Abbildung 2-3-2 c).

Klinisch unterscheidet man lediglich zwei Zonen, den reversibel vom irreversibel demineralisierten Bereich. Das irreversibel geschädigte Gebiet entspricht den Zonen der Penetration/Nekrose und der Demineralisation. Hier ist die organische Matrix durch proteolytische Enzyme der invadierten Bakterien zerstört. Dieser Bereich muss vollständig entfernt werden, während man das reversibel geschädigte Dentin mit der Zone der Sklerosierung und der Tertiärdentinbildung belässt.

Die Ausdehnung der Dentinkaries stellt sich klinisch und histologisch stets größer dar, als es das Röntgenbild vermuten lässt.

2.3.3 Probleme der Dentinadhäsion

Im Gegensatz zu schmelzbegrenzten Kavitäten, bei denen durch die Säure-Ätz-Technik ein fester Verbund zwischen Komposit und Schmelz hergestellt werden kann, ist die Haftung im Dentin komplizierter und problembehafteter. Dies ist auf die chemische und strukturelle Zusammensetzung des Dentins zurückzuführen (Swift et al., 1995). Dennoch konnten durch die Entwicklung neuer Generationen von Dentinhaftvermittlern zunehmend die Eigenschaften verbessert und die Indikation für adhäsive Restaurationen erweitert werden. Die Haftung zwischen Komposit und Dentin beruht im Wesentlichen auf drei Mechanismen, die zusammen eine mikromechanische Verankerung etablieren: Zottenbildung, Verklettung und Verzahnung. Deren Entstehung und klinische Bedeutung wird in Kapitel 2.3.4 genauer erläutert. Chemische Bindungen, wie beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen, van der Waals Kräfte oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen spielen klinisch bei der Dentinadhäsion nur eine untergeordnete Rolle.

Heutzutage unterscheidet man zwei grundlegende Verfahren, um einen Verbund zwischen dem hydrophilen Dentin und dem hydrophoben Komposit herzustellen. Das sind zum einen *Etch-and-Rinse-Adhäsivsysteme* und zum anderen *selbstkonditionierende Adhäsive* (Lopes et al., 2002). Ohne die Verwendung dieser Adhäsivsysteme kann kein adäquater Verbund hergestellt werden, was die Ausbildung von Randspalten und Sekundärkaries zur Folge hat (Blunck, 2005).

Das Hauptproblem bei der Dentinadhäsion stellt die hydrophile Oberfläche des Dentins dar, da das Kollagenetzwerk etwa 25 Vol.-% Wasser enthält (Schroeder, 1992). Zusätzlich kommt es durch die Eröffnung der Dentintubuli nach Präparation und Ätzung zu einem Liquorausstrom. Dieses Problem wird durch die Verwendung eines hydrophilen, kurzkettigen Primers gelöst. Er ist in der Lage, in das feuchte Kollagenetzwerk zu infiltrieren, erhöht dort die Oberflächenenergie und führt so zu einer besseren Benetzbarkeit. Aufgrund seines amphiphilen Charakters ist es nun möglich, den hydrophoben Bonder aufzutragen, der ebenfalls in das freigelegte Kollagenetzwerk eindringt, sich mit dem Primer zur Hybridschicht vermischt und dort über mikromechanische Verankerung als Bindeglied zwischen Dentin und hydrophobem Komposit dient (Blunck, 2005).

Das zweite entscheidende Problem entsteht bei der Verwendung rotierender Instrumente. Auf der Oberfläche des Dentins bildet sich eine 1 – 5 µm dicke

Schmierschicht, der so genannte *smear layer*, der aus zerstörten Odontoblastenfortsätzen, Dentinliquor, Bakterien, Kollagen- und Hydroxylapatitkristalltrümmern besteht. Dieser verschließt die eröffneten Tubuli und verhindert so den Kontakt des Komposits zum kompakten Dentin (Kakaboura, 1989). Zudem kann der *smear layer* Bakterien enthalten, die überleben, sich vermehren und zur Entstehung eines Kariesrezidivs führen (Swift et al., 1995).

Die Verwendung von Etch-and-Rinse-Systemen führt zur Entfernung des *smear layers*, sodass die Tubuli eröffnet sind und die oben geschilderte Anwendung des hydrophilen Primers mit anschließendem Bonding zum Einsatz kommen kann. Bei der Nutzung selbstätzender Systeme werden saure Primer eingesetzt, die sowohl die Zahnhartsubstanzen ätzen als auch gleichzeitig in die konditionierten Oberflächen eindringen können. Obwohl die Schmierschicht dabei nicht entfernt wird, lösen die sauren Primer diese an und dringen bis zum kompakten Dentin vor. Analog führen sie hier zu einer Demineralisation des Dentins mit der Folge der mikromechanischen Verankerung (Blunck, 2005).

2.3.4 Mikromechanische Verankerung

2.3.4.1 Zottenbildung

Durch die Anwendung von Säuren wird der *smear layer* von der Oberfläche des Dentins entfernt und v. a. das stärker mineralisierte peritubuläre Dentin demineralisiert. Dadurch werden die Tubuluseingänge eröffnet und um etwa 3 µm erweitert, sodass der Primer in sie eindringen kann (Pashley et al., 1993). Vermischt sich nun der Primer mit den Monomeren des Adhäsivs bilden sich schlauchförmige Kunststoff-*Tags* oder *Zotten*, die bis zu 50 µm in die Dentinkanäle hineinreichen und über Seitenäste die Haftung verbessern. Trotzdem tragen sie mit nur 6 MPa wenig zur Dentinhaftung bei (Prati et al., 1990). Grund dafür sind die Polymerisationsschrumpfung, die zu einer reduzierten Wandständigkeit führt, die unvollständige Polymerisation beim Kontakt des Adhäsivs mit der Liquorflüssigkeit und eine zum Teil löchrige Struktur der Zotten als Folge einer Durchmischung von Liquor und Monomeren (Pashley und Pashley, 1991; Prati et al., 1990).

2.3.4.2 Verzahnung

Die Wand der Dentintubuli wird von dem stärker mineralisierten peritubulären Dentin gebildet. Die intertubuläre Substanz ist weniger stark mineralisiert, dafür enthält sie mehr Kollagen (Schroeder, 1992). Bei der Behandlung mit sauren Agenzien ergibt sich daraus eine unterschiedlich starke Demineralisation mit verschiedenen großen Hohlräumen, die intertubulär etwa 0,05 – 0,1 µm und peritubulär etwa 1 – 3 µm betragen. Kommt es nun zum Ausfließen dieser retentiven Räume entsteht eine Verzahnung mit dem Dentin analog der Kunststoff-Schmelz-Verbindung. Diesem Mechanismus kommt die größte Bedeutung im Dentinverbund zu (Pashley, 1992a).

2.3.4.3 Verklettung

Die verschiedenen Verfahren der Dentinkonditionierung mit Säuren oder sauren Primern führen zu einer unterschiedlichen Freilegung der Dentinoberfläche. Nach Verwendung eines Primers, der das Kollagennetzwerk durchdringt und die Oberflächenenergie und damit die Benetzbarkeit des Dentins erhöht, kann das Adhäsiv in das Kollagennetzwerk penetrieren. Es bildet sich die *Hybridschicht*, die nach Lichtpolymerisation ein stabiles Geflecht mit den Kollagenfasern bildet. In dieses Polymernetz sind zudem nicht herausgelöste Hydroxylapatitkristalle eingebettet. Diese Hybridschicht erreicht je nach Verlauf der Tubuli eine Schichtstärke zwischen 2 – 10 µm und führt so zu einem stabilen Verbund (Nakabayashi et al., 1991).

3. Ziele und Fragestellung

Die Hauptursache für den Ersatz von Füllungen ist das Entstehen von Sekundärkaries im Randbereich von Füllungen und entlang von Randspalten (Kidd et al., 1992; Manhart, 2003; Mjör und Gordan, 2002). Dieses Problem tritt vor allem bei Kompositfüllungen auf, die im Dentin durch eine schlechtere Haftung gekennzeichnet sind (Swift et al., 1995). Auch überkronte Zähne weisen häufig eine am Füllungsrand beginnende, in die Tiefe fortschreitende Dentinkaries auf. Leider gibt es im Vergleich zum Schmelz nur wenig Forschung auf dem Gebiet der Dentinkaries bzw. über das Wirken von präventiven Ansätzen im Dentin (ten Cate et al., 1998), beispielsweise der Applikation von Fluorid.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Produkt zu testen, das durch eine so genannte Tiefenfluoridierung die Zähne vor Sekundärkaries schützen soll. Diese Art des Schutzes verspricht das Produkt *Dentin-Versiegelungsliquid* (DVL, Humanchemie GmbH, Alfeld/Leine, Deutschland), welches aus 2 Touchierlösungen besteht, die nacheinander in die unbehandelte Kavität appliziert werden. Dabei wird das kariesfreie Dentin relativ trocken gelegt und anschließend mit der ersten Flüssigkeit touchiert, die v. a. aus Magnesiumfluorosilikat und Kupfer(II)-Fluorosilikat in hoher Konzentration besteht und in die Poren der Zahnhartsubstanz eindringt. Nach einer Einwirkzeit von 30 s erfolgt eine weitere Touchierung mit der zugehörigen Calciumhydroxid-hochdispers-Suspension. Sie reagiert mit dem Fluorosilikat-Komplex der ersten Lösung unter Bildung von extrem kleinen Calciumfluorid-, Magnesiumfluorid- und wenigen Kupferhydroxyfluoridkristallen sowie Kieselsäure-Gel. Durch die hohe Konzentration von Fluoriden, die in der Tiefe der Zahnhartsubstanz in das Kieselsäure-Gel eingebettet sind, soll eine hohe Remineralisation der Zahnhartsubstanz erreicht und damit die Bildung von Karies verhindert werden. Zusätzlich sollen die geringen Kupferkonzentrationen im DVL einen bakteriziden Schutz gegen Anaerobier im Dentin bewirken (Knappwost und Knauer, 1999).

Nach der Applikation der Touchierlösungen erfolgte der Verschluss der Kavität mit einem Komposit und dem dazugehörigen Bondingsystem.

Für die vorliegende Arbeit ergaben sich daraus folgende konkrete Fragestellungen, denen in einem In-vitro-Kariesmodell nachgegangen werden sollte. Mit diesem Modell ist es möglich, einen kariogenen Biofilm zu züchten, der die Entwicklung von Initialläsionen an Schmelz und Dentin erlaubt.

- (1) Wird durch die Anwendung des Produktes *Dentin-Versiegelungsliquid* (Humanchemie GmbH, Alfeld/Leine, Deutschland) die Sekundärkariesentstehung an dentinbegrenzten Kompositfüllungen gehemmt?

Arbeitshypothese: Das Fluoridprodukt *Dentin-Versiegelungsliquid* inhibiert die Entstehung von Karies am Füllungsrand.

- (2) Ist die Haftung des Komposits am Dentin durch das Fluoridprodukt *Dentin-Versiegelungsliquid* verschlechtert, sodass sich tiefere Randspalten bilden?

Arbeitshypothese: Die Anwendung des *Dentin-Versiegelungsliquids* führt zu tieferen Randspalten im Dentin. Fluorid verschlechtert die Haftung des Komposits am Dentin.

4. Material und Methode

4.1 Auswahl und Herstellung der Proben

Das Probenmaterial muss durch eine möglichst gleiche Beschaffenheit gekennzeichnet sein. Die Zähne sollten daher weder plaque- noch kariesbefallen sein, sie sollten nicht durch mechanische Einflüsse beschädigt oder in größerem Ausmaß mit fluoridhaltigen Verbindungen in Kontakt gekommen sein. Als Probenkörper dienten daher menschliche retinierte dritte Molaren, die den oben aufgeführten Anforderungen entsprachen.

Die Zähne wurden nach der operativen Entfernung in 0,1%iger Thymollösung aufbewahrt und anschließend von anhaftenden Geweberesten mit Hilfe von Scalern und Gracey-Küretten gesäubert. Daraufhin wurden die Wurzeln der Zähne 1 mm unterhalb der Schmelz-Zement-Grenze (SZG) mit einer Innenlochsäge (Leica Typ 1600, Leitz, Wetzlar) abgetrennt und die Höcker okklusal soweit abgetragen, bis das Dentin nicht mehr von Schmelz bedeckt war. Anschließend wurden die Zähne in oro-vestibulärer Richtung vertikal halbiert. Durch dieses Vorgehen konnte die Ausdehnung des Pulpenkavums und somit die Schichtstärke des Dentins am Kavitätenboden bestimmt und kontrolliert werden (Abb. 4-1, b).

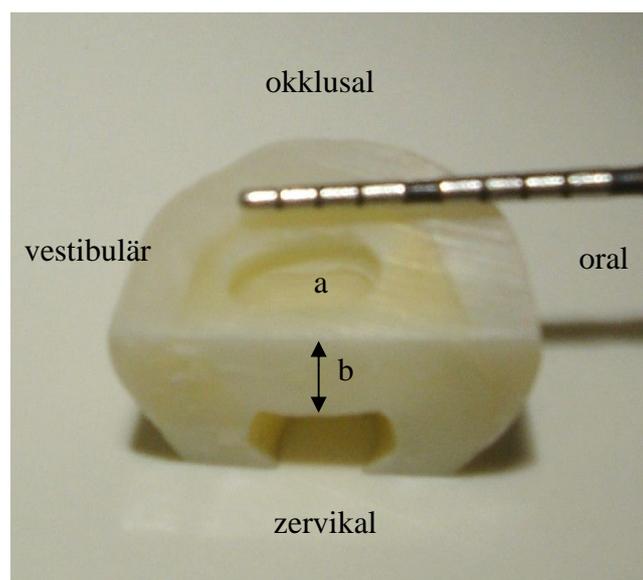


Abb. 4-1: Probenzahn mit Standardkavität (a)
b = Abstand zwischen Pulpenkavum und Kavitätenboden

Anschließend wurde eine etwa 2 mm x 3 mm x 1,5 mm (B x L x T) große, allseitig vom Dentin umgebene Kavität mit einem walzenförmigen Präparierdiamanten mittlerer Körnung (80 µm, Nr. 836 KR 012, Komet) und einem Schnellläufer unter ständiger Wasserkühlung präpariert. Mit einem Tasterzirkel wurde kontrolliert, dass an jeder Stelle des Kavitätenbodens sowie zirkulär um die Kavität eine Mindestschichtstärke des Dentins von 1 mm gegeben war. Die Lagerung der Zähne in Leitungswasser (0,1 mg/l Fluorid) verhinderte ein Austrocknen der Zahnhartsubstanzen zwischen jedem Arbeitsschritt.

Die Kavitäten wurden randomisiert und in 4 Gruppen zu je 30 Proben aufgeteilt.

4.1.1 Methodik

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
1.	Präparation	Präparation	Präparation	Präparation
2.		Touchierung		Touchierung
3.			Adhäsivsystem	Adhäsivsystem
4.	Füllung	Füllung	Füllung	Füllung
5.	Lichthärtung	Lichthärtung	Lichthärtung	Lichthärtung
6.	Thermocycling	Thermocycling	Thermocycling	Thermocycling

Die Kavitäten der Gruppe A wurden ausschließlich mit dem Hybridkomposit Z100 (3M Espe, Seefeld) gefüllt, um einen insuffizienten Komposit-Dentin-Verbund mit den Folgen einer verstärkten Randspaltbildung zu simulieren. Das Dentin der Gruppe B wurde ebenfalls nicht konditioniert, es wurde lediglich das DVL (Humanchemie GmbH, Alfeld/Leine) vor dem Komposit (Z100) appliziert. So konnte die Wirksamkeit des Produktes selbst bei verstärktem Randspalt getestet werden.

Bei den Gruppen C und D wurde das Adhäsivsystem Optibond FL (Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) nach Ätzung mit 37%iger Phosphorsäure (Total Etch, Ivoclar-

Vivadent, Schaan, Liechtenstein) angewendet. Das DVL wurde zusätzlich in Gruppe C vor der Dentinkonditionierung appliziert, um auch unter optimalen Bedingungen die Wirksamkeit des Produktes testen zu können.

Die Touchierung erfolgte mit dem *Dentin-Versiegelungsliquid* (Humanchemie GmbH, Alfeld/ Leine, Deutschland). Das DVL setzt sich aus zwei hintereinander zu applizierenden Lösungen zusammen. Zunächst wurde die Kavität mit der fluoridhaltigen ersten Lösung (Touchierlösung, pH 2, 43.500 ppm F⁻ als Magnesiumfluorosilikat, NaF und Kupfersulfat) für 30 s mit einem Applicator Tip (Dentsply, DeTrey GmbH, Konstanz, Deutschland) touchiert. Unmittelbar darauf erfolgte die Applikation der zweiten Lösung, einer fluoridfreien, Ca(OH)₂-haltigen Komponente (Nachtouchierlösung, pH 14, 9,6 Gew.-% Ca(OH)₂). Auch diese wurde für 30 s in das Dentin einmassiert. Der Überschuss wurde anschließend verblasen.

Als Verbundsystem für die Gruppen C und D kam Optibond FL (Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) zum Einsatz. Die Kavitäten der Gruppe D wurden gemäß den Herstellerangaben zunächst mit der Doppeltouchierung des DVL behandelt, bevor die Ätzung des Dentins mit 37%iger Phosphorsäure für 20 s erfolgte. Danach wurden die Säure und die Präzipitate für 20 s mit Wasser sorgfältig abgesprüht. Nach leichter Trocknung mit einem Luftsprayansatz und Rewetting wurde der Primer für weitere 20 s in das Dentin einmassiert und anschließend der Bonder aufgetragen. Dieser wurde gleichmäßig dünn in der Kavität mit Hilfe eines Luftsprayansatzes verteilt und für 40 s mit einer Polymerisationslampe gehärtet.

Als Füllungsmaterial kam in allen 4 Gruppen das Hybridkomposit Z100 (3M Espe, Seefeld, Deutschland) zur Anwendung. Die Applikation erfolgte in einem Schritt ohne Inkrementtechnik. Das Komposit wurde für 40 s auspolymerisiert und danach mit Hilfe von Sof-Lex-Scheiben zunächst mit mittlerer, dann feiner und als letztes sehr feiner Körnung (3M Espe, Seefeld, Deutschland) geglättet.

Um die Proben auf dem Probenrad des Kariesmodells montieren zu können, wurde eine handelsübliche Angelsehne mit einem Durchmesser von etwa 1,2 mm in etwa 1 cm lange Stücke geteilt. Die Angelsehne wurde im Pulpenkavum der Proben mit dem dünnfließendem Feinsthybridkomposit Tetric Flow (Ivoclar Vivadent AG, Schaan,

Liechtenstein) befestigt, sodass die Kavitätenfläche parallel zur Oberfläche des Probenrades ausgerichtet war. Diese Positionierung sollte beim späteren Betrieb des Kariesmodells dafür sorgen, dass eine gleichmäßige Benetzung durch die herabtropfenden Medien stattfindet.

Um die übrigen Zahnoberflächen vor Karies zu schützen, wurden diese mit einem säurefesten Lack (Dyract-Lack, Dentsply DeTrey, Konstanz, Deutschland) versiegelt.

4.1.2 Thermocycling

Die Proben wurden einer Temperaturwechselbelastung (2000 Zyklen, 5 °C und 55 °C, 30 s Tauchzeit) unterzogen, um eine künstliche Alterung zu provozieren und somit die Entstehung von Randspalten zu forcieren. Nach dem Thermocycling lagerten die Proben bis zum darauffolgenden Arbeitsschritt in Leitungswasser (0,1 mg/l Fluorid), um eine Austrocknung zu vermeiden. Die Zeitspanne betrug dabei nicht länger als 72 Stunden.

4.1.3 Sterilisation der Proben

Vor der Inkubation in der künstlichen Mundhöhle wurden die Proben bei 55 °C mit Ethylenoxid gassterilisiert. Die Zähne lagerten dabei in einer mit feuchtem Schaumstoff beschickten Tupperware-Dose, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Dose wurde mit geöffnetem Deckel in Sterilisationsfolie eingeschweißt. Nach erfolgter Sterilisation konnte der Deckel innerhalb der Folie geschlossen und die Proben so in den Isolator eingeschleust werden (Seemann et al., 2005a).

4.2 Aufbau des In-vitro-Kariesmodells

Das In-vitro-Kariesmodell (Abb. 4-2a; Abb. 4-2b) besteht im Wesentlichen aus einer Reaktionskammer, in dem sich die Zahnproben zur Kultivierung eines Biofilms befinden, einem Isolator, der das Reaktionsgefäß bakterien dicht von der Außenwelt isoliert, diversen Schlauchpumpen und einem Heizröhrensystem.

Über die Hauptschleuse mit einem Durchmesser von 43,5 cm wurden alle benötigten Materialien, in Sterilisationsfolien eingeschweißt und materialgerecht sterilisiert, in den Isolator (Modell 90, Metall und Plastik, Randolphzell, Deutschland) eingebracht werden, bevor dieser bakterien dicht verschlossen und sein Innenraum durch 20-minütiges Einwirken einer 5%igen Peroxyessigsäure sterilisiert wurde. Erst danach erfolgte der endgültige Aufbau der Apparatur im Inneren des Isolators über die Handschuheingriffe.

Die zur Inkubation notwendigen Flüssigkeiten und Keime konnten den Isolator während des Versuches durch ein Interface passieren (Nebenschleuse, \varnothing 9 cm), das in die Außenhaut des Isolators eingelassen war. Dadurch war es möglich, ein kontrolliert kontaminiertes Milieu zu schaffen, das die Voraussetzungen zur Kariesentstehung (Wirt, Zeit, Substrat, Bakterien) erfüllt.



Abbildung 4-2a: In-vitro-Kariesmodell

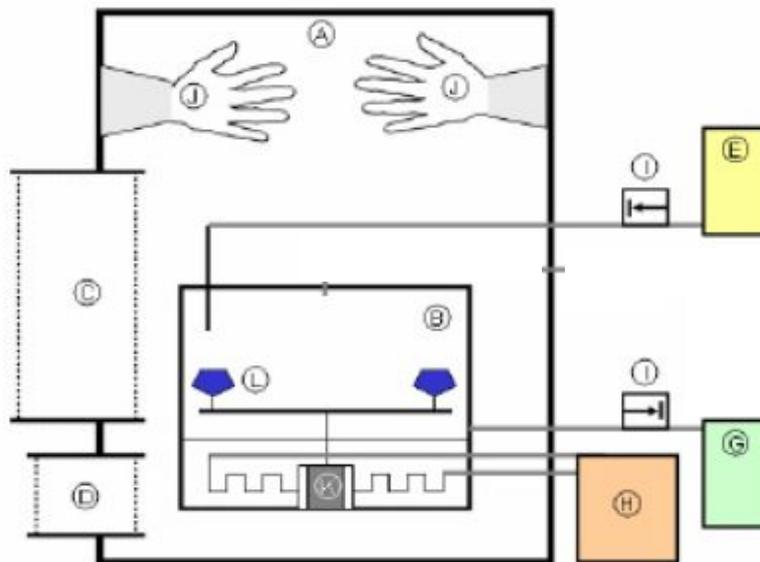


Abbildung 4-2b:

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: A = steriler Bereich innerhalb des Isolators; B = Reaktionskammer; C = Hauptschleuse für den initialen Transfer aller Materialien; D = Nebenschleuse für den Transfer kleinerer Gegenstände während des laufenden Versuches; E = flüssige Medien; G = Abfallcontainer; H = Wasserthermostat und Heizröhrensystem zur Temperierung der Reaktionskammer; I = Schlauchpumpen; J = Handschuheaingriffe für das Arbeiten innerhalb des Isolators; K = Schrittmotor; L = auf Probenrad montierte Zahnproben passieren Tropfspitzen, die alle erforderlichen flüssigen Medien fördern [nach (Seemann et al., 2005a)]

4.2.1 Reaktionskammer



Abb. 4-2-1: Reaktionskammer

Ein transparentes Polymethylmethacrylat-Gefäß, dessen Boden mit Epoxidharz (Wessex Resin and Adhesives Ltd, Romsey, UK) ausgegossen war, bildet die Reaktionskammer (Abbildung 4-2-1). In dem Boden verläuft das wasserführende Heizsystem, das aus einem spiralförmigen Kupferrohr (\varnothing 1,0 cm) besteht. Dieses Kupferrohr wird über ein Umlaufsystem von einem temperierten Wasserbad (Haake B3, Karlsruhe, Deutschland) versorgt, das außerhalb des Isolators steht. So kann eine konstante Inkubationstemperatur von 34 – 35 °C im Reaktionsgefäß erreicht werden. Die Temperatur wird mit einem Quecksilberthermometer gemessen, welches durch eine Bohrung im Deckel in das Innere des Reaktionsgefäßes ragt und dessen Messspitze sich in der Nähe der rotierenden Zahnproben befindet.

Im Inneren des Reaktionsgefäßes treibt ein Schrittmotor (RS 440-436, RS components, Mörfelden Walldorf, Deutschland) das Probenrad (Polyoxymethylen, \varnothing 20 cm) an. Der Motor befindet sich im Deckel der Reaktionskammer und ist über eine Magnetkupplung mit dem Probenrad verbunden.

Die Zahnproben werden in der Mitte des Probenrades platziert. Über eine Steuereinheit außerhalb des Isolators kann die Umdrehungsgeschwindigkeit eingestellt werden. Sie lag während des Versuches bei 2 U/min. Die Zahnproben wurden über Kanülen mit allen nötigen Flüssigkeiten versorgt. Der *Luer*-Verschluss der Kanülen kann in den Kunststoffhalterungen im Deckel des Reaktionsgefäßes befestigt werden.

An der tiefsten Stelle der Reaktionskammer ist ein Abfluss installiert, der die Flüssigkeiten in einen sterilisierten Abfallbehälter außerhalb des Isolators leitet.

Das gesamte Reaktionsgefäß wurde inklusive Motor in eine Sterilisationstüte verpackt und bei 60 °C mit 3%igem Formaldehyd sterilisiert.

4.2.2 Medien

Die Versorgung der Zahnproben erfolgte über die Tropfspitzen mit Tryptikase-Soja-Bouillon (TSB, Becton Dickinson, Sparks, USA), einer 10%igen Saccharose-Lösung und einer Minerallösung in Form künstlichen Speichels.

Alle Medien wurden durch Autoklavieren sterilisiert und in sterile Infusionsflaschen (1l) gefüllt. Jedes Medium wurde über eine eigene Schlauchpumpe (Alitea, Modell XV, Watson Marlow Alitea, Stockholm, Schweden) in sterilen Infusionsschläuchen (Heidelberger Verlängerung 04097408, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) transportiert (Abbildung 4-2-2a). Die Koordination der Pumpen erfolgte über eine Relaisschaltung. Dabei wurden die Proben zu Beginn jeder vollen Stunde mit der Saccharose-Lösung und in einem festgelegten Abstand von je 15 min mit TSB und der Minerallösung versorgt. Den Ablauf steuerte dabei ein eigens entwickeltes Computerprogramm nach dem in Abbildung 4-2-2b dargestellten Schema.



Abbildung 4-2-2a: Medien und ihre Pumpen

Die Tryptikase-Soja-Bouillon, die nach Herstellerangaben zubereitet wurde, ermöglicht das Wachstum der Bakterien und die Bildung eines Biofilms.

Die 10%ige Saccharose-Lösung diente als Substrat für die Bakterien zur Produktion extrazellulärer Polysaccharide und von Lactat.

Durch die Minerallösung konnte der remineralisierende Effekt von Speichel simuliert werden. Zur Herstellung der Minerallösung wurden einem Liter destilliertem Wasser 0,33 g KH_2PO_4 , 0,34 g Na_2HPO_4 , 1,27 g KCl, 0,16 g NaSCN, 0,58 g NaCl, 0,17 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,16 g NH_4Cl , 0,2 g Harnstoff, 0,03 g Glucose, 0,002 g Vitamin C und 2,7 g Muzin (M-1778 Schweinemuzin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) zugesetzt und auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt (Seemann et al., 2005a).

Die Abfallflüssigkeit wurde in einer 15 Liter fassenden Ballonflasche gesammelt, die vor Versuchsbeginn mit 3%igem Formaldehyd bei 60 °C sterilisiert wurde.

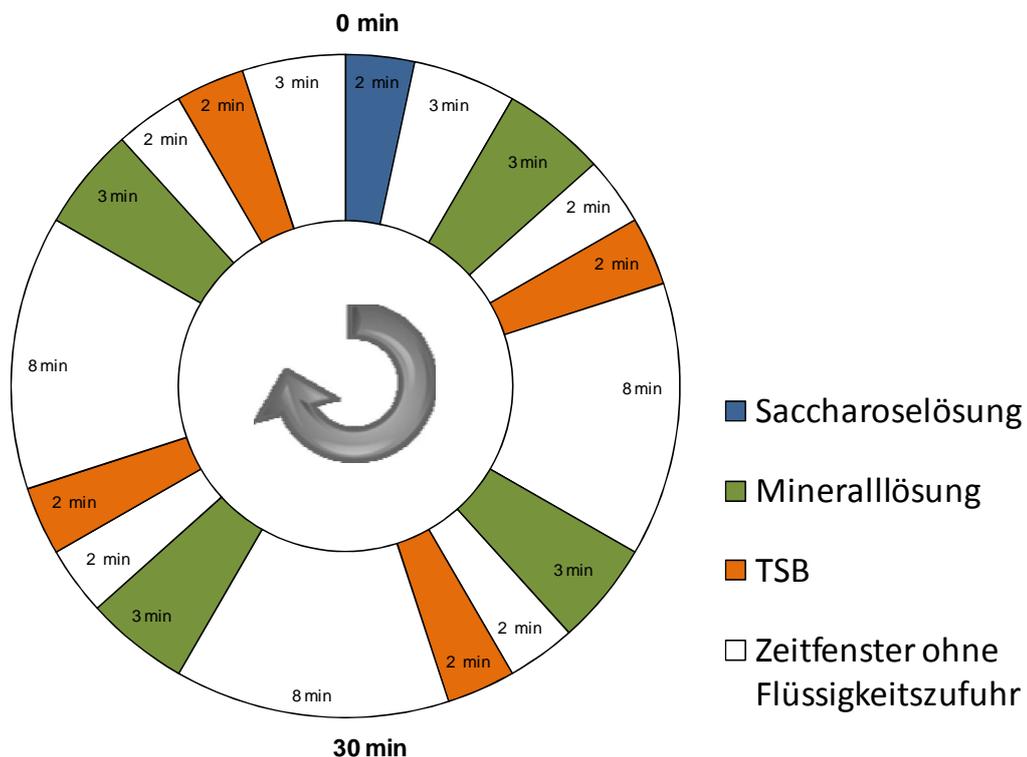


Abbildung 4-2-2b:

Zeitlicher Ablauf der Computer-gesteuerten Schlauchpumpen zur Ausbildung eines Biofilms und kariesähnlicher Läsionen auf den Zahnproben über einen Zeitraum von 18 Tagen. Dargestellt sind 60 Minuten.

4.2.3 Keime

Zur Bildung eines Biofilms wurde ein kariogener Stamm von *S. mutans* (DSM 20523; ATCC 25175) eingesetzt, der bereits in mehreren Vorversuchen Verwendung fand (Seemann et al., 2005a). Der Keim wurde in lyophilisierter Form von der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland) bezogen.

S. mutans wurde zunächst auf Blut-Agar-Platten vorkultiviert. Einzelne Kolonien wurden anschließend in 20 ml Tryptikase-Soja-Bouillon überführt und unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C inkubiert, sodass die so gewonnene Suspension ohne weitere Aufbereitung zur Kontamination der Apparatur verwendet werden konnte. Die Infektion der Zahnproben mit *S. mutans* erfolgte zweimal in einem Abstand von 8 Tagen. Dabei wurden jeweils 20 ml dieser Keimsuspension über eine zusätzliche Tropfspitze appliziert. Die Fördermenge betrug wie bei den anderen Medien 0,4 ml/min, sodass jede Probe mit ca. 1 ml Keimsuspension kontaminiert wurde.

4.3 Erzeugung kariöser Läsionen

Zur Erzeugung von Sekundärkaries kam das in Kapitel 4.2 beschriebene In-vitro-Kariesmodell (Abb. 4-2a, 4-2b) zur Anwendung. Die Proben wurden in der Mitte des Probenrades im fertig aufgebauten Kariesmodell befestigt und für 18 Tage mit den in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Medien und der in Abbildung 4-2-2b dargestellten zeitlichen Abfolge versorgt. Die Rotationsgeschwindigkeit des Probenrades wurde auf 2 U/min und die Fördermenge der Schlauchpumpen auf 0,4 ml/min eingestellt. Bei Bedarf wurden leere Medienbehälter gegen volle und mit ihnen die zuführenden Schläuche ausgetauscht. Die Inkubationstemperatur lag konstant zwischen 34 – 35 °C. Durch die zweimalige Applikation von jeweils 20 ml Keimsuspension (siehe Kapitel 4.2.3) am 1. und 8. Versuchstag erfolgte die kontrollierte Kontamination mit *S. mutans* über eine zusätzliche Tropfspitze. Die Fördermenge betrug wie bei den anderen Medien 0,4 ml/min, sodass jede Probe mit ca. 1 ml Keimsuspension kontaminiert wurde.



Abbildung 4-3-2: Reaktionskammer im Isolator während des laufenden Versuches

Am Ende des Versuches wurden die Zähne mit einer weichen Zahnbürste (Meridol, GABA, Lörrach) und Mullgaze vorsichtig gereinigt, um den Biofilm zu entfernen. Bis zur Anfertigung der Schliffe (siehe Kapitel 4.4) lagerten die Zähne in Leitungswasser, um eine Austrocknung zu vermeiden. Die gesamte Apparatur wurde nach dem Versuch sterilisiert.

4.4 Anfertigung der Zahnschliffe

Zur Anfertigung der Zahnschliffe wurden die Zahnproben mit Hilfe einer Schleif- und Poliermaschine (DP-U4, Struers, Dänemark; Abbildung 4-4-1) bearbeitet. Zunächst wurden die Proben mit einer siliziumkarbidbeschichteten PVC-Nassschleifscheibe so getrimmt, dass eine Aufsicht auf den Füllungsquerschnitt und damit die weitere Auswertung möglich war (Abbildungen 4-4-2, 4-4-3, 4-4-4). Anschließend erfolgte die Politur der freigelegten Füllungs- und Zahnoberfläche mittels Polierscheiben mit einer Körnung von 2400.

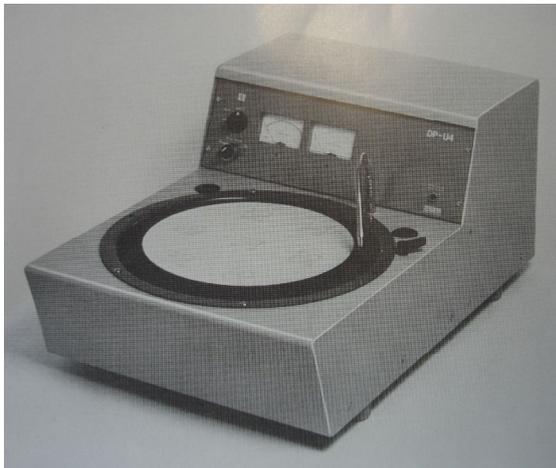


Abb. 4-4-1: Schleif- und Poliermaschine



Abb. 4-4-2: Schleifen einer Zahnprobe

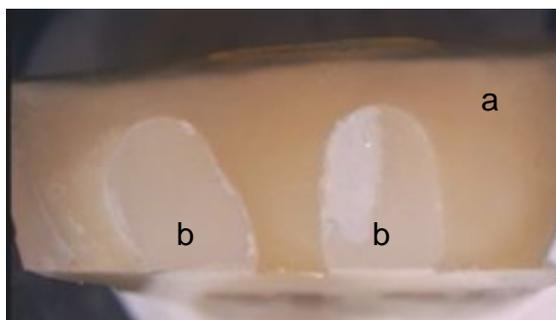


Abb. 4-4-3: angeschliffene Kompositfüllungen, Ansicht von okklusal
a = Dentin b = Komposit

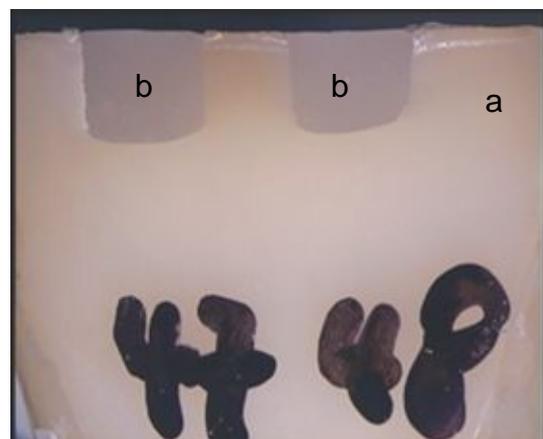


Abb. 4-4-4: angeschliffene Kompositfüllungen, laterale Ansicht
a = Dentin b = Komposit

4.5 Funktionsprinzip des CLSM

Die Schliffe wurden nach der von *Fontana* et al. (Fontana et al., 1996) beschriebenen Methode zur Beurteilung der Kariesausdehnung mit einem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) analysiert (Zeiss LSM 510, Carl Zeiss, Jena, Deutschland). Die auf *Fontana* basierende Methode wurde jedoch nach *Seemann* so abgeändert, dass keine Anfärbung der Proben stattfand (Seemann et al., 2005a; Seemann et al., 2005b).

In der konfokalen Mikroskopie werden Strukturen erkannt, indem das von einer Probe emittierte Licht aus einer einzigen Fokalebene gebündelt und sämtliches Licht, das nicht aus dieser Ebene stammt, unterdrückt wird.

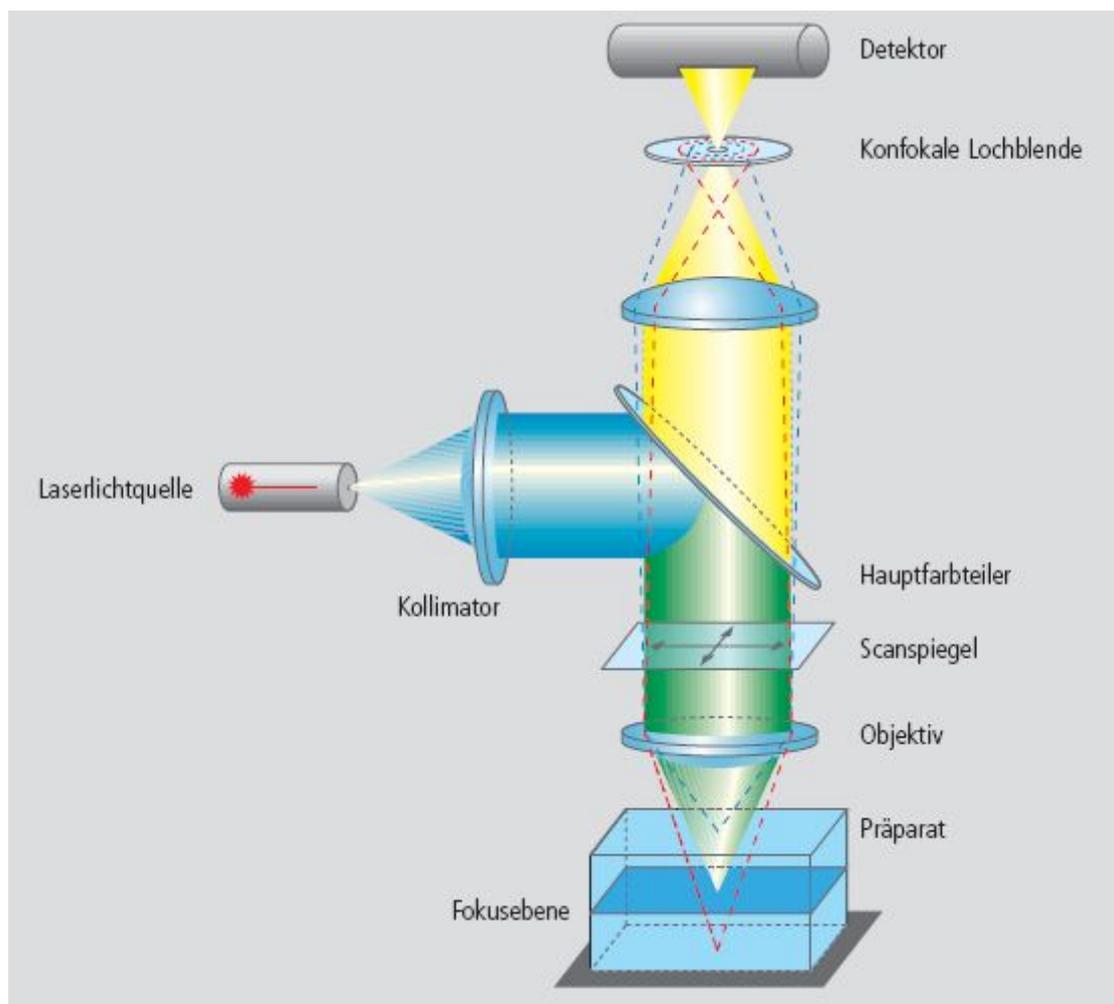


Abb. 4-5: Schematischer Aufbau eines Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops [nach (Zeiss, 2008)]

Fluoreszenzlicht und Reflexionslicht der Probe werden durch dieselbe Linse zurückgeleitet. Der Lichtstrahl gelangt durch die Konfokalöffnung, das so genannte Pinhole, in den Detektor und wird derart fokussiert, dass alles außerfokale Licht, also Licht, das von anderen Bereichen der Probe unterhalb oder oberhalb der Fokalebene abgegeben wird, unterdrückt wird. Bei dem Detektor handelt es sich um einen lichtempfindlichen Detektor (z. B. eine Photodiode), der hinter der Konfokalöffnung angeordnet ist. Dieser Detektor empfängt nur das Licht von einem Punkt der Probe. Dadurch kann mit dem konfokalen Mikroskop im Gegensatz zum konventionellen Mikroskop, bei dem ein größerer Bereich der Probe zu sehen ist, zu einem Zeitpunkt immer nur ein Punkt der Probe beobachtet werden. Ein Gesamtbild der Probe ergibt sich daher erst durch das punktweise Abtasten der Probe. Bei dem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 (Zeiss, Jena, Deutschland) wird dafür der Lichtpunkt verschoben.

Das Volumen der optischen Schnitte hängt von verschiedenen Parametern ab, wie dem Durchmesser der Öffnung und der Wellenlänge (Leica, 2007).

Das Kernstück des LSM 510 META ist ein Scanmodul, das motorisierte Kollimatoren, Scanspiegel, separat justierbare und positionierbare Pinholes sowie hochempfindliche Detektoren (einschließlich des META-Detektors) enthält. Mit einem hocheffizienten optischen Gitter werden die Fluoreszenzemissionen getrennt und auf die 32 Kanäle des META-Detektors verteilt. Damit lässt sich für jeden Punkt des gescannten Bildes die gesamte spektrale Signatur aufnehmen (Zeiss, 2008).

Die Anregung erfolgte für Kanal 1 (blaue Farbe) durch einen Helium-Neon-Laser (Wellenlänge 633 nm) bei einer relativen Intensität von 100% und für den Kanal 2 (grüne Farbe) durch einen Argon-Laser (Wellenlänge 488 nm) bei einer relativen Intensität von 17%. Der Strahlengang des reflektierten Lichtes wurde für die Detektion der beiden Farben wie folgt konfiguriert: Kanal 1, Langpassfilter (LP 650), 545 µm pinhole, main dichroic beam splitter HFT 633; Kanal 2, Bandpassfilter (BP 505 - 530), 397 µm pinhole, main dichroic beam splitter HFT 488.

Es wurde ein 10x Plan-Neofluar-Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0,30 verwendet.

4.6 Ausmessung der Demineralisation

Mit Hilfe der Software *Zeiss LSM 510 image browser* (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) wurden pro Probe drei Parameter bestimmt:

1. Die Fläche der Primärkaries auf der Oberfläche der Zahnprobe.

Es erfolgten vier Einzelmessungen im Abstand von 50 µm und die Berechnung der Primärkariesfläche auf einer Länge von 200 µm (weiße Markierungen; Abb. 4-6). Die Primärkariesfläche wurde in diesem In-vitro-Versuch als diejenige Fläche definiert, deren Abstand mehr als 200 µm von der Füllungsoberfläche betrug.

2. Die Fläche der Sekundärkaries (Wandläsion).

Beginnend am Rand der Füllung erfolgten 5 Messungen zur Tiefe der Demineralisation in einem Abstand von jeweils 50 µm (gelbe Markierungen; Abb. 4-6).

3. Die Tiefe des Randspaltes zwischen Restauration und Dentin.

(waagerechte rote Markierung; Abb 4-6)

In Abbildung 4-6 sind die CLSM-Ausmessungen der Demineralisationstiefen einer kariesähnlichen Läsion am Füllungsrand eines Schliffes aus Gruppe B dargestellt.

Das durch einen kariösen Angriff demineralisierte Dentin fluoresziert im CLSM bei den o. g. Einstellungen grün, während sich das unveränderte Dentin blau darstellt.

Die rote senkrechte Linie markiert den ursprünglichen Verlauf der Zahnhartsubstanz. Dabei wurde eine Gerade an der Füllungsoberfläche angelegt und über die Füllungsoberfläche hinaus verlängert. Der dunkle Bereich zwischen dem grün fluoreszierenden demineralisiertem Dentin und der roten senkrechten Linie lässt deutlich den Substanzverlust erkennen. Ob es sich hierbei um einen tatsächlichen Substanzverlust oder um eingefallenes Dentin durch Mineralverlust handelt, bleibt der Spekulation überlassen.

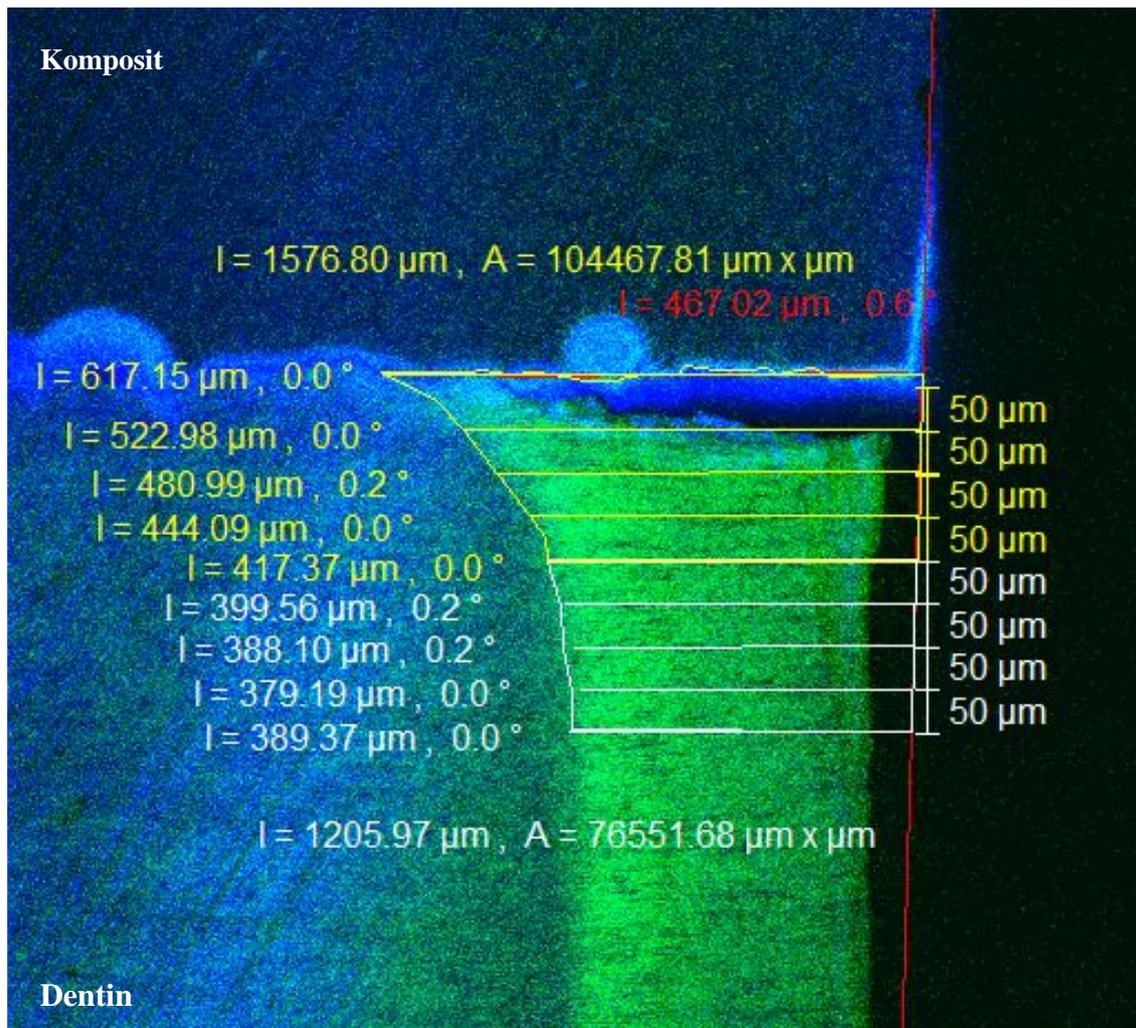


Abbildung 4-6: Histologisches Bild (Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie) eines senkrechten Schnittes mit Abmessungen zur Bestimmung der o. g. Parameter
 I = Tiefe der Demineralisation gemessen vom ursprünglichen Dentinverlauf
 A = Fläche der Demineralisation (gelb= Sekundärkaries; weiß= Primärkaries)

4.7 Statistische Aufbereitung der Daten

Bei den vorliegenden Daten handelt es sich um metrische Messwerte. Zur Beurteilung der Verteilung wurden zunächst Boxplots angefertigt. Diese bestehen aus Rechtecken, die 50% der Werte zwischen der 25. und 75. Perzentile beinhalten und Extensionslinien, welche die Minimal- und Maximalwerte darstellen. Die Mediane sind durch horizontale Balken innerhalb der Rechtecke angegeben. Ausreißer sind als Kreise eingetragen.

Aufgrund fehlender Varianzhomogenität und fehlender Normalverteilung der Messdaten kamen nicht-parametrische Testverfahren zur Darstellung und Auswertung der Ergebnisse zur Anwendung.

Als Vortest zum Vergleich der Gruppen wurde der *Kruskal-Wallis-Test* eingesetzt. Anschließend erfolgte der paarweise Vergleich zwischen den Gruppen mit dem *Mann-Whitney-U-Test*, um herauszufinden, ob sich die Gruppen signifikant voneinander unterscheiden.

Es wurde $p < 0,05$ als Signifikanzniveau für alle statistischen Tests festgelegt. Die Berechnungen erfolgten mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows 14.0.

5. Ergebnisse

5.1 Plaquewachstum und Bildung kariöser Läsionen

Bereits zwei Tage nach Applikation der *Mutans*-Streptokokken war eine Plaquebildung auf den Zahnproben sichtbar. Nach 10-tägiger Inkubation konnte ein generelles Plaquewachstum beobachtet werden, das makroskopisch einem ungestörten Plaquewachstum in vivo entsprach (Abbildung 5-1). Die Plaque wies eine weiße, körnige Konsistenz auf und erreichte bis zum Ende des Experiments eine Dicke zwischen 2 und 3 mm.



Abbildung 5-1: Aufsicht auf das Probenrad mit 5 Proben, die nach 18-tägiger Inkubation eine deutliche Plaquebildung aufwiesen.

5.1.1 Primärkaries

Nach 18-tägiger Inkubation in der künstlichen Mundhöhle bildeten sich auf den Zahnproben fest anhaftende bakterielle Beläge, die am Dentin deutlich stärker hafteten als auf dem Schmelz.

Auf der Schmelzoberfläche zeigten sich immer weißliche Demineralisationen, die klinisch einer initialen Schmelzläsion (white spot) entsprechen (Abbildung 5-1-1a).

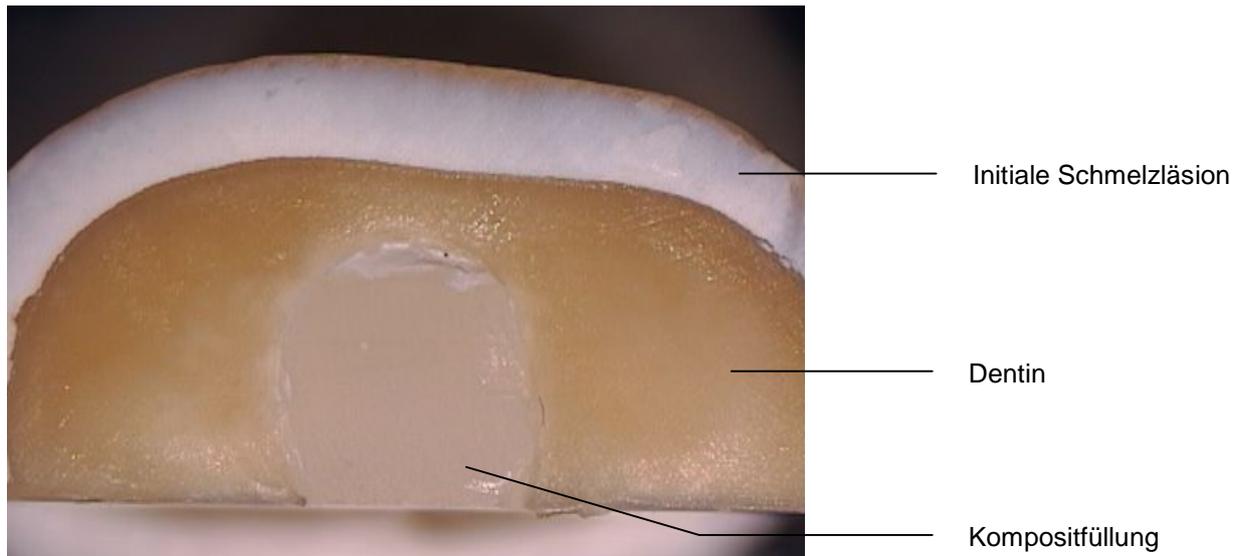


Abbildung 5-1-1a: Aufsicht auf eine von Plaque befreite Zahnprobe nach 18-tägiger Inkubation in der künstlichen Mundhöhle

Im Dentin konnten bei einigen Proben bereits makroskopisch ein sichtbarer Substanzverlust sowie ein Randspalt zwischen Dentin und Kompositfüllung festgestellt werden (Abbildung 5-1-1b).

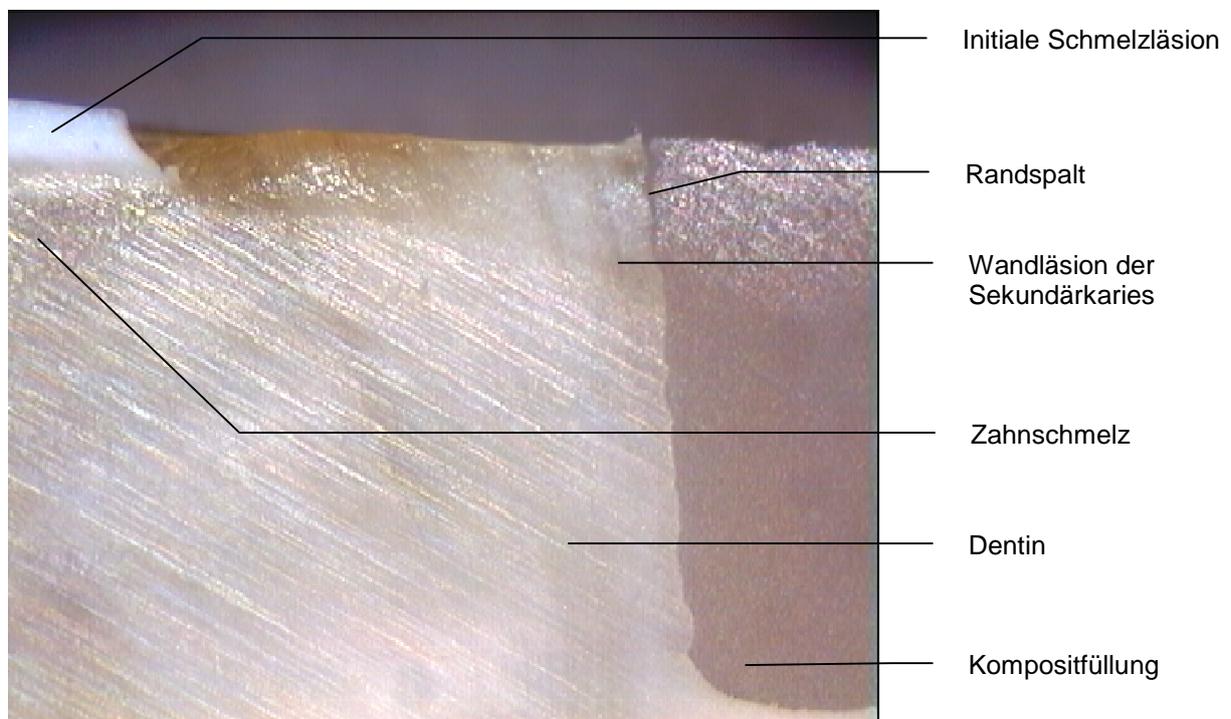


Abbildung 5-1-1b: seitliche Ansicht eines Schnittes durch eine Zahnprobe

Einige Proben wiesen partiell eine dünne Schmelzschicht auf, die vor dem Einbringen in die künstliche Mundhöhle makroskopisch nicht erkennbar war und erst durch die weißliche Demineralisation nach Versuchsende auffiel. Diese partiell schmelzbedeckten Proben wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen, sodass nur 187 der 240 Proben für die Statistik verwendet werden konnten.

5.1.2 Sekundärkaries

Im Bereich des Füllungsrandes kam es in allen Fällen zur Ausbildung charakteristischer Sekundärkariesläsionen, unabhängig davon, ob ein Randspalt vorhanden war oder nicht (Abbildung 5-1-2).

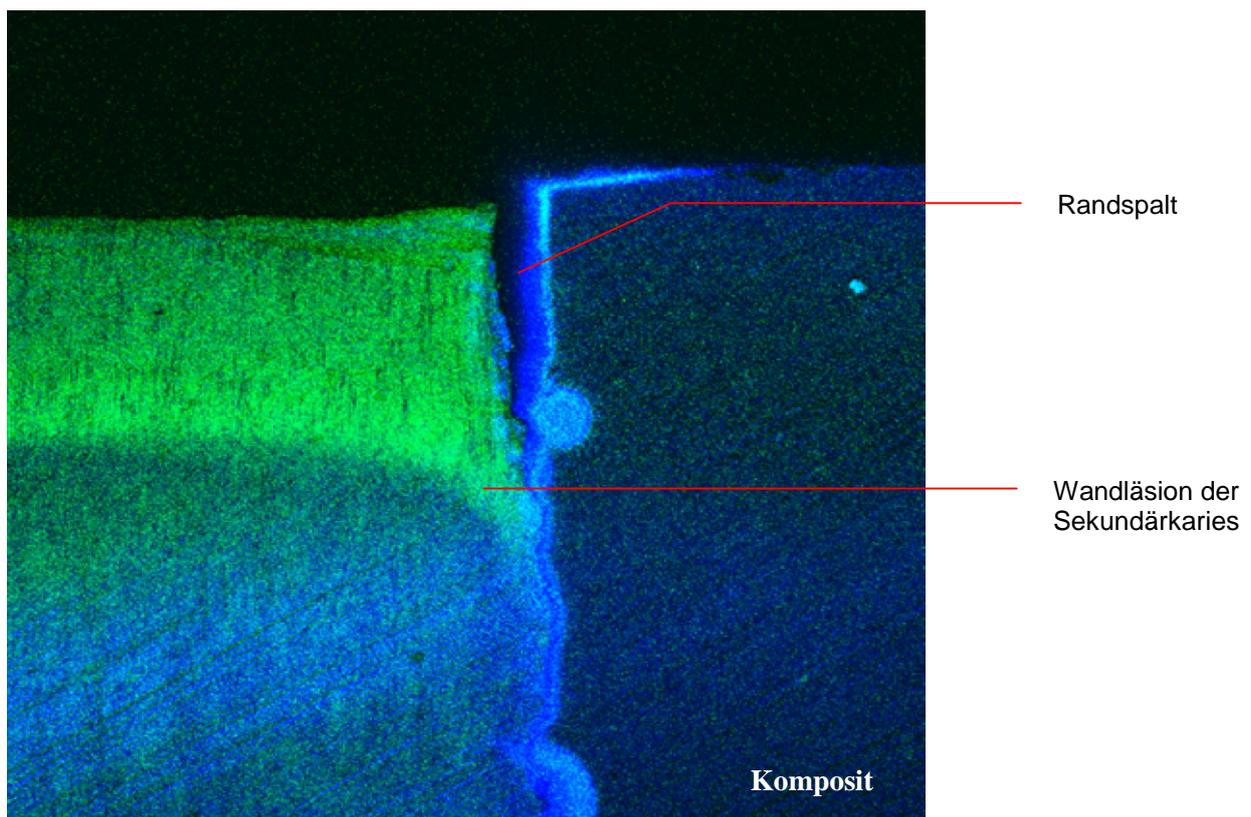


Abbildung 5-1-2 Histologisches Bild (konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie) eines senkrechten Schnittes durch die in Abbildung 5-1-1b dargestellte Füllung

5.2 Ergebnisübersicht

Die Berechnungen basieren auf dem Vergleich geclusterter Daten. Das heißt, es kam zu Mehrfachmessungen an einer Einheit, also jeweils links und rechts einer Füllung an demselben Zahn.

5.2.1 Fläche der Sekundärkaries

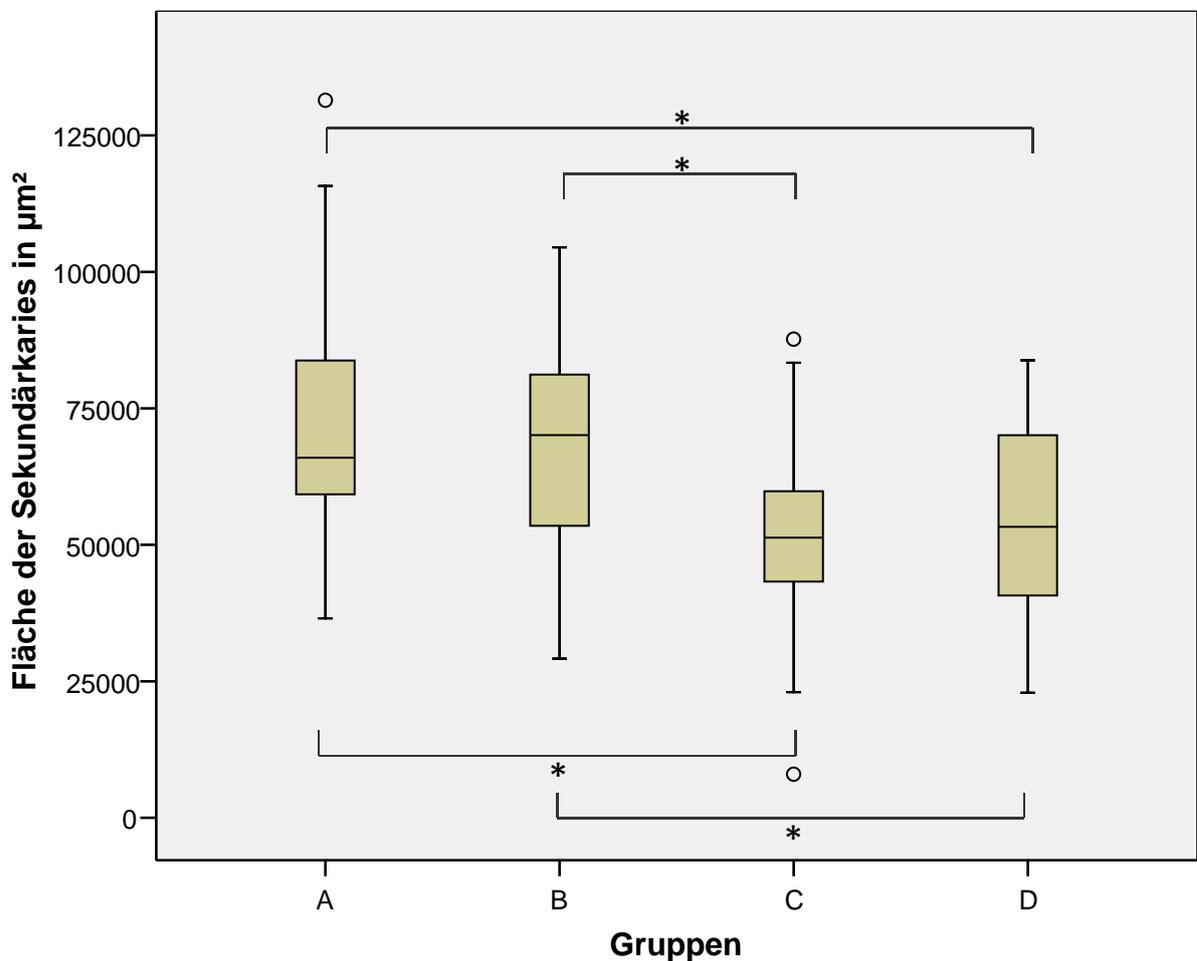


Abb. 5-2-1: Boxplot zur Darstellung der Sekundärkariesfläche der geclusterterten Daten

* = statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p < 0,05$)

Tabelle 5-2-1 stellt die Anzahl der geclusterten gültigen und fehlenden Proben gegenüber, die bei der Auswertung der Sekundärkariesfläche einbezogen wurden.

Gruppen	Proben					
	Gültig		Fehlend		Gesamt	
	N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
kein Adhäsiv, keine Touchierung (A)	48	100,0%	0	,0%	48	100,0%
kein Adhäsiv, aber Touchierung (B)	50	100,0%	0	,0%	50	100,0%
Adhäsiv, keine Touchierung (C)	42	100,0%	0	,0%	42	100,0%
Adhäsiv, Touchierung (D)	47	100,0%	0	,0%	47	100,0%

An den Kavitätenrändern zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich der Sekundärkariesbildung.

Gruppe C (Adhäsiv, keine Touchierung; Median: 51306 μm^2 , unteres Quartil: 42717 μm^2 , oberes Quartil: 60326 μm^2) und Gruppe D (Adhäsiv, Touchierung; Median: 53295 μm^2 , unteres Quartil: 40566 μm^2 , oberes Quartil: 70593 μm^2) wiesen die geringste Sekundärkariesfläche auf. Gruppe A (kein Adhäsiv, keine Touchierung; Median: 65955 μm^2 , unteres Quartil: 59159 μm^2 , oberes Quartil: 84694 μm^2) und Gruppe B (kein Adhäsiv, Touchierung; Median: 70095 μm^2 , unteres Quartil: 53374 μm^2 , oberes Quartil: 81299 μm^2) zeigten deutlich größere Sekundärkariesflächen.

Der Unterschied zwischen Gruppe C und Gruppe D sowie zwischen Gruppe A und Gruppe B war statistisch nicht signifikant ($p = 0,605$ bzw. $p = 0,495$; *Mann-Whitney-U-Test*), jedoch unterschied sich Gruppe C signifikant von Gruppe A und von Gruppe B (jeweils $p < 0,001$; *Mann-Whitney-U-Test*). Auch Gruppe D zeigte signifikante Unterschiede zu den Gruppen A und B ($p < 0,001$ bzw. $p = 0,001$; *Mann-Whitney-U-Test*).

5.2.2 Fläche der Primärkaries

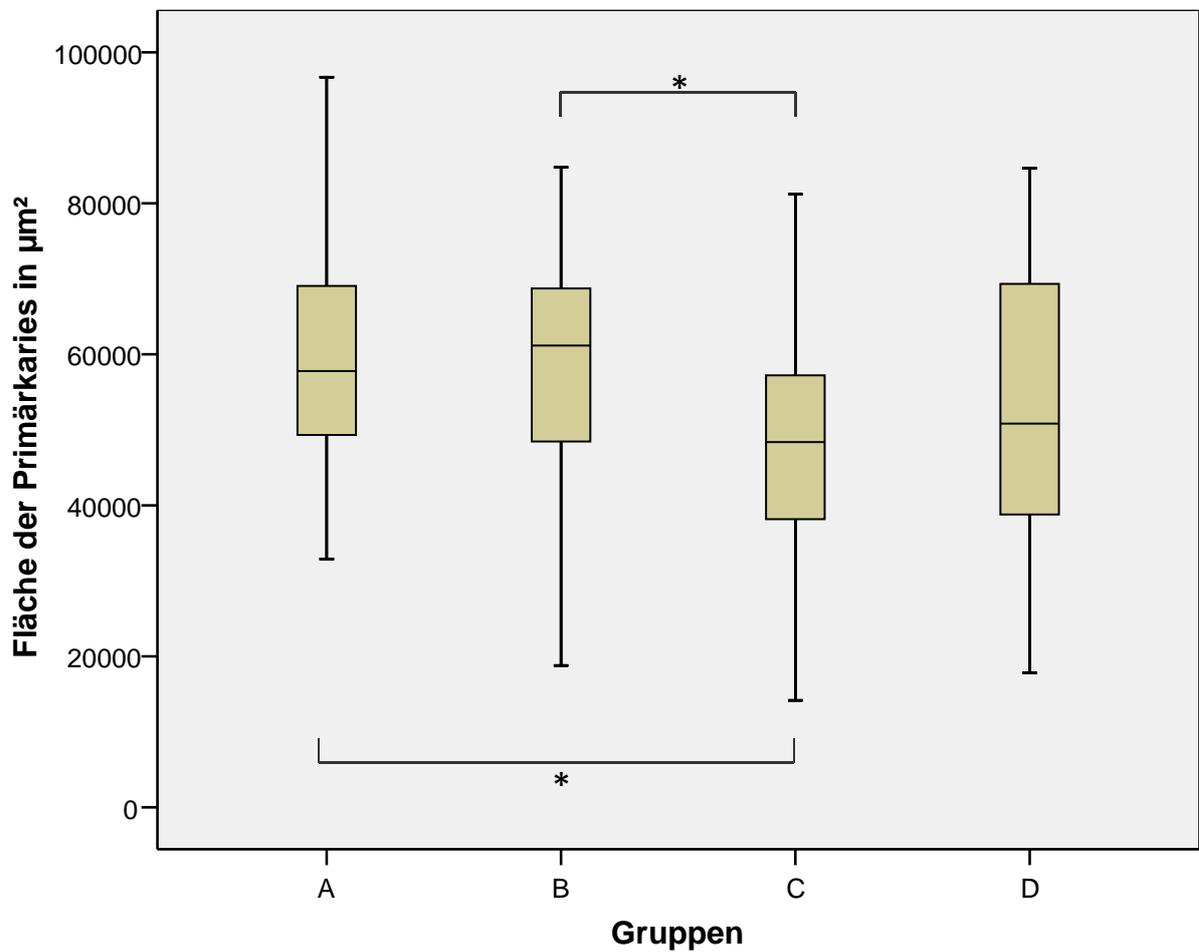


Abb. 5-2-2: Boxplot zur Darstellung der Primärkariesfläche der geclusterten Daten

* = statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p < 0,05$)

Tabelle 5-2-2a stellt die Anzahl der geclusterten gültigen und fehlenden Proben gegenüber, die bei der Auswertung der Primärkariesfläche einbezogen wurden.

Gruppen	Proben					
	Gültig		Fehlend		Gesamt	
	N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
kein Adhäsiv, keine Touchierung (A)	34	70,8%	14	29,2%	48	100,0%
kein Adhäsiv, aber Touchierung (B)	47	94,0%	3	6,0%	50	100,0%
Adhäsiv, keine Touchierung (C)	40	95,2%	2	4,8%	42	100,0%
Adhäsiv, Touchierung (D)	39	83,0%	8	17,0%	47	100,0%

Die Fläche der Primärkaries konnte bei 27 Proben nicht bestimmt werden, da der Mindestabstand von 800 μm zur Nachbarfüllung oder zum Schmelzmantel nicht gegeben war. Dieser Fehler trat zufällig auf und verteilte sich ungleichmäßig auf die Gruppen (Tabelle 5-2-2a).

Wie aus der Tabelle 5-2-2b hervorgeht, ergab sich zwischen den Primärkariesflächen der Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied mit Ausnahme des Vergleiches der Gruppen A und C sowie B und C ($p = 0,005$ bzw. $p = 0,002$; *Mann-Whitney-U-Test*). Gruppe C (Adhäsiv, keine Touchierung; Median: 48369 μm^2 , unteres Quartil: 38150 μm^2 , oberes Quartil: 57224 μm^2) und Gruppe D (Adhäsiv, Touchierung; Median: 50828 μm^2 , unteres Quartil: 38672 μm^2 , oberes Quartil: 69950 μm^2) wiesen die geringste Primärkariesfläche auf, während Gruppe A im Median 57784 μm^2 (unteres Quartil: 49297 μm^2 , oberes Quartil: 69366 μm^2) und Gruppe B im Median 61156 μm^2 (unteres Quartil: 48136 μm^2 , oberes Quartil: 69266 μm^2) besaß.

Tabelle 5-2-2b stellt die asymptotischen p-Werte des paarweisen Vergleiches der Primärflächenkaries der einzelnen Gruppen mit Hilfe des *Mann-Whitney-U-Tests* dar: s = signifikant; n. s. = nicht signifikant

Fläche der Primärkaries	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
Gruppe A	-			
Gruppe B	,878 (n. s.)	-		
Gruppe C	,005 (s.)	,002 (s.)	-	
Gruppe D	,151 (n. s.)	,166 (n. s.)	,383 (n. s.)	-

5.2.3 Randspalttiefe

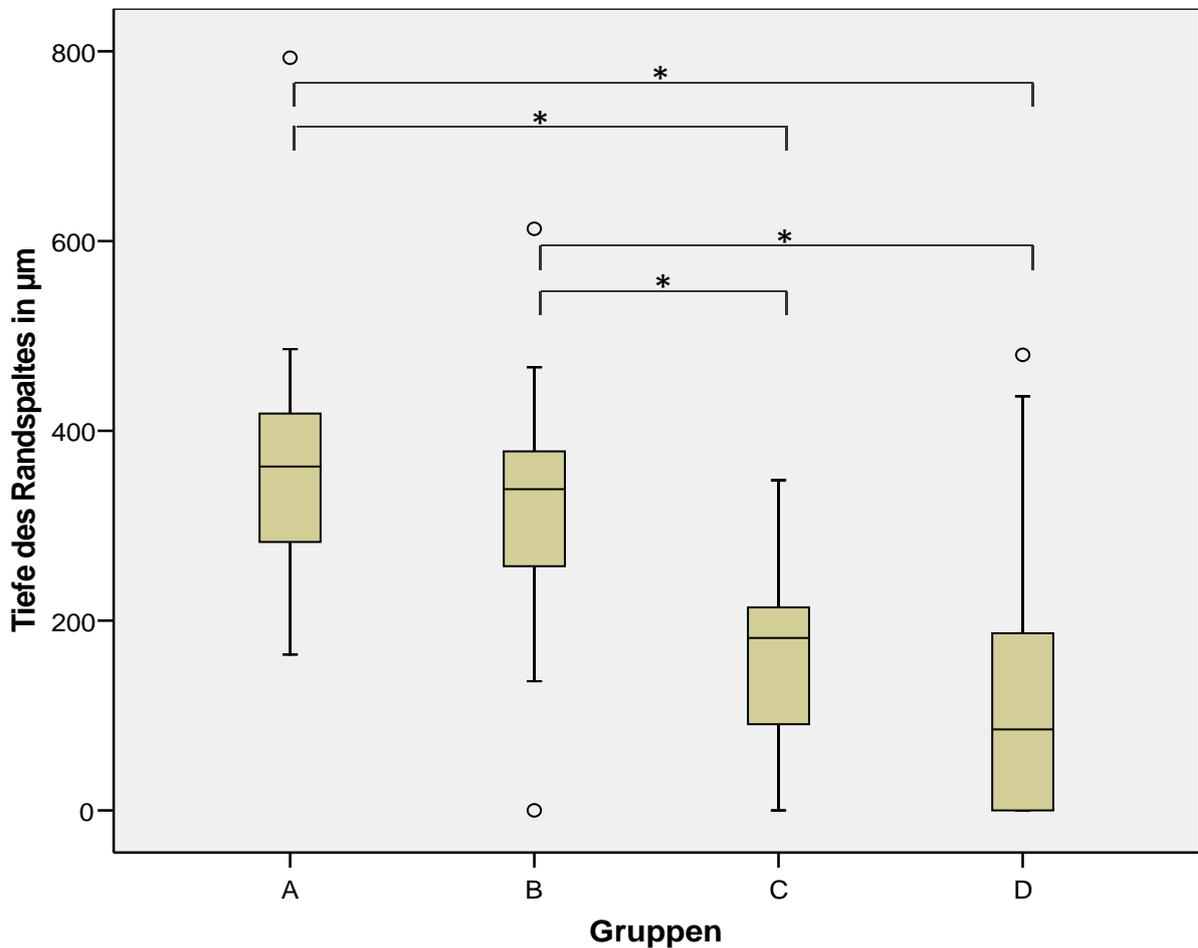


Abb. 5-2-3: Boxplot zur Darstellung der Randspalttiefe der geclusterten Daten

* = statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p < 0,05$)

Tabelle 5-2-3 stellt die Anzahl der geclusterten gültigen und fehlenden Proben gegenüber, die bei der Auswertung der Randspalttiefe einbezogen wurden.

Gruppen	Proben					
	Gültig		Fehlend		Gesamt	
	N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
kein Adhäsiv, keine Touchierung (A)	48	100,0%	0	,0%	48	100,0%
kein Adhäsiv, aber Touchierung (B)	50	100,0%	0	,0%	50	100,0%
Adhäsiv, keine Touchierung (C)	42	100,0%	0	,0%	42	100,0%
Adhäsiv, Touchierung (D)	47	100,0%	0	,0%	47	100,0%

An den Kavitätenrändern zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich der Randspalattiefe. Bei den Gruppen A und B (jeweils ohne Adhäsivsystem) bildeten sich die tiefsten Randspalten.

Gruppe A (kein Adhäsiv, keine Touchierung; Median: 362 μm , unteres Quartil: 282 μm , oberes Quartil: 419 μm) und Gruppe B (kein Adhäsiv, Touchierung; Median: 339 μm , unteres Quartil: 257 μm , oberes Quartil: 379 μm) unterschieden sich signifikant ($p < 0,001$; *Mann-Whitney-U-Test*) von Gruppe C (Adhäsiv, keine Touchierung; Median: 182 μm , unteres Quartil: 81 μm , oberes Quartil: 215 μm) und Gruppe D (Adhäsiv, Touchierung; Median: 85 μm , unteres Quartil: 0 μm , oberes Quartil: 191 μm).

Zwischen den Gruppen A und B sowie zwischen den Gruppen C und D bestand kein statistisch signifikanter Unterschied in der Randspalattiefe ($p > 0,05$; *Mann-Whitney-U-Test*).

5.2.4 Aggregierte Daten

Die gesamten bisher dargestellten Berechnungen basieren auf dem Vergleich geclustelter Daten. Dabei kommt es zu Mehrfachmessungen an einer Einheit, also jeweils links und rechts einer Füllung an demselben Zahn. Fasst man die beiden Seiten als Messwiederholungen auf, kann man diese Daten mitteln. Aus diesem Grund wurden die Daten aggregiert, also der Mittelwert beider Seiten gebildet und erneut nach dem bereits oben dargestellten Prinzip statistisch berechnet.

Fläche der Sekundärkaries

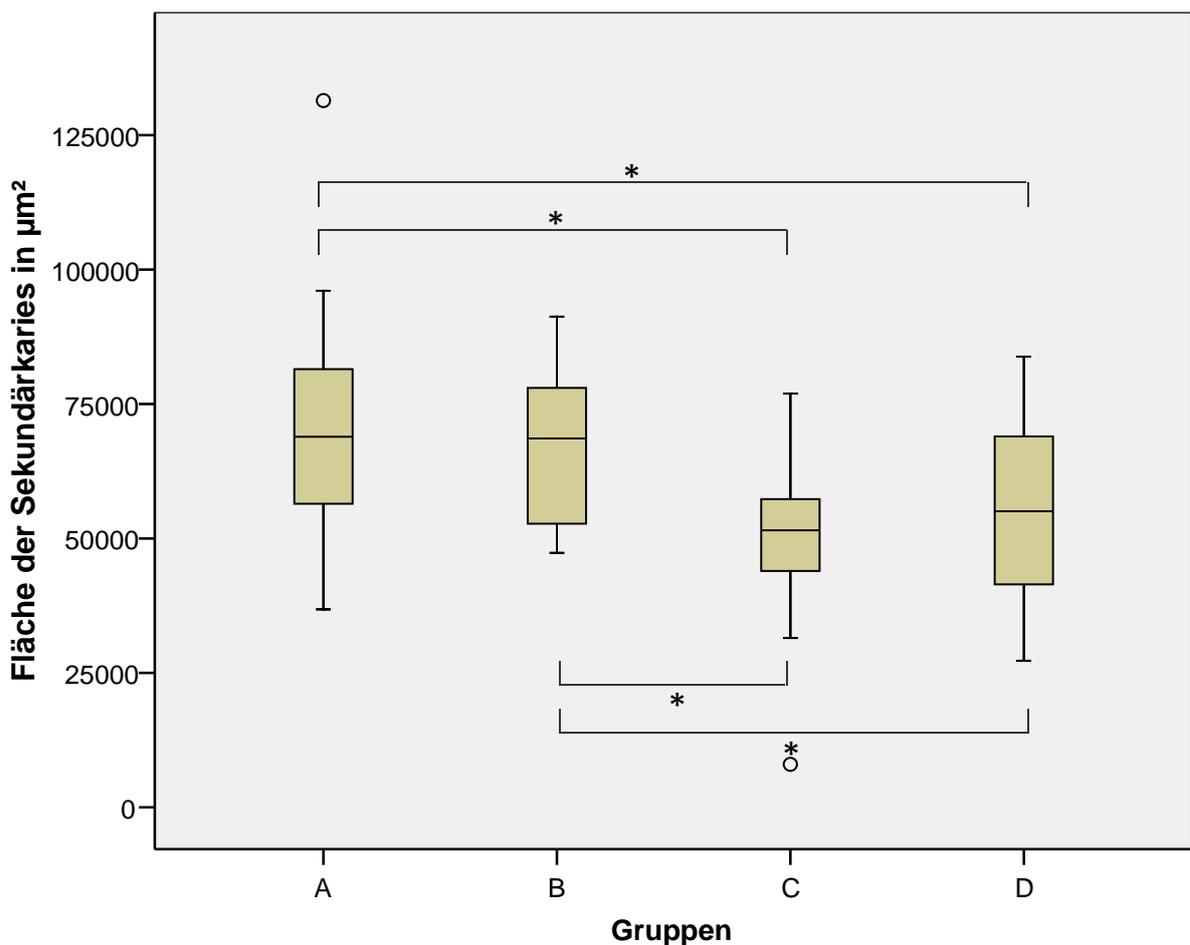


Abb. 5-2-4a: Boxplot zur Darstellung der Sekundärkariesfläche der aggregierten Daten

* = statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p < 0,05$)

Tabelle 5-2-4a stellt die Anzahl der aggregierten gültigen und fehlenden Proben gegenüber, die bei der Auswertung der Sekundärkariesfläche einbezogen wurden.

Gruppen	Proben					
	Gültig		Fehlend		Gesamt	
	N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
kein Adhäsiv, keine Touchierung (A)	29	100,0%	0	,0%	29	100,0%
kein Adhäsiv, aber Touchierung (B)	28	100,0%	0	,0%	28	100,0%
Adhäsiv, keine Touchierung (C)	25	100,0%	0	,0%	25	100,0%
Adhäsiv, Touchierung (D)	29	100,0%	0	,0%	29	100,0%

Auch bei den aggregierten Daten zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich der Sekundärkariesflächen zwischen den Gruppen.

Die geringsten Sekundärkariesflächen wiesen dabei Gruppe C (Adhäsiv, keine Touchierung; Median: 51519 μm^2 , unteres Quartil: 43940 μm^2 , oberes Quartil: 58211 μm^2) und Gruppe D (Adhäsiv, Touchierung; Median: 55066 μm^2 , unteres Quartil: 40577 μm^2 , oberes Quartil: 69446 μm^2) auf. Zwischen den Gruppen C und D bestand kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,235$; *Mann-Whitney-U-Test*).

Gruppe A (kein Adhäsiv, keine Touchierung; Median: 68908 μm^2 , unteres Quartil: 56195 μm^2 , oberes Quartil: 81701 μm^2) und Gruppe B (kein Adhäsiv, Touchierung; Median: 68603 μm^2 , unteres Quartil: 52387 μm^2 , oberes Quartil: 78287 μm^2) besaßen auch bei den aggregierten Daten deutlich größere Sekundärkariesflächen. Dabei unterschied sich Gruppe C statistisch signifikant von Gruppe A und B (jeweils $p < 0,001$; *Mann-Whitney-U-Test*) sowie Gruppe D von Gruppe A und B ($p = 0,004$ bzw. $p = 0,019$; *Mann-Whitney-U-Test*).

Zwischen den Gruppen A und B ließ sich aber auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied nachweisen ($p = 0,482$; *Mann-Whitney-U-Test*).

Fläche der Primärkaries

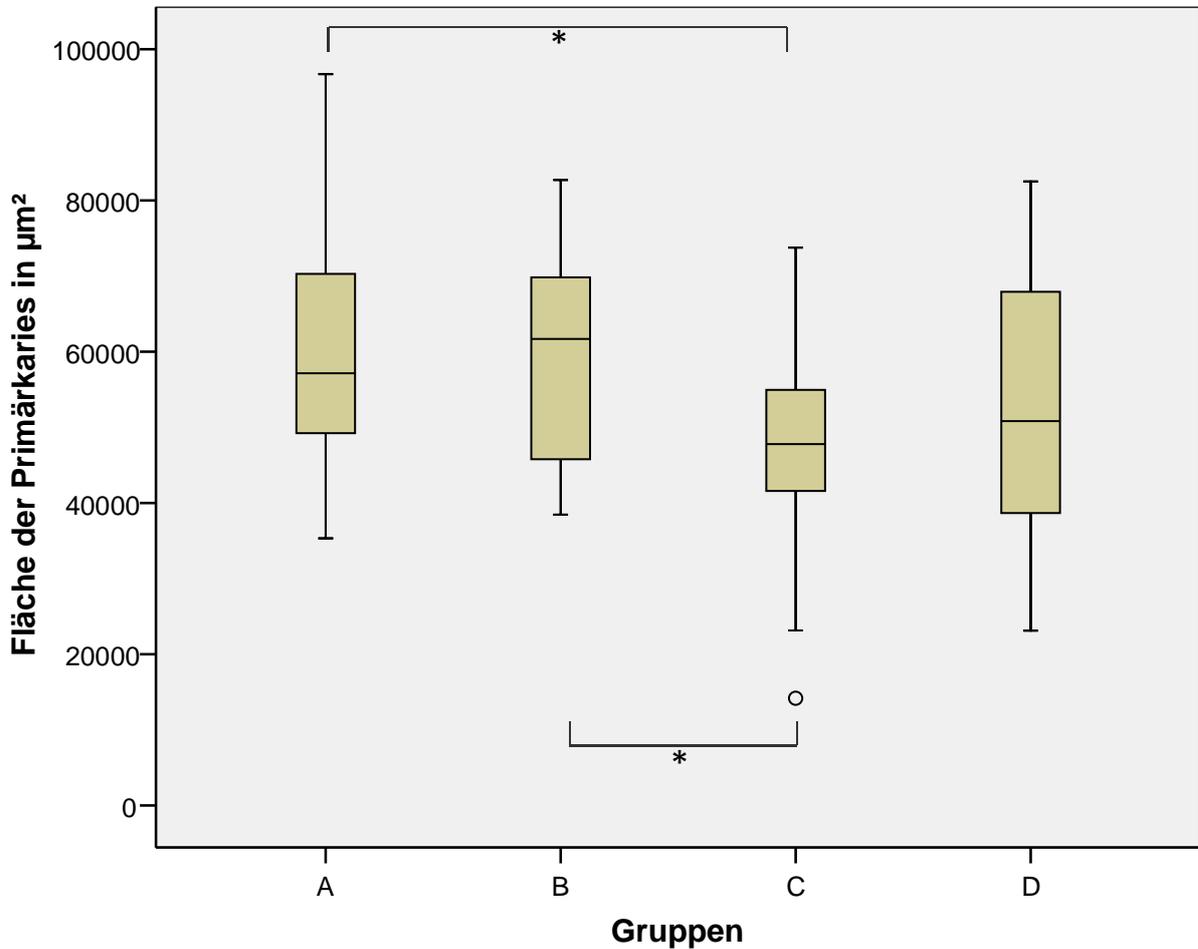


Abb. 5-2-4b: Boxplot zur Darstellung der Primärkariesfläche der aggregierten Daten

* = statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p < 0,05$)

Tabelle 5-2-4b1 stellt die Anzahl der aggregierten gültigen und fehlenden Proben gegenüber, die bei der Auswertung der Primärkariesfläche einbezogen wurden.

Gruppe	Proben					
	Gültig		Fehlend		Gesamt	
	N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
kein Adhäsiv, keine Touchierung (A)	25	86,2%	4	13,8%	29	100,0%
kein Adhäsiv, aber Touchierung (B)	28	100,0%	0	,0%	28	100,0%
Adhäsiv, keine Touchierung (C)	24	96,0%	1	4,0%	25	100,0%
Adhäsiv, Touchierung (D)	25	86,2%	4	13,8%	29	100,0%

Bezüglich der Primärkariesfläche entsprachen die Ergebnisse der aggregierten Daten denen der geclusterten Daten. Wie aus der Tabelle 5-2-4b2 hervorgeht, ergab sich zwischen den Primärkariesflächen der Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied mit Ausnahme des Vergleiches der Gruppen A und C sowie B und C ($p = 0,016$ bzw. $p = 0,012$; *Mann-Whitney-U-Test*).

Gruppe C (Adhäsiv, keine Touchierung; Median: $47784 \mu\text{m}^2$, unteres Quartil: $40970 \mu\text{m}^2$, oberes Quartil: $55477 \mu\text{m}^2$) und Gruppe D (Adhäsiv, Touchierung; Median: $50828 \mu\text{m}^2$, unteres Quartil: $38520 \mu\text{m}^2$, oberes Quartil: $68940 \mu\text{m}^2$) wiesen die geringste Primärkariesfläche auf, während Gruppe A (kein Adhäsiv, keine Touchierung) im Median $57147 \mu\text{m}$ (unteres Quartil: $47580 \mu\text{m}^2$, oberes Quartil: $70892 \mu\text{m}^2$) und Gruppe B (kein Adhäsiv, Touchierung) im Median $61692,96 \mu\text{m}^2$ (unteres Quartil: $45660 \mu\text{m}^2$, oberes Quartil: $69875 \mu\text{m}^2$) besaß.

Tabelle 5-2-4b2 stellt die asymptotischen p-Werte des paarweisen Vergleiches der Primärkariesfläche der einzelnen Gruppen mit Hilfe des *Mann-Whitney-U-Tests* dar: s = signifikant; n. s. = nicht signifikant

Fläche der Primärkaries	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
Gruppe A	-			
Gruppe B	,943 (n. s.)	-		
Gruppe C	,016 (s.)	,012 (s.)	-	
Gruppe D	,273 (n. s.)	,219 (n. s.)	,271 (n. s.)	-

Randspalttiefe

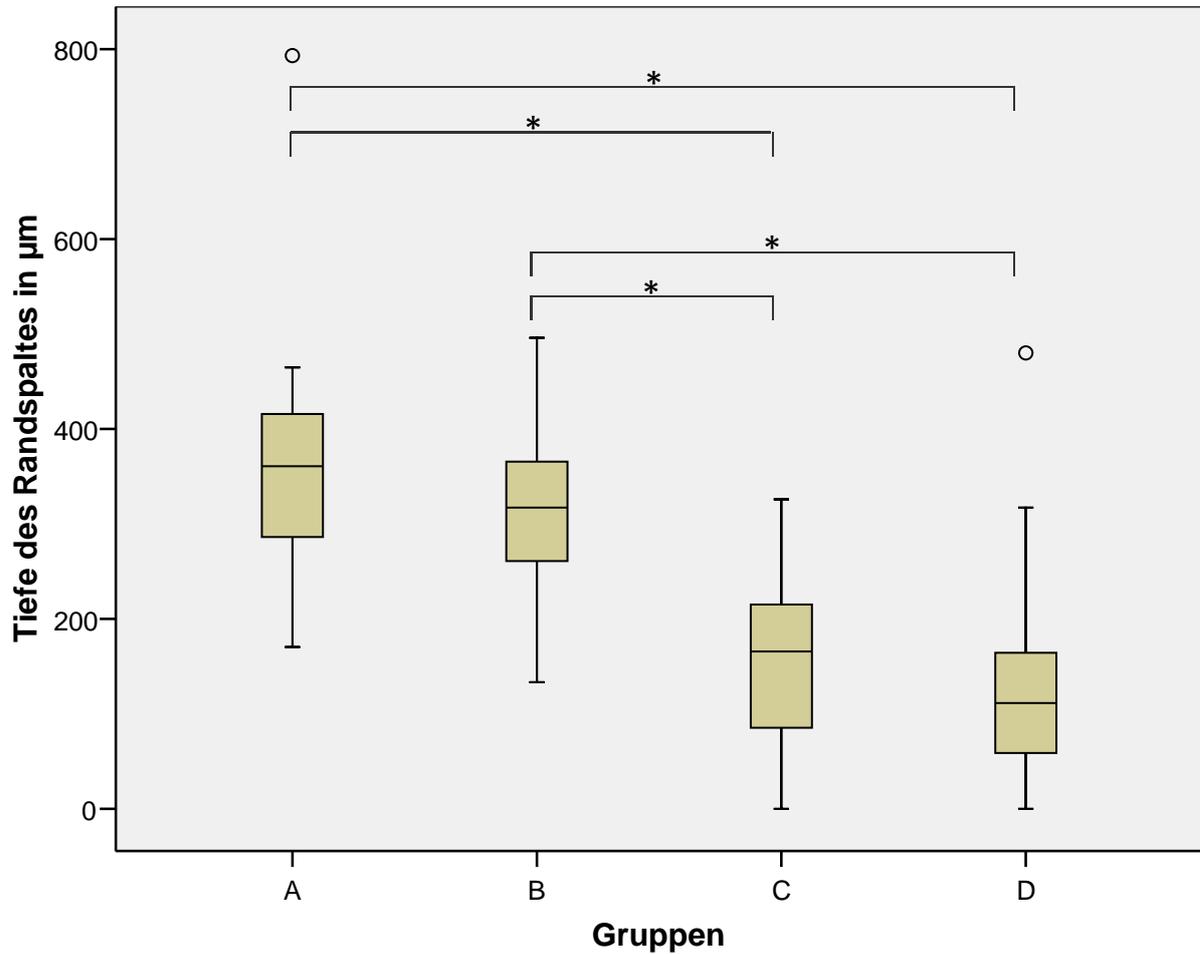


Abb. 5-2-4c: Boxplot zur Darstellung der Randspalttiefe der aggregierten Daten

* = statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p < 0,05$)

Tabelle 5-2-4c stellt die Anzahl der aggregierten gültigen und fehlenden Proben gegenüber, die bei der Auswertung der Randspalttiefe einbezogen wurden.

Gruppen	Proben					
	Gültig		Fehlend		Gesamt	
	N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
kein Adhäsiv, keine Touchierung (A)	29	100,0%	0	,0%	29	100,0%
kein Adhäsiv, aber Touchierung (B)	28	100,0%	0	,0%	28	100,0%
Adhäsiv, keine Touchierung (C)	25	100,0%	0	,0%	25	100,0%
Adhäsiv, Touchierung (D)	29	100,0%	0	,0%	29	100,0%

Auch bei den aggregierten Daten unterschieden sich die Ergebnisse hinsichtlich der Rangfolge der einzelnen Gruppen nicht von denen der geclusterten Daten. Gruppe A (kein Adhäsiv, keine Touchierung; Median: 361 μm , unteres Quartil: 278 μm , oberes Quartil: 417 μm) und Gruppe B (kein Adhäsiv, Touchierung; Median: 317 μm , unteres Quartil: 257 μm , oberes Quartil: 366 μm) wiesen die tiefsten Randspalten auf. Zwischen den Gruppen A und B bestand kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,100$; *Mann-Whitney-U-Test*).

Gruppe C (Adhäsiv, keine Touchierung; Median: 166 μm , unteres Quartil: 81 μm , oberes Quartil: 219 μm) und Gruppe D (Adhäsiv, Touchierung; Median: 11 μm , unteres Quartil: 56 μm , oberes Quartil: 173 μm) zeigten auch bei den aggregierten Daten deutlich geringere Randspalttiefen und unterschieden sich somit statistisch signifikant von den Gruppen A und B (jeweils $p < 0,001$; *Mann-Whitney-U-Test*).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die aggregierten Daten sowohl in der Fläche der Sekundärkaries, der Fläche der Primärkaries, der Tiefe des Randspaltes als auch bezüglich der asymptotischen p-Werte den Doppelmessungen entsprechen.

6. Diskussion

Karies ist eine der am weitesten verbreiteten Erkrankungen und kommt bei etwa 99% der deutschen Erwachsenen vor (Schiffner und Reich, 1999). In den letzten Jahren konnte jedoch ein deutlicher Kariesrückgang in allen Altersklassen festgestellt werden, insbesondere ist bei Kindern im Vergleich zur DMS III aus dem Jahr 1997 ein Rückgang der Karieserfahrung um 58,8% (von 1,7 auf 0,7 Zähne) festzustellen. Der Kariesanierungsgrad hingegen liegt bei Kindern und Jugendlichen trotz allem auf hohem Niveau (zwischen 78,1% und 79,8%) und bei Erwachsenen und Senioren mit etwa 95% sogar auf außerordentlich hohem Niveau (Schiffner und Micheelis, 2006). Sekundärkaries stellt weiterhin die häufigste Ursache für den Ersatz von Füllungen dar. Dieser wiederum nimmt knapp 2/3 der Behandlungszeit deutscher Zahnärzte in Anspruch und verursacht enorme Kosten im Gesundheitssystem. Es ist daher notwendig, nach neuen Therapieansätzen zu suchen, um die Langlebigkeit von zahnärztlichen Restaurationen zu gewährleisten und Karies weiter einzudämmen.

Ein möglicher Ansatz zur Sekundärkariesprävention besteht in der Anwendung von Fluorid vor der Füllungslegung. Diese Art Imprägnierung der Kavität soll die Sekundärkariesentwicklung an Füllungsrandspalten inhibieren. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit das kariesinhibierende Potenzial eines kommerziell erhältlichen *Dentin-Versiegelungsliquids* (DVL, Humanchemie GmbH, Alfeld/Leine, Deutschland) auf Fluoridbasis in einem biofilmbasierten In-vitro-Kariesmodell untersucht.

6.1 Diskussion der Ergebnisse

Dentin kann aufgrund seiner Oberflächenstruktur nach lokaler Fluoridapplikation große Mengen an Fluorid anreichern. Kleine fluoridhaltige Globuli, deren Größe zwischen 2 – 20 nm beträgt, präzipitieren je nach Art des Fluoridierungsmittels in einer Schichtdicke zwischen 0,2 und 2 µm (Nelson et al., 1983; Petzold et al., 2000). Diese Eigenschaft macht sich auch das DVL zu Nutze. *Knauer* fand heraus, dass die Größe der Kalziumfluoridkristalle nach Ausfällung des DVL nur 5 nm beträgt, sodass die fluoridhaltigen Globuli besonders tief in das Dentin eindringen können und dadurch

effektiv vor Karies schützen sollen (Knauer, 2004). Bis heute liegen kaum wissenschaftliche Untersuchungen zur Fluoridaufnahme nach Applikation von Magnesiumfluorosilikat und Kupfer(II)-Fluorosilikat mit anschließender Fluoridfällung durch Kalziumhydroxid vor. Kürzlich untersuchten *Buchalla et al.* die Fluoridaufnahme von demineralisiertem Schmelz durch das Produkt *Tiefenfluorid* der Humanchemie GmbH (Buchalla et al., 2007a).

Die Zusammensetzung der Produkte *Tiefenfluorid* und *Dentin-Versiegelungsliquid* (Humanchemie GmbH, Alfeld/Leine, Deutschland) ähneln einander sehr und die Wirkweise basiert auf den gleichen Mechanismen. *Buchalla et al.* fanden heraus, dass die Tiefenfluoridierung zwar zu einer starken Anreicherung von löslichem und strukturell gebundenem Fluorid auf der Oberfläche des demineralisierten Schmelzes führt, dass aber dennoch kein signifikanter Unterschied zur Wirkung von vergleichbaren Fluoridpräparaten besteht. Zudem konnte auch keine höhere Fluoridanreicherung in der Tiefe der Initialläsion nachgewiesen werden (Buchalla et al., 2007a).

Nach den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie konnte ebenfalls kein signifikanter Schutz vor einer Sekundärkariesbildung durch die Anwendung des DVL in einer dentinbegrenzten Kavität festgestellt werden. Bei den Gruppen mit Adhäsivsystem (Gruppen C und D) entstand signifikant weniger Sekundärkaries im Vergleich zu den Gruppen ohne Adhäsivsystem (Gruppen A und B). Dies ist vermutlich auf die Verwendung des Adhäsivsystems und die damit verbundene Oberflächenversiegelung bzw. durch den optimierten Verbund zwischen Komposit und Dentin zurückzuführen, der das Entstehen von Randspalten minimiert. Durch die Verwendung des DVL konnte weder bei den Gruppen mit Adhäsivsystem noch bei den Gruppen ohne Adhäsivsystem eine Inhibition der Sekundärkaries nachgewiesen werden.

Vom DVL scheint also kein relevanter inhibierender Effekt auf die Sekundärkariesbildung auszugehen. Setzt man voraus, dass Fluorid prinzipiell eine kariesprophylaktische Wirkung besitzt (Fischer et al., 1995; Keyes und Englander, 1975; ten Cate und Duijsters, 1983), muss hinterfragt werden, warum sich die Entstehung von Sekundärkaries nicht durch die Applikation einer fluoridhaltigen Lösung vor dem Legen einer Kompositfüllung verhindern lässt.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass fluoridfreisetzende Glasionomermemente bei Kontakt mit einer lokalen Fluoridquelle Fluorid anreichern und dieses stetig an die umliegende Zahnhartsubstanz abgeben. Das führt zu einer Hypermineralisation der angrenzenden Zahnhartsubstanz mit Demineralisationsresistenz (ten Cate et al., 1998)

und schützt so nachweislich vor Sekundärkaries (Davidson, 1998; Han et al., 2002a). Im Gegensatz dazu kommt es nach einmaliger Applikation eines fluoridhaltigen Präparates in die Kavität mit der Zeit zur Erschöpfung des Fluoridreservoirs. Bei andauerndem Einwirken kariogener Noxen kann der Demineralisationsprozess nicht verhindert werden. Als Folge bildet sich Sekundärkaries entlang des Füllungsrandes aus.

Ein weiterer Erklärungsversuch für die reduzierte Wirkung des Fluoridproduktes ergibt sich aus der Art der Anwendung. Die Touchierung erfolgt vor der Dentinkonditionierung, sodass durch das anschließende Ätzen mit 37%iger Phosphorsäure die Wirkung des Fluorids verloren gehen könnte.

Die Primärkariesfläche wurde in diesem In-vitro-Versuch als diejenige Fläche definiert, deren Abstand mehr als 200 µm vom Kavitätenrand beträgt. Die Primärkariesfläche wurde als Kontrollmessung eingesetzt, um festzustellen, ob alle Gruppen einem ähnlichen Kariesangriff ausgesetzt waren.

Erwartungsgemäß dürften keine signifikanten Unterschiede in der Größe der Primärkariesfläche zwischen den Gruppen auftreten. Umso überraschender ist, dass sich die Gruppen A und C sowie die Gruppen B und C zueinander jeweils signifikant voneinander unterscheiden. Anhand der Ergebnisse wird jedoch auch deutlich, dass sich die Gruppen ohne Adhäsivsystem (Gruppen A und B) und die Gruppen mit Adhäsivsystem (Gruppen C und D) in ihrem Randspaltverhalten ähneln. Durch die vermehrten Randspalten bei den Gruppen A und B könnte die Keimbesiedlung begünstigt worden sein, sodass die Plaque schneller eine kritische Masse erreicht und die Demineralisation entsprechend früher einsetzen konnte. Für diese Vermutung konnte aufgrund des Studiendesigns kein Beweis durchgeführt werden.

Einen weiteren Erklärungsansatz für die Unterschiede in der Größe der Primärkariesfläche zwischen den Gruppen mit und denen ohne Adhäsivsystem bietet die Anwendung des Adhäsivsystems. Dieses wird nach Applikation verblasen und verteilt sich dadurch unkontrolliert auch über den Kavitätenrand hinaus. Das benetzte Dentin außerhalb der Kavität könnte dadurch ebenfalls stärker vor kariogenen Noxen geschützt sein. Zusätzlich zum Versiegelungseffekt kommt es durch die antibakteriellen Eigenschaften des Optibond FL-Primers (Baseren et al., 2005) möglicherweise zu einer verzögerten Besiedelung und damit zu weniger Primärkaries.

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob die Applikation hoher Fluoridkonzentrationen in die Kavität zu einer verstärkten Randspaltbildung führt. Dies hätte zur Konsequenz, dass sich durch die ungünstigen Bedingungen im Randspalt zwischen Dentin und Füllungsmaterial eine besonders hohe Dichte kariogener Keime bildet und so das Risiko für die Entstehung von Sekundärkaries gefördert wird.

Durch die Anwendung von Fluoriden kommt es zum Verschluss der Dentintubuli durch die Fluoridglobuli (vergleiche Kapitel 2.2.2), sodass das Eindringen des Primers und des Adhäsivs in das Kollagengeflecht verhindert und damit der Verbund zwischen Komposit und Dentin verschlechtert werden könnte. Daher erscheint es möglicherweise sinnvoll, eine Fluoridapplikation vor dem Legen einer Kompositfüllung zu unterlassen. Diese These konnte allerdings in dieser Studie nicht belegt werden. Zwar zeigten die Gruppen ohne Adhäsivsystem (Gruppen A und B) signifikant größere Randspalttiefen verglichen mit den Gruppen, bei denen ein Adhäsivsystem zur Anwendung kam (Gruppe C und D), jedoch waren keine signifikanten Unterschiede in der Tiefe des Randspaltes bei der zusätzlichen Verwendung des DVL zu verzeichnen.

Warum die Verwendung des DVL nach den Ergebnissen dieser Studie keinen signifikanten Einfluss auf die Ausbildung von Randspalten hatte, könnte durch die Art der Anwendung des DVL erklärt werden. Die Doppeltouchierung soll nach Angaben des Herstellers vor der Dentinkonditionierung erfolgen. Nach der Fluoridapplikation erfolgt die Ätzung mit 37%iger Phosphorsäure. Diese führt zum Auflösen des smear layer auf der Dentinoberfläche, was das Herauslösen der Mineralien aus dem Kollagengeflecht zur Folge hat und so die Tubuluseingänge öffnet (Pashley, 1992b). Dieser Vorgang stellt die entscheidende Grundlage für einen adäquaten Verbund zwischen Zahn und Komposit dar und scheint nicht durch die zuvor applizierte Touchierlösung beeinflusst zu werden.

Die signifikanten Unterschiede in der Randspalttiefe beim Vergleich der Gruppen A und B mit den Gruppen C und D sind auf die Verwendung des Adhäsivsystems zurückzuführen. Durch die Konditionierung des Dentins in den Gruppen C und D kann ein mikromechanischer Verbund zwischen Zahn und Komposit hergestellt werden, der die Ausbildung von Randspalten minimiert. Dennoch stellt der Verbund zwischen Dentin und Komposit eine der größten Herausforderungen in der zahnärztlichen Forschung dar, denn bekanntermaßen ist die ausgeprägte Polymerisationsschrumpfung der größte Nachteil der Komposite und führt im Dentinbereich regelmäßig zu Randspalten (Gladys et al., 2001).

Die durch Knappwost propagierte „kariesprophylaktische Wirkung kleinster Cu-Konzentrationen“ (Bonsack und Knappwost, 1954; Knappwost und Knauer, 1999) konnte hinsichtlich der Ergebnisse dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Ob die Konzentration an Kupferionen in dem Präparat zu niedrig ist, um „dauerhaft“ (Knappwost und Knauer, 1999) eine bakterizide Wirkung zu entfalten, konnte aufgrund des Studiendesigns nicht evaluiert werden. Die Angabe „dauerhaft desinfizierende“ Wirkung, wie sie im Informationsbrief über das DVL von der Humanchemie GmbH angepriesen wird, ist zudem nicht näher spezifiziert und nicht durch die Angabe von Quellen belegt.

6.2 Diskussion von Material und Methode

6.2.1 In-vitro-Untersuchung

Die Vorteile von In-vitro-Studien gegenüber In-vivo- und In-situ-Experimenten bestehen darin, dass die Untersuchungen nicht die Compliance der Patienten erfordern und individuelle Einflüsse (Mundhygiene, Mundöffnung, Speichelzusammensetzung, Ernährungsgewohnheiten, Kaudruck) ausgeschaltet werden. In-vitro-Untersuchungen ermöglichen die Anwendung destruktiver Testverfahren, wie z. B. die Auswertung der Proben unter dem CLSM nach Anfertigung von Zahnschliffen, bei denen die Zähne für die mikroskopische Beurteilung zerstört werden müssen.

In-vitro-Studien können allerdings nur bedingt Aufschluss über die Eignung von Füllungsmaterialien, desinfizierenden oder protektiv wirksamen Lösungen geben. Die tatsächliche Wirksamkeit kann streng genommen nur durch klinisch kontrollierte Experimente am Menschen in seinem jeweiligen sozialen Umfeld ermittelt werden. Aus ethischer Sicht sind Experimente, wie sie beispielsweise in der *Vipeholm-Studie* durchgeführt wurden (Gustafsson et al., 1954), nicht vertretbar. Daher kam für diese experimentelle Untersuchung ein Kariesmodell zur Anwendung, das die natürlichen Bedingungen der Mundhöhle weitestgehend imitiert. Das heißt, dass die zu testenden Zahnhartsubstanzen in einem feucht-warmen Milieu einer kariogenen Bakterienflora sowie Speichel in seiner natürlichen Zusammensetzung ausgesetzt waren. Es lassen sich alle vier ätiologischen Faktoren der Karies (Wirt, Substrat, Mikroorganismen, Zeit) darstellen (Seemann et al., 2005a), jedoch mit dem Nachteil, dass die Auswirkungen der komplexen Bedingungen in der Mundhöhle, wie Unterschiede im Verhalten (Ernährung, Mundhygiene usw.) und in der Ausprägung von Wirtsfaktoren (Speichelzusammensetzung, Mundflora usw.), nicht berücksichtigt werden können. Außerdem stellt der Einsatz einer Monokultur von *S. mutans* eine starke Vereinfachung des sonst so komplex zusammengesetzten Mundhöhlenmilieus dar.

Ein weiteres Problem birgt die Handhabung des Systems. Erst durch eine ausführliche Instruktion kann ein störungsfreier Ablauf garantiert und eine Fremdkontamination verhindert werden.

6.2.2 Auswahl der Zähne

Um Kariesfreiheit zu garantieren, wurden ausschließlich extrahierte, retinierte dritte Molaren verwendet.

Das „Alter“ der Zähne war nicht bekannt. Es könnten daher altersbedingte Strukturunterschiede der Testzähne vorliegen. *Mixson* konnte jedoch zeigen, dass trotz großer Altersunterschiede zwischen den Zähnen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Qualität des Randschlusses im Dentin auftraten (*Mixson et al.*, 1993). Zudem kann durch die randomisierte Aufteilung von einer gemischten Zusammensetzung der vier Gruppen ausgegangen werden.

Natürlich können auch interindividuelle Unterschiede in der Zahnhartsubstanzstruktur zu unterschiedlich stark ausgeprägten Läsionen führen. *Seemann* demonstrierte jedoch in mehreren Experimenten und an verschiedenen Zahnproben, dass bei der Verwendung der künstlichen Mundhöhle reproduzierbare Läsionstiefen auftreten. Auch die Platzierung auf dem Probenrad ergab keine signifikanten Unterschiede in der Kariesentstehung, sodass der Forderung nach Reproduzierbarkeit entsprochen wird (*Seemann et al.*, 2005a).

6.2.3 Kavitätenpräparation

Für Kompositfüllungen wird keine makromechanische Retentions- und Widerstandsform benötigt. Durch die Anwendung der Adhäsivtechnik können die Kavitäten unter maximaler Zahnhartsubstanzschonung präpariert werden.

In der vorliegenden Studie wurden leicht konische, etwa 2 mm x 3 mm x 1,5 mm (B x L x T) große, einflächige Kavitäten präpariert, die vollständig von Dentin begrenzt waren. Diese Präparationsform ließ sich verhältnismäßig einfach standardisieren. Trotzdem kam es vor, dass einige Füllungen nicht vollständig von Dentin umgeben waren und zum Teil an Schmelz grenzten. Die dünne Schmelzschicht war erst im demineralisierten Zustand nach Versuchsende sichtbar, sodass diese Proben nicht ausgewertet werden konnten. Da dieser Fehler zufällig auftrat, kann dennoch von einer repräsentativen Auswertung der einzelnen Gruppen ausgegangen werden.

6.2.4 Fülltechnik und Polymerisation

Die Proben wurden in 4 Gruppen aufgeteilt und unter unterschiedlichen Bedingungen mit dem Hybridkomposit Z100 gefüllt. Auf die Anwendung des Adhäsivsystems wurde in den Gruppen A und B verzichtet, um selbst bei einem „worst-case“-Szenario die Wirkung der kupferdotierten Fluoridlösung zu untersuchen.

Für die Durchdringungstiefe lichthärtender Komposite ist neben den materiellen Eigenschaften des Komposits (Zusammensetzung und Farbe) v. a. die Intensität, die Wellenlänge und die Einwirkdauer des Lichtes von Bedeutung (Reinhardt, 1991a; Yearn, 1985). Die in dieser Studie verwendete Polymerisationslampe führt laut Herstellerangaben mit einer Wellenlänge von 470 nm zur sicheren Aushärtung bei Schichtstärken bis zu 2 mm. Daher konnte auf ein Mehrschichtverfahren verzichtet werden, das bei größeren Kavitäten zur vollständigen Aushärtung der einzelnen Schichten und damit zur Reduktion der Polymerisationsschrumpfung und zur Verbesserung der marginalen Integrität beiträgt (Lutz et al., 1986; Tjan et al., 1992). Durch das Einschichtverfahren, das insbesondere bei okklusalen Füllungen angewendet wird, kommt es zu einem sehr ungünstigen c-Faktor, der Grund für das Auftreten von vermehrten Randspalten sein kann (Feilzer et al., 1987). Zudem wurde die vom Hersteller vorgegebene Polymerisationszeit von 20 s überschritten. Es kann bei einer verlängerten Polymerisationszeit zu einer stärkeren Schrumpfung und damit zu Randspalten kommen (Yoshikawa et al., 2001). Ziel der Studie war es aber herauszufinden, ob selbst bei bestehendem Randspalt eine Inhibition der Sekundärkariesbildung durch die kupferdotierte Fluoridlösung erreicht wird.

6.2.5 Möglicher Einfluss des verwendeten Dentinadhäsivs

Das System Optibond FL zeichnet sich durch hohe und stabile Haftwerte mit geringer Streuung der Messwerte aus (Asmussen und Peutzfeldt, 2003). Es wird daher häufig, wie auch in dieser Studie, als Referenzprodukt eingesetzt.

Der Primer von Optibond FL zeigte in Untersuchungen von *Baseren* die stärkste antibakterielle Wirkung seiner Versuchsgruppe gegenüber *S. mutans* und *L. casei* (Baseren et al., 2005) und kann selbst bei versehentlich kontaminierten oder feuchten Kavitäten zusammen mit dem Optibond FL Bond zuverlässig eingesetzt werden

(Grande et al., 2005). Es wurde bereits in anderen Studien gezeigt, dass Füllungen unter der Verwendung von Optibond FL einen besonders guten Randschluss im Schmelz aufweisen, jedoch im Dentin eine vergleichsweise erhöhte Randspaltbildung vorliegt (Peschke et al., 2000). Dennoch erzielte Optibond FL die höchsten Haftwerte im Vergleich mit anderen Mehrschrittadhäsivsystemen (Haller, 1998).

Optibond FL zählt zu den Etch-and-Rinse-Bondingsystemen, die in drei Arbeitsschritten appliziert werden. Verarbeitungsfehler seitens des Behandlers stellen daher den entscheidenden Nachteil gegenüber selbstkonditionierenden Adhäsivsystemen dar. So führt beispielsweise ein zu langes Ätzen und zu starke Trocknung des Dentins sowie zu exzessives Verblasen des Primers zu schlechteren Haftwerten (Frankenberger, 2002; Frankenberger et al., 2000; Peschke et al., 2000). In dieser Studie wurden die einzelnen Schritte gemäß den Herstellerangaben sorgfältig und gleichmäßig durchgeführt, um Verarbeitungsfehler zu vermeiden.

6.2.6 Füllungsmaterial

Bei dem verwendeten Z100 handelt es sich um ein zahnfarbendes plastisches Füllungsmaterial der Firma 3M ESPE, dessen Eignung für den Einsatz im Seitenzahnggebiet bereits erwiesen ist (Beun et al., 2007). Die besonders guten physikalischen Eigenschaften, insbesondere der hohe Elastizitätsmodul, zeichnen dieses Hybridkomposit aus (Beun et al., 2007; Ilie et al., 2005). Z100 dient daher häufig als Referenzsubstanz für wissenschaftliche Untersuchungen.

6.2.7 *Dentin-Versiegelungsliquid* (Humanchemie GmbH)

Das *Dentin-Versiegelungsliquid* (DVL) ist ein kommerziell erhältliches Präparat der Humanchemie GmbH (Alfeld, Deutschland), das aus zwei Komponenten besteht, die nacheinander in die unbehandelte Kavität appliziert werden. Die erste Komponente setzt sich insbesondere aus Magnesiumfluorosilikat und Kupfer(II)-Fluorosilikat in hoher Konzentration bei niedrigem pH-Wert (pH 2) zusammen, während die zweite Komponente Kalziumhydroxid enthält. Die erste Lösung des DVL, die Touchierlösung,

dringt in die Poren der Zahnhartsubstanz ein. Beim Nachtouchieren mit der zweiten Lösung, dem Fällungsmittel, soll das enthaltene Kalziumhydroxid-hochdispers auch innerhalb der Dentinporen mit dem Fluorosilikat-Komplex der ersten Lösung unter Bildung von nur 5 nm großen Kalziumfluoridkristallen sowie Magnesiumfluorid- und wenig Kupferhydroxyfluoridkristallen sowie Kieselsäure-Gel reagieren (Knauer, 2004). Es wird vermutet, dass bei dieser Vorgehensweise mehr Kalziumfluorid in der Zahnhartsubstanz angereichert wird als bei einer einfachen Natriumfluoridapplikation. Allerdings untersuchten *Buchalla* et al. in einer Studie die Wirkung des Präparates *Tiefenfluorid* der Humanchemie GmbH, welches auf dem gleichen Wirkprinzip wie das DVL beruht und eine sehr ähnliche Zusammensetzung aufweist. In dieser Studie konnte *Buchalla* et al. konnten zeigen, dass die so genannte Tiefenfluoridierung zwar zu einer ausgeprägten Anreicherung einer Kalziumfluoriddeckschicht (KOH-lösliches Fluorid) und strukturell gebundenem Fluorid führt, diese sich aber nicht von einer Natriumfluoridapplikation mit gleich hohem Fluoridgehalt und pH-Wert unterscheidet, und dass eine höhere Fluoridanreicherung in der Tiefe einer Initialläsion nicht nachgewiesen werden konnte. Die empfohlene Fluoridfällung (Nachtouchierung) scheint nach *Buchalla* et al. ebenfalls keinen zusätzlichen Nutzen zu haben (*Buchalla* et al., 2007b).

Trotz allem ist zu erwarten, dass die Verwendung des DVL zu einer Kariesreduktion im Vergleich zu unbehandeltem Dentin führt. In zahlreichen Studien wurde bereits die Wirksamkeit von Fluorid als Kariostatikum beschrieben (vergleiche Kapitel 2.2).

Zusätzlich sollen Kupferverbindungen, die in der ersten Touchierlösung vorhanden sind, die Kavität desinfizieren und so vor Sekundärkaries schützen. Durch die erste Touchierung wird ein sehr dünner Film in die Kavität eingebracht, der, so *Knappwost*, durch das alkalische Milieu der Nachtouchierung eine bis zu 100-fach stärkere Desinfektionskraft ausbildet als reines $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Diese Wirkung geht aus der Bildung des extrem schwer löslichen Kupfersulfids hervor und wirkt polyvalent bakterizid (*Knappwost* und *Knauer*, 1999).

Dieser Wirkmechanismus wird ebenfalls bei der Depotelektrophorese zur Wurzelkanalbehandlung angeführt. Die DGZMK zweifelt jedoch die Wirksamkeit des Verfahrens an (*Hülsmann*, 2000).

6.2.8 Ausarbeitung und Politur

Durch die Politur und Ausarbeitung einer Kompositfüllung ist es möglich, eventuelle Überschüsse zu entfernen und eine Glättung der Oberfläche zu erzielen. Dies steigert die Ästhetik und erschwert gleichzeitig die Plaqueanlagerung, sodass der Entstehung von Parodontopathien und Sekundärkaries entgegengewirkt werden kann (Chen et al., 1988).

Bei der lichtinduzierten Härtung von Kompositen bildet sich auf der Oberfläche eine etwa 25 – 100 µm dicke Schicht, die *Sauerstoffinhibitionsschicht*, die durch eine geringere Härte aufgrund eines erhöhten Restdoppelbindungsgehaltes, schlechtere physikalische Eigenschaften sowie eine erhöhte Farbstoffaufnahme gekennzeichnet ist (Reinhardt, 1991b). Die Politur erfolgte daher unter direkter Sicht mit flexiblen, aluminiumoxidbeschichteten Scheiben mittlerer, feiner und sehr feiner Körnung (Sof-Lex, 3M Espe, Seefeld). Dadurch sollte ein gleichmäßiges Abtragen von Füllkörpern und organischer Matrix gewährleistet werden.

Eine solche in vitro vorgenommene Politur der Proben lässt sich nicht ohne Weiteres auf die klinische Situation übertragen speziell im approximalen Kasten von Klasse-II-Füllungen, wo keine direkte Sichtkontrolle möglich ist und eine korrekte Ausarbeitung durch Nachbarzähne oder durch die gingivalen Verhältnisse erschwert wird.

Das Ziel der vorliegenden Studie bestand jedoch nicht darin, die Qualität von Polierverfahren unter simulierten klinischen Bedingungen zu untersuchen, sondern es sollte die Wirksamkeit der kupferdotierten Fluoridtouchierlösung evaluiert werden.

6.2.9 Feuchtlagerung

Die Probenzähne lagerten zwischen den verschiedenen Arbeitsschritten in Leitungswasser (0,1 mg/l Fluorid), um eine Austrocknung der Zahnhartgewebe zu verhindern. Nach dem Legen der Kompositfüllungen wurden die Proben erneut 48 Stunden bei Raumtemperatur in Leitungswasser (0,1 mg/l Fluorid) aufbewahrt. Der durch die Polymerisationsschrumpfung bedingte Volumenverlust des Komposits konnte so teilweise durch hygroskopische Expansion kompensiert und der interne Stress reduziert werden (Hansen und Asmussen, 1989; Koike et al., 1990).

6.2.10 Thermische Wechselbelastung

Die Zähne sind in vivo durch die Zufuhr von heißen und kalten Speisen und Getränken permanenten Temperaturschwankungen ausgesetzt. Bedingt durch den unterschiedlichen thermischen Expansionskoeffizienten von Dentin und Komposit kommt es bei einer Temperaturwechselbelastung zu ungleichen Volumenänderungen und dadurch zu mechanischen Ermüdungserscheinungen an der Verbundgrenze. Komposit dehnt sich bei Erwärmung stärker aus als Dentin und bei Abkühlung kontrahiert er sich etwa 3- bis 8,5-mal stärker als die Zahnhartsubstanz (Janda, 1988). Dies führt vor allem am Übergang vom Komposit zum Zahn zu Spannungen und ist für das Entstehen von Randspalten verantwortlich (Ehrenberg et al., 2006; Gale und Darvell, 1999).

Um die Proben auch in vitro entsprechenden Belastungen auszusetzen, wurden sie über 2000 Zyklen einer Temperaturdifferenz von 50 °C exponiert. Dabei verweilten sie jeweils 30 s in 55 °C warmem bzw. 5 °C kaltem Wasser. Die thermische Wechselbelastung ist im Gegensatz zur alleinigen Wasserlagerung als realistische Beurteilungsmethode anerkannt und für Langzeitprognosen eine wichtige Voraussetzung (Blunck, 1988; Crim et al., 1985), wobei der Einfluss des Temperaturwechselbades nach *Roulet* nicht überbewertet werden sollte. Das klinische Verhalten von Kompositen sei nur bedingt vorhersagbar und ein Verzicht auf In-vivo-Studien unmöglich (Roulet, 1987).

6.2.11 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) wurde in den vergangenen Jahren immer häufiger im zahnärztlich-wissenschaftlichen Bereich eingesetzt. Als non-invasive und non-destruktive Methode ermöglicht sie eine dreidimensionale Rekonstruktion der zu untersuchenden Zellen oder Gewebe mit hoher Auflösung. Damit stellt sie eine gute Möglichkeit dar, zahnärztliche Materialien, Karies und Dentin zu untersuchen (Zhang und Li, 2007). Anhand des von *Fontana* et al. entwickelten und auch von *Sá* et al. angewendeten Verfahren konnten durch die Nutzung der CLSM-Technik in der vorliegenden Arbeit die Tiefe des Randspaltes sowie die Tiefe und Fläche der Primär- und Sekundärkaries bestimmt werden (Fontana et al., 1996; *Sá* et al., 2004). Die

Methode von *Fontana* et al. wurde allerdings nach *Seemann* dahingehend modifiziert, dass kein Anfärben erfolgte (Seemann et al., 2005a; Seemann et al., 2005b).

7. Schlussfolgerungen

Aus den Ergebnissen der vorliegenden In-vitro-Studie lässt sich keine signifikante kariesinhibierende Wirkung des *Dentin-Versiegelungsliquids* (DVL, Humanchemie GmbH, Alfeld/Leine) nachweisen. Trotz der im Produkt enthaltenen Kupferionen und des hohen Fluoridgehaltes führte die Verwendung nicht zur Inhibition von Sekundärkaries am Kavitätenrand von dentinbegrenzten Kompositfüllungen.

Die geringste Sekundärkariesbildung zeigte sich in den Gruppen, in denen ein Adhäsivsystem in Verbindung mit 37%iger Phosphorsäure angewendet wurde. Die zusätzliche Applikation des DVL bewirkte keine Verbesserung der Ergebnisse, sondern stellt nur einen zusätzlichen Kosten- und Zeitaufwand dar.

Allerdings ergaben die Ergebnisse auch, dass die Verwendung des Produktes und damit die Anwendung hoher Fluoridkonzentrationen vor der Dentinkonditionierung und vor dem Legen einer Kompositfüllung nicht zur Bildung von tieferen Randspalten führte. Das DVL scheint somit die Funktion des Adhäsivsystems nicht nachteilig zu beeinflussen.

8. Zusammenfassung

Der Austausch von Füllungen nimmt den größten Teil der Behandlungszeit von Zahnärzten in Anspruch. Sekundärkaries an Randspalten wird dabei maßgeblich verantwortlich gemacht.

Während sich der überwiegende Teil der Forschung mit Sekundärkaries im Schmelz beschäftigt, liegen nur wenige wissenschaftliche Arbeiten über Sekundärkaries im Dentin und über die Wirksamkeit präventiver Maßnahmen im Dentin, beispielsweise der Applikation von Fluorid, vor. Gegenstand der vorliegenden Studie in einem biofilmbasierten In-vitro-Kariesmodell war es daher, das kariespräventive Potenzial eines fluoridhaltigen Produktes zu untersuchen, das vor der Füllungslegung in die unbehandelte Kavität appliziert wird. Das *Dentin-Versiegelungsliquid* (DVL, Humanchemie GmbH, Alfeld/Leine) besteht aus einem Fluoridpräparat (43.500 ppm F⁻ als Magnesiumfluorosilikat, Kupfersulfat und Natriumfluorid, pH 2; Touchierlösung) und einer Ca(OH)₂-Lösung (Nachtouchierlösung). Beide Lösungen werden konsekutiv aufgetragen. Durch eine kontinuierliche Fluoridabgabe und durch die antibakterielle Wirkung der Kupferionen soll das DVL dauerhaft vor einer Sekundärkariesentwicklung schützen.

Ziel der Studie war es daher zu untersuchen, ob das DVL die Ausbildung von Sekundärkariesläsionen an Kavitätenwänden im Bereich von Füllungsrandspalten inhibieren kann und ob das DVL die Wirksamkeit eines Adhäsivsystems negativ beeinflusst.

Dazu wurden 120 dentinbegrenzte und mit einem Komposit versorgte Kavitäten dem kariogenen Milieu eines In-vitro-Kariesmodells ausgesetzt. Die Zähne wurden zufällig auf 4 Gruppen verteilt. Die Proben der Gruppe A dienten als Kontrollgruppe. Sie wurden ohne die Anwendung des DVL und ohne Verwendung eines Adhäsivsystems mit Komposit gefüllt, was zu einer Randspaltbildung mit Sekundärkariesentwicklung führte. Die Zähne der Testgruppen wurden vor der Füllungslegung folgendermaßen behandelt:

Gruppe B: DVL ohne Adhäsivsystem

Gruppe C: kein DVL, aber Anwendung eines Etch-and-Rinse-Adhäsivsystems

Gruppe D: DVL und Anwendung eines Etch-and-Rinse-Adhäsivsystems

Nach Thermocycling (2000 Zyklen, 5 °C und 55 °C, 30 s Tauchzeit), das durchgeführt wurde, um Randspalten zu induzieren, wurden die Proben sterilisiert und für 18 Tage einem kariogenen Biofilm aus *Streptococcus mutans* ausgesetzt. Nach Anfertigung von Zahnschliffen wurde das Ausmaß der Demineralisation im Randbereich der Füllungen sowie die Tiefe des Randspaltes in einem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop bestimmt.

In den Gruppen ohne Adhäsivsystem (Gruppe A und B) entstanden wie erwartet signifikant tiefere Randspalten und dadurch auch signifikant mehr Sekundärkaries (*Mann-Whitney-U-Test*, $p < 0,05$) im Vergleich zu den Gruppen C und D, bei denen ein Adhäsivsystem zur Anwendung kam. Die Applikation des DVL vor der Adhäsivtechnik führte dabei in der gewählten Versuchsanordnung nicht zu tieferen Randspalten, jedoch konnte durch die Verwendung des DVL auch keine Inhibition der Sekundärkaries erreicht werden.

Aus den Ergebnissen dieser In-vitro-Studie lässt sich kein signifikanter Schutz vor Sekundärkaries durch das DVL ableiten, sodass auf Basis der vorliegenden Daten keine Praxisempfehlung für die Anwendung vor der Adhäsivtechnik in dentinbegrenzten Kavitäten ausgesprochen werden kann.

9. Summary

Purpose: The aim of this study was to evaluate the preventive effect of fluoride precipitation with calcium hydroxide on secondary caries in a bacterial based in vitro caries model.

Methods: Caries-free, retained wisdom teeth were randomly divided into four groups (n=30). The enamel was cut off and cylindrical cavities 3 mm in diameter and 1,5 mm in depth were prepared on each dentine surface. The cavities of Group A and B were restored with composite (Z100) only. A fluoride solution (43,500 ppm F⁻ as magnesium fluorosilicate, copper sulphate and sodium fluoride, pH 2; *Dentin-Versiegelungsliquid* primary application solution, Humanchemie) and a Ca(OH)₂ solution (*Dentin-Versiegelungsliquid* secondary application solution, Humanchemie) were applied in group B before the insertion of the composite. Group C and D were restored according to the manufacturers' instructions with phosphoric acid etching and the adhesive/composite system (Optibond FL/ Z100). The cavities of Group D were also treated with the fluoride and Ca(OH)₂ solution (*Dentin-Versiegelungsliquid* primary and secondary application solutions, Humanchemie) before etching and inserting the adhesive/composite system. After thermo-cycling, the specimens were exposed to a cariogenic *Streptococcus mutans* biofilm in an artificial mouth model for 18 days. After cutting the cavities, the depths of demineralization along the fillings were measured on serial sections by confocal laser scanning microscopy. The depth of the marginal leakage was also measured to evaluate if the use of fluorides influences the marginal adaption of composites to dentine.

Results: A significant difference in the demineralization area and the marginal integrity could be found between Group A and B (no adhesive system used) compared to Group C and D (use of phosphoric acid and an adhesive system). The marginal leakage and the demineralization was significantly higher in the Groups A and B (p < 0,05; Mann-Whitney Test) compared to the Groups C and D. The marginal adaption was not influenced by the DVL, but the use of the DVL did not help to prevent secondary caries in dentine either.

Conclusion: The study demonstrated that an additional precipitation reaction with Ca(OH)₂ following fluoridation does not significantly prevent secondary caries in

dentine. Based on the present in vitro data, the best results were achieved by using the adhesive/composite system according to the manufacturers' instructions.

10. Literaturverzeichnis

Arends C (1969) *Zahnkaries und Speichel*. Hanser, München.

Arends J, Jongebloed WL (1977) The enamel substrate-characteristics of the enamel surface. *Swed Dent J* 1(6):215-24.

Asmussen E, Peutzfeldt A (2003) Short- and long-term bonding efficacy of a self-etching, one-step adhesive. *J Adhes Dent* 5(1):41-5.

Axelsson P, Lindhe J (1978) Effect of controlled oral hygiene procedures on caries and periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol* 5(2):133-51.

Baseren M, Yazici AR, Ozalp M, Dayangac B (2005) Antibacterial activity of different generation dentin-bonding systems. *Quintessence Int* 36(5):339-44.

Beun S, Glorieux T, Devaux J, Vreven J, Leloup G (2007) Characterization of nanofilled compared to universal and microfilled composites. *Dent Mater* 23(1):51-9.

Blunck U (1988) Rastermikroskopische Beurteilung von Kompositfüllungen im Dentin in vitro. *Dtsch Zahnärztl Z* 43(8):939-43.

Blunck U (2005) Adhäsivsysteme. *ZAHN PRAX* (8):752-759.

Bonsack C, Knappwost A (1954) [The fluoride supplementing effect of copper in local caries therapy.]. *Dtsch Zahnärztl Z* 9(1):33-4.

Botha FS, Botha SJ, Kroon J, Steyn PL (2001) Caries prediction factors in children with primary dentition. *Sadj* 56(8):348-52.

Bowden GH (1990) Microbiology of root surface caries in humans. *J Dent Res* 69(5):1205-10.

Bratthall D, Hansel-Petersson G, Sundberg H (1996) Reasons for the caries decline: what do the experts believe? *Eur J Oral Sci* 104(4):416-22; discussion 423-5, 430-2.

Buchalla W, Lennon AM, Trage K, Becker K, Attin T (2007a) Schmelz-Fluoridaufnahme nach Fluoridierung und Fluoridfällung. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 117(2):118-22.

Buchalla W, Wiegand A, Lennon AM, Trage K, Becker K, Attin T (2007b) Fluoridaufnahme in demineralisierten Schmelz nach Fluoridierung und Fluoridfällung. *Dtsch Zahnärztl Z* 62(5):301-7.

Burke EJ, Qualtrough AJ (1994) Aesthetic inlays: composite or ceramic? *Br Dent J* 176(2):53-60.

Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP (1993) Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res* 72(1):37-45.

Chen RC, Chan DC, Chan KC (1988) A quantitative study of finishing and polishing techniques for a composite. *J Prosthet Dent* 59(3):292-7.

- Cismak A, Morawietz K, Petzold M (2001) Wirkmechanismus der Desensibilisierung freiliegender Zahnhälse durch fluoridhaltige Präparate, in *Fraunhofer IWM Jahresbericht 2001*.
- Clarke J (1924) On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br J Exp Pathol*:141-6.
- Crim GA, Swartz ML, Phillips RW (1985) Comparison of four thermocycling techniques. *J Prosthet Dent* 53(1):50-3.
- Davidson CL (1998) Glass ionomer cement, an intelligent material. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol* 40(1):38-42.
- Dean HT (1938) Chronic endemic dental fluorosis (Mottled Enamel), pp 387. *Dental Science and Dental Art*, Philadelphia.
- Dijkman AG, de Boer P, Arends J (1983) In vivo investigation on the fluoride content in and on human enamel after topical applications. *Caries Res* 17(5):392-402.
- Duchin S, van Houte J (1978) Colonization of teeth in humans by *Streptococcus mutans* as related to its concentration in saliva and host age. *Infect Immun* 20(1):120-5.
- Ehrenberg D, Weiner GI, Weiner S (2006) Long-term effects of storage and thermal cycling on the marginal adaptation of provisional resin crowns: a pilot study. *J Prosthet Dent* 95(3):230-6.
- Emilson CG (1981) Effect of chlorhexidine gel treatment on *Streptococcus mutans* population in human saliva and dental plaque. *Scand J Dent Res* 89(3):239-46.
- Eriksen HM, Bjertness E, Hansen BF (1986) Cross-sectional clinical study of quality of amalgam restorations, oral health and prevalence of recurrent caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 14(1):15-8.
- Feilzer AJ, De Gee AJ, Davidson CL (1987) Setting stress in composite resin in relation to configuration of the restoration. *J Dent Res* 66(11):1636-9.
- Fischer C, Lussi A, Hotz P (1995) [The cariostatic mechanisms of action of fluorides. A review]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 105(3):311-7.
- Fitzgerald RJ (1968) Plaque microbiology and caries. *Ala J Med Sci* 5(3):239-46.
- Fitzgerald RJ, Keyes PH (1960) Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J Am Dent Assoc* 61:9-19.
- Fontana M, Dunipace AJ, Gregory RL, Noblitt TW, Li Y, Park KK, Stookey GK (1996) An in vitro microbial model for studying secondary caries formation. *Caries Res* 30(2):112-8.
- Forss H, Seppa L (1990) Prevention of enamel demineralization adjacent to glass ionomer filling materials. *Scand J Dent Res* 98(2):173-8.
- Frankenberger R (2002) Schmelz- und Dentinbonding - State of the Art 2002. http://www.vollkeramik.de/Bericht_Frankenberger.htm.
- Frankenberger R, Kramer N, Petschelt A (2000) Technique sensitivity of dentin bonding: effect of application mistakes on bond strength and marginal adaptation. *Oper Dent* 25(4):324-30.

- Gale MS, Darvell BW (1999) Thermal cycling procedures for laboratory testing of dental restorations. *J Dent* 27(2):89-99.
- Gehring F (1983) [Effect of amine fluoride and sodium fluoride on the germs of plaque flora]. *Dtsch Zahnärztl Z* 38 Suppl 1:S36-40.
- Gibbons R, van Houte J (1975) Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Ann Rev Microbiol* 29:19-44.
- Gladys S, Van Meerbeek B, Lambrechts P, Vanherle G (2001) Microleakage of adhesive restorative materials. *Am J Dent* 14(3):170-6.
- Goldberg J, Tanzer J, Munster E, Amara J, Thal F, Birkhed D (1981) Cross-sectional clinical evaluation of recurrent enamel caries, restoration of marginal integrity, and oral hygiene status. *J Am Dent Assoc* 102(5):635-41.
- Gonzalez-Cabezas C, Li Y (1999) Distribution of three cariogenic bacteria in secondary carious lesions around amalgam restorations. *Caries Res* 33:357-365.
- Grande RH, Reis A, Loguercio AD, Singer Jda M, Shellard E, Neto PC (2005) Adhesive systems used for sealing contaminated surfaces: a microleakage evaluation. *Braz Oral Res* 19(1):17-22.
- Gülzow H, Hellwig E, Hetzer G (2002) Empfehlungen zur Kariesprophylaxe mit Fluoriden. Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde.
- Gustafsson BE, Quensel CE, Lanke LS, Lundqvist C, Grahnen H, Bonow BE, Krasse B (1954) The Vipeholm dental caries study; the effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta Odontol Scand* 11(3-4):232-64.
- Haller B (1998) Beständigkeit der Dentinhaftung von Komposit und Kompomer - eine In-Vitro-Studie über sechs Monate. *Acta Med Dent Helv* 3(15):15-22.
- Han L, Cv E, Li M, Niwano K, Ab N, Okamoto A, Honda N, Iwaku M (2002a) Effect of fluoride mouth rinse on fluoride releasing and recharging from aesthetic dental materials. *Dent Mater J* 21(4):285-95.
- Han L, Edward C, Okamoto A, Iwaku M (2002b) A comparative study of fluoride-releasing adhesive resin materials. *Dent Mater J* 21(1):9-19.
- Hannig C, Hannig M, Attin T (2005) Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci* 113(1):2-13.
- Hannig M, Bossmann K (1989a) [Dental pellicle (1). Ultrastructural variety as expression of complex formation and maturation]. *Quintessenz* 40(7):1319-27.
- Hannig M, Bossmann K (1989b) [Dental pellicle (2). Ultrastructural variety as expression of complex formation and maturation]. *Quintessenz* 40(8):1485-9.
- Hansen EK, Asmussen E (1989) Marginal adaptation of posterior resins: effect of dentin-bonding agent and hygroscopic expansion. *Dent Mater* 5(2):122-6.
- Hellwig K, Attin (1999) *Einführung in die Zahnerhaltung*. vol 2 München, Jena.

- Hickel R, Dasch W, Janda R, Tyas M, Anusavice K (1998) New direct restorative materials. FDI Commission Project. *Int Dent J* 48(1):3-16.
- Hotz PR (1979) Experimental secondary caries around amalgam, composite and glass ionomer cement fillings in human teeth. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* 89(9):965-86.
- Hülsmann M (2000) Zur Bewertung der Depotelektrophorese in der Endodontie; Gemeinsame Stellungnahme des DGZMK und der DGZ.
- Ilie N, Kunzelmann KH, Hickel R (2005) Werkstoffkundliche Untersuchungen zu Kompositen. *Dtsch Zahnärztl Z* (60):321-34.
- Imfeld TN (1983) Identification of low caries risk dietary components. *Monogr Oral Sci* 11:1-198.
- Janda R (1988) [Conditioning tooth hard substance with acids and complex-builders. 2. Dentin]. *Phillip J Restaur Zahnmed* 5(5):265-74.
- Jenkinson HF, Lamont RJ (1997) Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med* 8(2):175-200.
- Kaiser D, Neumeister V, Stößer L, Hetzer G (2006) Fluoridkonzentration im Speichel und in der Plaque nach Verzehr fluoridsalzhaltiger Speisen. *Oralprophylaxe & Kinderzahnheilkunde* 28(3):110-114.
- Kakaboura A (1989) [Smear layer on prepared dentin]. *Odontostomatol Proodos* 43(3):211-23.
- Keyes PH (1960) The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. *Arch Oral Biol* 1:304-20.
- Keyes PH (1968) Research in dental caries. *J Am Dent Assoc* 76(6):1357-73.
- Keyes PH, Englander HR (1975) Fluoride therapy in the treatment of dentomicrobial plaque diseases. *J Am Soc Prev Dent* 5(1):16-21, 36-8, 40.
- Kidd EA, Toffenetti F, Mjör IA (1992) Secondary caries. *Int Dent J* 42:127-138.
- Klimek J, Hellwig E (1999) *Kariologie* Heidemann (Hrsg.), Urban & Fischer.
- Knappwost A, Knauer L (1999) Cu-dotierte Tiefenfluoridierung der Kavitäten bei Kunststofffüllungen - Unverzichtbar zur Prävention von Sekundärkaries. *ZBay* (3):32.
- Knauer L (2004) In der Tiefe liegt die Kraft. *DZ*:54-5.
- Köhler B, Andréen I, Jonsson B (1988) The earlier the colonization by mutans streptococci, the higher the caries prevalence at 4 years of age. *Oral Microbiol Immunol* 3(1):14-7.
- Köhler B, Bratthall D (1978) Intrafamilial levels of *Streptococcus mutans* and some aspects of the bacterial transmission. *Scand J Dent Res* 86(1):35-42.
- Koike T, Hasegawa T, Manabe A, Itoh K, Wakumoto S (1990) Effect of water sorption and thermal stress on cavity adaptation of dental composites. *Dent Mater* 6(3):178-80.
- König KG (1971) *Karies und Kariesprophylaxe*. vol 2. W. Goldmann, München.

- König KG (1987) *Karies und Parodontopathien*. Thieme, Stuttgart.
- König KG, Mühlemann HR (1967) The cariogenicity of refined and unrefined sugar in animal experiments. *Arch Oral Biol* 12:1297-8.
- Krasse B (1966) Human streptococci and experimental caries in hamsters. *Arch Oral Biol* 11(4):429-36.
- Kristoffersson K, Bratthall D (1982) Transient reduction of *Streptococcus mutans* interdentially by chlorhexidine gel. *Scand J Dent Res* 90(6):417-22.
- Kröncke A (1981) Sekundärkaries. *Dtsch Zahnärztl Z* (36):69-73.
- Leica (2007) Benutzerhandbuch Leica TCS SP2 deutsch, pp 7-8. Art.Nr.: 15-9330-052.
- Listgarten MA (1994) The structure of dental plaque. *Periodontol* 2000 5:52-65.
- Loesche WJ (1985) Nutrition and dental decay in infants. *Am J Clin Nutr* 41(2 Suppl):423-35.
- Loesche WJ (1986) Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 50(4):353-80.
- Lopes GC, Baratieri LN, de Andrada MA, Vieira LC (2002) Dental adhesion: present state of the art and future perspectives. *Quintessence Int* 33(3):213-24.
- Lutz E, Krejci I, Oldenburg TR (1986) Elimination of polymerization stresses at the margins of posterior composite resin restorations: a new restorative technique. *Quintessence Int* 17(12):777-84.
- Mackert J, Wahl M (2004) Are there acceptable alternatives to amalgam? *J Calif Dent Assoc.* 32(7):601-10.
- Macpherson LM, Stephen KW (2001) The effect on human salivary fluoride concentration of consuming fluoridated salt-containing baked food items. *Arch Oral Biol* 46(10):983-8.
- Maltz M, Zickert I, Krasse B (1981) Effect of intensive treatment with chlorhexidine on number of *Streptococcus mutans* in saliva. *Scand J Dent Res* 89(6):445-9.
- Manhart J (2003) Überlebenszeitanalyse von konservierend-zahnärztlichen Restaurationen. *ZWR - Das Deutsche Zahnärzteblatt* 112:142-155.
- Marsh P, Martin M (2003) *Orale Mikrobiologie*. vol 4. Thieme, Stuttgart.
- Meckel AH (1965) The formation and properties of organic films on teeth. *Arch Oral Biol* 10(4):585-98.
- Miller W (1892) *Die Mikroorganismen der Mundhöhle*. vol 1. G. Thieme, Leipzig.
- Mixson JM, Richards ND, Mitchell RJ (1993) Effects of dentin age and bonding on microgap formation. *Am J Dent* 6(2):72-6.
- Mjör IA (1996) Glass-ionomer cement restorations and secondary caries: a preliminary report. *Quintessence Int* 27(3):171-4.

- Mjör IA (1997) The reasons for replacement and the age of failed restorations in general dental practice. *Acta Odontol Scand* 55(1):58-63.
- Mjör IA, Gordan VV (2002) Failure, repair, refurbishing and longevity of restorations. *Oper Dent* 27(5):528-34.
- Mjör IA, Toffenetti F (2000) Secondary caries: a literature review with case reports. *Quintessence Int* 31(3):165-79.
- Nakabayashi N, Nakamura M, Yasuda N (1991) Hybrid layer as a dentin-bonding mechanism. *J Esthet Dent* 3(4):133-8.
- Nelson DG, Jongebloed WL, Arends J (1983) Morphology of enamel surfaces treated with topical fluoride agents: SEM considerations. *J Dent Res* 62(12):1201-8.
- Newbrun E (1982) Sugar and dental caries. *Clin Prev Dent* 4(3):11-4.
- Noack M (2004) Sekundärkaries - Prävention und Therapie. *Quintessenz* 55(10):1073-1081.
- Øgaard B, Rølla G, Ruben J, Dijkman T, Arends J (1988) Microradiographic study of demineralization of shark enamel in a human caries model. *Scand J Dent Res* 96(3):209-11.
- Oliveira JPP, Gonzalez-Cabezas C, Zottis LH (1999) Placement/Replacement of restorations in privat practice: Porto Alegre, Brazil. *J Dent Res* 78, 496.
- Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Ervin RF, Gordon HA, Wagner M (1955) Experimental caries in germfree rats inoculated with enterococci. *J Am Dent Assoc* 50(3):259-72.
- Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Wagner M, Gordon HA, Luckey TD (1954) 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* 33(2):147-74.
- Pashley DH (1992a) Dentin bonding agents. *Curr Opin Dent* 2:46-51.
- Pashley DH (1992b) The effects of acid etching on the pulpodentin complex. *Oper Dent* 17(6):229-42.
- Pashley DH, Ciucchi B, Sano H, Horner JA (1993) Permeability of dentin to adhesive agents. *Quintessence Int* 24(9):618-31.
- Pashley DH, Pashley EL (1991) Dentin permeability and restorative dentistry: a status report for the American Journal of Dentistry. *Am J Dent* 4(1):5-9.
- Peschke A, Blunck U, Roulet JF (2000) Influence of incorrect application of a water-based adhesive system on the marginal adaptation of Class V restorations. *Am J Dent* 13(5):239-44.
- Petzold M, Berthold L, Cismak A, Morawietz K (2000) A study of the microstructure of fluoride globuli formed after AmF and NaF treatment of enamel surfaces. *Caries Research* 34:354-355.
- Prati C, Biagini G, Rizzoli C, Nucci C, Zucchini C, Montanari G (1990) Shear bond strength and SEM evaluation of dentinal bonding systems. *Am J Dent* 3(6):283-8.

- Pruitt KM (1977) Macromolecular components of oral fluids at tooth surfaces. *Swed Dent J* 1(6):225-40.
- Reinhardt KJ (1991a) Der Einfluß der Lichtquelle auf die Randständigkeit von Kompositfüllungen. *Dtsch Zahnärztl Z* 46(2):132-4.
- Reinhardt KJ (1991b) Restdoppelbindungen und Grenzflächeneffekt von Kunststoffmaterialien. *Dtsch Zahnärztl Z* 46(3):204-8.
- Rølla G, Øgaard B, Cruz RA (1991) Clinical effect and mechanism of cariostatic action of fluoride-containing toothpastes: a review. *Int Dent J* 41(3):171-4.
- Roulet JF (1987) A materials scientist's view: assessment of wear and marginal integrity. *Quintessence Int* 18(8):543-52.
- Sá LT, Gonzalez-Cabezas C, Cochran MA, Fontana M, Matis BA, Moore BK (2004) Fluoride releasing materials: their anti-cariogenic properties tested in in vitro caries models. *Oper Dent* 29(5):524-31.
- Sanderink R (2005) *Curriculum Orale Mikrobiologie und Immunologie*. vol 1. Quintessenz, Berlin.
- Schaeken MJ, van der Hoeven JS, Franken HC (1986) Comparative recovery of *Streptococcus mutans* on five isolation media, including a new simple selective medium. *J Dent Res* 65(6):906-8.
- Schiffner U, Micheelis W (2006) Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV)- Kurzfassung. Institut der Deutschen Zahnärzte (IDZ) im Auftrag von Bundeszahnärztekammer und Kassenzahnärztlicher Bundesvereinigung.
- Schiffner U, Reich E (1999) Prävalenzen zu ausgewählten klinischen Variablen bei den Erwachsenen (35-44 Jahre). *Deutscher Ärzteverlag (Dritte Deutsche Mundgesundheitsstudie- DMS III)*:247-334.
- Schroeder H (1992) *Orale Strukturbiologie*. vol 4. Thieme, Stuttgart.
- Seemann R (2002) *Plaque*. In: Roulet J.-F., Zimmer S. (Hrsg.): *Farbatlant der Zahnmedizin* 16. Prophylaxe und Präventivzahnmedizin. S 34-38. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Seemann R, Bizhang M, Kluck I, Loth J, Roulet JF (2005a) A novel in vitro microbial-based model for studying caries formation--development and initial testing. *Caries Res* 39(3):185-90.
- Seemann R, Kluck I, Bizhang M, Roulet JF (2005b) Secondary caries-like lesions at fissure sealings with Xeno III and Delton--an in vitro study. *J Dent* 33(5):443-9.
- Sheiham A (1983) Sugars and dental decay. *Lancet* 1(8319):282-4.
- Smit P, Heniger J (1975) Antoni van Leeuwenhoek (1632 - 1723) and the discovery of bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 41(1):217- 228.
- Smith FA, Downs WL, Hodge HC, Maynard EA (1960) Screening of fluorine-containing compounds for acute toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2:54-8.

- Socransky SS, Manganiello AD, Propas D, Oram V, van Houte J (1977) Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *J Periodontal Res* 12(2):90-106.
- Steinke A, Netzschil L, Riethe P (1983) Der Einfluß verschiedener Fluorid- und Chloridverbindungen auf den ATP-Gehalt von *Streptococcus mutans*. *Dtsch Zahnärztl Z* (38):41-44.
- Stephan RM (1966) Effects of different types of human foods on dental health in experimental animals. *J Dent Res* 45(5):1551-61.
- Straetemans MM, van Loveren C, de Soet JJ, de Graaff J, ten Cate JM (1998) Colonization with *mutans streptococci* and *lactobacilli* and the caries experience of children after the age of five. *J Dent Res* 77(10):1851-5.
- Streckfuss JL, Perkins D, Horton IM, Brown LR, Dreizen S, Graves L (1980) Fluoride resistance and adherence of selected strains of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces after exposure to fluoride. *J Dent Res* 59(2):151-8.
- Swift EJ, Jr., Perdigao J, Heymann HO (1995) Bonding to enamel and dentin: a brief history and state of the art, 1995. *Quintessence Int* 26(2):95-110.
- ten Cate JM, Damen JJ, Buijs MJ (1998) Inhibition of dentin demineralization by fluoride in vitro. *Caries Res* 32(2):141-7.
- ten Cate JM, Duijsters PP (1983) Influence of fluoride in solution on tooth demineralization. I. Chemical data. *Caries Res* 17(3):193-9.
- Theilade E, Theilade J (1976) Role of plaque in the etiology of periodontal disease and caries. *Oral Sciences Reviews*:23-63.
- Theilade E, Theilade J, Mikkelsen L (1982) Microbiological studies on early dento-gingival plaque on teeth and Mylar strips in humans. *J Periodontal Res* 17(1):12-25.
- Theilade J (1984) Development and structure of dental plaque. *Dtsch Zahnärztl Z* 39(8):606-10.
- Thylstrup A, Fejerskov O (1978) Clinical appearance of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histologic changes. *Community Dent Oral Epidemiol* 6(6):315-28.
- Tjan AH, Bergh BH, Lidner C (1992) Effect of various incremental techniques on the marginal adaptation of class II composite resin restorations. *J Prosthet Dent* 67(1):62-6.
- van Loveren C (2001) Antimicrobial activity of fluoride and its in vivo importance: identification of research questions. *Caries Res* 35 Suppl 1:65-70.
- Volpe AR (1983) [Function of fluoride in prevention]. *Riv Odontostomatol Implantoprotesi* (6):59, 61, 63.
- Whitford GM (1996) The metabolism and toxicity of fluoride. *Monogr Oral Sci* 16 Rev 2:1-153.
- Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE (1996) Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol* 50:513-52.
- Wilson NH, Burke FJ, Mjor IA (1997) Reasons for placement and replacement of restorations of direct restorative materials by a selected group of practitioners in the United Kingdom. *Quintessence Int* 28(4):245-8.

- Yearn JA (1985) Factors affecting cure of visible light activated composites. *Int Dent J* 35(3):218-25.
- Yoshikawa T, Burrow MF, Tagami J (2001) A light curing method for improving marginal sealing and cavity wall adaptation of resin composite restorations. *Dent Mater* 17(4):359-66.
- Zeiss (2008) LSM 510 and LSM 510 META Laser Scanning Mikroskope, pp 6.
<http://www.zeiss.de/C12567BE00459794/Inhalt-Frame/FD9FA0090EEE01A641256A550036267B>.
- Zhang YS, Li NY (2007) [Current application of confocal laser scanning microscope (CLSM) in stomatology]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 16(2):219-24.
- Zimmer S, Jahn KR, Barthel CR (2003) Recommendations for the use of fluoride in caries prevention. *Oral Health Prev Dent* 1(1):45-51.
- Zimmer S, Seemann R, Roulet J-F (2000) Skript des Präventivzahnmedizin und Parodontalpropädeutikkurses der Abt. für Zahnerhaltung, Charité, Berlin.

11. Anhang

11.1 Abkürzungs- und Produktverzeichnis

Abkürzungen

CHX	Chlorhexidin
CLSM	Konfokale (confocal) Laser-Scanning-Mikroskopie
CTD	sicher toxische Dosis (certainly toxic dose)
DGZMK	Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DVL	<i>Dentin-Versiegelungsliquid</i> (Humanchemie GmbH)
EPS	extrazelluläre Polysaccharide
md	Manteldentin
PTD	wahrscheinlich toxische Dosis (probably toxic dose)
REM	Rasterelektronenmikroskop
SDG	Schmelz-Dentin-Grenze
SZG	Schmelz-Zement-Grenze
TSB	Tryptikase-Soja-Bouillon
zpd	zirkumpulpaes Dentin

Produkte

Al₂O₃ belegte Polierscheiben

Sof-Lex Medium, 12,7 mm, No. 1982M mit 80 µm Körnung
Sof-Lex Fine, 12,7 mm, No. 1982F mit 40 µm Körnung
Sof-Lex Superfine 12,7 mm, No. 1982SF mit 12 µm Körnung
3M Espe, Seefeld, Deutschland

Applikator

Applicator Tip, Dentsply, DeTrey GmbH, Konstanz, Deutschland

Dentin-Versiegelungsliquid

Touchierlösung, pH 2, 43.500 ppm F⁻ als Magnesiumfluorosilikat, NaF und Kupfersulfat
Nachtouchierlösung, pH 14, 9,6 Gew.-% Ca(OH)₂
Humanchemie GmbH, Alfeld/Leine, Deutschland

Diamantschleifer

Komet, Nr.836KR 012, Mittlere Körnung 80 µm, Gebr. Brasseler GmbH, Lemgo, Deutschland

Haftvermittler

OptiBond® FL, Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland

Infusionsschläuche

Heidelberger Verlängerung 04097408, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Komposit

Z100, 3M Espe, Seefeld, Deutschland
Tetric Flow, Ivoclar Vivadent AG, Ellwangen-Jagst, Deutschland

Konditionierer

Total Etch, 37% Phosphorsäure Ätzel, Fa. Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein

Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM)

Zeiss LSM 510, Carl Zeiss, Jena, Deutschland

Lack

Dyract-Lack, Dentsply DeTrey, Konstanz, Deutschland)

Medien

TSB; Becton Dickinson, Sparks, USA

Polymerisationslampe

Translux CL, Heraeus Kulzer GmbH, 63450 Hanau, Deutschland

Schlauchpumpe

Alitea, Modell XV, Watson Marlow Alitea, Stockholm, Schweden

Schleif- und Poliermaschine

DP-U4, Struers, Dänemark

11.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, *PD Dr. Rainer Seemann*, für die Überlassung des Themas, die intensive Unterstützung während der Durchführung der Versuche sowie die gewissenhafte Durchsicht des Manuskripts.

Ich danke *Marion von Zitzewitz* für die Hilfestellung und Anregung während der Durchführung der Versuchsreihen im Labor.

Des Weiteren möchte ich mich beim Robert-Koch-Institut (Berlin) für die Möglichkeit der Nutzung des CLSM bedanken. Insbesondere danke ich Herrn *Dr. Kazimierz Madela* für die freundliche Betreuung und Hilfestellung am Gerät.

Ich danke Herrn *Dr. Thomas Kersten* für die zuverlässige Unterstützung beim Kultivieren der *S. mutans* Monokultur.

Mein spezieller Dank gilt auch Frau *Dr. Tania Schink* für die geduldige Hilfestellung beim Auswerten der statistischen Ergebnisse und bei der Beantwortung meiner Fragen.

Ich danke den Mitarbeitern der Medizinisch-Technischen Labore der Charité für die freundliche Unterstützung beim Vorbereiten der Versuche.

Ich möchte meiner Familie, besonders meinen Großeltern, meinem Partner Patrick sowie meinen Freunden ganz herzlich danken, die mich während der gesamten Zeit unterstützt und mir mit Kritik und Ratschlägen sowie aufmunternden Worten zur Seite gestanden haben.

Mein größter Dank gebührt jedoch meinen lieben Eltern, die mich stets unterstützt haben, und ohne die dieses Studium und diese Dissertation nicht ohne Weiteres möglich gewesen wären.

11.3 Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Berlin, 21.07.2008

11.4 Erklärung

Ich, Franziska Schneider, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „*Sekundärkariesinhibition in einem biofilmbasierten In-vitro-Kariesmodell*“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 21.07.2008

Franziska Schneider