

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

DISSERTATION

**Untersuchung zur Inneren Läsion der Sekundärkaries  
im biofilmbasierten In-vitro-Modell**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katja Diercke

aus Schwerin

Gutachter: 1.Priv.-Doz. Dr. R. Seemann

2. Prof. Dr. med. dent. habil. E. Glockmann

3. Priv.-Doz. Dr. M. Naumann

Datum der Promotion: 18.09.2009

In Erinnerung an meinen Großvater Karl Hugo Pecher  
und für meine Familie

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b> .....	<b>8</b>
2.1	Definition der Sekundärkaries .....	8
2.2	Lokalisation der Sekundärkaries.....	9
2.3	Diagnose der Sekundärkaries .....	10
2.4	Histopathologie der Sekundärkaries.....	11
2.5	Mikrobiologie im Randspalt .....	15
2.6	Mikroleakage und Randspalt .....	17
2.7	Studiendesigns zur Untersuchung von Sekundärkaries .....	20
2.7.1	In vivo Untersuchungen .....	20
2.7.2	In vitro Untersuchungen.....	21
<b>3</b>	<b>ZIEL DER STUDIE</b> .....	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODE</b> .....	<b>27</b>
4.1	Experimentelles Design .....	27
4.2	Probendesign.....	28
4.3	Voruntersuchung im REM.....	30
4.4	Biofilmbasiertes In-vitro-Kariesmodell .....	31
4.4.1	Allgemeiner Aufbau .....	31
4.4.2	Mikrobiologische Tests nach Abschluss.....	34
4.5	Auswertung im Konfokalen Laserscannenden Mikroskop.....	35
4.6	Statistik .....	37
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>38</b>
5.1	Voruntersuchung.....	38

<b>5.2</b>	<b>Biofilmbasiertes In-vitro-Kariesmodell .....</b>	<b>39</b>
<b>5.3</b>	<b>Ergebnisse der Konfokalen Laserscanning Mikroskopie.....</b>	<b>40</b>
5.3.1	Kontrollgruppe .....	40
5.3.2	Testgruppen .....	41
5.3.2.1	Proben .....	41
5.3.2.2	Verworfen Proben.....	42
5.3.3	Fläche der Demineralisation der Inneren Läsion.....	44
5.3.3.1	Innere Läsion im Schmelz .....	44
5.3.3.2	Innere Läsion im Dentin.....	48
5.3.3.3	Zusammenfassung der Fläche der Demineralisation .....	52
5.3.4	Mittlere und maximale Läsionstiefen der Inneren Läsion.....	54
5.3.4.1	Innere Läsion im Schmelz .....	54
5.3.4.2	Innere Läsion im Dentin.....	60
5.3.4.3	Zusammenfassung der Läsionstiefen.....	67
<b>5.4</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse .....</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>70</b>
<b>6.1</b>	<b>Diskussion der Methode .....</b>	<b>70</b>
6.1.1	Auswahl zu vergleichender Stichproben .....	70
6.1.2	Vergleichbarkeit boviner und humaner Zähne.....	70
6.1.3	Kritische Betrachtungen zum Probendesign .....	71
6.1.4	Kritische Betrachtung zum biofilmbasierten In-vitro-Kariesmodell.....	73
6.1.5	Kritische Betrachtung zur Auswertungstechnik .....	76
<b>6.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>78</b>
6.2.1	Morphologie der Inneren Läsion .....	78
6.2.2	Abhängigkeit der Inneren Läsion von der Äußeren Läsion.....	81
6.2.3	Einfluss der Spaltbreite auf die Innere Läsion .....	83
<b>6.3</b>	<b>Klinische Schlussfolgerungen .....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>90</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>106</b>

## 1 EINLEITUNG

Sekundärkaries ist weltweit die häufigste Ursache für einen Füllungsaustausch [Healey & Phillips 1949, Dahl & Eriksen 1978, Mjör 1985, 1992, Mjör & Toffenetti 1992, 2000, Qvist et al. 1986, 1990, Mjör & Jokstad 1993, Qvist 1993, Friedl et al. 1995, Pink et al. 1994, Mjör & Qvist 1997, Hickel & Manhart 2001]. Jedes Jahr werden enorme Summen für ihre Therapie ausgegeben. Darunter befindet sich ein unbekannter Prozentsatz fälschlicherweise als kariös diagnostizierter Restaurationen [Mjör & Ryge 1981, Özer & Thylstrup 1995, Kidd & Beighton 1996]. Dies belegen Studien, in denen Zahnärzte die Diagnose Sekundärkaries nicht einstimmig an denselben Restaurationen stellten [Rytömaa et al. 1979, Elderton & Nuttall 1983, Merrett & Elderton 1984, Söderholm et al. 1989, Kidd 1990, Kidd et al. 1992]. Gleichfalls konnte in Fragen der Therapie eine große Variationsbreite zwischen invasivem Handeln und präventiven Maßnahmen festgestellt werden [Mileman et al. 1982, Elderton & Nuttall 1983]. So erklärt sich, dass die Sekundärkaries nicht nur ein wirtschaftliches, sondern vor allem ein medizinisches Problem darstellt.

Ursache dieser Uneinigkeiten ist unter anderem die noch nicht vollständig geklärte Ätiologie der Sekundärkaries mit dem Resultat einer eher invasiven als präventiven Therapie. Gleichwohl ist eine nicht notwendige Behandlung aus medizinischer Sicht genauso unzulässig wie eine unterlassene Behandlung einer Karies [Rytömaa et al. 1979]. Dabei sieht sich der Behandler vorwiegend mit folgenden Fragen konfrontiert:

- ◆ Ist ein klinisch tastbarer Füllungsrand ein Indiz für eine Karies „unter“ einer Restauration?
- ◆ Ist ein verfärbter Rand gleichbedeutend mit einer Sekundärkaries?
- ◆ Welches ist die Spaltbreite, die unweigerlich zur Sekundärkaries führt?
- ◆ Kann es im Spalt bei gleichzeitig kariesfreier Oberfläche überhaupt zur Ausbildung einer Inneren Läsion kommen?

Untersuchungen zeigen, dass weder ein sondierbarer noch ein verfärbter Füllungsrand verlässliche Indikatoren für eine Sekundärkariesläsion darstellen [Hamilton et al. 1983, Gilmour et al. 1990, Kidd & O'Hara 1990, Pimenta et al. 1995]. Ebenfalls gibt es bisher keinen Konsens darüber, ob die Spaltbreite zwischen Restauration und Kavitätenwand ein Haupteinflussfaktor für die Sekundärkaries ist. Einige Studien fanden keinen Zusammenhang zwischen Spaltbreite und Sekundärkaries [Söderholm et al. 1989, Kidd

& O'Hara 1990, Kidd & Beighton 1996, Rezwani-Kaminski et al. 2002]. Dagegen konstatierten andere Studien sehr wohl in der Spaltbreite einen zuverlässigen diagnostischen Parameter für die Sekundärkaries [Jørgensen & Wakumoto 1968, Goldberg et al. 1981, Derand et al. 1991, Hodges et al. 1995, Totiam et al. 2007].

In diesen Untersuchungen wurden stets die Innere, d.h. die im Spaltbereich vorzufindende, Läsion und die Äußere Läsion der Sekundärkaries gleichzeitig betrachtet. Das multikausale Bild der Karies jedoch macht es schwierig, einzelne Faktoren wie beispielsweise die Spaltbreite und deren Einfluss auf die Läsionstiefe im Spalt einzuschätzen. So blieb bislang ungeklärt, ob zum einen im Spalt unabhängig von einer Äußeren Läsion eine isolierte Innere Läsion entsteht und zum anderen inwiefern diese von der Spaltbreite und von der Äußeren Läsion beeinflusst wird. Dies gab den Anlass für die vorliegende Arbeit.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Definition der Sekundärkaries

*„This recurrence of decay is a rebeginning on the perfect surface of the enamel and is entirely different from [...] a rebeginning of decay from leakage.“ [Black 1914]*

1914 unterschied Black die „Wiederkehr einer Läsion“ („*recurrence of decay*“) von einem „Neubeginn einer Läsion“ („*rebeginning of decay*“). Er beschrieb die „Wiederkehr einer Läsion“ als eine neu entstandene Karies, die in Form von weißem Schmelz neben einer optimal gefertigten Füllung vorzufinden ist, und den „Neubeginn einer Läsion“ als Folge einer insuffizienten Füllung. Rekurrente Karies nach Black (heute: Primärkaries) bedeutet somit keine rekurrente Karies (heute: Sekundärkaries) nach gegenwärtigem Verständnis. Aus dieser Tatsache resultieren häufig Missverständnisse in der Literatur [Özer & Thylstrup 1995], weshalb eine Differenzierung zwischen erneutem Aufflammen einer nicht vollständig exkavierten Karies und neu entstandener Karies wichtig ist.

1962 wird die Sekundärkaries von der „Commission on oral and dental statistics“ definiert als diejenigen kariösen Läsionen, welche am Rand einer bestehenden Restauration auftreten [Baume 1962]. Eine erneut beginnende Karies wird von Wannemacher 1965 als das Fortschreiten einer unvollständig entfernten Karies beschrieben. Darauf basierend bedeutet eine Sekundärkaries in der vorliegenden Arbeit eine kariöse Läsion, die am Rand einer Restauration neu entstanden ist. Demgegenüber wird der Begriff Kariesrezidiv im Zusammenhang mit nicht vollständig exkavierter Karies unter einer Restauration verwendet.

Synonyme für die Sekundärkaries sind die rekurrente Karies, sekundäre Karies und sekundäre Randkaries [Jahn & Binus 1980] bzw. für ein Kariesrezidiv die residuale Karies.

## 2.2 Lokalisation der Sekundärkaries

„... studies have shown that recurrent caries was seen predominantly at the gingival margins of all types of Class II through Class V restorations, while it was rarely associated with Class I restorations or on the occlusal part of Class II restorations.“  
[Mjör 2005]

Zur Lokalisation der Sekundärkaries soll beispielhaft eine Studie von Mjör [1985] erwähnt werden. Dieser diagnostizierte an 1427 Füllungen eine sekundäre Randkaries bei 72% der Amalgam- und 43% der Kompositfüllungen. Von den restaurierten Zähnen wurden 363 weiter untersucht auf die Lokalisation der Läsion: 67% der Karies war an Amalgamfüllungen und 17% an Kompositrestorationen zervikal und approximal lokalisiert. Allein 6% der Sekundärkaries fand sich an Amalgam- und 11% an Kompositrestorationen inzisal bzw. okklusal [Mjör 1985] (Abb. 2.1). Ursächlich für die gingivale Präferenz scheint die dort häufig anzufindende massive Plaqueakkumulation zu sein [Özer 1997].

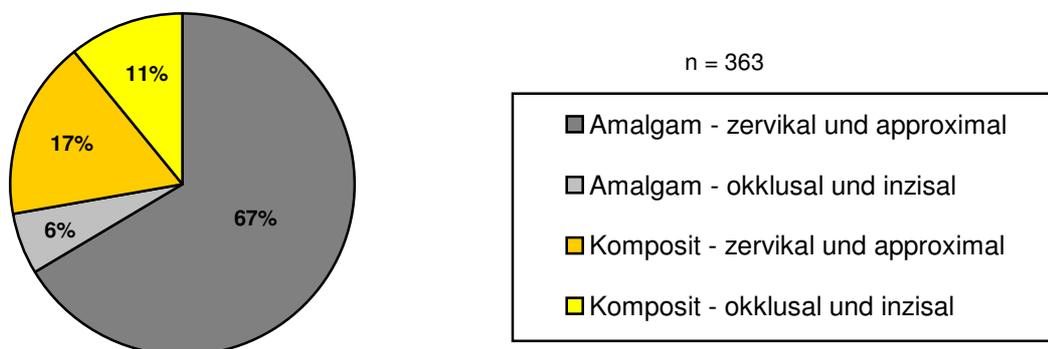


Abbildung 2.1: Anatomische Lokalisation der Sekundärkaries in der permanenten Dentition [nach Mjör 1985]

Weitere Studien bestätigen dies und fügen hinzu, dass die okklusalen Bereiche bei Kompositfüllungen häufiger betroffen sind als bei Amalgamfüllungen [Mjör & Qvist 1997, Mjör 1998]. Kavitätenränder oberhalb des approximalen Kontaktpunktes entwickeln ebenfalls häufiger eine Karies als zervikal des Kontaktpunktes gelegene Füllungs­ränder [Otto & Rule 1988]. Goldberg konnte keine Präferenz der Sekundärkaries für eine okklusale, mesiale, distale, bukkale bzw. linguale Lage der Läsion finden [Goldberg et al. 1981].

### 2.3 Diagnose der Sekundärkaries

*„The clinical diagnosis of secondary caries is by far the most common reason for replacement of restorations, but the scientific basis for the diagnosis is meager.“*

[Mjör & Toffenetti 2000]

Aus der bevorzugten zervikalen und approximalen Lage der Sekundärkaries resultieren Probleme in der Erkennung dieser Läsionen. Weitere spezifische Probleme bei der Sekundärkariesdiagnose ergeben sich daraus, dass die Innere Läsion im Anfangsstadium der Sekundärkaries klinisch nicht sichtbar ist. Auch ist ein klinisch defekter Rand bzw. ein Randspalt nicht immer mit einer Sekundärkaries gleichbedeutend. So scheint es zwischen Spaltbreite und Sekundärkaries keinen Zusammenhang zu geben [Hamilton et al. 1983, Söderholm et al. 1998, Gilmour et al. 1990, Kidd & O’Hara 1990, Pimenta et al. 1995, Rezwani-Kaminski et al. 2002]. Hierzu sind in der Literatur jedoch auch gegenteilige Meinungen zu finden [Jørgensen & Wakumoto 1968, Goldberg et al. 1981, Derand et al. 1991, Hodges et al. 1995, Totiam et al. 2007].

Schließlich kommt erschwerend hinzu, dass sowohl die klinische Unterscheidung einer sekundären Karies von einem Kariesrezidiv als auch einer aktiven von einer inaktiven sekundären Karies problematisch ist [Kidd & O’Hara 1990]. Denn, wenn die Diagnose Sekundärkaries gestellt wird, lässt sich nachfolgend nicht mehr feststellen, ob es sich dabei um eine neue Läsion oder eine nicht vollständig exkavierte Karies handelt.

Die wissenschaftliche Basis zur Diagnose der Sekundärkaries ist sehr gering. Deshalb werden häufig Restaurationen bereits präventiv ausgetauscht. Dies führt dazu, dass Füllungen am häufigsten wegen einer Sekundärkaries erneuert werden müssen [Mjör & Toffenetti 2000]. Außerdem kommen die einmal restaurierten Zähne in den so genannten „cycle of reresoration“, in dem bei jedem erneuten Füllungsaustausch gleichzeitig die Kavität vergrößert wird [Brantley et al. 1995].

## 2.4 Histopathologie der Sekundärkaries

„In both types of outer lesion examination by microradiography and polarized light, revealed all the structural detail typical of artificial primary caries [...] The wall lesion appeared as a narrow ribbon and tended to encompass the whole filling without penetrating deeply into the tissue.“ [Hals & Nernaes 1971]

Ein häufig in der Literatur beschriebener und zur wissenschaftlichen Basis gehörender Teil der Sekundärkaries ist die Pathohistologie dieser Läsion. Erstmals beschrieben wurde diese 1971 von Hals & Nernaes. Sie präparierten nur Amalgam gefüllte Zähne mit einer in vitro erzeugten Sekundärkaries, um diese dann mittels Polarisationsmikroskopie histologisch zu begutachten. Sie kennzeichneten die Sekundärkaries als zweigeteilten Defekt mit einer Äußeren und einer Inneren Läsion (Abb. 2.2). Die Innere Läsion wird häufig auch als Wandläsion bezeichnet.

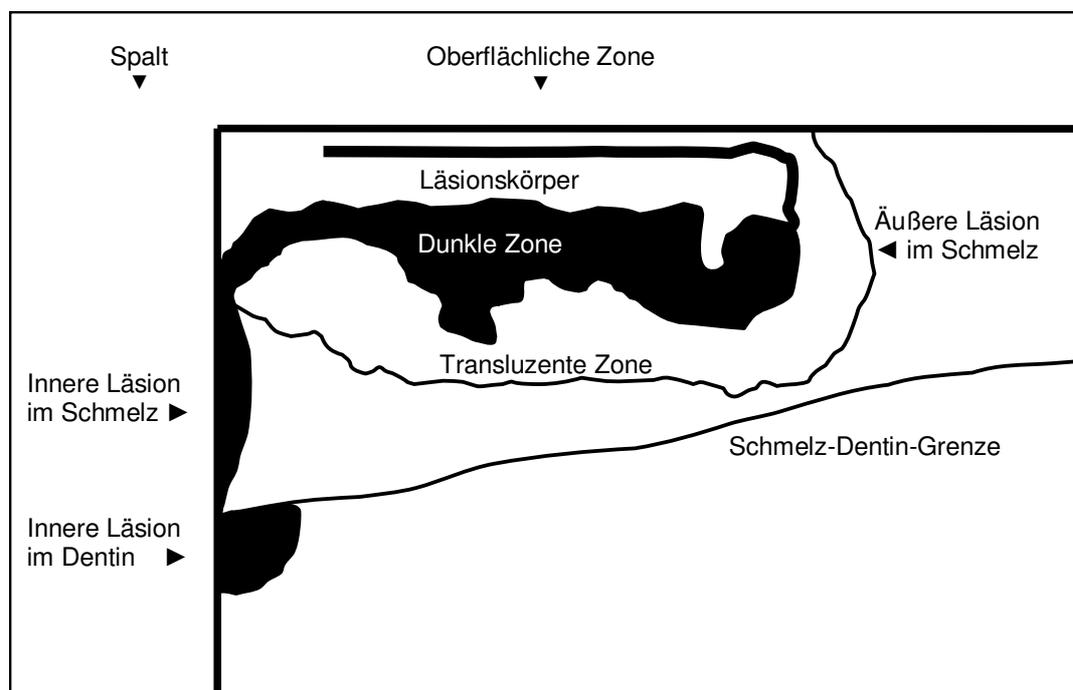


Abbildung 2.2: Erscheinungsbild der Sekundärkaries im Polarisationsmikroskop [nach Kidd 1976a]

Histologisch gleicht im Polarisationsmikroskop die Äußere Läsion einer initialen Primärkaries (Abb. 2.2):

- ◆ *intakte oberflächliche Zone* [Kidd 1976a, Hicks et al. 1986, Gilmour et al. 1990],
- ◆ *Läsionskörper* [Kidd 1976a, Hicks et al. 1986, Gilmour et al. 1990],
- ◆ *dunkle Zone* [Kidd 1976a, Hicks et al. 1986, Gilmour et al. 1990] und
- ◆ *transluzente Zone* [Kidd 1976a, Gilmour et al. 1990].

Dies führte zu der Annahme, dass die Ursache der Äußeren Läsion in einem primären kariösen Angriff an der Zahnoberfläche besteht [Hals & Nernaes 1971, Hals et al. 1974].

Dagegen entsteht die Innere Läsion auf Grund des Mikrospalts, in den Bakterien, Flüssigkeiten oder Wasserstoffionen zwischen Restauration und Kavitätenwand eindringen [Hals & Nernaes 1971, Kidd 1976a]. Sie stellt sich im polarisationsoptischen Mikroskop als ein enges Band dar, das die gesamte Füllung umgibt, ohne dabei tief ins Gewebe einzudringen [Hals & Nernaes 1971, Kidd 1976a, Gilmour et al. 1990]. Sie kennzeichnet eine geringere Progredienz im Vergleich zum Oberflächendefekt, vermutlich verursacht durch den wesentlich längeren Diffusionsweg der Flüssigkeiten [Kröncke 1981]. Sobald die Innere Läsion die Schmelz-Dentin-Grenze erreicht hat, breitet sie sich im Dentin seitlich in einer breiteren Front, den Schmelz unterminierend, aus [Kidd 1976a, Kröncke 1981] (Abb. 2.2).

Das pathohistologische Bild der Sekundärkaries als zweigeteilten Defekt wurde vielfach sowohl *in vitro*, *in situ*, als auch *in vivo* im Polarisationsmikroskop, mittels Mikroradiografie und Konfokaler Laserscannender Mikroskopie (CLSM) bestätigt [Hals & Nordervall 1973, Hals et al. 1974, Kidd 1976a, 1987, Eriksen & Pears 1978, Kidd & Joston-Bechal 1980, Hicks et al. 1986, Gilmour et al. 1990, 1993, Derand et al. 1991, Kidd 1991, Dionysopoulos et al. 1994, 1996, Grossman & Mateijka 1995, Fontana et al. 1996, Garcíá-Godoy et al. 1998, Pereira et al. 1998, Hicks 2000, Totiam et al. 2005, 2007, Thomas et al. 2007]. Trotzdem gibt es Zweifel an einer von der Äußeren Läsion unabhängigen Existenz der Inneren Läsion: Stattdessen sei die Sekundärkaries gleichfalls eine Primäre Karies neben einer Füllung und die Innere Läsion lediglich ein Ausläufer dieser Äußeren Läsion [Özer & Thylstrup 1995, Özer 1997, Mjör & Toffenetti 2000]. Dies wird damit begründet, dass sich sowohl Primäre als auch Sekundäre Karies entlang der Schmelzprismen ausbreiten (Abb. 2.3). Folglich kann die Karies begrenzt durch die Richtung der Prismen nicht in die Tiefe des Spaltes zwischen Restauration

und Zahn vordringen. Nur die Schmelzprismen, die von der Zahnoberfläche in den Spalt hineinreichen, verursachen eine Innere Läsion. Der Ursprung einer Inneren Läsion liegt folglich nicht wie von Hals & Nernaes 1971 beschrieben in der Mikroleakage sondern ebenfalls an der Schmelzoberfläche in Form einer Primärkaries. Das Vorhandensein einer Wandläsion per se wird somit in Frage gestellt [Özer 1997, Mjör & Toffenetti 2000]. Unterstützt wird diese Theorie zusätzlich dadurch, dass die Sekundäre Karies nicht nur histologisch, sondern auch mikrobiologisch der Primärkaries gleicht [Kidd et al. 1993].

Özer L. „The relation between gap size , microbial accumulation and structural features of natural caries in extracted teeth with class II amalgam restorations.“ PhD thesis 1997, Departement of Cariology and Endodontics, University of Copenhagen, Denmark, 1995

Abbildung 2.3: Zwei Sekundärkariesläsionen mit parallel zur Kavitätenwand verlaufenden Schmelzprismen (oben) und von der Kavitätenwand weglaufenden Schmelzprismen (unten) im Lichtmikroskop (links), im Polarisationsmikroskop mit Wasser (Mitte) und Zeichnung des polarisationsoptischen Bildes: Weiße bzw. rote Linie = „zentrale Transversale“ = tiefster Punkt der Kavität, der hin zur Oberfläche entlang der Schmelzprismen in die Spaltregion führt. [nach Özer 1997]

Özer zeigt in seiner Studie mit der Polarisationsmikroskopie einen triangulären Verlauf der Inneren Läsion im Schmelz, bei der der tiefste Punkt der Läsion, wenn man dem Verlauf der Schmelzprismen folgt, zum Schmelz an der Zahnoberfläche neben dem Eingang zum Spalt führt (Abb. 2.3). Er vergleicht seine polarisationsoptischen Bilder mit den Ergebnissen von Bjørndal & Thylstrup (1995) über den Läsionsverlauf approximaler Primärläsionen im Polarisationsmikroskop. Diese haben ebenfalls eine konische Form. Innerhalb der Läsion definierten sie eine Linie, die vom tiefsten Punkt der Läsion bis zur Oberfläche entlang der Schmelzprismen verläuft – die „zentrale Transversale“. Der höchste Grad an Demineralisation findet sich immer entlang dieser Linie unabhängig von der Läsionstiefe. Die Autoren schließen daraus, dass der Punkt, an dem die zentrale Transversale die Oberfläche schneidet, der Initiationspunkt der Primärkaries sein muss. Von dort aus breitet sich die Karies entlang der Prismen im Laufe der Zeit aus. Die konische Läsionsform ist nach Bjørndal & Thylstrup das Resultat der Anordnung der Schmelzprismen und der anatomischen Bedingungen für eine Anreicherung eines kariogenen Milieus von außen.

Özer (1997) wiederum schlussfolgert nun für die Sekundärkaries, dass dort die Initiation der Läsion an der Zahnoberfläche neben dem Spalteingang liegen muss, da die in seine Bilder eingezeichnete „zentrale Transversale“ immer dort endet (Abb. 2.3).

Für die im Polarisationsmikroskop sichtbare Innere Läsion gibt es außerdem folgende Interpretationen: Der erkennbare dünne Streifen im Schmelz wird als die für Amalgame typische Spaltbildung gedeutet, die beim Legen der Füllung entsteht, sich aber im Laufe der Zeit verringert [Kidd 1976a]. Der ebenfalls bei Kompositen sichtbare Streifen im Polarisationsmikroskop ist die Folge der Schmelzätzung [Grieve & Jones 1980]. Die dunkle Zone der Läsion ist nur im Schmelz vorzufinden. Im Dentin zeigt sich lediglich ein dünner Streifen, der ein Zeichen für den Ionenaustausch an der Grenzfläche zwischen Restauration und Zahn ist. Die „seitliche Ausbreitung im Dentin“ liegt in der anatomischen Richtungsänderung der Dentintubuli begründet [Özer & Thylstrup 1995].

## 2.5 Mikrobiologie im Randspalt

„Es gibt einige welche es und zwar allem Ernste behaupten, daß der Zahnschmerz auch von Würmern entstehe, welche die Nerven des Zahnes und Zahnfleisches reißen, [...]. An dem Zahnfleische habe ich selbst Würmer gesehen, und zwar bei sehr gemeinen Leuten, welche unreinlich leben, besonders faulenden alten Käse gerne genießen, mit dem die Würmer zwischen den unsaubern Zähnen geraten, und davon ernährt werden. Ich habe aber nicht merken können, dass dergleichen Würmer durch ihr Nagen einen Zahnschmerz verursacht hätten, ...“ [Pfaff 1756]

Einen weiteren Pfeiler der wissenschaftlichen Basis der Sekundärkaries stellt die Mikrobiologie dar. Ihre Ursprünge liegen in Millers Arbeit aus dem Jahre 1892 über „Die Mikroorganismen der Mundhöhle“. Dort erwähnt er erstmals Mikroorganismen als Verursacher der Sekundärkaries und nicht Würmer, wie Pfaff 1756.

Wichtig für die Sekundärkaries ist, dass Akkumulationen von Mikroorganismen im Spalt zwischen Zahn und Restauration nachgewiesen wurden [Mejare et al. 1979, Qvist et al. 1977, Qvist 1980, Brännström & Nyborg 1973, González-Gabzas et al. 1995, 1999, 2002, Splieth et al. 2003]. In einem Spalt sind die Mikroorganismen fähig, sich trotz guter Versiegelung zu Tausenden zu vermehren [Brännström & Nyborg 1973]. *Streptococcus mutans* kann sogar nach scheinbar vollständiger Exkavation in den Dentintubuli überleben [González-Cabezas et al. 1995]. Bei marginaler Insuffizienz, besonders breiten Spalten bzw. rauen Füllungsflächen sind diese Ansammlungen von Bakterien stärker ausgeprägt [Buchmann 1992].

Die mikrobielle Flora der Sekundären Karies unterscheidet sich nicht von derjenigen der Primären Karies. Die Zusammensetzung der Keime gleicht eher der einer Plaque und kariösen Dentin als der im Speichel [Mejare et al. 1979, Splieth et al. 2003]. So finden sich unter Komposit- und Amalgamfüllungen strikte und fakultative Anaerobier [Kidd et al. 1993]. Dabei überwiegen grampositive Streptokokken und Aktinomyzeten über gramnegative Bakterien wie Veillonella, Fusobacterium, Camphylobacter und Selenomonas [Mejare et al. 1979]. Besonders *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* und *Actinomyces naeslundii* prägen das mikrobiologische Bild der Sekundärkaries [Kidd et al. 1993, González-Gabzas et al. 1995, 1999, 2002]. In der identischen Zusammensetzung der bakteriellen Flora von Primär- und Sekundärkaries liegt

begründet, dass Saccharose für die Sekundärkaries ein weitaus kariogeneres Substrat als Glukose darstellt [Derand et al. 1991].

Unabhängig von Material, Ausdehnung und Lokalisation der Füllung findet eine mikrobielle Adhärenz an Restaurationen und eine Penetration des Spaltraumes statt [Buchmann et al. 1992, Skjørland 1973]. Jedoch haben die unterschiedlichen Füllungsmaterialien andere Auswirkungen auf *Streptococcus mutans*. Dies zeigen Untersuchungen sowohl an initialer Plaque in vivo [Skjørland et al. 1982], an neu gelegten Füllungen [Wallman-Björklund et al. 1987, Svanberg et al. 1990a] als auch an sechs Monate bis 2½ Jahre alten Füllungen [Svanberg et al. 1990b]. Eine hohe Anzahl von *Streptococcus mutans* wird in der Plaque auf Kompositen, gefolgt von Amalgamen und einer sehr geringen Anzahl in der Plaque auf Glasionomern quantifiziert [Sønju & Glantz 1975, Ørstavik & Ørstavik 1976, Moura et al. 2004]. Diskutiert wird für das bessere Abschneiden der Amalgame und der Glasionomern eine Absenkung des pH-Wertes in der Plaque durch das in  $\gamma$ -freien Amalgamen enthaltene Kupfer [Wallman-Björklund et al. 1987]. Ebenfalls bewirkt das Fluorid in den Glasionomern eine Verschiebung des pH-Werts in den sauren Bereich [Svanberg et al. 1990b]. *Streptococcus mutans* nimmt über passive Diffusionswege Fluorid in Form von Flusssäure auf. Dies führt zu zwei Mechanismen, die den Energie-Stoffwechsel des Keimes, die Glykolyse, nachhaltig stören: Zum einen kommt es intrazellulär zu einer Übersäuerung der Zelle und damit zur Hemmung glykolytisch aktiver Enzyme, die hauptsächlich im alkalischen Milieu aktiv sind. Zum anderen hemmt Fluorid das für die Bildung von Phosphoenolpyruvat verantwortliche Enzym – die Enolase. Phosphoenolpyruvat ist maßgeblich am Transportsystem der Zelle beteiligt. Wird dieses nur noch vermindert gebildet, kann weniger Substrat in die Zelle gelangen [Sanderink et al. 2004]. Das saure Umfeld schafft insgesamt somit einen ungünstigeren Lebensraum für *Streptococcus mutans* [Hamilton 1977].

Dies ist insofern von Bedeutung, da eine steigende Anzahl an *Streptococcus mutans* und Laktobazillen in der Plaque an Restaurationsrändern mit einem gehäuftem Auftreten sekundärer kariöser Läsionen [Emilson & Krasse 1985, Svanberg et al. 1987] und einer höheren Konzentrationen dieser Keime im Speichel einhergehen [Zickert et al. 1983, Wallman & Krasse 1992, Svanberg et al. 1990b, Mundorff et al. 1990, Bentley et al. 1990].

## 2.6 Mikroleakage und Randspalt

*„Das Plombieren eines Zahnes nennt man diejenige Operation, da man eine nahmhafte und merkliche Höhle, welche auch wohl vorher gebrennet worden, mit Blei oder Gold oder Stanniol ausfüllet. [...] In die Höhle des Zahnes bringet man ein oder das anderemal trockene Baumwolle, damit sich alle Feuchtigkeiten hineinziehen mögen. Sonst würde das Blei sich nicht so recht fest an die Wände des Zahnes andrücken und feste sitzen. Ja die Feuchtigkeiten würden unter dem Blech in Fäulnis gehen den Zahn zerfressen und Schmerzen verursachen.“ [Pfaff 1756]*

Bereits 1756 hatte Phillipp Pfaff erkannt, dass ein Spaltraum zwischen Füllung und Zahn für einen Langzeiterfolg in der Füllungstherapie verhindert werden muss. Diesem Spaltraum wird auch heute noch die bedeutendste Rolle in der Ätiologie der Sekundärkaries zugetraut.

Dabei wird die Mikroleakage vom Randspalt (Spaltraum) unterschieden: Als Mikroleakage wird die Passage von Bakterien, Flüssigkeiten, Molekülen und Ionen zwischen Kavitätenwand und Füllungsmaterial bezeichnet [Kidd 1976a]. Mikroleakage bezeichnet also eine minimale Menge (*mikro*) an Flüssigkeit, die ein- oder austreten kann (*leakage*) [Mjör & Toffenetti 2000]. Besondere Aufmerksamkeit muss dabei den Wegen der Ionen zwischen Speichel und Pulpa und deren Effekte auf die Pulpa gewidmet werden [Going et al. 1960]. Im Gegensatz zum Randspalt erscheint die Mikroleakage so klein, dass sie klinisch nicht sichtbar ist [Kidd 1976b].

Der Begriff Randspalt (Perlokationsspalt, gap) beschreibt in erster Linie den Raum zwischen Zahn und Restauration, unabhängig davon, ob Bakterien, Flüssigkeiten, Moleküle und Ionen sich in ihm aufhalten oder nicht. Der Spalt stellt somit einen statischen Zustand dar, während die Mikroleakage die dynamischen Vorgänge in diesem Zwischenraum beschreibt [Buchmann et al. 1992]. Ursachen für eine Spaltbildung sind neben einer unvollständigen Exkavation in folgenden Bereichen zu suchen: Eigenschaften des Füllungswerkstoffs, Sorgfalt des Zahnarztes, Zeit, Ausmaß und Alter der Füllung, Art der Kavitätenwandbearbeitung, Gestaltung der Füllungsoberfläche sowie Verarbeitungsfehler [Jahn & Binus 1980].

In der Literatur ist häufig die Grenze zwischen den Begriffen Mikroleakage und Randspalt fließend oder sie werden nicht unterschieden.

Potentiell verfügen alle Füllungen materialbedingt über eine Mikroleakage bzw. es verschlechtert sich die Qualität des Füllungsrandes [Kidd 1976b, Brännström 1984, Goldberg 1990, Rigsby et al. 1990, Federlin et al. 1998, Irie & Suzuki 1999, Irie et al. 2002, Iwami et al. 2005, Piwowaczyk et al. 2005]. Nachweisen lässt sich dies mit den verschiedensten Methoden: Techniken mit Farbstoffen [Arcoria et al. 1991, Saunders et al. 1991, Tjan & Tan 1991, Gale et al. 1994, Brackett et al. 1995], mit radioaktiven Markern [Powis et al. 1988, Puckett et al. 1995], mit chemischen Markern [Hammersfahr et al. 1987, Holtan et al. 1990], mit Rasterelektronenmikroskopie [Abdalla & Davidson 1993, Hotta & Aono 1994], mit Bakterien [Rose et al. 1955, Seltzer 1955], mit Luftdruck [Pickard & Gayford 1965, Möller et al. 1983], durch Neutronenaktivitätsanalyse [Going et al. 1968, Meyer et al. 1974] sowie mit Künstlicher Karies [Kidd 1976b].

Folgen der Mikroleakage sind dann: Randverfärbungen, fortschreitende Verschlechterungen von Kavitätenrändern [Going 1972], Hypersensibilitäten [Brännström 1984], das Eindringen von Bakterien [Brännström & Nyborg 1971, Mejare et al. 1979, Qvist 1980] mit daraus folgenden entzündliche Veränderungen der Pulpa [Brännström & Nyborg 1973, Bergenholtz et al. 1982, Crim & Chapman 1994] und Sekundärkaries [Ellis & Brown 1967, Hals & Nernaes 1971, Eriksen & Pears 1978, Goldberg et al. 1981, Derand et al. 1991, Jørgensen & Wakumoto 1968, Hodges et al. 1995, Papagiannoulis et al. 2002].

Dafür sind folgende Vorgänge im Zahn-Restaurations-Spalt verantwortlich: Die zunächst luftgefüllten Mikrospalten (8-10 $\mu$ m) füllen sich schnell mit Flüssigkeit. Diese strömen auf Grund des Druckgefälles ständig von der Pulpa zur Zahnoberfläche respektive zum Füllungsspalt aus [Johnson et al. 1973, Brännström 1984, Ben Amar & Cardash 1991]. Dieser Ausstrom von Flüssigkeiten verursacht Hypersensibilitäten, da er zu Deformationen an den Nervenenden in den Dentintubuli führt und somit eine Schmerz sensation in den Mechanorezeptoren am pulpaseitigen Ende der Nerven auslöst [Brännström & Johnson 1978, Brännström 1992, Pashley 1996, Charoenlarp et al. 2007]. Verstärkt wird dieser Ausstrom, wenn Sekundärdentin an der pulpawärtigen Wand fehlt und/oder das Dentin an der Zahnoberfläche frei zugänglich zur Mundhöhle liegt. In der Regel verringert sich der Flüssigkeitsaustrom mit der Zeit. Dies kann verschiedene Gründe haben: Erstens akkumulieren feste Mineralien an der Dentintubuliwand, zweitens kann die Füllung materialbedingt expandieren, drittens

kalzifiziert der Pellikel und verschließt die Tubuli von außen und/oder viertens blockiert irreguläres Dentin die Dentintubuli am pulpanahen Ende. Gleichzeitig zum Ausstrom von Flüssigkeiten findet ein Einstrom dem chemischen Gradienten folgend von beispielsweise Saccharose und Säure statt. Wird der Spalt im Laufe der Zeit von der Mundhöhle ausgehend infiziert [Brännström & Nyborg 1971, Mejare et al. 1979, Qvist 1980] oder besteht bereits eine Infektion durch eine nicht vollständige Exkavation, häufig an der Schmelz-Dentin-Grenze [Kidd et al. 1996, Kidd & Beighton 1996], vermehren sich die Bakterien dort. Dies resultiert dann in entzündlichen Veränderungen der Pulpa durch das Wiederaufflammen einer Residualkaries [Brännström 1984] bzw. durch die Entstehung einer Sekundärkaries. Ob die Mikroleakage per se als Ursache der Sekundärkaries gelten kann, bleibt jedoch umstritten (s. Kap. 2.4).

Dabei sollen chemisch toxische Faktoren, wie Säure und Bestandteile des Füllungsmaterials, keine Entzündung der Pulpa hervorrufen [Brännström & Nyborg 1973, Bergenholtz et al. 1982, Brännström 1984, Cox et al. 1987]. Stattdessen scheint die Infektion der Mikroleakage ausschlaggebend für Irritationen der Pulpa zu sein. Zum Einfluss der Spaltbreite auf die Sekundärkaries liegen Studien mit sehr widersprüchlichen Ergebnissen vor (Tab. 2.1): Dass die Spaltbreite die Sekundäre Karies beeinflusst, zeigen die Studien von Jørgensen und Wakumoto 1968, Goldberg et al. 1981, Derand et al. 1991 und Hodges et al. 1995, Totiam et al. 2007. Andere Studien formulieren keinen Zusammenhang zwischen Spaltbreite und Sekundärkaries [Söderholm et al. 1989; Kidd & O'Hara 1990, Pimenta et al. 1995, Rezwani-Kaminski et al. 2002]. Ebenfalls kann allein anhand der Randqualität einer Restauration keine Aussage über den Zustand der Zahnhartsubstanz im Spalt gemacht werden [Goldberg et al. 1981, Pimenta et al. 1995].

Alle diese Studien untersuchen die Äußere und Innere Läsion gleichzeitig. Bisher wurde keine Studie zum Einfluss der Spaltbreite auf die Innere Läsion in Schmelz und Dentin unabhängig von einer Äußeren Läsion realisiert. Außerdem stellt sich die Frage, wie breit ein Spalt sein muss, um Sekundärkaries entstehen zu lassen, und welche klinischen Konsequenzen daraus resultieren.

## 2.7 Studiendesigns zur Untersuchung von Sekundärkaries

*„The basis of an artificial mouth model is to provide a continuous or intermitted supply of nutrients to bacterial plaque or biofilms growing within an environment, which mimics the in vivo oral niches and habitats.“* [Tang et al. 2003]

Zur Erzeugung von Sekundärkaries sind grundsätzlich alle Modelle denkbar, die zur Erzeugung von Primärkaries genutzt werden. Sie lassen sich im Allgemeinen in In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen aufteilen. Zu den ersteren gehören klinische Studien am Menschen und Tierexperimente. In-situ-Untersuchungen sowie Untersuchungen an extrahierten Zähnen können, die Sekundärkaries betrachtend zu den In-vivo-Untersuchungen gezählt werden, da die Karies im menschlichen Mundhöhlenmilieu entstanden ist. Zu den In-vitro-Untersuchungen gehören alle diejenigen Studien, bei denen versucht worden ist, eine der „natürlichen“ Läsion ähnliche Karies zu erzeugen, indem möglichst viele Faktoren der menschlichen Mundhöhle, je nach Ziel der Studie, künstlich nachgeahmt werden [Tang et al. 2003]. Dazu zählen sowohl die rein chemischen und die mikrobiellen Modelle als auch die künstlichen Mundhöhlen.

### 2.7.1 In vivo Untersuchungen

„Echte“ kariöse Läsionen können nur in vivo entstehen in einer natürlichen, von Mikroorganismen besiedelten und von natürlichem Speichel beeinflussten Umgebung. Die menschliche Mundhöhle ist jedoch ein hochgradig komplexes Ökosystem, das es dem Untersucher derzeit unmöglich macht, alle für die Kariesentstehung relevanten Faktoren zu beachten und in Modellversuchen zu imitieren [Gustafsson et al. 1954, Axelsson & Lindhe 1978, Kristofferson et al. 1985, Eisenberg et al. 1991].

So können interindividuelle Unterschiede hinsichtlich der Ernährung, Mundhygiene, Genetik und der vorhandenen Mundhöhlenflora die Ergebnisse einer in vivo Studie für den Untersucher unkontrollierbar verfälschen. Des Weiteren kann die Demineralisation in vivo nur bedingt evaluiert werden, da „Gold-Standards“ zur Bestimmung der Demineralisationstiefe wie die Mikroradiografie, aber auch die Konfokale Laserscanning Mikroskopie nicht angewandt werden können, ohne die Zähne zuvor zu extrahieren. Letztgenanntes Problem greifen in situ durchgeführte Studien auf, indem Zahnproben an Prothesen oder Schienen befestigt werden [Dijkman & Arends 1992, Benelli et al. 1993, Sønju-Clasen & Øogard 1999]. Diese werden für eine bestimmte Zeit von

Probanden getragen. Nach Ablauf der Versuchsdauer können die Proben dann aufbereitet und mikroskopisch untersucht werden. Individuelle Faktoren wie die Genetik, die Keimflora sowie die Ernährungs- und Lebensgewohnheiten können hier ebenfalls nicht standardisiert werden. Gleiches gilt für die Ex-vivo-Studien. In ihnen werden die Zähne bebändert, um Plaqueretentionsstellen zu schaffen. Meist handelt es sich dabei um Zähne, die aus kieferorthopädischen Gründen extrahiert werden müssen [Brännström & Nyborg 1971, 1973, Hals & Norderval 1973, 1974, Czochrowska et al. 1998]. Vorteil dieser Methode ist im Vergleich zum In-situ-Versuch eine ununterbrochene Vitalität der Proben. Nachteilig kann sich die Extraktion auf die Struktur des Schmelzes auswirken, d.h. eine Beurteilung, besonders der approximalen Karies, ist nur bedingt möglich. Diese Studien beschränken sich deshalb auf die Sekundärkaries an okklusalen Füllungen.

Um ebenfalls die Keimflora, die Ernährung und Lebensgewohnheiten experimentell zu standardisieren, müssen ethisch bedenkliche Tierversuche durchgeführt werden. In der Sekundärkariesforschung wird in der Regel die Ratte gewählt, da ihre Molaren ähnlich den menschlichen Zähnen demineralisieren [König 1965]. Durch eine sterile Aufzucht in Isolatoren kann die Mundhöhlenflora aller Versuchstiere größtmöglich unter In-vivo-Bedingungen angeglichen werden [Fitzgerald 1968, Orland et al. 1955]. Die Ernährung wird mittels Automaten mit steriler Nahrung vereinheitlicht [König 1965]. Fehler durch interindividuelle genetische Unterschiede bleiben [Hunt 1944, König 1965].

### **2.7.2 In vitro Untersuchungen**

In-vivo-Methoden sind sehr aufwendig, teuer, teilweise ethisch bedenklich, langwierig und schwer zu kontrollieren. Deshalb können In-vivo-Studien oft in nur geringem Probenumfang durchgeführt werden. Hinzu kommt der Wunsch nach einer Reduzierung des Kariesgeschehens auf wenige für die Untersuchung wichtige Faktoren, die dann besser kontrolliert und standardisiert werden können und deren Einfluss am Ende besser zu beurteilen ist. Deshalb wurden in den letzten 50 Jahren verschiedene In-vitro-Systeme entwickelt.

Zum einen können die Zahnproben in rein physikochemischen Modellen und zum anderen in mikrobiologischen Systemen demineralisiert werden. Bei letzteren resultiert die Karies aus den Säuren des bakteriellen Stoffwechsels.

Die physikochemischen Methoden beschränken sich auf die Erzeugung einer Läsion an den Proben durch die Applikation demineralisierender Agentien (häufig Milch- oder Essigsäure) [Silverstone 1967, 1968, Hals & Nernaes 1971, Kidd 1976a, Grieve 1980]. Beschrieben sind grundsätzlich zwei physikochemische Methoden: die Säuregelmethode und die Säurelösungsmethode. Während im Gelmodell verschiedene Substanzen (Gelatinelösung, Methanhydroxydiphosphat, Ethanhydroxydiphosphat, Hydroxyethylzellulose, Methylzellulose, Carboxymethylzellulose und Agargel) auf die Proben gebracht werden, werden im Lösungsmodell der wässrigen Lösung zusätzlich zur Säure Kalzium- und Phosphationen hinzugefügt [Seemann 2005].

Die physikochemischen Methoden weichen stark von den Bedingungen der natürlichen Mundhöhle ab. Besonders deswegen, weil keine Keime in die Erzeugung der kariesähnlichen Läsionen involviert sind. So bleibt bei beiden Methoden eine Plaque- bzw. Biofilmbildung aus. Gerade diese scheint jedoch in Bezug auf eine Besiedlung des Spaltes zwischen Zahn und Restauration für die Untersuchung der Sekundärkaries von Bedeutung zu sein [Derand et al. 1991, Özer 1997, Söderholm et al. 1998].

So wurden die chemischen Modelle weiterentwickelt, indem bakterielle Rein- oder Mischkulturen den Systemen hinzugefügt wurden [Sissons 1997, 1998, Sissons et al. 1998]. In den meisten Fällen wird das Modell mit dem Kariesleitkeim *S. mutans* infiziert [Schiffner & Schmeiser 1995, Fontana et al. 1996, Deng & Ten Cate 2004]. Auf der Grundlage dieser einfachen mikrobiologischen Modelle entstanden in den darauf folgenden Jahren die künstlichen Mundhöhlen [Seemann et al. 2006]. In ihnen wird mittels spezieller Apparaturen versucht, „... eine kontinuierliche oder intermittierende Versorgung der bakteriellen Plaque oder des Biofilms mit Substrat ...“ zu gewährleisten und damit den Bedingungen in der menschlichen Mundhöhle gerecht zu werden [Tang et al. 2003]. Neben den bakteriellen Keimen und deren Substrat wird humaner oder künstlicher Speichel eingesetzt, um die natürliche Remineralisation zu simulieren.

Tabelle 2.1: Übersicht der Studien zur Abhängigkeit der Sekundärkaries (SK) von der Spaltbreite und von der Randqualität: *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM), Lichtmikroskopie (LM), Mikroradiografie (MR), Polarisationsmikroskopie (PM), Rasterelektronenmikroskopie (REM), Stereomikroskopie (SM)

	Studie (Füllungs- material, Kavitäten- form)	Material und Methoden		Ergebnisse
		Ziel der Studie/ Studiendesign	Demineralisations- technik/ Auswertungstechnik	
In-vitro	Gilmour et al. 1990 (Komposit)	Untersuchung der Mikroleakage an Füllungen mit und ohne Ansträgung bzw. mit und ohne Ätztechnik n = 55 Sekundärkaries als Indikator für Mikroleakage	Culture bath technique mit <i>S.mutans</i> (10 Tage)  <b>Mikroleakage:</b> Bewertung durch Vorhandensein einer IL im PM (Wasser und Quinoline) ja/ nein	<b>IL:</b> 5% bei mit Ansträgung und Ätzung, 16% bei ohne Ansträgung und Ätzung, 31% bei ohne Ansträgung und ohne Ätzung  <b>Zusammenhang von SK und Randqualität</b> (fehlende statistische Tests)
	Derand et al. 1991 (Amalgam, Modell)	Untersuchung der Sekundärkaries in Abhängigkeit von der Spaltbreite n = 32 Standardisierte Spaltbreiten in einem Minischlitten-Modell: 10 Gruppen 5 in Saccharose und 5 in Glukose mit jeweils Spalten von 0, 30, 40, 60, 80µm	Säuregeltechnik mit <i>S.mutans</i> (4 Wochen)  <b>SK:</b> MR, PM (Wasser) keine Quantifizierung der Läsion	<b>in Saccharose:</b> dicke Plaque und alle Proben mit IL im Dentin außer bei 0µm <b>in Glukose:</b> dünne Plaque und mit IL im Dentin bei 60 und 80µm <b>PM:</b> ÄL bei 100%, IL bei 46% in Saccharose und bei 21% in Glukose <b>MR:</b> keine IL im Schmelz, jedoch im Dentin (fehlende statistische Tests)
	Totiam et al. 2007 (Komposit, Modell)	Untersuchung eines Zusammenhangs von SK und Spaltbreite Standardisierte Spaltbreiten in einem Minischlitten-Modell (0, 25, 254, 1016µm)	Culture bath technique mit <i>S.mutans</i> (8 Tage)  <b>SK:</b> CLSM	<b>Zusammenhang von SK und Spaltbreite</b> <b>ÄL:</b> signifikante Unterschiede im Schmelz zwischen 1016µm und 0, 25 bzw. 254µm, im Dentin zwischen 1016 und 0 µm bzw. 254 und 0µm <b>IL:</b> signifikante Unterschiede im Schmelz zwischen 1016 und 0 bzw. 25µm, im Dentin zwischen allen Gruppen außer 0 und 25µm
In-situ	Thomas et al. 2007 (Komposit, Polyacrylat, Modell)	Untersuchung, ob eine IL entsteht und ob die ÄL schneller fortschreitet bei Kompositfüllungen als bei ungefüllten Zähnen n = 16 (2 Prothesen mit je 4 un- und 4 restaurierten Proben)	Prothesen (20 Wochen)  <b>SK:</b> MR alle 4 Wochen	<b>IL:</b> keine IL bei spaltfreien Kompositrestorationen keine eindeutige IL bei Komposit, IL neben Polyacrylat

Ex-vivo	Jørgensen, Wakumoto 1968 <b>(Amalgam, Klasse I)</b>	Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen SK und Qualität des Füllungsrandes bzw. Spaltbreite n = 134 (Alter 9-15 Jahre, hohe Kariesaktivität)	<b>SK:</b> Visuell im SM <b>Spaltbreite:</b> Visuell im SM	<b>Zusammenhang von SK und Spaltbreite</b> SK erst ab 50µm Spaltbreite - diese Spaltbreite kann man sondieren Überschüsse an Füllungsrandern erhöhen SK
	Söderholm et al. 1989 <b>(Amalgam, Klasse I, II und V)</b>	Zusammenhang zwischen Spaltbreite und SK; Kann mit Sonde SK diagnostiziert werden oder nur Aussage über Randqualität getroffen werden? n = 35 (68 Oberflächen)	<b>SK:</b> visuell, Sondierung nach Füllungsentfernung <b>Spaltbreite:</b> REM	<b>kein Zusammenhang von SK und Spaltbreite</b> defekter Füllungsrand ist kein Indikator für SK Sonde kann nicht zur Diagnostik einer SK beitragen
	Kidd, O'Hara 1990 <b>(Amalgam, Klasse I)</b>	Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen defektem Füllungsrand und SK n = 30 Ausschluss von Zähnen mit Karies an der Oberfläche	<b>SK:</b> PM (Quinoline) <b>Qualität des Füllungsrandes:</b> Fotografie mit SM	<b>kein Zusammenhang von SK und Qualität des Füllungsrandes IL:</b> bei 54% der Regionen mit defektem Füllungsrand und bei 54% der Regionen ohne defektem Füllungsrand
	Özer 1997 <b>(Amalgam, Klasse II)</b>	Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen Spaltbreite, mikrobielle Akkumulation und Sekundärkaries n = 50 (Ausschluss von Zähnen mit Karies an der Oberfläche)	<b>SK:</b> Sonde, SM, LM, PM <b>MiBi:</b> Visuell <b>Spaltbreite:</b> SM	<b>kein Zusammenhang zwischen SK und Spaltbreite</b> erst ab 250µm vermehrte SK Starker Zusammenhang zwischen mikrobieller Akkumulation und SK
	Pimenta et al. 1995 <b>(Amalgam, Klasse I)</b>	Untersuchung, ob Randdefekt in Zusammenhang mit SK steht n = 55 Ausschluss von Zähnen mit Karies an der Oberfläche	<b>SK:</b> Visuell, PM (Quinoline) <b>Qualität des Füllungsrandes:</b> REM	<b>kein Zusammenhang von SK und Qualität des Füllungsrandes visuell:</b> 3.6% SK und korrekter Rand, 20% SK und defekter Rand <b>PM:</b> 47% mit SK und korrektem Rand, 59% SK und defektem Rand
In-vivo	Goldberg et al. 1981 <b>(Amalgam, Klasse II)</b>	Untersuchung des Einflusses der Qualität des Füllungsrandes und der Mundhygiene auf die SK <i>Querschnittsstudie</i> (Patienten der University of Connecticut Health Center, 17-61 Jahre) n = 87	<b>Mundhygiene:</b> Plaque und Gingivaler Index <b>SK:</b> Klinische Sondierung mit spitzer Sonde, Röntgen <b>Qualität des Füllungsrandes:</b> Fotografie-Vergleich nach Mahler	<b>Zusammenhang von SK und Qualität des Füllungsrandes</b>  Verminderung des allgemeinen Kariesrisikos ist jedoch wirksamer gegen SK

In -vivo	<p>Hamilton et al. 1983 <b>(Amalgam, Klasse II)</b></p>	<p>Untersuchung, inwiefern das Ausmaß der marginalen Fraktur einer Füllung deren Lebensdauer bestimmt (Vergleich zweier Amalgame) <i>Longitudinalstudie</i> (Kontrolle nach 1, 2, 3, 4, 5 und 10 Jahren) n = 48 (31 Patienten im Alter von 18-57),</p>	<p><b>Anatomische Form, Marginale Adaptation, SK:</b> Visuelle Beurteilung und Sondierung nach Kriterien von Cvar &amp; Ryge 1971</p>	<p><b>kein Zusammenhang von SK und Qualität des Füllungsrandes</b></p> <p>über 10 Jahre hatte sich die Randqualität signifikant verschlechtert, jedoch ist die SK nicht signifikant mehr aufgetreten (Fluoridgehalt der Gegend 1ppm)</p>
	<p>Hodges et al. 1995 <b>(Amalgam, Klasse I)</b></p>	<p>Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Sekundärkaries und Spaltbreite <i>Querschnittsstudie</i> n = 18 (Patienten der Universitätsklinik, Alter &gt;20 Jahre)</p>	<p>Füllungen mit defektem Rand und keiner SK wurden abgeformt, Füllungen entfernt und die Kavität auf SK mittels Sonde untersucht <b>Spaltbreite:</b> Replikas im REM</p>	<p><b>Zusammenhang von SK und Spaltbreite</b></p> <p>Differenz von 187µm zwischen mittlerer Spaltbreite der kariösen und der nicht kariösen Seiten bei einer Standardabweichung von 167µm</p>
	<p>Rezwani-Kaminski et al. 2002 <b>(Komposit, Klasse I und II)</b></p>	<p>Untersuchung der Anfälligkeit von Kompositrestorationen nach 18-20 Jahren <i>Longitudinalstudie</i> n = 16</p>	<p><b>SK:</b> Visuell und Sondierung nach CPM Index</p> <p><b>Qualität des Füllungsrandes:</b> Replikas im REM</p>	<p><b>kein Zusammenhang von SK und Spaltbreite</b></p> <p>alle Füllungen hatten raue Oberflächen und Randdefekte, nur 2 Zähne hatten SK (fehlende statistische Tests)</p>

### 3 ZIEL DER STUDIE

In der englisch- und deutschsprachigen Literatur finden sich keine Studien zur Entstehung einer Inneren Läsion in Schmelz und Dentin bei gleichzeitiger Verhinderung einer Äußeren Läsion und unter Betrachtung verschiedener Spaltbreiten.

Daher soll in dieser Studie der Frage nachgegangen werden, ob sich charakteristische Innere Läsionen unabhängig von Äußeren Läsionen ausbilden können und inwiefern unterschiedliche Spaltbreiten sowie die Äußere Läsion das Ausmaß der Inneren Läsion beeinflussen.

Diese Fragestellung hat einen direkten Einfluss auf die klinische Diagnostik der Sekundärkaries, ihrer Therapie sowie ihrer Prävention. Entsteht nämlich eine Innere Läsion nicht ohne eine Äußere Läsion, könnten die Diagnostik und die präventiven Maßnahmen auf die Äußere Läsion beschränkt werden. Entsteht die Innere Läsion jedoch unabhängig von der Äußeren Läsion, ist eine „hidden caries“ im Spaltbereich möglich und andere, darauf wiederum abgestimmte, Konzepte zur Aufdeckung und Behandlung der Wandläsion müssten entwickelt werden.

Folgende *Fragen* und **Arbeitshypothesen** ergeben sich:

1. *Entsteht bei Vorliegen eines Randspaltes eine Innere Läsion, wenn die Bildung einer Äußeren Läsion an der Zahnoberfläche unterbunden wird?*  
- **Trotz Verhinderung der Ausbildung einer Primärläsion kommt es zur Ausbildung von Inneren Läsionen.**
2. *Gibt es Unterschiede in der Ausdehnung der Inneren Läsion in Abhängigkeit von der Spaltbreite bei Verhinderung der Äußeren Läsion?*  
- **Je größer der Randspalt, desto ausgeprägter ist die Innere Läsion.**
3. *Beeinflusst die Äußere Läsion das Ausmaß der Inneren Läsion? – Die Innere Läsion ist stärker ausgeprägt bei gleichzeitiger Existenz einer Äußeren Läsion.*

## 4 MATERIAL UND METHODE

### 4.1 Experimentelles Design

15 kariesfreie Rinderfrontzähne wurden aus sechs Unterkiefern extrahiert. Aus jedem Zahn wurden vier Proben gesägt. Je eine der vier Proben wurde je einer der vier Gruppen zugeteilt:

**Testgruppe 50** (Spaltbreite von 50µm mit versiegelter Zahnoberfläche zur Vermeidung der Ausbildung einer Primärläsion),

**Testgruppe 100** (Spaltbreite von 100µm mit versiegelter Zahnoberfläche zur Vermeidung der Ausbildung einer Primärläsion),

**Testgruppe 250** (Spaltbreite von 250µm mit versiegelter Zahnoberfläche zur Vermeidung der Ausbildung einer Primärläsion),

**Kontrollgruppe** (Spaltbreite von 250µm).

In jeder der Gruppen befanden sich somit 15 Proben (Abb. 4.1).

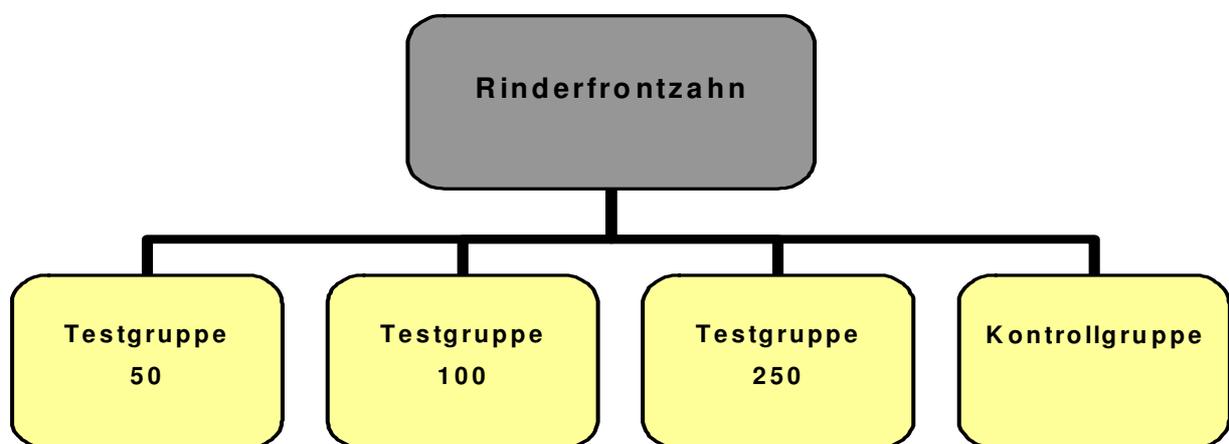


Abbildung 4.1: Gruppeneinteilung der Proben

## 4.2 Probendesign

Zunächst wurden die Zähne in Formalin desinfiziert, dann von ihren Wurzeln getrennt und in kaltpolymerisierenden Kunststoff (Technovit 4004, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) eingebettet. Mittels einer Innenlochsäge (Leitz 1600, Ernst Zeitz, Wetzlar, Deutschland) konnten aus jedem Zahn vier Quader 3 x 3 x 5mm gewonnen werden. Die Proben lagerten anschließend in destilliertem Wasser.

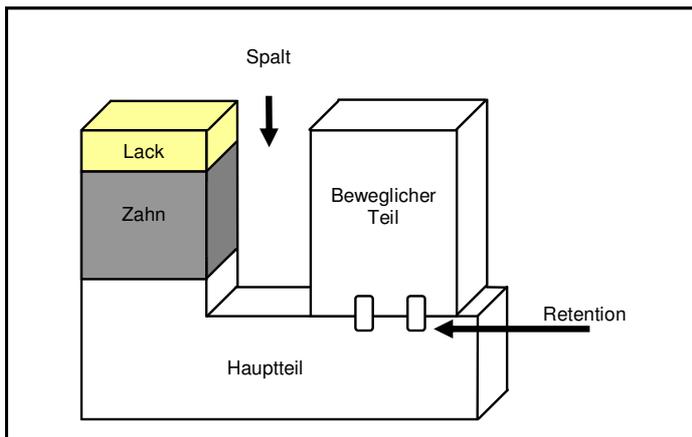


Abbildung 4.2: schematische Darstellung des Minischlittens mit einer Probe aus einer der Testgruppen

Für die Erzeugung verschiedener Randspalten wurde in Zusammenarbeit mit dem medizinischen Forschungslabor der Charité ein Minischlitten aus Polyoxymethylen nach Vorbildern von Derand et al. 1991 und Totiam et al. 2005, 2007 entwickelt (Abb. 4.2).

Dieser Minischlitten besteht aus einem Hauptteil, in dem die gesägte Zahnprobe mittels Komposit (Z100, Fa. 3M ESPE, Neuss, Deutschland) befestigt wird und einem beweglichen Teil. Der bewegliche Teil kann über eine Führungsrille an den Probenkörper herangeschoben werden. Die der Zahnprobe zugewandte Wand des Quaders ahmte die „Restaurationswand“ nach.

Zum Einbau der Zahnproben in den Hauptteil wurde der bewegliche Teil bis auf 0µm herangeführt und die Probe mittels Kunststoff so befestigt, dass kein Spalt zwischen Zahnprobe und beweglichem Teil im Stereomikroskop bei 4facher Vergrößerung (Stemi 2000, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) erkennbar war.

Bei allen drei Testgruppen wurde anschließend der oberflächliche Schmelz mit einer zweifachen Schicht Nagellack („Nivea Flex & Strong with Bamboo“, NIVEA Beauté Beiersdorf AG, Hamburg, Deutschland) (*Inhaltsstoffe*: Butyl Acetate, Ethyl Acetate, Nitrocellulose, Acetyl Tributyl Citrate, Adipic Acid/Neopentyl Glycol/Trimellitic Anhydride Copolymer, Isopropyl Alcohol, Styrene/Acrylates Copolymer, Stearalkonium Bentonite, Heliantus Annuus Bambusoidea, Calcium Pantothenate, Trimethylpentanediyl Dibenzoate, Benzophenone-1, Polyvinyl Butyral, Polyethylene, Dimethicone, Trimethylsiloxysilicate, Mica, CI 77891, CI 77491, CI 77499, CI 19140, CI 15880, CI 15850, CI 77742, CI 77163, CI 60725, CI 77007) abgedeckt, um das Entstehen einer Karies, von der Oberfläche des Zahnes ausgehend zu verhindern.

Nach der Fertigstellung der Proben mussten alle Proben bei 4facher Vergrößerung folgende Kriterien erfüllen:

- ◆ *spaltfreier Randschluss bei herangefahrenem beweglichen Teil zwischen diesem und der Zahnprobe,*
- ◆ *planer Abschluss der Oberflächen von beweglichem Teil und Zahnprobe, sowie*
- ◆ *eine Lackschicht, die ausschließlich die Oberfläche der eingebetteten Zahnprobe bedeckte.*

Alle Proben wurden von 1 bis 60 durchnummeriert.

Mit Hilfe von Metallplättchen der Dicke 50µm, 100µm und 250µm wurden die erwünschten Spaltbreiten eingestellt. Dazu wurden die Metallplättchen jeweils zwischen Probe und beweglichen Teil gebracht, dann entfernt und die Weiten des Spaltes unter einem geeichten Lichtmikroskop (Laborlux 12, Ernst Zeitz, Wetzlar, Deutschland) kontrolliert. Der bewegliche Teil des Minischlittens konnte mittels Komposit in den hierfür eingefrästen Retentionsrillen des Minischlittens im erforderlichen Abstand fixiert werden. Anschließend wurde die Spaltbreite nochmals unter dem Lichtmikroskop geprüft.

Um die fertigen Proben für das In-vitro-Kariesmodell sterilisieren zu können, wurden sie in eine mit destilliertem Wasser gefüllte Tupperware Dose gelegt. Die Dose wurde mit offenem Deckel in eine Papier-Plastik-Tüte eingeschweißt. Die Gassterilisation der Proben erfolgte mit Ethylenoxid bei 55°C für fünf Stunden. Danach wurde die Dose, ohne dabei die Papier-Plastik-Tüte zu öffnen, geschlossen und in den Isolator gelegt.

### 4.3 Voruntersuchung im REM

In einer Voruntersuchung sollte die entwickelte Methode der Probenherstellung auf parallele, gleichmäßige Spalten geprüft werden. Dazu wurden zwei Proben in die Minischlitten eingebaut und jeweils 50µm, 100µm und 250µm Randspalten eingestellt. Die Spalten wurden mit einem dünnfließenden additionsvernetzenden Silikon („Honigum<sup>®</sup> Automix Light“, Dental Material Gesellschaft, Chemisch Pharmazeutische Fabrik GmbH, Hamburg, Deutschland) abgeformt und zur besseren Stabilisierung in einem kondensationsvernetzenden Silikon („Silagum<sup>®</sup> Putty Standard, Katalysator und Base, Dental Material Gesellschaft, Chemisch Pharmazeutische Fabrik GmbH, Hamburg, Deutschland) befestigt. Nach 24 Stunden wurden die Abformungen mit 70%igem Alkohol und Chloroform gereinigt, mit Epoxidharz (Stycast 1266, Grace N.V., Westerlo, Belgien) ausgegossen und auf Objektträger geklebt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Proben im Sputter (Sputter-Coater SCD 030, Balzers Union, Blazers, Fürstentum Liechtenstein) mit Gold bei einer Stromstärke von 40mA in einer Argonatmosphäre von  $0,5 \times 10^{-5}$  bar beschichtet. Die Replikas wurden unter dem Rasterelektronenmikroskop (AMRAY 1810, Amray Inc., 160 Middlesex Turnpike, Bedford, Massachusetts, USA) auf parallele gleichmäßige Spalten beurteilt (s. Kap. 5.1).

## 4.4 Biofilmbasiertes In-vitro-Kariesmodell

### 4.4.1 Allgemeiner Aufbau

Seemann et al. beschreiben 2005 ein biofilmbasiertes In-vitro-Kariesmodell, in dem die Proben nicht in den Medien gebadet werden, sondern die Medien über spezielle Tropfspritzen auf die Proben appliziert wurden. Dieses Kariesmodell besteht aus einem bakteriendichten Plastikwürfel (A) („Isolator“, Modell 90; Metall und Plastik, Randolphzell, Deutschland)(Abb. 4.5) und einer darin befindlichen Reaktionskammer (B)(Abb. 4.4). Der Plastikwürfel ist in einem Metallgerüst aufgehängt. Der Zugang zur Reaktionskammer kann entweder über die Hauptschleuse (C), die Nebenschleuse (D) bzw. mittels eingebauter Gummihandschuhe (J) erfolgen (Abb. 4.3). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Mundhöhle gleicht der von Seemann et al. 2005. Jedoch wurde diese in sofern weiterentwickelt, dass der Motor jetzt auf dem Deckel lokalisiert ist und die Achse von oben in die Reaktionskammer hineinragt (Abb. 4.4).

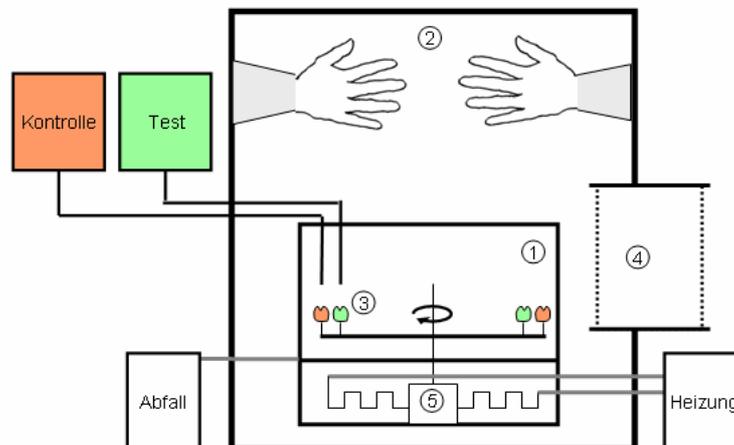


Abbildung 4.3: schematische Darstellung des biofilmbasierten In-vitro-Kariesmodells [Seemann 2005]: steriler Bereich innerhalb des Isolators (A); Reaktionskammer (B); Hauptschleuse für den initialen Transfer aller Materialien (C); Nebenschleuse für den Transfer kleinerer Gegenstände während des laufenden Versuches (D); flüssige Medien (E); synthetische Luft (F); Abfallbehälter (G); Wasserthermostat und Heizröhrensystem zur Temperierung des Reaktionsgefäßes (H); Schlauchpumpen (I); Handschuheingriffe für Arbeiten innerhalb des Isolators (J); Schrittmotor (K); Zahnproben auf dem Probenrad passieren die Tropfspritzen, die die erforderlichen Medien befördern (L)

Ein steriler experimenteller Aufbau der Reaktionskammer im Isolator wurde wie folgt erreicht: Die in einen Sterilgutbeutel eingeschweißte Reaktionskammer sowie die weiteren notwendigen Materialien, ebenfalls in Sterilgutbeuteln eingeschweißt, wurden bei 60°C mit 3%igem Formaldehyd sterilisiert und dann ins Innere des Isolators über die Hauptschleuse gebracht. Anschließend wurde der Innenraum des Isolators mit einer 5%igen Peroxyessigsäure 20 Minuten ausgesprüht. Mittels der Handschuheingriffe wurden die sterilen Materialien in der desinfizierten Umgebung entnommen und entsprechend aufgebaut.



Abbildung 4.4: Reaktionskammer mit Probenrad und Proben

Die Reaktionskammer wurde über ein wasserbetriebenes System (G) beheizt. Hierfür war ein spiralförmig gewundenes Kupferrohr ( $d = 1,0\text{cm}$ ) am Boden der Reaktionskammer in Epoxidharz eingebettet (Wessex Resin and Adhesives Ltd; Romsey, Großbritannien). Die Heizquelle befand sich in Form eines Wasserbades (Haake B3; Karlsruhe, Deutschland) außerhalb des „Isolators“. Ein Schrittmotor (K) (RS 440-436; RS components, Mörfelden, Deutschland) befand sich auf dem Deckel der Reaktionskammer und drehte über eine von dort in die Reaktionskammer reichende Achse das Probenrad (L) (Polyoxymethylen,  $d = 20\text{cm}$ ). Nur die Achse befand sich im Innern der Kammer. Auf dem Probenrad konnten maximal 60 Minischlitten untergebracht werden. Im Deckel der Reaktionskammer waren ein Thermometer, eine Luftschleuse (F) für die kontinuierliche Gaszufuhr und zehn Kunststoffhalterungen eingelassen. Letztere dienten zur Befestigung der Tropfspritzen mittels Luer-

Verschluss. Der Abfluss befand sich am Boden der Reaktionskammer und wurde in einen Abfallbehälter (G) außerhalb des Isolators gepumpt (Abb. 4.3).

Alle Medien wurden aus ebenfalls sterilen Infusionsflaschen über sterile Infusionsschläuche (Heidelberger Verlängerung 04097408, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und jeweils eine dazugehörige Schlauchpumpe (E) (Alitea, Modell XV, Watson Marlow Alitea, Stockholm, Schweden) der Reaktionskammer zugeführt. Eine hierfür entwickelte Software organisierte die Schlauchpumpen mit Hilfe von Relaisschaltungen (Abb. 4.5).



Abbildung 4.5: Isolator mit der Reaktionskammer (rechts) und Infusionsflaschen mit Medien und Schlauchpumpen (links)

Die Lösungen wurden autoklaviert und steril in Infusionsflaschen gefüllt. Über die Tropfspritzen wurden auf die Proben drei Lösungen appliziert:

- ◆ „Tryptikase-Soja-Bouillon“ (TSB „trypticase soy broth“, Becton Dickinson, Sparks, USA) für das bakterielle Wachstum;
- ◆ eine remineralisierende Lösung („künstlicher Speichel“): Ein Liter destilliertes Wasser enthält 1,2g KCl; 0,84g NaCl; 0,26g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,15g  $\text{CaCl}_2$ ; pH = 6,8 [Shellis 1978],

- ◆ *sowie ein bakterielles Substrat für die Produktion extrazellulärer Polysaccharide und Milchsäure durch die Bakterien in Form einer 10%igen Saccharoselösung.*

In einem Zeitraum von 21 Tagen erhielten die Proben eine sich wiederholende Behandlung: TSB für 2min jede 1min, Künstlichen Speichel für 2min alle 15min und 10%ige Saccharoselösung einmal in einer Stunde statt TSB.

Die Proben wurden mit einer Geschwindigkeit von 0,4ml/min betropft bei einer Rotationsgeschwindigkeit des Probenrades von 3U/min. Die Temperatur der Reaktionskammer betrug kontinuierlich  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Die Anzüchtung eines kariogenen Stammes von *Streptococcus mutans* erfolgte aus seiner lyophilisierten Form, die von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen erhalten wurde (DSM 20523; ATCC 25175, Braunschweig, Deutschland). Die Vorkultivierung des Keimes fand zunächst auf Blut-Agar-Platten statt. Anschließend wurden einzelne Kolonien in 30ml Trytikase-Soja-Bouillon überführt und unter anaeroben Bedingungen bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Mit 20ml dieser Keimsuspension wurde die Apparatur am Beginn des Versuchs und eine Woche danach kontaminiert.

Nach Abschluss des Versuches wurden die Proben mit destilliertem Wasser, Zahnseide („Oral B Zahnseide“ *ungewachst*, Procter & Gamble Service GmbH, Schwalbach am Taunus, Deutschland) und Bürstchen („Miniatur-Zahnreinigungsbürstchen“, Kerr Hawe GmbH, 76158 Karlsruhe, Deutschland) gereinigt. Die Proben lagerten bis zur Auswertung in destilliertem Wasser.

#### **4.4.2 Mikrobiologische Tests nach Abschluss**

Mikrobiologisches Material wurde unmittelbar vor Abschluss des Experiments aus dem Abfallbehälter und dem Innern der Reaktionskammer entnommen. Zur Testung auf Fremdkeime wurden die entnommenen Proben auf Columbia-Blut-Agar-Platten (Sifin GmbH, Berlin, Deutschland) und auf Mitis-Salivarius-Bacitracin-Agar-Platten (20% Saccharose und 200IU/l Bacitracin, BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) ausgestrichen und drei Tage bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Platten optisch auf andere entstandenen Kolonien geprüft.

#### 4.5 Auswertung im Konfokalen Laserscannenden Mikroskop

Vor der Untersuchung im Konfokalen Laserscanning Mikroskop (CLSM) („Zeiss LSM 510“, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) wurden die Proben aus den Minischlitten entnommen und das Befestigungskomposit mit Sandpapier (Körnung 220) entfernt. Anschließend wurden die Proben mit Sandpapier (Körnung 500) bis zu einer Dicke von 1mm senkrecht zum Spalt geschliffen (Körnung 500) und poliert (Körnung 4000). Im CLSM wurden dann die beiden Seiten der Proben gescannt und vermessen, die im Minischlitten senkrecht zum Spalt gelegen waren. So wurden zwei repräsentative „Schnitte“ einer Probe erhalten, ohne dafür die Probe erneut einbetten und schneiden zu müssen.

Für die Evaluation der Demineralisation in Schmelz und Dentin wurde ein bereits etabliertes Verfahren angewandt [Fontana et al. 1996, Seemann 2005, Seemann et al. 2005a, 2005b, 2006]: Im CLSM wurde ein 2,5x Fluor-Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0,12 eingestellt. Der Strahlengang des Argonlasers (488nm, relative Intensität: 45%) verlief wie folgt: Kanal 1, Langpass (LP 650), 386µm pinhole; Kanal 2, Bandpass (BP 505 -530), 386µm pinhole und Kanal 3, Bandpass (BP 560 – 615), 374µm pinhole. HFT 488 (Hauptfarbteiler) war der „main dichroic beam splitter“ und NFT 545 (Nebenfarbteiler) der „secondary dichroic beam splitter“.

Mit einer speziellen Software („Zeiss LSM 510 Image Browser rel. 4.0“) konnten die Läsionen in Schmelz und Dentin ausgemessen werden. Bei ausgeprägtem Substanzverlust in der Kontrollgruppe wurde die ursprüngliche Begrenzung der Probe anhand der verbliebenen Kompositmasse rekonstruiert. Auf Grund der unterschiedlich breiten Schmelz- und Dentinschichten wurde für eine Standardisierung ein Messkorridor festgelegt. Dieser verlief im Schmelz von der oberen Begrenzung der Probe bis 300µm in die Tiefe und im Dentin 1250µm von der oberen Kante der Probe bis 1550µm in die Tiefe. Innerhalb dieser 300µm tiefen Strecke wurden zum einen die Fläche der Demineralisation in Schmelz und Dentin (Abb. 4.6) und zum anderen alle 60µm die Läsionstiefe ermittelt. Aus den fünf erhaltenen Einzelwerten für die Läsionstiefe wurde ein Mittelwert errechnet. Ferner wurde die maximale Läsionstiefe in Schmelz und Dentin über die gesamte Länge der Probe bestimmt.

Für die Auswertung standen also folgende Werte zur Verfügung:

- (1) Fläche der Demineralisation im Schmelz [ $\mu\text{m}^2$ ]
- (2) Fläche der Demineralisation im Dentin [ $\mu\text{m}^2$ ]
- (3) mittlere Läsionstiefe im Schmelz [ $\mu\text{m}$ ]
- (4) mittlere Läsionstiefe im Dentin [ $\mu\text{m}$ ]
- (5) maximale Läsionstiefe im Schmelz [ $\mu\text{m}$ ]
- (6) maximale Läsionstiefe im Dentin [ $\mu\text{m}$ ]

Jede Probe lieferte dementsprechend zwölf Werte, sechs für jede Seite einer Probe. Sämtliche Messungen wurden von einer Person durchgeführt ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit der Proben.

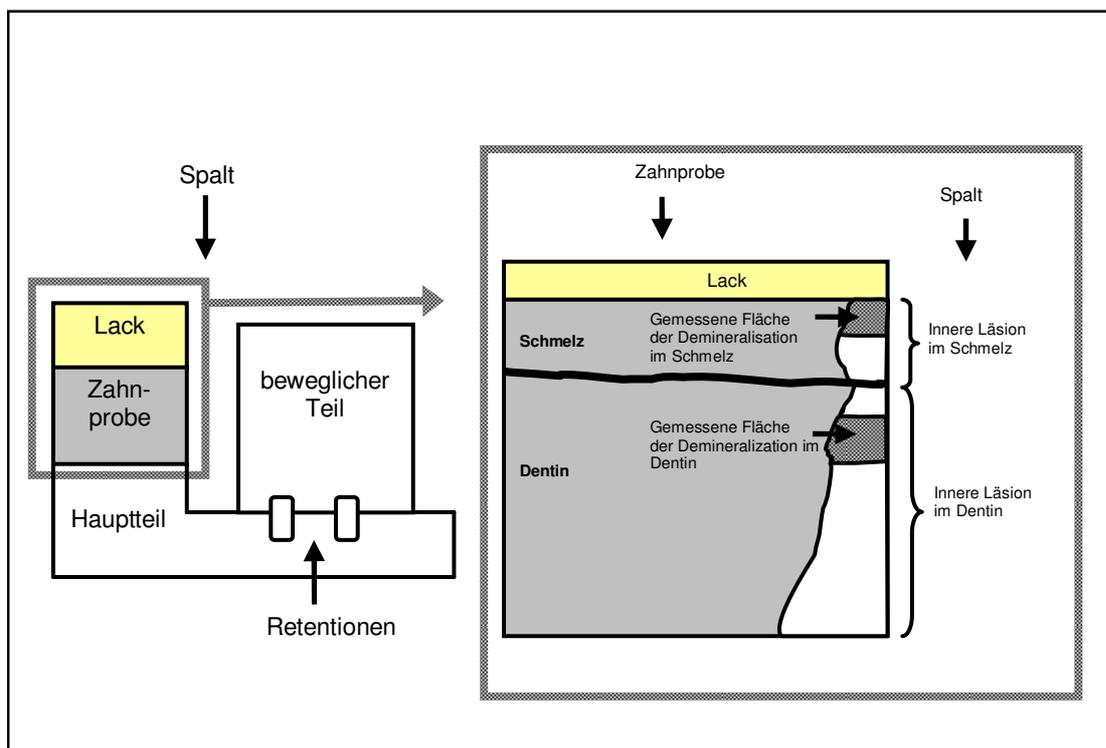


Abbildung 4.6: Zeichnung vom Minischlitten (links) und detaillierte Zeichnung für die Messung der Fläche der Demineralisation

## 4.6 Statistik

Alle statistischen Berechnungen und Grafiken wurden mit Hilfe von SPSS für Windows Version 12.0. durchgeführt. Die Berechnungen beschränkten sich auf den Vergleich der drei Testgruppen untereinander (Testgruppe 50/ Testgruppe 100, Testgruppe 50/ Testgruppe 250, Testgruppe 100/ Testgruppe 250) und der Testgruppe 250 mit der Kontrollgruppe. Eine Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft ( $p < 0,05$ ).

Bei gegebener Normalverteilung wurde der gepaarte t-Test mit einer sequentiellen „Bonferroni-Korrektur“ nach Holm zur statistischen Prüfung angewandt. Die  $\alpha$ -Fehlerkorrektur nach Bonferroni ist der Tendenz nach eher konservativ. Das heißt, dass der  $\alpha$ -Wert immer kleiner wird je mehr Einzelvergleiche gemacht werden und sich letztendlich keine Signifikanz mehr ergibt. Deshalb empfiehlt Holm 1979 eine verbesserte Bonferroni-Korrektur [Bortz 2005].

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Voruntersuchung

In einer Voruntersuchung konnte ein gleichmäßiger Verlauf des Spaltes geprüft werden bei geplantem Vorgehen (Abb. 5.1).

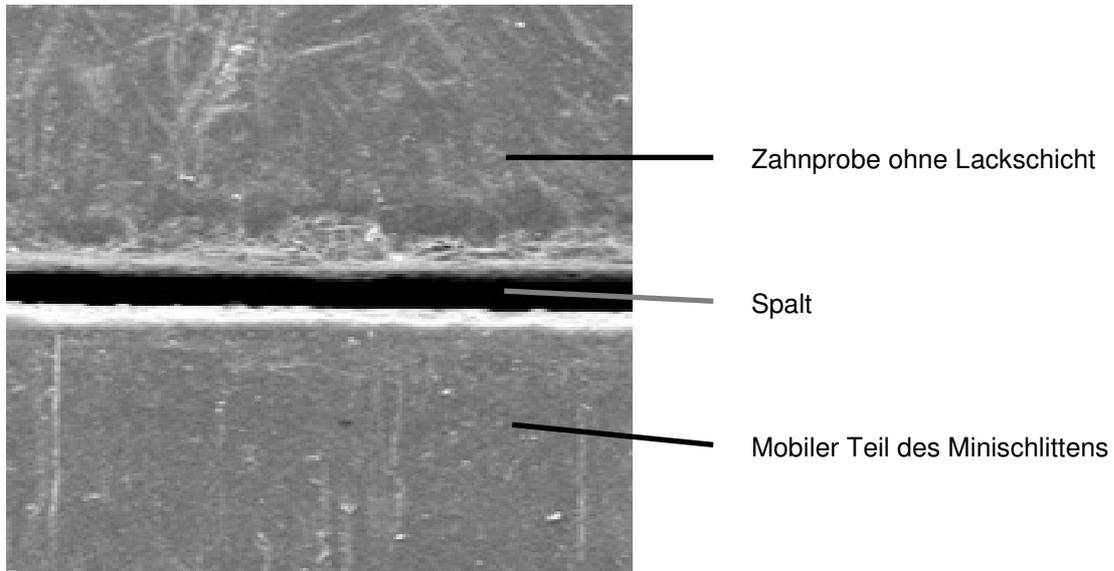


Abbildung 5.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Probe mit einer Spaltbreite von 50µm bei 30facher Vergrößerung

## 5.2 Biofilmbasiertes In-vitro-Kariesmodell

Nach 21tägiger Inkubation hatte sich ein deutlicher Biofilm auf sämtlichen Proben gebildet. Alle Proben waren vollständig mit einer weiß-gelben Plaqueschicht bedeckt (Abb. 5.2).



Abbildung 5.2: Makroskopische Darstellung des ungestörten Plaquewachstums nach dreiwöchiger Inkubation im biofilmbasierten Kariesmodell

Die Abfallflüssigkeit zeigte keine Merkmale einer Fremdkontamination wie Bildung eines Biofilms oder eine unübliche Trübung der Flüssigkeit. Nach Abschluss der Untersuchung wurde auf den mikrobiologischen Testplatten, die mit Material aus der Reaktionskammer und aus dem Abfall beimpft waren, ausschließlich die Anwesenheit von *Streptococcus mutans* nachgewiesen.

### 5.3 Ergebnisse der Konfokalen Laserscanning Mikroskopie

#### 5.3.1 Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe war die starke Demineralisation der Proben bereits makroskopisch an der weiß-opaken Oberfläche zu erkennen (Abb. 5.3). Die Aufnahmen im CLSM bestätigten dies mikroskopisch: Äußere und Innere Läsion im Schmelz waren in den CLSM-Aufnahmen durch einen hohen Substanzverlust gekennzeichnet. Die Innere Läsion im Dentin hatte sich den Schmelz unterminierend ausgebreitet (Abb. 5.4).

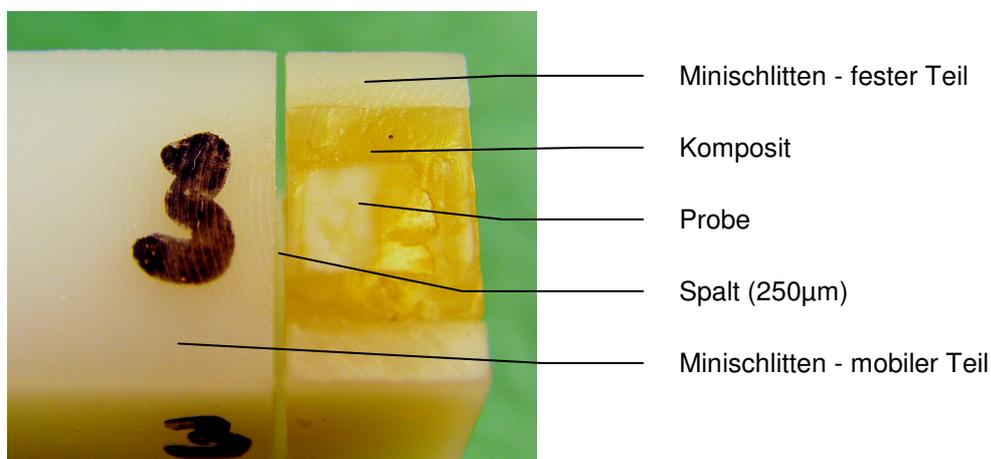


Abbildung 5.3: Makroskopische Darstellung der Probe Nr.3 aus der Kontrollgruppe mit weiß-opaker Oberfläche und Substanzverlust

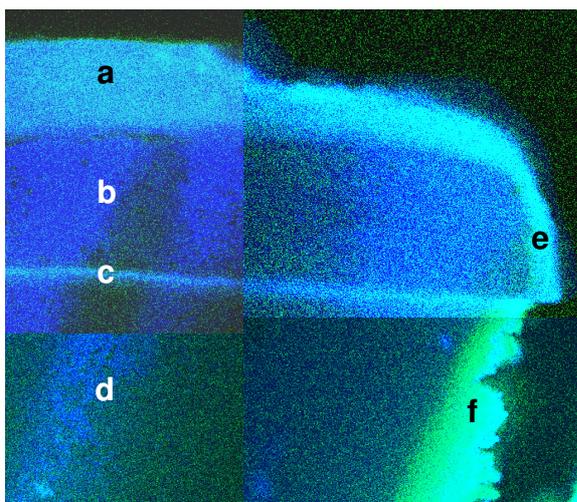


Abbildung 5.4: CLSM-Aufnahmen einer Probe aus der Kontrollgruppe mit starkem Substanzverlust in Schmelz und Dentin: (a) Äußere Läsion im Schmelz, (b) Schmelz, (c) Schmelz-Dentin-Grenze, (d) Dentin, (e) Innere Läsion im Schmelz, (f) Innere Läsion im Dentin

## 5.3.2 Testgruppen

### 5.3.2.1 Proben

An allen Proben der Testgruppen war im Konfokalen Laserscanning Mikroskop eine Wandläsion in Schmelz und Dentin unterschiedlichen Ausmaßes sichtbar. Die Innere Läsion im Schmelz erschien als halbkreisförmige Läsion. Die Innere Läsion im Dentin unterminierte stets den Schmelz. Sie verlief im Dentin in Form eines rechtwinkligen Dreiecks, dessen Basis am Boden der Probe lokalisiert war (Abb. 5.5). Eine Primärkaries konnte durch den Lack an der Oberfläche der Proben erfolgreich verhindert werden.

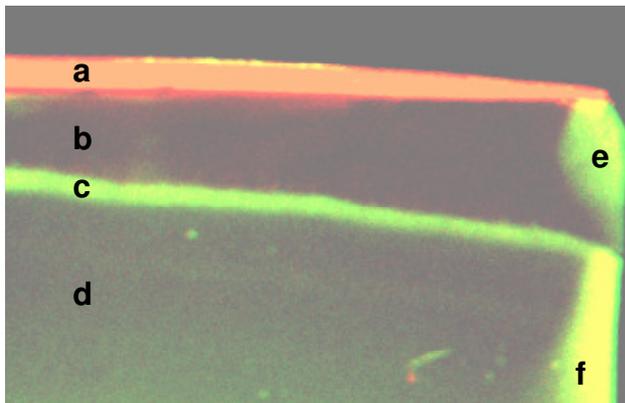


Abbildung 5.5: CLSM-Aufnahme einer Anregung mittels eines Argonlasers bei einer relativen Intensität von 45% mit einem 2,5x Plan Neonfluor-Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0,12: Wandläsion in Schmelz und Dentin: (a) Lackschicht, (b) Schmelz, (c) Schmelz-Dentin-Grenze, (d) Dentin, (e) Innere Läsion im Schmelz, (f) Innere Läsion im Dentin. Die oberflächliche Lackschicht ist durch die Probenaufbereitung für die Mikroskopie teilweise verloren gegangen.

### 5.3.2.2 Verworfenne Proben

Proben mit einem totalen oder partiellen Lackverlust wurden nach dem Durchlauf im Kariesmodell von den Messungen ausgeschlossen. Jede dieser Proben entwickelte eine im CLSM sichtbare Äußere Läsion im Schmelz (Abb. 5.6).

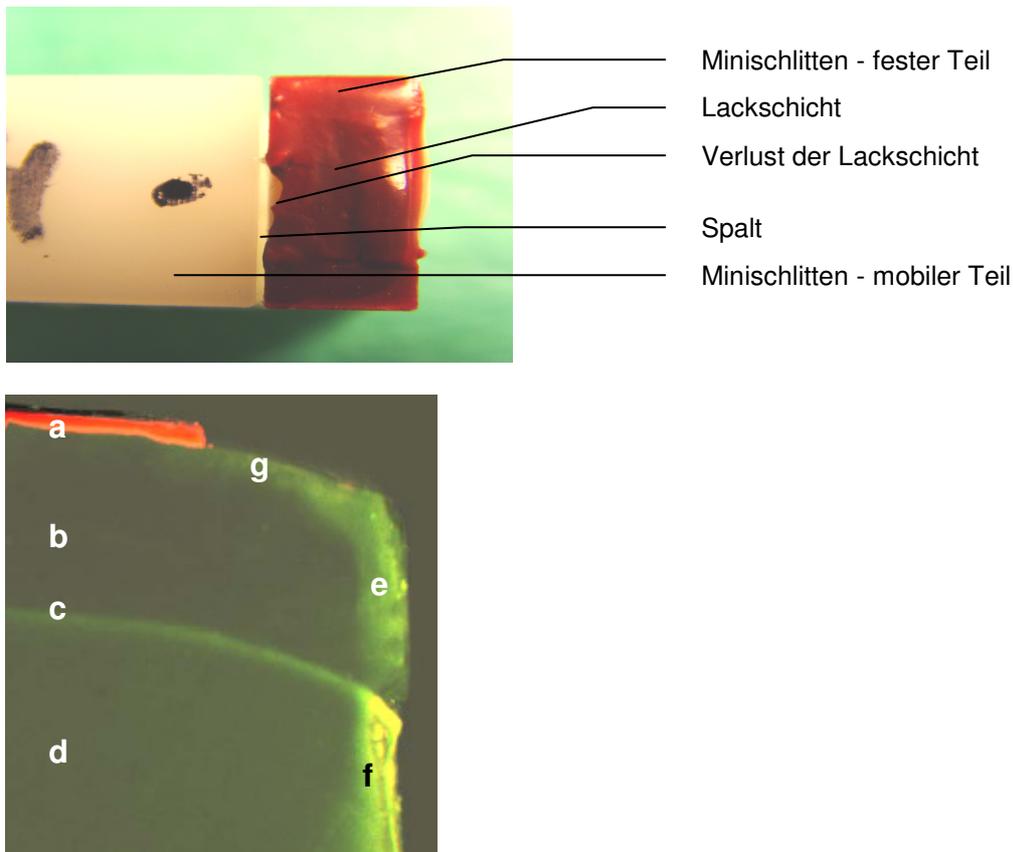


Abbildung 5.6: Makroskopische Darstellung einer Probe mit partiellem Verlust der Lackschicht (oben) und CLSM- Aufnahme (unten) bei einer Anregung mittels eines Argonlasers bei einer relativen Intensität von 45% mit einem 2,5x Plan Neonfluor- Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0,12: (a) Lackschicht, (b) Schmelz, (c) Schmelz- Dentin- Grenze, (d) Dentin, (e) Innere Läsion im Schmelz, (f) Innere Läsion im Dentin (g) Äußere Läsion im Schmelz.

Proben mit einer dünneren Schmelzschicht als  $300\mu\text{m}$  wurden ebenfalls nicht in die Auswertung miteinbezogen. Dies betraf jeweils eine Seite einer Probe aus der Testgruppe 50 (Probe Nr. 53) und aus der Testgruppe 100 (Probe Nr. 08). Eine Seite einer Probe aus der Kontrollgruppe (Probe Nr. 35) konnte aufgrund des hohen Substanzverlustes und der damit nicht mehr möglichen Rekonstruktion der ursprünglichen Ränder der Probe nicht vermessen werden.

Die Grundgesamtheit bestand vor Beginn der Untersuchung aus 60 Proben mit 120 zu messenden Seiten. Nach der Demineralisation im In-vitro-Kariesmodell standen aus zuvor beschriebenen Gründen noch 26 Werte für die Testgruppe 50, 23 Werte für die Testgruppe 100, 27 Werte für die Testgruppe 250 und 29 Werte für die Kontrollgruppe zur Auswertung zur Verfügung (Tab. 5.1).

Tabelle 5.1: Schematische Darstellung der ein- und ausgeschlossenen Messungen der vier Gruppen

	Testgruppe 50	Testgruppe 100	Testgruppe 250	Kontrollgruppe 250
Anzahl der messbaren Probenseiten vor der Demineralisation	30	30	30	30
Anzahl der ausgeschlossenen Probenseiten	4	7	3	1
Anzahl der gemessenen Probenseiten	26	23	27	29

### 5.3.3 Fläche der Demineralisation der Inneren Läsion

#### 5.3.3.1 Innere Läsion im Schmelz

Ein schwacher Trend hin zu größerer Demineralisationen bei größeren Spalten war an den Mittelwerten für die Fläche der Demineralisation der Inneren Läsion im Schmelz abzulesen. Testgruppe 50 und 100 waren annähernd gleich stark demineralisiert. Zwischen den Testgruppen 100 und 250, sowie 50 und 250 gab es große Unterschiede in der demineralisierten Fläche der Wandläsion. Signifikant unterschieden sich die Kontrollgruppe und die Testgruppe 50 jeweils von der Testgruppe 250 (Tab. 5.2 und Abb. 5.7).

Tabelle 5.2: Deskriptive Statistik für die Fläche der Demineralisation der Inneren Läsion im Schmelz

	Fläche der Demineralisation der Inneren Läsion im Schmelz in $\mu\text{m}^2 \times 10^3$							
	Gültige n	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	25. Perzentil	Median	75. Perzentil
Testgruppe 50	26	74	14	41	97	62	74	83
Testgruppe 100	23	79	15	53	110	68	74	89
Testgruppe 250	27	90	25	50	144	69	94	106
Kontrollgruppe	29	756	149	206	1049	698	768	85

Hohe Standardabweichungen zeigten sich vor allem in der Kontrollgruppe. Der Variationskoeffizient lag mit 19% für die Testgruppe 50 und 100, sowie 27% für die Testgruppe 250 und 20% für die Kontrollgruppe im Bereich für gleichmäßig verteilte Stichproben.

Ein Wert der Testgruppe 100 lag als Ausreißerwert außerhalb des 1,5fachen, jedoch innerhalb des 3fachen Interquartilbereichs (IQB). In der Kontrollgruppe war ein Wert der Probe Nr. 58 außerhalb des 3fachen Interquartilbereichs lokalisiert und ist somit als Extremwert im Boxplot gekennzeichnet (Abb. 5.7).

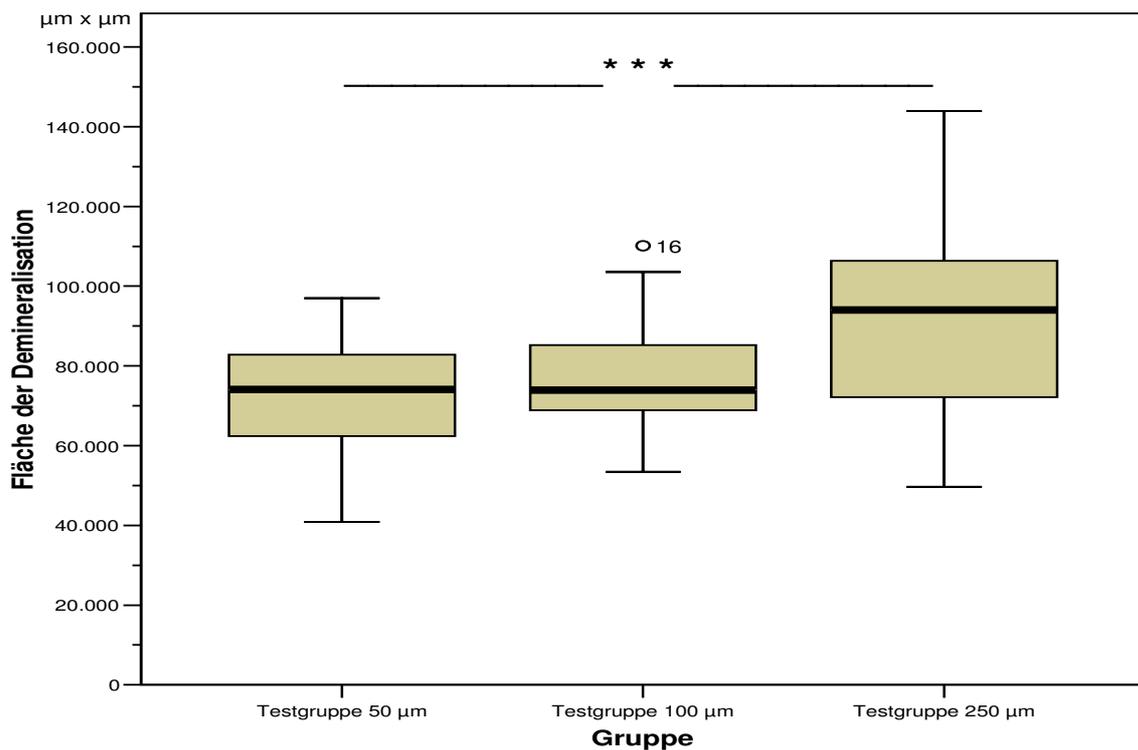
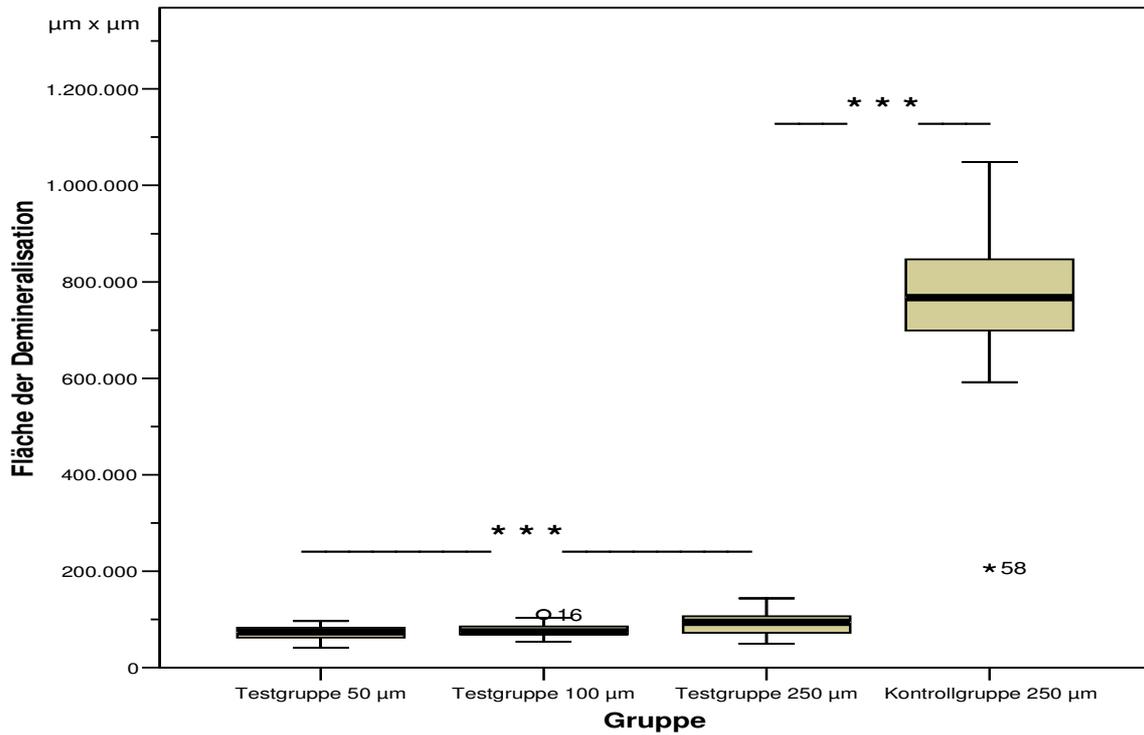


Abbildung 5.7: Boxplot der Fläche der Demineralisation der Inneren Läsion im Schmelz der vier Gruppen (oben) und der drei Testgruppen (unten) (\_\_\_\*\*\*\_\_\_ = statistisch signifikanter Unterschied zwischen zwei Gruppen, o = Probe mit Ausreißerwert, \* = Probe mit Extremwert)

Die zu testenden Gruppen folgten einer Normalverteilung, so dass der gepaarte t-Test mit einer sequentiellen „Bonferroni-Korrektur“ nach Holm angewandt wurde ( $p < 0,05$ ).

Tabelle 5.3: Induktive Statistik für die Fläche der Demineralisation der Inneren Läsion im Schmelz: gepaarter t-Test mit sequentieller „Bonferroni-Korrektur“ nach Holm

Gruppen	T-Wert	Rang des Betrages von T-Wert	P-Wert	Alphaniveau-adjustierung	Signifikanz
Testgruppe 50/ Testgruppe 100	-1,694	3	0,108	$0,05/2 = 0,0250$	nein
Testgruppe 100/ Testgruppe 250	-0,600	4	0,556	0,05	nein
Testgruppe 50/ Testgruppe 250	-2,647	2	0.014	$0,05/3 = 0,0166$	ja
Testgruppe 250/ Kontrollgruppe	-20,751	1	$< 0.0005$	$0,05/4 = 0,0125$	ja

Die Unterschiede zwischen den Testgruppen 50 und 100, sowie 100 und 250 waren statistisch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu fanden sich statistisch signifikante Differenzen zwischen der Testgruppe mit der kleinsten und derjenigen mit der größten Spaltbreite. Einen weiteren statistisch signifikanten Unterschied ergab der Vergleich der Testgruppe 250 mit der Kontrollgruppe bei gleicher Spaltbreite (Tab. 5.3).

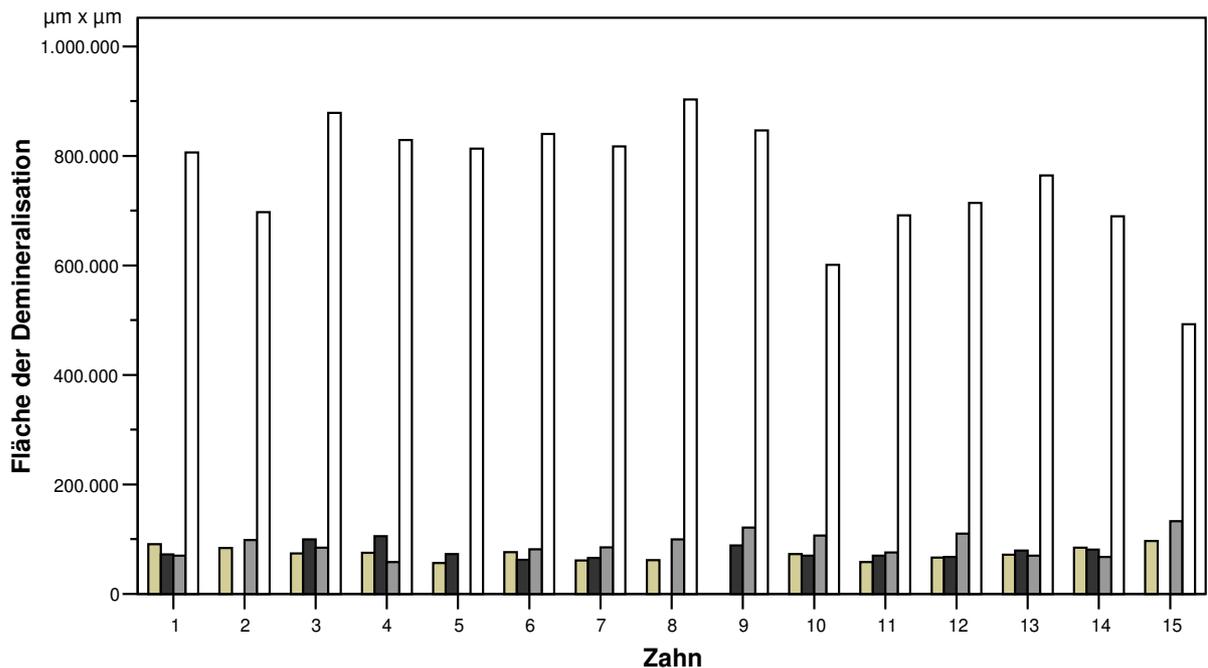


Abbildung 5.8: Balkendiagramm der Mittelwerte der Fläche der Demineralisation der Inneren Läsion im Schmelz der einzelnen Zähne: Testgruppe 50 (beige), Testgruppe 100 (schwarz), Testgruppe 250 (grau) und Kontrollgruppe (weiß)

Jeder Rinderzahn war in vier Teile gesägt worden. Somit war in jeder Gruppe derselbe Zahn vertreten. Dies ermöglichte es, in einem Balkendiagramm die Mittelwerte der Fläche der Demineralisation der Wandläsion im Schmelz darzustellen. In ihm konnten die einzelnen Proben aufgeschlüsselt nach Zähnen für eine bessere Übersicht dargestellt werden.

Bei drei Zähnen war der erwartete Anstieg in der Demineralisationsfläche der Inneren Läsion von der kleinsten hin zur größten Spaltbreite zu erkennen (Zahn Nr. 7, 11, und 12). Lässt man die fehlenden Werte außer Acht, galt dies für weitere fünf Zähne (Zahn Nr. 2, 5, 8, 9 und 15). Bei sieben Zähnen, d.h. bei 47%, war kein Zusammenhang zwischen Spaltbreite und Wandläsion ersichtlich.

Deutlich hob sich im Balkendiagramm für die demineralisierte Fläche der Wandläsion im Schmelz die Kontrollgruppe von den Testgruppen ab (Abb. 5.8).

### 5.3.3.2 Innere Läsion im Dentin

Im Dentin konnte für die Innere Läsion ein schwacher Zusammenhang zwischen einer Zunahme der Fläche der Demineralisation mit größer werdender Spaltbreite gezeigt werden. Hier unterschieden sich im Gegensatz zu den Werten für die Innere Läsion im Schmelz deutlich die Testgruppen 50 und 100, nicht aber die Testgruppe 50 von der Testgruppe 250. Der Unterschied zwischen Testgruppe 250 und der Kontrollgruppe mit einem ebenfalls 250µm weiten Spalt fiel im Dentin geringer aus als im Schmelz (vgl. Kap. 5.3.3.1)(Tab. 5.4).

Tabelle 5.4: Deskriptive Statistik für die Fläche der Demineralisation der Inneren Läsion im Dentin

	Fläche der Demineralisation der Inneren Läsion im Dentin in $\mu\text{m}^2 \times 10^3$							
	Gültige n	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	25. Perzentil	Median	75. Perzentil
Testgruppe 50	26	118	32	66x	191	91	115	142
Testgruppe 100	23	142	36	57	198	132	151	162
Testgruppe 250	27	148	44	61	236	115	152	180
Kontrollgruppe	29	169	49	84	267	139	176	191

Die Standardabweichung war im Dentin für alle vier Gruppen erneut hoch. Der Variationskoeffizient lag jedoch mit Werten unter 30% (Testgruppe 50: 28%, Testgruppe 100: 26%, Testgruppe 250: 30% und die Kontrollgruppe 29%) im Bereich für gleichmäßig verteilte Werte in den einzelnen Gruppen (Tab. 5.4).

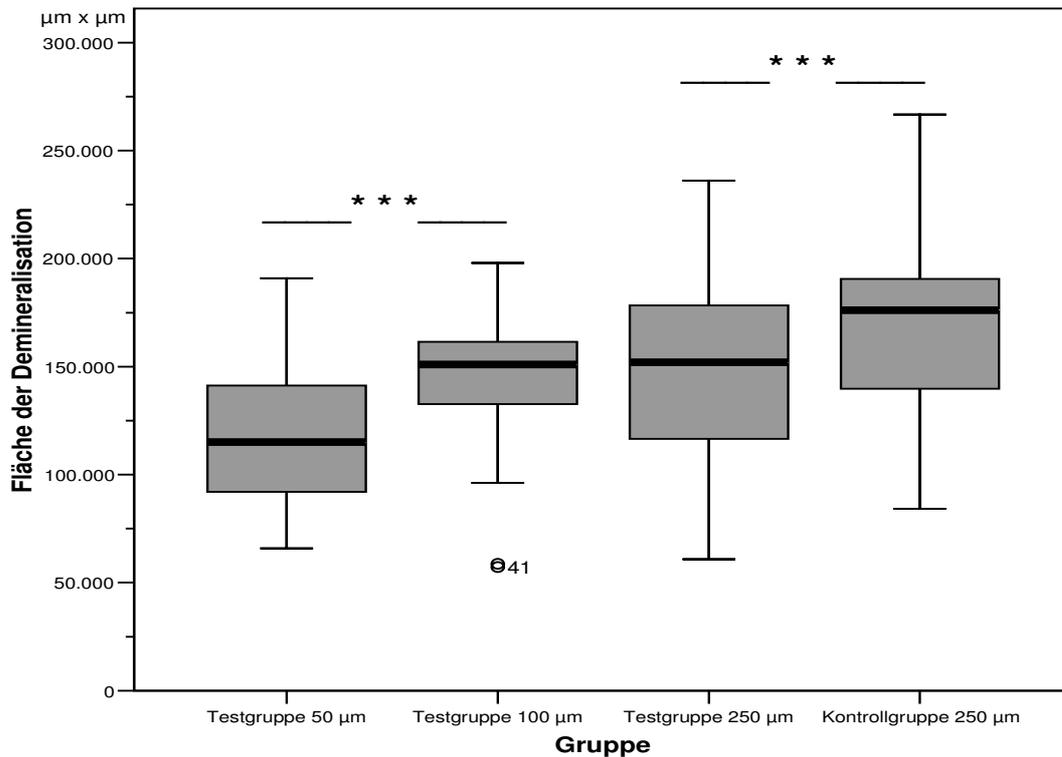


Abbildung 5.9: Boxplot für die Fläche der Demineralisation der Inneren Läsion im Dentin

(\_\_\_\*\*\*\_\_\_ = statistisch signifikanter Unterschied zwischen zwei Gruppen, o = Probe mit Ausreißerwert)

Im Boxplot war die geringere Demineralisation der Inneren Läsion im Dentin in der Testgruppe 50 im Vergleich zur Testgruppe 100 abzulesen. Dagegen unterschieden sich die Mediane der Testgruppe 100 und der Testgruppe 250 nicht deutlich voneinander.

Wie bereits für die Fläche der Demineralisation im Schmelz lag im Dentin die Box der Testgruppe 250µm versiegelter Oberfläche niedriger als die der Kontrollgruppe mit gleicher Spaltbreite bei unversigelter Oberfläche (vgl. Kap. 5.3.3.1).

Zwei Werte in der Testgruppe 100 nahmen Ausreißerwerte an. Beide gehörten zur Probe Nr. 41. Extremwerte, d.h. außerhalb des 3fachen Interquartilbereichs gelegene Werte, fanden sich für die Demineralisationsfläche der Wandläsion im Dentin nicht (Abb. 5.9).

Die zu testenden Gruppen waren normalverteilt, so dass der gepaarte t-Test mit sequentieller „Bonferroni-Korrektur“ nach Holm angewandt wurde ( $p < 0,05$ ).

Tabelle 5.5: Induktive Statistik für die Fläche der Demineralisation der Inneren Läsion im Dentin: gepaarter t-Test mit sequentieller „Bonferroni-Korrektur“ nach Holm

Gruppen	T-Wert	Rang des Betrages von T-Wert	P-Wert	Alphaniveau-adjustierung	Signifikanz
Testgruppe 50/ Testgruppe 100	-2,864	2	0,010	$0.05/3 = 0.0166$	ja
Testgruppe 100/ Testgruppe 250	-0,041	4	0,968	0.05	nein
Testgruppe 50/ Testgruppe 250	-2,015	3	0.056	$0.05/2 = 0.025$	nein
Testgruppe 250/ Kontrollgruppe	-2,890	1	0,008	$0.05/4 = 0.0125$	ja

Im Dentin unterschieden sich die Werte für die Fläche der Demineralisation der Wandläsion der Testgruppe 50 statistisch signifikant von den Werten der Testgruppe 100.

Statistisch nicht signifikant differierten die Testgruppe 50 und die Testgruppe 250 trotz stärker voneinander abweichender Mittelwerte sowie die Testgruppe 100 und die Testgruppe 250.

Die Kontrollgruppe und die Testgruppe zeigten in der Fläche der Demineralisation statistisch signifikante Unterschiede im Dentin (Tab. 5.5).

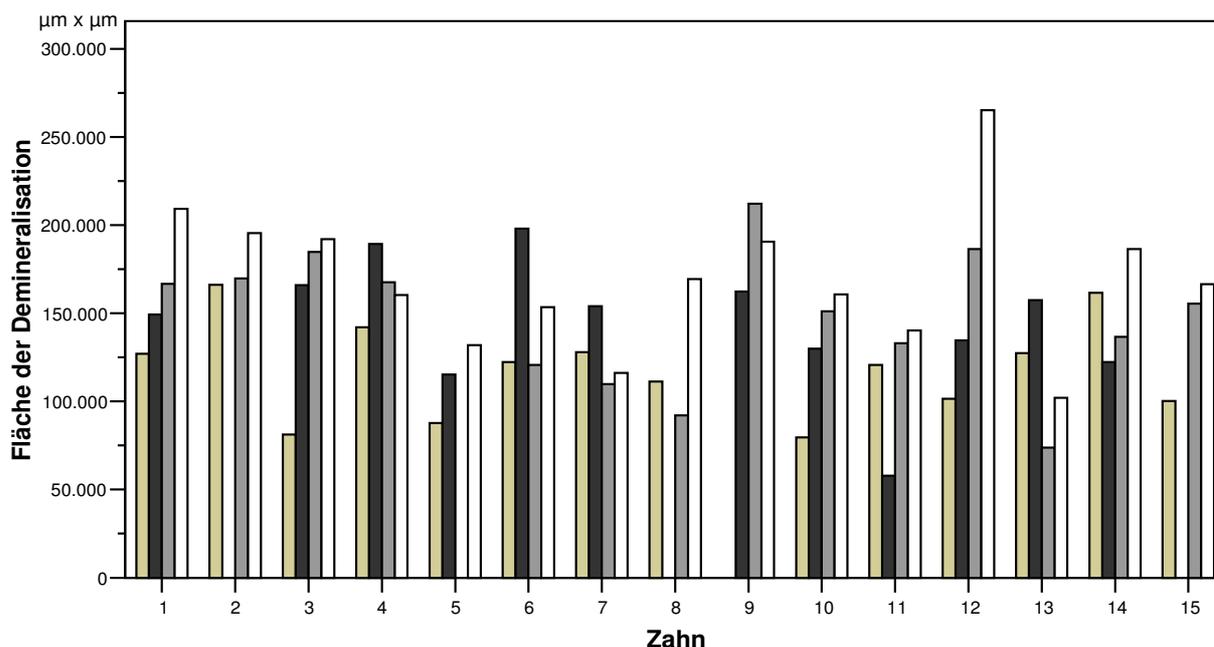


Abbildung 5.10: Mittelwerte der Fläche der Demineralisation der Inneren Läsion im Dentin der einzelnen Zähne: Testgruppe 50 (beige), Testgruppe 100 (schwarz), Testgruppe 250 (grau) und Kontrollgruppe (weiß)

Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte der Fläche der Demineralisation der Inneren Läsion im Dentin der 15 Rinderzähne dargestellt. Die vier Säulen entsprechen den vier aus einem Zahn gesägten Proben.

Beim Betrachten der Gruppen der einzelnen Mittelwerte für die Wandläsion im Dentin war kein Zusammenhang zwischen den Spaltbreiten und der demineralisierten Fläche der 15 Zähne zu sehen. Fünf der fünfzehn Zähne (Zahn Nr. 1, 3, 9, 10 und 12) wiesen einen stufenförmigen Anstieg der Säulen im Balkendiagramm in Richtung weitester Spaltbreite auf. Zusätzliche drei Zähne (Zahn Nr. 2, 5 und 15) zeigten bei Nichtbetrachten fehlender Messwerte ebenfalls einen Anstieg. Bei den verbleibenden sieben Zähnen (47%) gab es keinen Zusammenhang zwischen Kariesausmaß und Spaltbreite.

Die Kontrollgruppe überragt in 67% der Fälle die drei Testgruppen im Dentin. Dies war nicht so deutlich wie im Schmelz (vgl. Kap. 5.3.3.1)(Abb. 5.10).

### 5.3.3.3 Zusammenfassung der Fläche der Demineralisation

Sowohl im Schmelz als auch im Dentin war die Fläche der Demineralisation in der Kontrollgruppe statistisch signifikant größer als in den drei Testgruppen.

Innerhalb der Testgruppen wies im Schmelz nur die Testgruppe mit der kleinsten Spaltbreite eine statistisch signifikant geringer demineralisierte Fläche auf als die Testgruppe mit der größten Spaltbreite. Im Dentin geschah dies nicht. Dort unterschieden sich die beiden Testgruppen mit den geringsten Spaltbreiten, 50 und 100  $\mu\text{m}$ , statistisch signifikant voneinander. Für die anderen Testgruppen stellten sich keine statistisch bedeutsamen Unterschiede heraus (Tab. 5.6).

Tabelle 5.6: Statistische Gruppierung für die Fläche der Demineralisation der Inneren Läsion im Schmelz und Dentin; Gruppen mit verschiedenen Buchstaben differieren statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

	Testgruppe 50	Testgruppe 100	Testgruppe 250	Kontrollgruppe
Fläche der Demineralisation der Inneren Läsion im Schmelz	A	A, B	B	C
Fläche der Demineralisation der Inneren Läsion im Dentin	A	B	A, B	C

Im Vergleich der demineralisierten Fläche von Schmelz und Dentin entlang des Spaltes zeigte sich in allen drei Testgruppen im Dentin eine größere Innere Läsion als im Schmelz.

An den Proben der Kontrollgruppe hingegen fand im Schmelz die deutlich stärkere Demineralisation statt (Abb. 5.11).

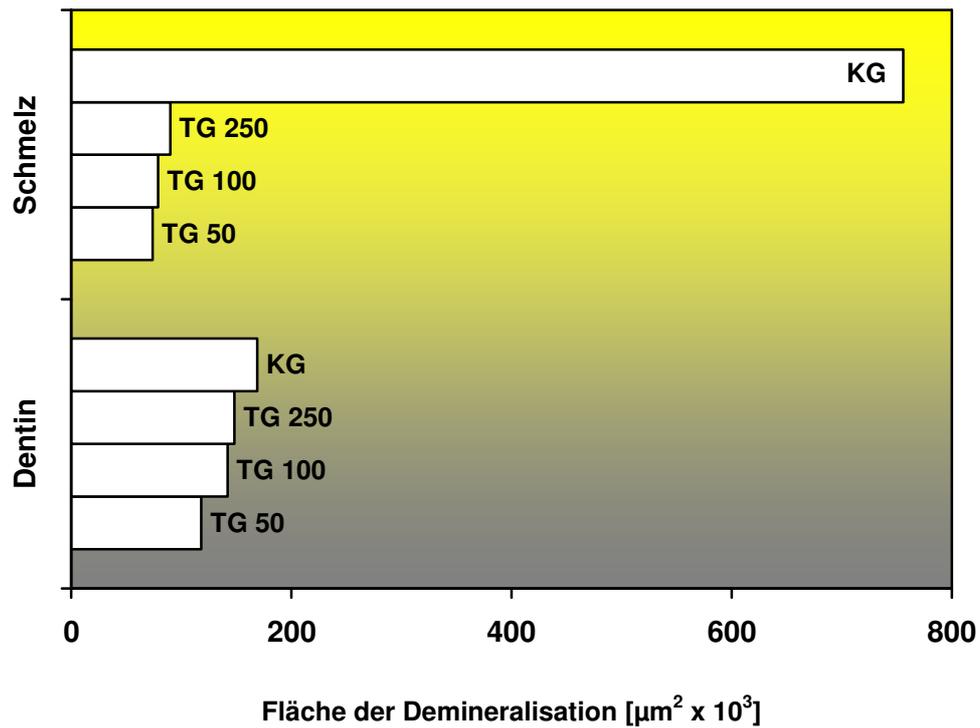


Abbildung 5.11: Darstellung der Mittelwerte der Fläche der Demineralisation der Inneren Läsion in Schmelz und Dentin der vier Gruppen

### 5.3.4 Mittlere und maximale Läsionstiefen der Inneren Läsion

#### 5.3.4.1 Innere Läsion im Schmelz

Einen leichten Anstieg von der Testgruppe 50 zur Testgruppe 250 bzw. zur Kontrollgruppe hin beschrieben die Werte für die mittlere Läsionstiefe der Inneren Läsion im Schmelz. Während im Schmelz zwischen den Testgruppen und der Kontrollgruppe klare Unterschiede zu erkennen waren, fanden sich innerhalb der Testgruppen keine eindeutigen Unterschiede zwischen den jeweiligen Mittelwerten. Die Testgruppe mit der kleinsten Spaltbreite und die Testgruppe mit der größten Spaltbreite differierten am stärksten (Tab. 5.7 und Abb. 5.12).

Tabelle 5.7: Deskriptive Statistik der mittleren Läsionstiefe der Inneren Läsion im Schmelz

	mittlere Läsionstiefe der Inneren Läsion im Schmelz in $\mu\text{m}$							
	Gültige n	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	25. Perzentil	Median	75. Perzentil
Testgruppe 50	26	251	53	137	357	209	252	282
Testgruppe 100	23	263	48	189	363	226	250	305
Testgruppe 250	27	308	79	168	483	236	318	361
Kontrollgruppe	29	2597	552	730	3466	2325	2665	3031

Die Standardabweichung war im Vergleich zu den anderen Parametern geringer. Der Variationskoeffizient für die mittlere Läsionstiefe der Wandläsion bewegte sich im Bereich für gleichmäßig verteilte Werte unter 30% (21% für die Testgruppe 50, 18% für die Testgruppe 100, 26% für die Testgruppe 250 sowie 21% für die Kontrollgruppe) (Tab. 5.7).

Ein Ausreißerwert für die mittlere Läsionstiefe im Schmelz ergab sich in der Kontrollgruppe (Abb. 5.12)

Ein schwacher Zusammenhang zwischen größeren Läsionstiefen und breiteren Spalten ließ sich ebenfalls für die maximale Läsionstiefe der Inneren Läsion im Schmelz formulieren. Besonders differierten die Testgruppe 50 und 100.

In der Kontrollgruppe waren die maximalen Werte für die Läsionstiefe zu finden (Tab. 5.8).

Tabelle 5.8: Deskriptive Statistik für die maximale Läsionstiefe der Inneren Läsion im Schmelz

	maximale Läsionstiefe der Inneren Läsion im Schmelz in $\mu\text{m}$							
	Gültige n	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	25. Perzentil	Median	75. Perzentil
Testgruppe 50	26	281	70	151	468	243	272	311
Testgruppe 100	23	294	57	210	425	255	277	324
Testgruppe 250	27	376	124	194	695	299	380	440
Kontrollgruppe	29	2795	431	1941	3566	2451	2781	3118

Gekennzeichnet war die maximale Läsionstiefe durch besonders große Standardabweichungen bei einem Variationskoeffizienten um 30% (25% für die Testgruppe 50, 19% für die Testgruppe 100, 33% für die Testgruppe 250 sowie 15% für die Kontrollgruppe) (Tab. 5.8).

Das Boxplot für die mittlere und maximale Läsionstiefe im Schmelz verdeutlichte die stärkere Demineralisation der Kontrollgruppe gegenüber den Testgruppen. Ein stufenförmiger Anstieg der Mediane von der Testgruppe 50 zur Testgruppe 250 über die Testgruppe 100 war schwach ausgeprägt (Abb. 5.12).

Zwei Ausreißerwerte fanden sich für die maximale Läsionstiefe in der Testgruppe 250 und in der Testgruppe 50 sowie für die Testgruppe 100 (Abb. 5.12).

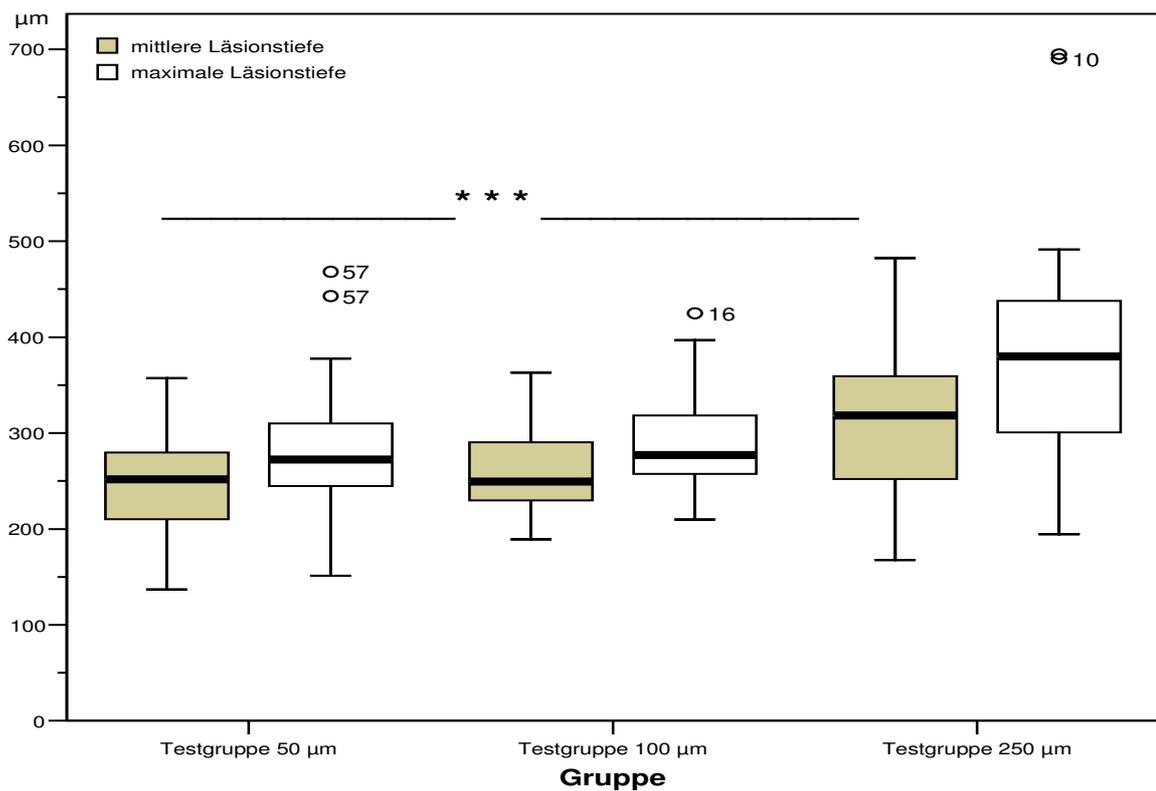
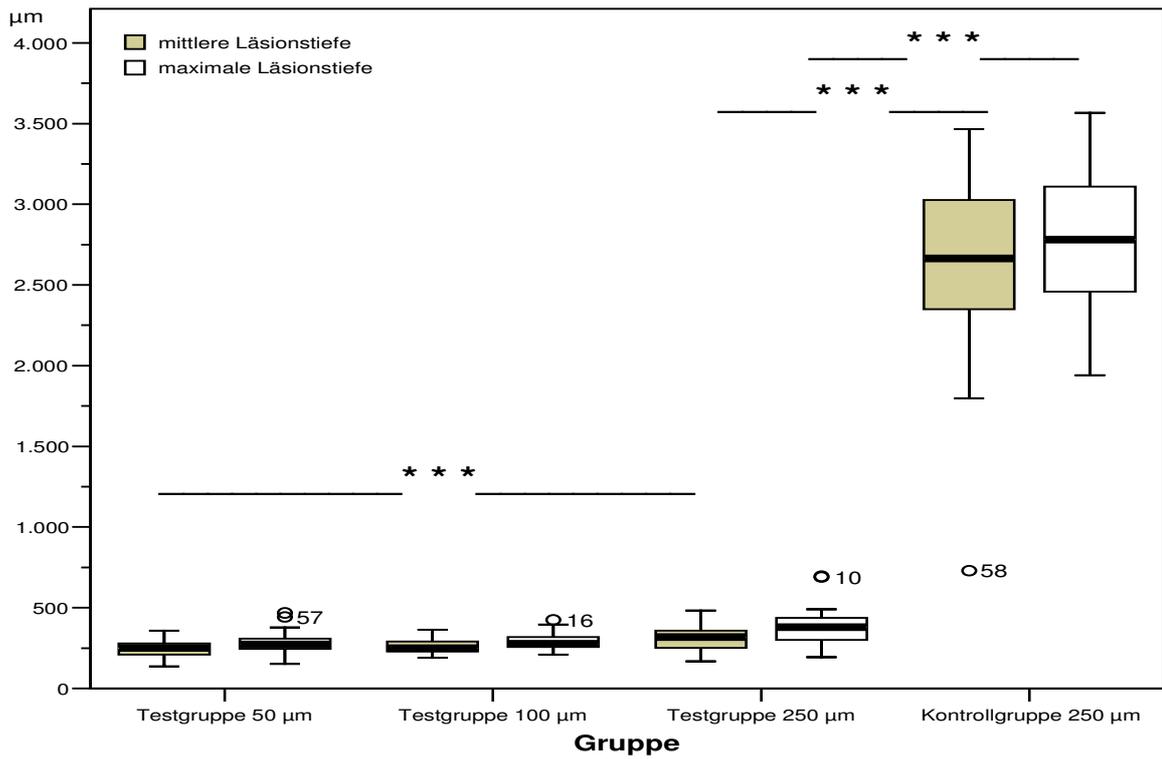


Abbildung 5.12: Boxplot der mittleren und maximalen Läsionstiefe der Inneren Läsion im Schmelz der vier Gruppen (oben) und der drei Testgruppen (unten) (\_\_\_\*\*\*\_\_\_ = statistisch signifikanter Unterschied zwischen zwei Gruppen, o = Probe mit Ausreißerwert)

Die Werte für die mittlere und maximale Läsionstiefe der Inneren Läsion der zu vergleichenden Gruppen folgten einer Normalverteilung. Hier wurde ebenfalls mit dem gepaarten t-Test mit einer sequentiellen „Bonferroni-Korrektur“ nach Holm die statistische Bedeutsamkeit der Unterschiede geprüft ( $p < 0,05$ ). In der mittleren und maximalen Läsionstiefe der Inneren Läsion im Schmelz unterschied sich statistisch signifikant die Testgruppe 250 von der Kontrollgruppe. Die Testgruppen mit der kleinsten und mit der größten Spaltbreite differierten statistisch signifikant in der mittleren Läsionstiefe wie in der Fläche der Demineralisation im Schmelz (vgl. Kap. 5.3.3.1). Dies galt nicht für die maximale Läsionstiefe, in der sich keine der Testgruppen von einer anderen unterschied (Tab. 5.9 und 5.10).

Tabelle 5.9: Induktive Statistik für die mittlere Läsionstiefe der Inneren Läsion im Schmelz: gepaarter t-Test mit sequentieller „Bonferroni-Korrektur“ nach Holm

Gruppen	T-Wert	Rang des Betrages von T-Wert	P-Wert	Alphaniveau-adjustierung	Signifikanz
Testgruppe 50 / Testgruppe 100	-1,747	3	0,098	$0.05/2 = 0.025$	nein
Testgruppe 100 / Testgruppe 250	-0,578	4	0,570	0.05	nein
Testgruppe 50 / Testgruppe 250	-8,549	2	$< 0,0005$	$0.05/3 = 0.0166$	ja
Testgruppe 250 / Kontrollgruppe	-19,157	1	$< 0,0005$	$0.05/4 = 0.0125$	ja

Tabelle 5.10: Induktive Statistik für die maximale Läsionstiefe der Inneren Läsion im Schmelz: gepaarter t-Test mit sequentieller „Bonferroni-Korrektur“ nach Holm

Gruppen	T-Wert	Rang des Betrages von T-Wert	P-Wert	Alphaniveau-adjustierung	Signifikanz
Testgruppe 50 / Testgruppe 100	-1,839	3	0,082	$0.05/2 = 0.025$	nein
Testgruppe 100 / Testgruppe 250	-1,699	4	0,105	0,05	nein
Testgruppe 50 / Testgruppe 250	-3,655	2	0.38	$0.05/3 = 0.0166$	nein
Testgruppe 250 / Kontrollgruppe	-25,806	1	$< 0,0005$	$0,05/4 = 0,0125$	ja

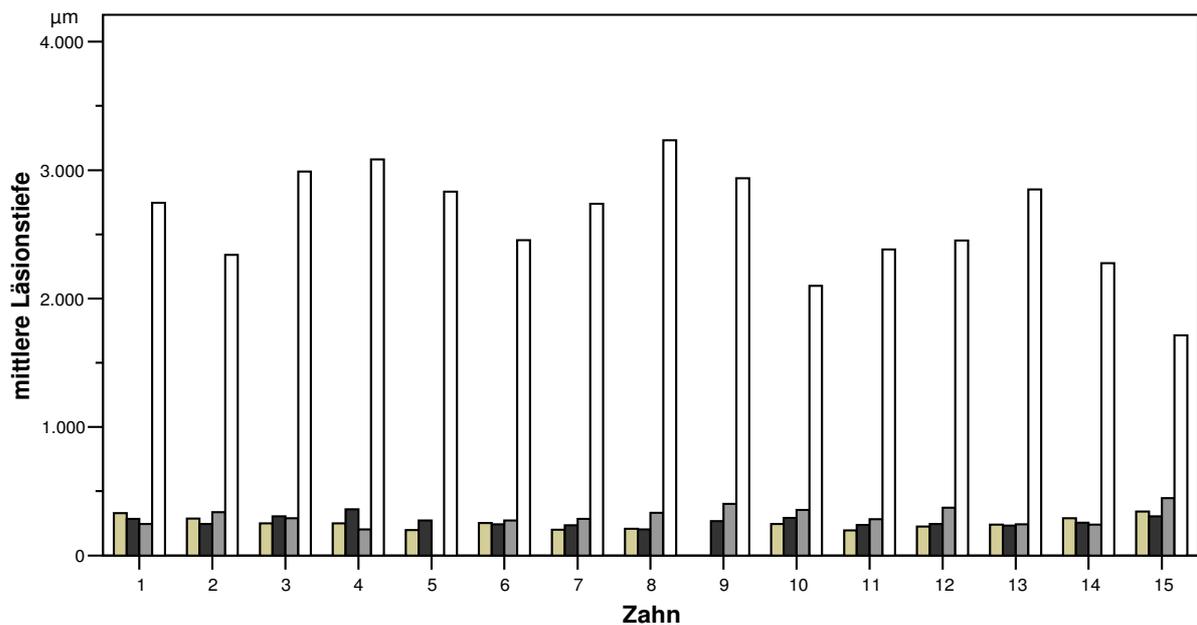


Abbildung 5.13: Balkendiagramm der Mittelwerte der mittleren Läsionstiefe der Inneren Läsion im Schmelz der einzelnen Zähne: Testgruppe 50 (beige), Testgruppe 100 (schwarz), Testgruppe 250 (grau) und Kontrollgruppe (weiß)

In der Darstellung der Mittelwerte für die Innere Läsion der vier Proben eines jeweiligen Rinderzahnes waren deutliche Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Testgruppen für die mittlere Läsionstiefe im Schmelz zu erkennen.

Die einzelnen Testgruppen differierten nicht so eindeutig voneinander. Ein Anstieg der mittleren Demineralisationstiefe in Richtung breitere Spalten war für vier Zähne (Zahn Nr. 7, 10, 11 und 12) ohne ausgeschlossene Proben und für zwei Zähne (Zahn Nr. 5 und 9) mit jeweils einer ausgeschlossenen Probe abzulesen. Die Proben von neun Zähnen (60%) folgten keinem Anstieg hin zu breiteren Spalten (Abb. 5.13).

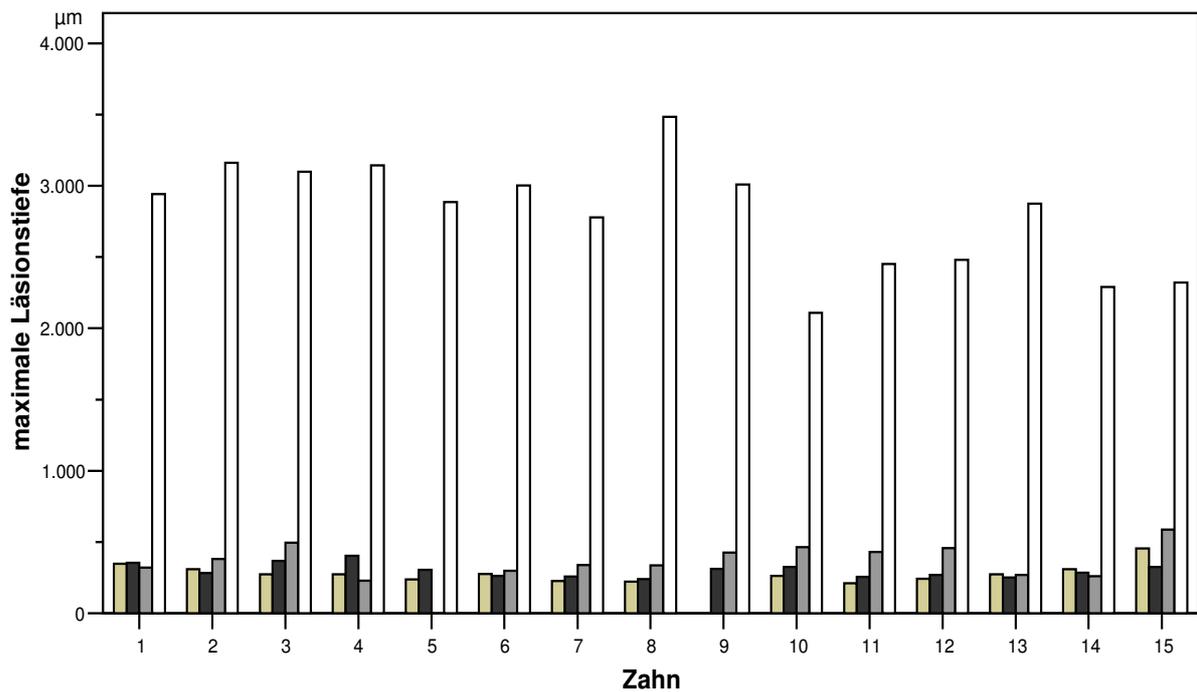


Abbildung 5.14: Balkendiagramm der Mittelwerte der maximalen Läsionstiefe der Inneren Läsion im Schmelz der einzelnen Zähne: Testgruppe 50 (beige), Testgruppe 100 (schwarz), Testgruppe 250 (grau) und Kontrollgruppe (weiß)

Eine Zunahme der Läsionstiefe bei gleichzeitigem Anstieg der Spaltbreite war für die maximale Läsionstiefe der Inneren Läsion im Schmelz bei sechs Zähnen (Zahn Nr. 3, 7, 8, 10, 11 und 12) und zusätzlichen zwei Zähnen mit jeweils einer ausgeschlossenen Probe (Zahn Nr. 5 und 9) abzulesen. Für sieben Zähne (47%) war kein Zusammenhang zwischen maximaler Läsionstiefe der Wandläsion und Spaltbreite nachzuweisen.

Die Kontrollgruppe hob sich im Schmelz wie für die Fläche der Demineralisation und für die mittlere Läsionstiefe deutlich von den drei Testgruppen ab (vgl. Kap. 5.3.3.1)(Abb. 5.13 und 5.14).

### 5.3.4.2 Innere Läsion im Dentin

Ein schwacher Zusammenhang von breiteren Spalten und daraus resultierenden tieferen Läsionen fand sich für die mittlere Läsionstiefe der Wandläsion im Dentin. Die Testgruppen 50 und 250 lagen hinsichtlich ihrer Mittelwerte am weitesten auseinander, gefolgt von der Testgruppe 50 und 100. Die Testgruppe 100 und 250 hingegen waren nur geringfügig unterschiedlich stark demineralisiert.

Alle drei Testgruppen wiesen eine geringere Demineralisation als die Kontrollgruppe auf. Dieser Unterschied war nicht so groß wie im Schmelz (Tab. 5.11).

Tabelle 5.11: Deskriptive Statistik für die mittlere Läsionstiefe der Inneren Läsion im Dentin

	mittlere Läsionstiefe im Dentin der Inneren Läsion in $\mu\text{m}$							
	Gültige n	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	25. Perzentil	Median	75. Perzentil
Testgruppe 50	26	399	113	223	650	297	389	487
Testgruppe 100	23	486	124	196	667	442	518	557
Testgruppe 250	27	502	149	207	804	384	519	628
Kontrollgruppe	29	592	169	286	902	482	602	651

Die Standardabweichung war hoch, derweil der Variationskoeffizient für die mittlere Läsionstiefe im Dentin nicht 30% überstieg (Testgruppe 50: 28 %, Testgruppe 100: 25%, Testgruppe 250: 30% und Kontrollgruppe: 29%)(Tab. 5.11).

An den Mittelwerten und Medianen ließ sich für die maximale Läsionstiefe der Inneren Läsion im Dentin ein stärkerer Unterschied zwischen den Gruppen ablesen als für die mittlere Läsionstiefe. Besonders prägnant differierten die Mittelwerte der Testgruppen 50 und 250.

Erneut liegen die Werte für die Kontrollgruppe höher als die der Testgruppen, jedoch bei weitem nicht so deutlich wie im Schmelz (Tab. 5.12).

Tabelle 5.12: Deskriptive Statistik für die maximale Läsionstiefe der Inneren Läsion im Schmelz

	maximale Läsionstiefe der Inneren Läsion im Dentin in $\mu\text{m}$							
	Gültige n	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	25. Perzentil	Median	75. Perzentil
Testgruppe 50	26	551	200	271	1135	377	534	669
Testgruppe 100	23	653	192	348	1023	483	648	817
Testgruppe 250	27	731	200	302	1001	570	771	888
Kontrollgruppe	29	885	320	410	2167	691	782	1048

Die Standardabweichung war für die maximale Läsionstiefe geringer in den Testgruppen als in der Kontrollgruppe. Der Variationskoeffizient der maximalen Läsionstiefe im Dentin war dabei für die Testgruppe 50 und die Kontrollgruppe mit 36% am höchsten von allen erhobenen Daten (Testgruppe 100: 29% und Testgruppe 250: 27%)(Tab. 5.12).

Im Boxplot zeigte sich vorwiegend für die maximale Läsionstiefe ein Anstieg der Boxen von der Testgruppe 50 bis zur Kontrollgruppe.

Für die mittlere Läsionstiefe konnten Unterschiede hauptsächlich zwischen der Testgruppe 50 und 100 bzw. 50 und 250, sowie zwischen der Testgruppe 50 und der Kontrollgruppe abgelesen werden (Abb. 5.15).

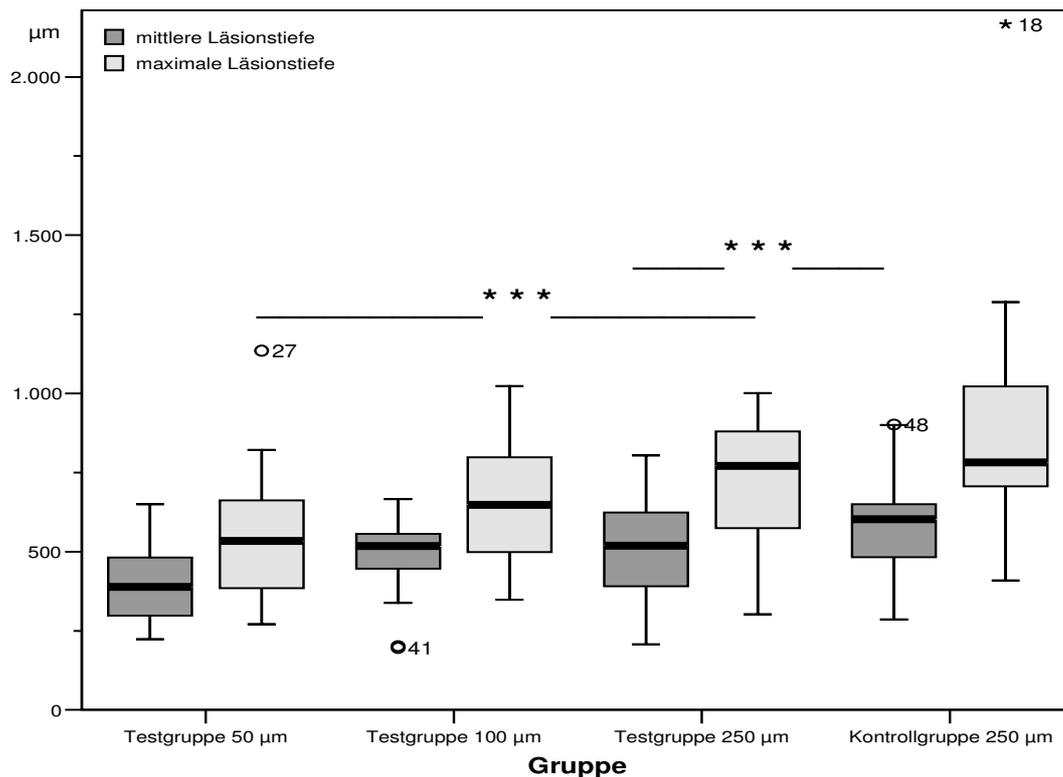


Abbildung 5.15: Boxplot der mittleren und maximalen Läsionstiefe der Inneren Läsion im Dentin der vier Gruppen (\_\_\_\*\*\*\_\_\_ = statistisch signifikanter Unterschied zwischen zwei Gruppen, o = Probe mit Ausreißerwert, \* = Probe mit Extremwert)

Ausreißer waren für die mittlere Läsionstiefe in der Testgruppe 100 die zwei Werte der Probe Nr. 41 und in der Kontrollgruppe ein Wert.

Für die maximale Läsionstiefe existierte ein Ausreißerwert in der Testgruppe 50 und ein Extremwert in der Kontrollgruppe (Abb. 5.15).

Die Differenzen der mittleren und maximalen Läsionstiefen der Wandläsion der zu vergleichenden Gruppen folgten einer Normalverteilung. Somit konnte die statistische Prüfung mittels des gepaarten T-Tests mit einer sequentiellen „Bonferroni-Korrektur“ nach Holm durchgeführt werden ( $p < 0,05$ ).

Ein bedeutsamer Unterschied wurde ausschließlich zwischen der Testgruppe 250 und der Kontrollgruppe für die mittlere Läsionstiefe der Inneren Läsion im Dentin ermittelt (Tab. 5.13).

Tabelle 5.13: Induktive Statistik für die mittlere Läsionstiefe der Inneren Läsion im Dentin: gepaarter t-Test mit sequentieller „Bonferroni-Korrektur“ nach Holm

Gruppen	T-Wert	Rang des Betrages von T-Wert	P-Wert	Alphaniveau-adjustierung	Signifikanz
Testgruppe 50 / Testgruppe 100	-2,247	2	0,37	$0.05/3 = 0.0166$	nein
Testgruppe 100 / Testgruppe 250	-0,327	4	0,747	0.05	nein
Testgruppe 50 / Testgruppe 250	-2,047	3	0.052	$0.05/2 = 0.025$	nein
Testgruppe 250 / Kontrollgruppe	-3,497	1	0,002	$0.05/4 = 0.0125$	ja

Die statistischen Tests für die maximale Läsionstiefe im Dentin ergaben keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Testgruppe 250, jedoch zwischen den Testgruppen 50 und 250. Damit war dies der einzige Parameter, bei dem sich die Kontrollgruppe nicht bedeutend von der Testgruppe 250 unterschied.

Obwohl sich die Testgruppe 50 und 250 sowie die Testgruppe 50 und 100 hinsichtlich ihrer Mittelwerte deutlich unterschieden, konnte dies nicht als statistisch signifikant bestätigt werden (Tab. 5.14).

Tabelle 5.14: Induktive Statistik für die maximale Läsionstiefe der Inneren Läsion im Dentin: gepaarter t-Test mit sequentieller „Bonferroni-Korrektur“ nach Holm

Gruppen	T-Wert	Rang des Betrages von T-Wert	P-Wert	Alphaniveau-adjustierung	Signifikanz
Testgruppe 50 / Testgruppe 100	-1,926	3	0,069	$0,05/2 = 0,025$	nein
Testgruppe 100 / Testgruppe 250	-1,206	4	0,242	0,05	nein
Testgruppe 50 / Testgruppe 250	-2,747	1	0,011	$0,05/4 = 0,0125$	ja
Testgruppe 250 / Kontrollgruppe	-2,305	2	0,030	$0,05/3 = 0,0166$	nein

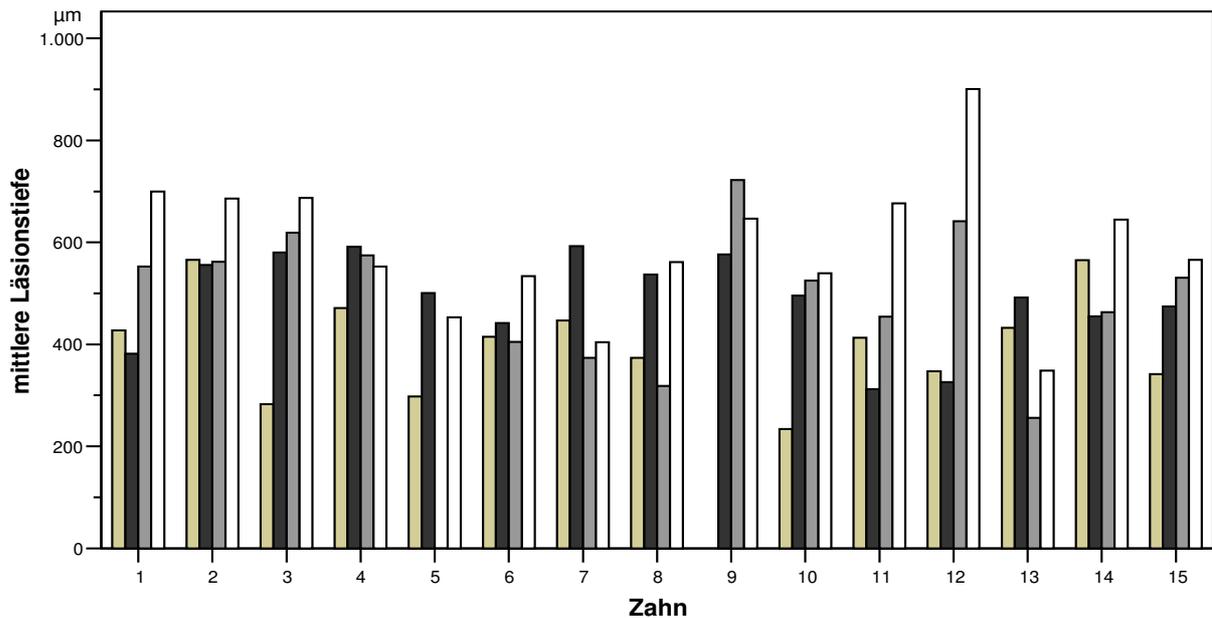


Abbildung 5.16: Balkendiagramm der Mittelwerte der mittleren Läsionstiefe der Inneren Läsion im Dentin der einzelnen Zähne: Testgruppe 50 (beige), Testgruppe 100 (schwarz), Testgruppe 250 (grau) und Kontrollgruppe (weiß)

Die einzelnen Proben der mittleren Läsionstiefe der Wandläsion im Dentin, nach Zähnen aufgeschlüsselt, zeigten keine so eindeutige Dominanz der Kontrollgruppe wie für die Werte im Schmelz. Bei zehn Zähnen lagen die Mittelwerte der Kontrollgruppe über denen der Testgruppen.

Aus diesem Balkendiagramm war weiterhin abzulesen, dass mit zunehmender Spaltbreite, nicht zwingend die Läsionstiefe im Dentin ansteigt. Im Dentin stiegen die Mittelwerte bei drei der fünfzehn Zähne (Zahn Nr. 3, 10 und 15) in der Läsionstiefe von der Testgruppe 50 hin zur Kontrollgruppe an. Dies bedeutete für 80% der Zähne keinen Zusammenhang zwischen mittlerer Läsionstiefe und Spaltbreite (Abb. 5.16).

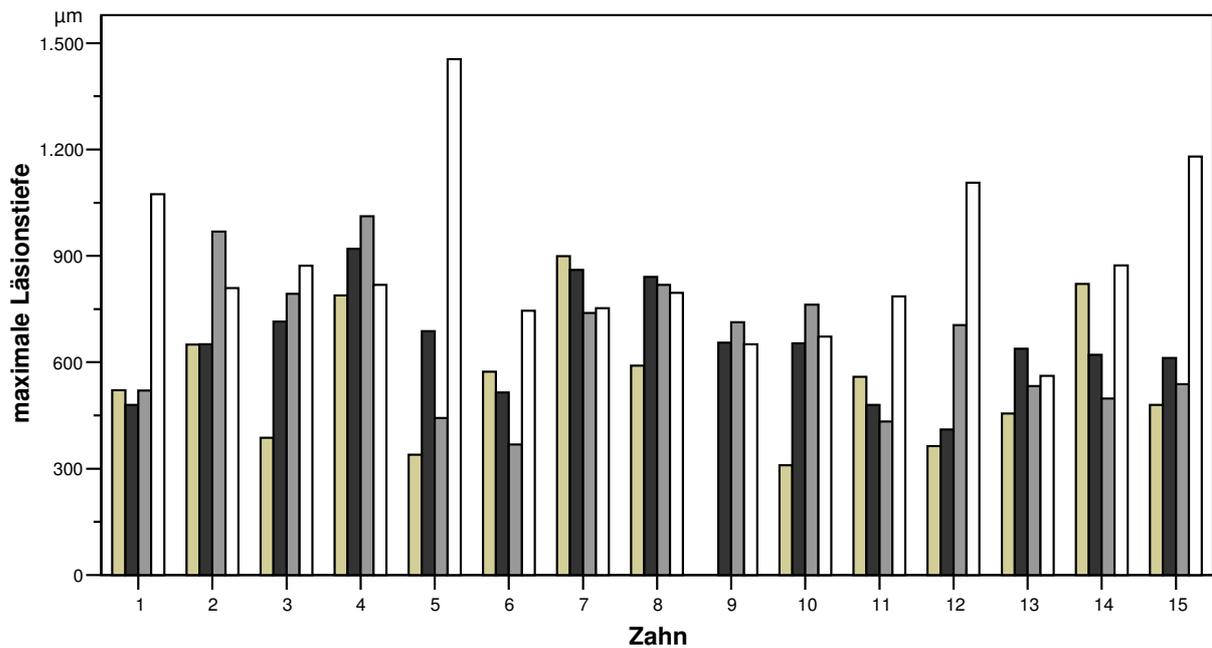


Abbildung 5.17: Balkendiagramm der Mittelwerte der maximalen Läsionstiefe der Inneren Läsion im Dentin der einzelnen Zähne: Testgruppe 50 (beige), Testgruppe 100 (schwarz), Testgruppe 250 (grau) und Kontrollgruppe (weiß)

Für die Hälfte der Zähne traf es zu, dass die maximale Läsionstiefe der Inneren Läsion der Kontrollgruppe im Dentin größer war als die der drei Testgruppen.

Einen Anstieg der Mittelwerte von der Testgruppe 50 zur Testgruppe 250 konnte für  $\frac{1}{3}$  der Zähne (Zahn Nr. 2, 3, 4, 10 und 12) gezeigt werden. Zwei Drittel der Zähne zeigten im Dentin keinen Zusammenhang zwischen steigender maximaler Läsionstiefe der Inneren Läsion bei zunehmender Spaltbreite (Abb. 5.17).

### 5.3.4.3 Zusammenfassung der Läsionstiefen

Die Demineralisation im Schmelz war stets für alle drei Parameter der Inneren Läsion in der Kontrollgruppe deutlich größer als in den drei Testgruppen. Im Dentin traf dies für die Fläche der Demineralisation und die mittlere Läsionstiefe zu, nicht aber für die maximale Läsionstiefe (Tab. 5.15). Gleichzeitig war im Dentin der Unterschied zwischen den Testgruppen und der Kontrollgruppe geringer als im Schmelz (Abb. 5.18)

Beim Vergleich der Testgruppen im Schmelz konnte zusammengefasst folgendes festgestellt werden: Es bestehen statistisch signifikante Unterschiede zwischen jeweils der Testgruppe mit der kleinsten und der mit der größten Spaltbreite hinsichtlich der Fläche der Demineralisation und der mittleren Läsionstiefe (vgl. Kap. 5.3.3.3). In der maximalen Läsionstiefe im Schmelz hingegen waren die Unterschiede zwischen den drei Testgruppen statistisch gesehen zufällig (Tab. 5.15).

Beim Vergleich der drei Testgruppen im Dentin fanden sich unterschiedliche Ergebnisse für die drei Parameter: Für die Fläche der Demineralisation hatte es zwischen 50 µm und 100 µm Spaltbreite statistisch signifikante Unterschiede gegeben, wohingegen sich die Testgruppen in der mittleren Läsionstiefe im Dentin nicht statistisch bedeutsam unterschieden. Für die maximale Läsionstiefe im Dentin wiederum ergab die statistische Prüfung einen Unterschied zwischen der Testgruppe 50 und 250 (Tab. 5.15).

Tabelle 5.15: Statistische Gruppierungen für die mittlere und maximale Läsionstiefe der Inneren Läsion in Schmelz und Dentin; Gruppen mit verschiedenen Buchstaben differieren statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

	Testgruppe 50	Testgruppe 100	Testgruppe 250	Kontrollgruppe
Mittlere Läsionstiefe der Inneren Läsion im Schmelz	A	A, B	B	C
Mittlere Läsionstiefe der Inneren Läsion im Dentin	A	A	A	B
Maximale Läsionstiefe der Inneren Läsion im Schmelz	A	A	A	B
Maximale Läsionstiefe der Inneren Läsion im Dentin	A	A, B	B, C	C

Abbildung 5.18 zeigt, dass an allen Zähnen die Kontrollgruppe am stärksten demineralisiert war. Für beide Parameter (mittlere und maximale Läsionstiefe) und beide Zahnhartsubstanzen ist hier die schwache, steigende Tendenz von geringeren Läsionstiefen bei schmalen Spalten hin zu stärkeren Demineralisationen bei breiteren Spalten abgebildet. Diese Tendenz hielt jedoch nicht der statistischen Prüfung stand (Abb. 5.18).

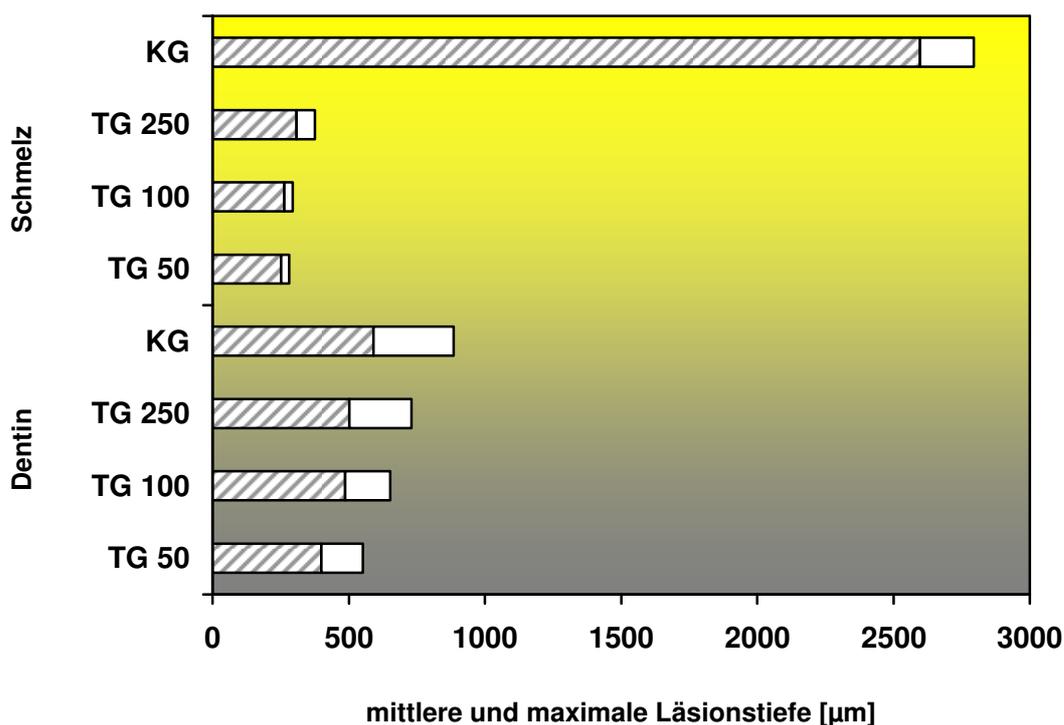


Abbildung 5.18: Diagramm der Mittelwerte der mittleren Läsionstiefe (gestreift) und der maximalen Läsionstiefe (weiß) der Inneren Läsion in Schmelz (oben) und im Dentin (unten) der vier Gruppen

Im Vergleich von Schmelz und Dentin war für mittlere und maximale Läsionstiefe der Inneren Läsion erkennbar, dass, so lange die Oberfläche versiegelt war, die Läsion im Dentin fast doppelt so stark ausgeprägt war wie im Schmelz (Testgruppe 50, Testgruppe 100, Testgruppe 250). Konnte dagegen der kariöse Angriff über die gesamte Oberfläche des Schmelzes erfolgen, überschritt die Läsionstiefe im Schmelz massiv die Läsionstiefe im Dentin (Kontrollgruppe)(Abb.5.18).

#### **5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Anhand der vorgestellten Ergebnisse, lassen sich folgende Aussagen treffen:

- 1. Eine Wandläsion bildete sich in einem deutlich ausgeprägten Spalt von 250 µm unabhängig von der Ausbildung einer Äußeren Läsion aus. Dies galt sowohl für Schmelz als auch für Dentin.*
- 2. Die Innere Läsion schritt im Dentin schneller voran als im Schmelz und unterminierte somit diesen.*
- 3. Ist eine Äußere Läsion verbunden mit einem Substanzverlust vorhanden, so ist die Innere Läsion in Schmelz und Dentin stärker geprägt.*
- 4. Bei Verhinderung der Ausbildung einer Primärläsion ließ sich sowohl für die Fläche der Demineralisation als auch für die mittlere und die maximale Läsionstiefe in Schmelz und Dentin zwar eine Tendenz zu größeren Mittelwerten bei breiteren Spalten erkennen, jedoch ohne statistische Signifikanz.*

## **6 DISKUSSION**

### **6.1 Diskussion der Methode**

#### **6.1.1 Auswahl zu vergleichender Stichproben**

Um die Gruppen dieser Studie vergleichen zu können, musste eine möglichst große Strukturgleichheit zwischen ihnen gegeben sein.

Dies sollte durch eine annähernd gleichzusetzende Fluoridierung der Zahnproben gewährleistet werden, da Fluoride nicht nur das Primärkariesrisiko, sondern auch das Sekundärkariesrisiko senken [Nagamine et al. 1997, Tam et al. 1997, Francci et al. 1999, Hicks et al. 2000]. Eine individuelle patientenabhängige Fluoridierung entfällt bei der Verwendung boviner Zahnproben, da Rinder in vergleichbaren Mengen Fluorid ausschließlich aus dem Futter und dem Trinkwasser aufnehmen.

Die Rinderzähne ermöglichten nicht nur angesichts ihrer annähernd einheitlichen Fluoridierung eine größere Standardisierung, sondern ebenfalls auf Grund ihrer Größe. Aus einem Zahn konnten mehrere vergleichbare Proben gewonnen werden, so dass jeder Zahn mit einer Probe in einer der vier Testgruppen vertreten war. Daraus resultierte eine weitere Harmonisierung bezüglich der strukturellen Voraussetzungen zwischen den einzelnen Gruppen.

Zwar sind mehrfache reproduzierbare Durchläufe für das in dieser Studie verwendete biofilmbasierte Modell beschrieben worden, so dass Untersuchungen mit einer hohen Anzahl an Proben prinzipiell möglich sind [Seemann et al. 2006], jedoch wurde zur Erreichung einer höchst möglichen Vergleichbarkeit der Gruppenergebnisse bewusst nur ein Durchlauf im In-vitro-Kariesmodell durchgeführt. Die Anzahl der Proben war daher durch die Kapazität des Modells von  $n = 60$  begrenzt.

#### **6.1.2 Vergleichbarkeit boviner und humaner Zähne**

Studien mit dem Ziel ein Äquivalent für menschliche Zähne in der Kariesforschung zu finden, zeigen, dass sich besonders bovine Zähne als Ersatz für humane Zähne eignen [Mellberg & Loertscher 1974, Sønju-Clasen & Øgaard 1999]. Das histologische Bild einer bovinen Initialkaries im Schmelz wurde im Polarisationsoptischen Mikroskop, im Rasterelektronenmikroskop und mittels Mikroradiografie untersucht. Kariöse Läsionen an Menschen- und Rinderzähnen erschienen im Polarisationsoptischen Mikroskop identisch. Gekennzeichnet sind sie durch eine oberflächliche, eine dunkle und eine

transluzente Schicht. Die Mikroradiografie zeigte innerhalb der Initialläsionen boviner Zähne eine radioopake oberflächliche Zone, eine transluzente Zone und einen Läsionskörper. Auch im Rasterelektronenmikroskop glichen die kariösen Läsionen von Rinderzähnen denjenigen menschlicher Zähne [Edmunds et al. 1988]. Der Mineralgehalt boviner Zähne stellte sich in mikroradiografischen Untersuchungen als vergleichbar mit dem menschlicher Zähne heraus. Weder in den oberflächlichen Schichten, noch im minimalen Mineralgehalt der Läsion oder in der unter der Oberfläche befindlichen Schicht („sound underlying enamel“) fanden sich signifikante Unterschiede [Edmunds et al. 1988]. Bei Rinderzähnen schritten die Läsionen auf Grund der größeren Porosität schneller fort als bei menschlichen Zähnen [Flim & Arends 1977, Featherstone & Mellberg 1981]. Dies war das Resultat sowohl eines rein chemischen Modells als auch eines bakteriellen Modells zur Erzeugung künstlicher Karies [Edmunds et al. 1988]. Da also Rinderzähne nachweislich auf einen kariösen Angriff den menschlichen Zähnen vergleichbar reagieren, stellten sie in dieser Arbeit die Alternative zu humanen Proben dar.

### **6.1.3 Kritische Betrachtungen zum Probendesign**

Die Verwendung von Nagellack als Demineralisationsbarriere wurde mehrfach in Untersuchungen beschrieben [Hals & Nernaes 1971, Dijkman & Arends 1992, Dijkman et al. 1994, Grossman & Matejka 1995, Fontana et al. 2002, Okuda et al. 2003]. Der Vorteil gegenüber zahnärztlichen Versiegeln liegt darin, dass durch die Farbe des Lacks die versiegelten Bereiche sowohl makroskopisch, als auch mikroskopisch von den freien Bereichen unterschieden werden können. Der verwendete Lack enthielt Kalzium, das eine Remineralisation hätte fördern können. Das Kalzium hätte jedoch auf alle drei Testgruppen denselben Effekt, so dass sein Einfluss als vergleichbar betrachtet werden kann.

Gegen einen möglichen massiven Einfluss des Kalziums auf die Innere Läsion im Schmelz spricht die Ausbreitung der Wandläsion in den Testgruppen bis direkt unter die Lackschicht (Abb. 5.5). Auf Grund dessen kann von einem Ausbleiben oder nur minimalem remineralisierendem Effekt des Kalziums in den Testgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe ausgegangen werden.

In einer Voruntersuchung im Rasterelektronenmikroskop wurde die Reproduzierbarkeit von gleichmäßig breiten Spalten an den Minischlitten untersucht und bestätigt

(Abb. 5.1). Zusätzlich wurden alle Proben nach der Fertigstellung unter dem Stereomikroskop auf Parallelität, freie Zugänglichkeit des Spaltes, richtige Positionierung des Lackanstriches und im Lichtmikroskop auf Genauigkeit der Breite kontrolliert.

Die hier gewählten Spaltbreiten sollten die klinisch relevanten Breiten abdecken. Die Spaltbreite von 50  $\mu\text{m}$  wurde gewählt, da in diesem Bereich nach Jørgensen & Wakumoto [1968] die kritische Spaltbreite liegt, bei der eine Sekundärkaries entsteht. Zudem kann diese Spaltbreite klinisch sondiert werden [Jørgensen & Wakumoto 1968]. Eine Spaltbreite von 250  $\mu\text{m}$  entspricht einem klinisch nicht akzeptablen Restaurations-Zahn-Spalt. Özer gab 250  $\mu\text{m}$  als kritische Spaltbreite an, ab der sich eine Sekundärkaries klinisch ausbildet [Özer 1997]. 100  $\mu\text{m}$  wurde dann als Spaltbreite zwischen 50  $\mu\text{m}$  und 250  $\mu\text{m}$  ausgewählt. Diese Angaben basieren ausschließlich auf Untersuchungen an Amalgamfüllungen. Zu Kompositfüllungen gibt es unseres Wissens nach keine klinischen Studienberichte, die sich mit dem Zusammenhang zwischen der Spaltbreite und der Ausprägung von Sekundärkaries beschäftigen. Da durch die Adhäsivtechnik ein chemischer Verbund zwischen Zahn und Komposit erreicht werden kann, ist vorstellbar, dass bei Kompositen geringere Spaltbreiten als bei Amalgamen für die Sekundärkariesentstehung relevant sind. Weiterhin lagern sich an Kompositen mehr Mikroorganismen ab und erhöhen somit das Sekundärkariesrisiko. In folgenden Studien sollten deshalb auch die Auswirkungen geringerer Spaltbreiten betrachtet werden, wie bei Totiam et al. 2007 in einer in vitro Studie geschehen.

Bisher wurden Untersuchungen zur Sekundärkaries und der Einfluss der Spaltbreite auf ihr Ausmaß vorwiegend an Amalgamfüllungen untersucht. In der vorliegenden Arbeit war es zunächst Ziel, mit einem inerten Material den Einfluss des Füllungsmaterials auf den Demineralisationsprozess gering zu halten bzw. auszuschließen. In Zukunft sind Studien geplant, die unter Verwendung des hier angewandten Studiendesigns die Sekundärkariesentwicklung an Füllungen mit unterschiedlichen Materialien untersuchen. Dazu können Amalgam oder Komposit bzw. fluoridfreisetzende Füllungsmaterialien in den mobilen Teil des Minischlittens eingebaut werden.

#### 6.1.4 Kritische Betrachtung zum biofilmbasierten In-vitro-Kariesmodell

Künstliche Karies kann auf verschiedene Weise erzeugt werden: Entweder durch die Applikation von Zahnhartsubstanz zerstörenden Säuren in Form von Lösungen oder Gelen (chemisches Modell) [ten Cate & Duijsters 1982, Buskes et al. 1985, Dionysopoulos et al. 1994, Pereira et al. 1998, Pimenta et al. 1998, Kielbassa et al. 2003] oder durch das Zusammenbringen von Bakterien mit einer Nährlösung, die zur Bildung demineralisierender Säuren führt (bakterielles Modell) [Pigman et al. 1952, Clarkson et al. 1984, Gilmour et al. 1990, 1993, Derand et al. 1991].

In den letzten Jahren gewannen die sogenannten künstlichen Mundhöhlen gesteigerte Aufmerksamkeit, da in ihnen das Ökosystem Mundhöhle mit seiner Bakterienflora ansatzweise simuliert werden kann. Ihr Vorteil gegenüber anderen Modellen basiert auf einer kontinuierlichen oder ununterbrochenen Nährstoffversorgung der bakteriellen Plaque. So kann der Biofilm in einer der Mundhöhle ähnlichen Umgebung wachsen [Fontana et al. 1996, Schiffner 1999, Tang et al. 2003, Seemann et al. 2005].



Abbildung 6.1: Erzeugung einer Plaque im biofilmbasierten In-vitro-Kariesmodell [Seemann 2005]

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben in einem biofilmbasierten In-vitro-Kariesmodell demineralisiert, das bereits in anderen Studien zur Erzeugung kariesähnlicher Läsionen angewendet wurde [Seemann et al. 2005a, 2005b, 2006, Seemann 2005] (Abb.6.1). Trotzdem ist es in Bezug auf seine Möglichkeit, komplizierte biologische Prozesse der menschlichen Mundhöhle umzusetzen, gegenüber In-situ, Tier- bzw. In-vivo-Versuchen unterlegen. Ein Grund dafür ist beispielsweise, dass

Vieles in Bezug auf die Wirkung des Speichels noch nicht untersucht und verstanden worden ist [Hay 1995]. Auch für die Vorgänge an der Speichel-Zahn-Kontaktfläche fehlen bislang in der Literatur detaillierte Kenntnisse über das Flüssigkeitsvolumen, Abdeckung der Oberfläche und Transportvorgänge der Substrate unterhalb der Plaque oder die Auswirkungen immunologischer Komponenten [White 1995].

Zum Einfluss verschiedener Spaltbreiten auf das Ausmaß kariöser Läsionen wurden bisher Studien in vivo an Amalgamfüllungen [Hodges et al. 1995], an extrahierten Zähnen (ebenfalls an Amalgamfüllungen) [Jørgensen und Wakumoto 1968, Söderholm et al. 1989] und Studien in vitro mit einer bakteriell erzeugten Demineralisation [Derand et al. 1991, Totiam et al. 2007] durchgeführt. Jedes dieser Studiendesigns hat seine Vor- und Nachteile. In vivo lässt sich eine residuale Karies schwer ausschließen, der Spalt ist nicht standardisierbar, individuelle kariespräventive Maßnahmen des jeweiligen Patienten sind schwer zu standardisieren und die Diagnose einer Sekundärkaries kann nicht nach histologischen Kriterien gestellt werden. Die Beurteilung der Spaltbreite ist ebenfalls klinisch problematisch, da, auch wenn sich an der Oberfläche klinisch eine bestimmte Spaltbreite messen lässt, diese nicht gleichmäßig breit bis an den Boden der Füllung verlaufen muss. Ein standardisierter Spalt in vivo wäre lediglich an neu gelegten Füllungen in später zu extrahierenden Zähnen vorstellbar. Die Extraktion birgt dann erneut die Gefahr von Artefakten, die das Ergebnis verfälschen können. Eine andere Möglichkeit wäre, die Zähne vor der Extraktion in der Mundhöhle auf Sekundärkaries zu untersuchen. Dabei bleiben dem Untersucher, wie bereits erwähnt, spezielle mikroskopische Techniken verwehrt. Um dann auch eine residuale Karies auszuschließen, wäre eine Longitudinalstudie notwendig, bei der Kariesfreiheit vor Füllungslegung nachgewiesen werden kann. Eine weitere Option sind In-situ-Experimente, die jedoch meist aus technischen Gründen mit nur geringem Probenumfang durchgeführt werden können. Außerdem machen die Vielzahl der unberechenbaren, individuellen, probandenabhängigen Faktoren der menschlichen Mundhöhle die Ergebnisse schwerer auswertbar.

Die Verwendung einer künstlichen Mundhöhle ist somit ein denkbarer Kompromiss. So ließen sich Faktoren wie gleichmäßige Spaltbreite, patientenabhängige Faktoren, Fähigkeiten des Zahnarztes beim Füllungslegen, Restaurationsmaterial und Lokalisation standardisieren. Allerdings wird dadurch, dass die Spaltbreite in den Vordergrund der Untersuchung rückt, häufig das komplexe Geflecht der

Sekundärkariesentstehung zu sehr vereinfacht [Söderholm et al. 1989, Özer and Thylstrup 1995].

Bevor Schlüsse aus den Ergebnissen dieser Studie auf die In-vivo-Situation gezogen werden, sollen noch einige Einschränkungen dieses Modells im Vergleich zur menschlichen Mundhöhle genannt werden: Verwendet wurde ausschließlich *Streptococcus mutans*, wodurch Wechselwirkungen mit anderen Keimen ausblieben. Ebenso konnten nicht alle immunologischen Gegebenheiten der Mundhöhle simuliert werden. Der verwendete Speichel sollte dem menschlichen Speichel gleichen, ist in seiner Zusammensetzung jedoch nicht identisch. Dabei gestaltet es sich als schwierig, ein zur Mundhöhle passendes Verhältnis aus ungelösten und gelösten Mineralien zwischen Speichel und Zahn zu finden [White 1995]. Außerdem ist es in Hinblick auf die Untersuchung von minimalen Spalten vorstellbar, dass ausgefallene Speichelproteine und Pellikel den Zugang zum Spalt verschließen können [Özer & Thylstrup 1995, Mjör & Toffenetti 2000]. Des Weiteren herrschen in verschiedenen Regionen der Mundhöhle auch unterschiedliche Bedingungen z.B. zwischen Ober- und Unterkiefer [Dawes & MacPherson 1993]. Unabhängig der von White erwähnten Nachteile, kommt in dieser Arbeit hinzu, dass den in Scheiben geschnittenen Probenkörpern die Blutversorgung und kariespräventive Maßnahmen inklusive der Fluoridierung durch Patient und Zahnarzt fehlten.

Der Vorteil dieses biofilmbasierten In-vitro-Kariesmodells liegt darin, dass in wenigen Tagen eine messbare kariesähnliche Läsion erzeugt werden konnte, die in vivo mindestens drei Monate benötigen würde und die Untersuchung sehr gut kontrollierbar war [White 1995]. Dabei findet ein ständiger Wechsel von De- und Remineralisation statt – ein Vorteil gegenüber rein chemischen Modellen. Von anderen mikrobiellen Systemen unterschied sich dieses Kariesmodell dadurch, dass die Proben nicht in den Medien gebadet, sondern mit ihnen betropft wurden. Somit kommt es zu keiner Übersättigung im Spalt, die die Remineralisationsrate senken und somit die Wiedereinlagerung von Mineralien artifiziell einschränken würde und Demineralisation selbst limitieren könnte [White 1995, Totiam et al. 2007]. Trotz der Intention, möglichst viele Gegebenheiten der menschlichen Mundhöhle nachzuahmen, büßt jedes In-vitro-Modell im Hinblick auf die In-vivo-Situation auf Kosten einer besseren Kontrolle über das Experiment ein. So kann anschließend nur eine eingeschränkte Übertragung der in vitro gewonnenen Daten auf die klinische Situation vorgenommen werden. Anhand der

Ergebnisse dieser Untersuchung kann somit keine quantitative Aussage über das Demineralisationsausmaß bei bestimmten Spaltbreiten für die menschliche Mundhöhle getroffen werden. Jedoch war ein Vergleich des Demineralisationsausmaßes zwischen den unterschiedlichen Testgruppen bzw. zur Kontrollgruppe möglich.

### **6.1.5 Kritische Betrachtung zur Auswertungstechnik**

Vergleichbare Ergebnisse setzen die Anwendung validierter Messmethodiken voraus, durchgeführt von einer Person in einem engen zeitlichen Rahmen und ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit der auszuwertenden Proben („blind“). Zur Evaluation der Demineralisation einer Probe sind in der Literatur verschiedene technische Möglichkeiten beschrieben: **(1)** Jod- Absorptionsspektrometrie [Almqvist et al. 1988]; **(2)** Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM) [Fontana et al. 1996, González-Gabzas et al. 1998, Okuda et al. 2003, Seemann et al. 2005]; **(3)** Lichtstreuung [Ten Bosch et al. 1984]; **(4)** Mikroanalyse [Boyde et al. 1961, Clarkson et al. 1984, Ngo et al. 1997]; **(5)** Bestimmung der Mikrohärtigkeit [Pimenta et al. 1998, Lobo et al. 2005]; **(6)** Mikroradiografie (TMR, LMR und WIM) [Hals & Nernaes 1971, Hals & Nordervall 1973, Hals et al. 1974, Derand et al. 1991, Dijkman & Arends 1992, Dijkman et al. 1994, Ngo et al. 1997, Kielbassa et al. 2003]; **(7)** Polarisationsoptisches Mikroskop [Hals 1971, 1973, 1974, Kidd 1976a, Hicks et al. 1986, Gilmour et al. 1990, 1993, Derand et al. 1991, Dionysopoulos et al. 1994, 1996, Grossman & Matejka 1995, García- Godoy et al. 1998, Pereira et al. 1998, Hicks et al. 2000, Kielbassa et al. 2003]; **(8)** Quantitative Lichtinduzierte Laserfluoreszenz Technik (QLF) [Al-Khateeb et al. 1997a, 1997b, González-Cabzas et al. 2003, Guggenheim et al. 2004]. Der Mikrohärtetest, die Mikroanalyse, die Mikroradiografie, die QLF sowie die CLSM ermöglichen eine quantitative Aussage über die kariöse Läsion, während die polarisationsoptische Mikroskopie, die Lichtmikroskopie und die Jod- Absorptionsspektrometrie zu den qualitativen Untersuchungen zählen. In der vorliegenden Arbeit fand die Konfokale Laserscanning Mikroskopie als quantitative Messmethode Anwendung.

Die Konfokalmikroskopie wird in der Zahnmedizin erst seit 1983 genutzt. Ursprünglich für die Zellforschung entwickelt, konnte die Technik in den letzten Jahren mit Hilfe verbesserter digitaler Verarbeitungssysteme weiterentwickelt werden [Pioch et al. 1996, González-Cabzas et al. 1998]. Bei der Konfokalen Laserscanning Mikroskopie wird die Probe pixel- und zeilenweise gescannt. Die dabei gewonnenen Daten werden zu einem

Bild zusammengerechnet. Das Prinzip der Konfokalen Lichtmikroskopie besteht darin, dass sie das von einer einzigen Ebene der Probe reflektierte oder emittierte Licht detektiert. Die konjugiert angeordnete Lochblende (Pinhole) sorgt dafür, dass nur das aus der Fokusebene stammende Licht auch vom Detektor registriert wird. Diese Methode ermöglicht die Darstellung von Proben mit Schichtdicken von wenigen Mikrometern. Initiale Läsionen, die in der bisher als Standard genutzten Transversalen Mikroradiografie nicht sichtbar gemacht werden konnten, werden im CLSM dargestellt [Sønju-Clasen & Øgaard 1999]. Fontana et al. 1996 entwickeln eine schnelle und unkomplizierte Methode, bei der die Zähne halbiert und anschließend mit einer fluoreszierenden Lösung (Rhodamine B) eingefärbt werden. Seemann et al. verzichten in ihren Untersuchungen auf eine Anfärbung der Proben [Seemann et al. 2005]. Diese Mikroskopiermethode verlangt eine vergleichsweise geringe Vorbereitung der Proben, ohne aufwendiges Präparieren in Form von Schneiden oder Trocknen. Somit sinkt auch das Risiko an Artefakten und technischen Fehlern im Gegensatz beispielsweise zur Mikroradiografie und Polarisationsoptischen Mikroskopie [Okuda et al. 2003]. Eine Belastung des Untersuchers durch Röntgenstrahlen entfällt und die selektive Darstellung tomografischer Ebenen bis in Tiefen von 100 µm unter der Probenoberfläche ermöglicht eine Auswertung der Proben unabhängig von Unebenheiten und Verunreinigungen der Oberfläche. Mittels geeigneter Software können außerdem Daten von Oberfläche, Flächen und Volumina der untersuchten Strukturen dargestellt werden [González-Cabezas et al. 1998].

## 6.2 Diskussion der Ergebnisse

### 6.2.1 Morphologie der Inneren Läsion

**Die Inneren Läsionen im Schmelz** breiteten sich entweder halbkreisförmig bzw. triangulär vom Spalt in Richtung Zahnhartsubstanz aus oder verliefen parallel zum Spalt. Ein triangulärer Läsionsverlauf ist sowohl für die Primärkaries [Bjørndal & Thylstrup 1995] als auch für die Äußere Läsion sowie für die Innere Läsion beschrieben worden [Özer 1997]. Auch parallel zum Spalt verlaufende Läsionen sind in der Literatur zu finden [Hals & Nernaes 1971, Kidd 1976a, Gilmour et al. 1990].

Bjørndal & Thylstrup beschreiben 1995 eine Gerade, die sogenannte „zentrale Transversale“ [Bjørndal & Thylstrup 1995, Özer 1997]. Diese beginnt am tiefsten Punkt der sekundären Läsion, verläuft in Richtung der Schmelzprismen und endet am Ursprung der jeweiligen Läsion (Abb. 2.3). Dieser Ort des Beginns der kariösen Läsion liegt bei einer Sekundärkaries an der Oberfläche des Zahnes im Bereich des Spalteingangs [Özer 1997] und wurde bisher nur für Äußere und Innere Läsionen gleichzeitig definiert. In der hier durchgeführten Studie ist bei bekanntem Prismenverlauf eine „zentrale Transversale“ ebenso für die Wandläsionen unabhängig von einer Äußeren Läsion denkbar. Die exakte Richtung der Schmelzprismen im CLSM konnte bei den hier gewählten Einstellungen nicht sichtbar gemacht werden, da bei einer Vergrößerung der Läsion nicht Schmelz- und Dentinläsion gleichzeitig hätten erhoben werden können. Um den Prismenverlauf genau zu klären, sind weitere Studien nach dem hier vorgestellten Modell mit Hilfe des Polarisationsmikroskops notwendig. Trotzdem soll anhand der Morphologie der hier zu beobachtenden Inneren Läsion im Schmelz eine mögliche Entstehung der Inneren Läsion diskutiert werden.

Verschiedene Möglichkeiten zur Entstehung der Inneren Läsion sind in Erwägung zu ziehen: Zum einen durch eine indirekte Demineralisation, d.h. ein Biofilm bildet sich an der Oberfläche aus, Säuren werden gebildet und gelangen ausschließlich von dort in den Spaltbereich. Zum anderen kann eine direkte Demineralisation der Zahnhartsubstanz im Spalt erfolgen, ausgehend von einem Biofilm, der sich im Spalt ausgebildet hat. Die dritte Form der Kariesentstehung ist eine Kombination aus direkter und indirekter Demineralisation. Im ersten Fall - der indirekten Demineralisation - müsste die Verlängerung des tiefsten Punkts der Läsion entlang der Schmelzprismen, d.h. der Initiationspunkt der Inneren Läsion, direkt am Spalteingang liegen, da hier

immer der erste Kontakt und somit im Verlauf der längste Kontakt der Zahnhartsubstanz mit den demineralisierenden Säuren stattfindet - immer vorausgesetzt, die Oberfläche des Zahnes wurde versiegelt wie in der vorliegenden Arbeit. Im zweiten Fall – der direkten Demineralisation – kann der oben beschriebene Initiationspunkt rein theoretisch im gesamten Spaltbereich liegen, da überall dort der erste und somit längste Kontakt mit Säuren stattgefunden haben könnte. Im dritten Fall kann der Läsionsbeginn direkt am Spalteingang und auf der gesamten Länge vorliegen.

Für die Entstehung der halbkreisförmigen bzw. triangulär sich ausbreitenden Läsionen im Schmelz scheint somit eine indirekte Demineralisation möglich. Bei schräg nach unten in Richtung Dentin verlaufenden Schmelzprismen können derartige Morphologien entstehen. Nicht erklärbar mit einer indirekten Demineralisation sind jedoch die gleich breit bis zum Dentin verlaufenden Läsionen. Für diese Läsionen lässt sich kein tiefster Punkt festlegen. Wird stattdessen angenommen, die tiefste Läsion liegt an der Schmelz-Dentin-Grenze, widerspricht dies einer gleich starken Demineralisation insofern, dass die „zentrale Transversale für diesen theoretischen Fall vom Spalteingang bis zur Schmelz-Dentin-Grenze verläuft. Dies wäre gleichbedeutend mit einem Schmelzprismenverlauf in dieselbe Richtung. Wenn sich aber die Karies hauptsächlich entlang der Prismen ausbreitet, dürften die Areale „oberhalb“ der „zentralen Transversalen“ nicht gleich stark demineralisiert sein, da deren Prismenöffnung an der Oberfläche, d.h. an der Versiegelung endet. Ebenso scheint die Annahme, die tiefste Läsion läge oben, direkt unter der Versiegelung, irrelevant, da hier die „zentrale Transversale“ parallel zur Oberfläche verlaufen muss und somit die Innere Läsion in der Tiefe nicht begründet werden kann. Für diese Läsionen kann die Läsion entweder allein durch direkte Demineralisation im Spalt entstanden sein oder aus einer Kombination aus direkter und indirekter Demineralisation.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass wenn wie in der vorliegenden Arbeit die Ausbildung einer Äußeren Läsion mittels eines Lacks verhindert wird, die Demineralisation ihren Ursprung zumindest für die parallel verlaufenden Läsionen auch im Spalt haben muss. Interessant ist dabei jedoch, auf welcher Höhe im Spalt dieser Punkt zu finden ist.

**Die Innere Läsion im Dentin** verlief bei allen Proben triangulär mit dem tiefsten Punkt an der Probenbasis. Dies kann in der Anreicherung der demineralisierenden Agentien am Boden des Minischlittens begründet sein.

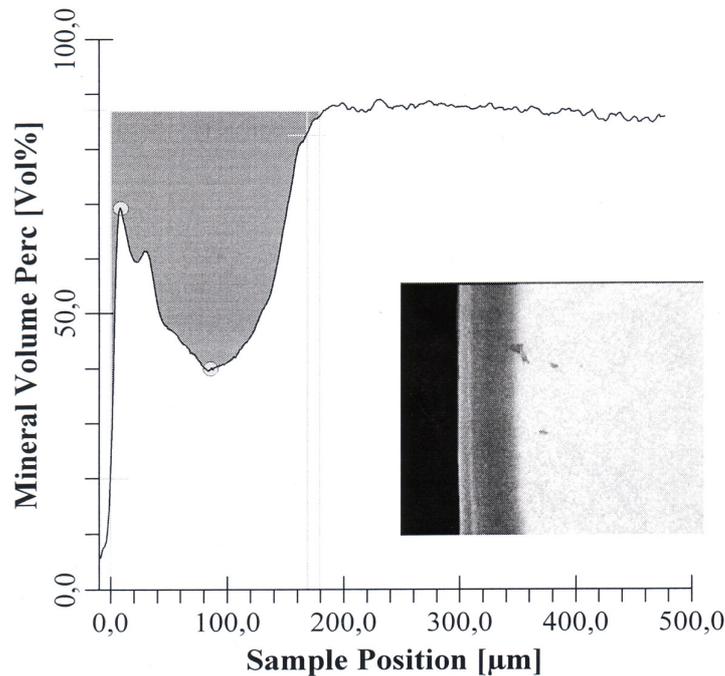


Abbildung 6.4: Verlauf des Mineralgehalts einer Probe, die im biofilmbasierten In-vitro-Kariesmodell demineralisiert worden ist (links) und Darstellung der Probe mittels Transversaler Mikroradiografie [Seemann et al. 2005]

Die massiven Demineralisationen in Schmelz und Dentin in der Kontrollgruppe sind eine Folge der Optimierung des Versuchsaufbaus auf die Erzeugung von Wandläsionen im Spalt: Um eine Demineralisation im Spaltbereich sicherzustellen, musste eine vergleichsweise lange Inkubationszeit gewählt werden. Diese war deutlich länger, als es zur Erzeugung von initialen Äußeren Läsionen an Rinderzähnen notwendig gewesen wäre. Folgende Überlegungen führten zu dieser Entscheidung: Zum einen war zu erwarten, dass im Spalt ein langsames Fortschreiten der Karies zu beobachten sein würde [Özer 1997] und zum anderen auch die oberflächliche Versiegelung der Proben die Kariesprogression mindern würde. Die lange Inkubationszeit hatte jedoch gleichzeitig zur Folge, dass die Proben der Kontrollgruppe eine massive Demineralisation erfuhren mit teilweise sehr starken Substanzverlusten: Infolge der massiven Demineralisierung kam es über die Initialläsion hinaus zu einer strukturellen Schwächung des Schmelzes in den Kontrollgruppen. Der so geschwächte Schmelz

brach dann ein und resultierte in einem Substanzverlust an diesen Proben. Dies war nicht der Fall bei den Proben der Testgruppen.

Dass es sich in diesem In-vitro-Kariesmodell um kariöse Läsionen und nicht um Erosionen handelt, wurde bereits 2005 von Seemann et al. nachgewiesen. Mittels transversaler Mikroradiografie konnte der Verlauf des Mineralverlusts aufgezeichnet werden. Ein Verlust an der Zahnhartsubstanz zeigte sich nicht nur an der Oberfläche (Erosion), sondern auch in tieferen Schichten im Schmelz (Initialläsion)(Abb.6.4).

### **6.2.2 Abhängigkeit der Inneren Läsion von der Äußeren Läsion**

Die Histologie der Sekundärkaries mit einer Äußeren und Inneren Läsion wird zum einen erklärt durch die Diffusion von Hydrogenionen in den Spalt, die durch Bakterien an der Zahnoberfläche gebildet werden (indirekte Demineralisation) bzw. durch eine direkte Demineralisation ausgehend von einem Biofilm im Spalt. Beide Theorien haben dazu geführt, dass angenommen wurde, dass breitere Spalten auch eine stärkere Demineralisation bewirken. Klinische Untersuchungen dazu zeigen kontroverse Ergebnisse [Derand et al. 1991, Totiam et al. 2007, Hodges et al. 1995, Kidd & O'Hara 1990, Rezwani-Kaminski et al. 2002]. Ebenso wird in letzter Zeit kritisiert, dass in den Untersuchungen die Innere Läsion lediglich ein Ausläufer der Äußeren Läsion sei oder eine residuale Karies [Mjör & Toffenetti 2000, Hodges et al. 1995, Kidd & Fejerskov 2004, Özer & Thylstrup 1995]. Einige Autoren zweifeln die Innere Läsion als eigenständige Läsion sogar an [Özer 1997, Mjör & Toffenetti 2000].

Im Unterschied zu den vorhandenen Studien, in denen stets Innere und Äußere Läsion gleichzeitig beurteilt werden, betrachtet diese Arbeit vornehmlich die Innere Läsion. Bei den Proben der Testgruppen wurden deshalb die Oberflächen versiegelt. Da alle Proben unabhängig von der Entstehung einer Primärläsion an der Oberfläche des Zahnes eine Innere Läsion in Schmelz und Dentin entlang des Zahn-Restaurations-Zwischenraums entwickelten, kann die Innere Läsion als eigenständige Läsionsform bezeichnet werden. Dies beschrieben bereits Kidd und O'Hara 1990. Totiam et al. 2007 fanden ebenfalls Wandläsionen an allen Proben, nachdem diese in einem mikrobiellen Modell in wesentlich kürzerer Zeit im Vergleich zu der hier beschriebenen Untersuchung demineralisiert worden waren. Auch die In-situ-Ergebnisse von Thomas et al. bestätigen: "... secondary caries can occur in two independent locations: at the surface and along the wall" [Thomas et al. 2007]. Dijkman & Arends [1992] hatten bereits in situ

und Dijkman et al. [1994] in vitro gezeigt, dass im Dentin eine Wandläsion unabhängig von der Äußeren Läsion bei 200µm Spaltbreite entsteht.

Da die Innere Läsion unabhängig von der Äußeren Läsion entsteht, stellt sich zusätzlich die Frage, ob sich beide gegenseitig beeinflussen oder ob beide zugleich von einem oder mehreren Faktoren beeinflusst werden: Die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Testgruppe 250 und der Kontrollgruppe lassen vermuten, dass sich das Ausmaß der Inneren Läsion mit steigender Demineralisation an der Zahnoberfläche (Äußere Läsion) verstärkt. Dies stimmt überein mit den Arbeiten von Mjör & Qvist 1997 sowie Fontana et al. 2002. Diese Autoren schlussfolgern, dass die klinisch sichtbare Äußere Läsion ein guter Indikator für eine Innere Läsion sein kann [Özer & Thylstrup 1995, Kidd & Beighton 1996, Mjör & Qvist 1997, Mjör & Toffenetti 2000]. Grossmann & Matejka raten 1999 dazu die Nutzung der Äußeren Läsion als einzigen diagnostischen Parameter kritisch zu sehen, da sie in einer klinischen Untersuchung für diesen Parameter eine hohe Sensitivität von 95% bei einer Spezifität von 68% nachwiesen. Aus klinischer Sicht bedeutet dies, dass wenn sich eine Äußere Läsion an der Zahnoberfläche ausgebildet hat, sich zu 95% eine Innere Läsion an der Kavitätenwand befindet.

Welches könnten die Gründe für eine gegenseitige Beeinflussung sein?

Denkbar wäre, dass die Äußere Läsion die Innere Läsion indirekt beeinflusst über die, durch einen hohen Substratverlust entstandene, Erweiterung des Spalteingangs und einer daraus resultierenden stärkeren Diffusion von Säuren in den Spalt. Die zur direkten Demineralisation zusätzliche Demineralisation durch Diffusion von Säuren könnte dann im Spalt ebenfalls stärkere Innere Läsionen bewirken. Die eigentliche Ursache in diesem Fall ist nicht die Äußere Läsion an sich, sondern der Biofilm an der Oberfläche des Zahnes.

Eine direkte Beeinflussung der Inneren Läsion durch die Äußere Läsion scheint nur, wie bereits in anderen Arbeiten beschriebenen [Özer 1997, Mjör & Toffenetti 2000], über die Schmelzprismen möglich. Bei einer Demineralisation an der Zahnoberfläche sind gleichzeitig mehr Prismen involviert als bei einer versiegelten Oberfläche – hier sind ausschließlich im Spaltbereich liegende Schmelzprismen beteiligt. Daraus könnte sich ebenfalls eine stärkere Demineralisation der Inneren Läsion bei gleichzeitiger Beteiligung der Oberfläche ergeben.

Aus verschiedenen Gründen sind die vorliegenden Ergebnisse kritisch zu sehen: da (1.) ein direkter Vergleich zwischen Innerer und Äußerer Läsion nur für eine Spaltbreite von 250µm untersucht wurde, (2.) es ungeklärt bleibt, ob die Innere Läsion durch eine Diffusion der Säuren von der Oberfläche oder durch eine direkte Besiedlung des Spaltraumes entsteht und (3.) ob dieses vereinfachte In-vitro-Kariesmodell auf die In-vivo-Situation vollständig übertragen werden kann. Die hier gezeigten Ergebnisse können somit aufgrund des Studiendesigns keine endgültige Aussage zum Einfluss der Äußeren auf die Innere Läsion machen. Gezeigt werden konnte jedoch, dass sich eine innere Läsion zwar ohne das Vorhandensein einer äußeren Läsion ausbilden kann, trotzdem aber ein Zusammenhang zwischen beiden besteht.

### **6.2.3 Einfluss der Spaltbreite auf die Innere Läsion**

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten auch einen Zusammenhang zwischen Ausmaß der Wandläsion und Spaltbreite, wenn die Ausbildung einer Äußeren Läsion verhindert wird. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien überein, bei denen jedoch Innere und Äußere Läsion gleichzeitig betrachtet werden [Jørgensen & Wakumoto 1968, Derand et al. 1991, Hodges et al. 1995, Özer 1997, Totiam et al. 2007]. Die Ursache für größere Läsionen bei weiteren Spalten ist in einem größeren Platzangebot für die Mikroorganismen zu vermuten. In kleineren Spalten entstehen zusätzlich wahrscheinlich schnell gesättigte Verhältnisse durch die demineralisierte Zahnhartsubstanz. Auf Grund dessen könnte es zur Remineralisation und somit Stagnation des kariösen Prozesses im Spalt kommen [Totiam et al. 2007].

Interessanterweise stieg im Schmelz die Demineralisationsfläche und die mittlere Läsionstiefe nur zwischen 50 und 250µm Spaltbreite an. Ein Vergrößern der Spalte zwischen Restauration und Zahn von 50 auf 100µm hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Demineralisation im Schmelz. Im Gegensatz dazu nahm die demineralisierte Fläche im Dentin bei einem Anstieg des Spaltraums von 50 auf 100 µm zu, jedoch nicht bei einer weiteren Anhebung auf 100 und 250µm. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens könnte sein, dass bei dem hier angewandten Versuchsaufbau die Innere Läsion im Dentin hauptsächlich das Resultat von Säuren ist, die von Bakterien produziert worden ist, die sich direkt im Spalt auf der Inneren Läsion in einem Biofilm angesiedelt haben. Im Schmelz hingegen wird die Innere Läsion von zwei unterschiedlichen Ressourcen unterhalten. Zum einen entsteht Säure, wie im Dentin,

durch direkt im Spalt befindliche Bakterien und zum anderen durch die Plaque an der Oberfläche, die in dieser Studie ungestört von Mundhygienemaßnahmen wachsen konnte. Von dort diffundiert eine zusätzliche Menge an Säure in den Spalt. Diese Erkenntnis wird unterstützt durch die Tatsache, dass in der Kontrollgruppe eine wesentlich stärkere Demineralisation der Proben erfolgte als in der Testgruppe 250 trotz gleicher Spaltbreite. Durch die fehlende Versiegelung der Oberfläche in der Kontrollgruppe konnte außen im Spaltbereich eine Läsion mit Substratverlust entstehen. Dieser trichterförmige Substratverlust ermöglicht eine bessere Anreicherung von Biomasse und somit eine erhöhte Diffusionsrate ins Spaltinnere [Özer 1997]., besonders deshalb, weil die Proben ungestört von Faktoren wie Mundhygiene, Bewegungen der oralen Gewebe und Ernährung in der vorliegenden Arbeit demineralisiert wurden.

Die maximale Läsionstiefe im Schmelz war im Gegensatz zur Fläche der Demineralisation und mittleren Läsionstiefe nur statistisch signifikant größer in der Kontrollgruppe gegenüber der Testgruppe 250. Dies zeigt, dass die Demineralisation zwischen den Gruppen nicht tiefer an einem bestimmten Ort, z.B. direkt unter der Oberfläche erfolgte, sondern der Schmelz insgesamt bzw. auf einer breiten Front demineralisierte. Für die mittlere Läsion im Dentin waren die Unterschiede statistisch signifikant in der Fläche der Demineralisation zwischen der Testgruppe 50 und 100. Für die mittlere Läsionstiefe war dieser Unterschied zwar anhand der Werte sichtbar, jedoch nicht signifikant. Die Fläche der Demineralisation ist diesbezüglich der repräsentativere Wert, da er statt einzelner Durchschnittswerte die gesamte demineralisierte Fläche einschließt. Durch die Bildung eines Mittelwertes aus fünf Einzelwerten kann eine methodische Verzerrung stattgefunden haben. Im Dentin muss die Messung der maximalen Läsionstiefe kritisch gesehen werden, da anzunehmen ist, dass sich am Boden des Minischlittens Säuren angesammelt hatten und eine retrograde Demineralisation im unteren Teil der Proben mitbeteiligt war.

Des Weiteren kann eine Schwellenspaltbreite für die bakterielle Kolonisation diskutiert werden, ab der sich im Zahn-Restoration-Zwischenraum eine Art „kritische Biofilmmasse“ ansiedelt. Dieser kritische Wert würde dann den Übergang von einer Demineralisation durch Diffusion der an der Oberfläche gebildeten Säuren in den Spalt (bei kleinen Spaltbreiten) zur Demineralisation durch Säuren, die durch Bakterien direkt

im Spalt gebildet wurden, (bei größeren Spalten) kennzeichnen. Özer [1997] gab eine Schwellenspaltbreite von 250µm anhand seiner Ex-vivo-Untersuchung an. Hodges et al. 1995 gaben 187µm als diejenige durchschnittliche Spaltbreite an, bei der sich in vivo kariöse Läsionen ausbilden. Mit dem hier angewandten Modell ist aus den oben genannten Gründen nur eine grobe Schätzung eines solchen Schwellenwertes bei 100µm möglich. Dieser ist in vitro kleiner, da hier eine massive Plaqueakkumulation möglich war und somit die mikrobielle Organisation ungestört verlaufen konnte. Hinzu kommt, dass bei Rinderzähnen die Läsionen doppelt so schnell fortschreiten wie bei humanen Zahnproben (vgl. Kap. 6.1.1.). Ein solcher Schwellenwert kann dem Zahnarzt nur eine grobe Orientierung geben, da individuelle Faktoren den Wert verschieben können, besonders diejenigen, die die Plaquebesiedlung modulieren. Ein absoluter, für alle Patienten gültiger Wert scheint somit unwahrscheinlich. Die Annahme, dass es bei Spaltbreiten unter 35µm zu keiner Inneren Läsion kommt [Jørgenson und Wakumoto 1968] ist sehr gewagt, zumal beispielsweise eine Studie zu fluoridhaltigen Linern dem widerspricht, indem sie an allen Proben eine Wandläsion entlang der Zahnhartsubstanz zeigt. Die nachträglich im Rasterelektronenmikroskop ausgemessenen Spalten reichten von 2 bis 5µm im Wurzelbereich und von 5 bis 15µm im Schmelzbereich, d.h. auch bei geringeren Spaltbreiten scheint eine Sekundärkaries möglich [García-Godoy et al. 1998].

Bei vergleichbarem Versuchsaufbau zeigt die Untersuchung von Totiam et al. 2007 statistisch signifikante Unterschiede im Schmelz erst ab einem Unterschied in der Spaltbreite von circa 1000µm. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen wurden alle Spalten bewusst mit *S. mutans* infiziert und eine Kolonisation des Keimes für 2 Stunden erlaubt [Totiam et al. 2007]. So wurden alle Spalten gleichzeitig infiziert und die Demineralisation begann zur selben Zeit. In der vorliegenden Arbeit wurde die Mikrobiologie im Spalt nicht erhoben. Somit lässt sich streng genommen nur vermuten, dass eine Infektion des Spaltes erfolgt ist. Vorangegangene Experimente mit diesem biofilmbasierten Modell zeigen jedoch, dass der Spaltraum der Proben mikrobiell besiedelt worden ist. Folglich musste *S. mutans* erst in den Spalt eindringen und sich anschließend organisieren. Dies könnte bei 250µm schneller erfolgen und effektiver sein als bei 50µm und könnte die signifikant stärkere Demineralisation im Schmelz bei 250µm erklären. Zum anderen wurden die Proben bei Totiam et al. [2007] nur für 8 Tage statt für 21 Tage demineralisiert. Interessant wäre, ob eine längere

Versuchsdauer zu signifikanten Unterschieden zwischen den verschiedenen Spaltbreiten führt.

Die Studie von Totiam et al. 2007 beschrieb im Dentin hinsichtlich der Inneren Läsion statistisch signifikante Unterschiede zwischen allen Gruppen (25, 250 und 1000 $\mu$ m), außer zwischen den zwei kleinsten Spaltbreiten (0  $\pm$  10 und 25 $\mu$ m). Hierfür kann die absichtliche Infektion des Spaltes ursächlich sein, durch die alle Proben gleichzeitig eine direkte Demineralisation erfuhren und der Anteil der indirekten Demineralisation durch Diffusion blieb unberücksichtigt. Um die in vitro erhaltenen Ergebnisse auf die In-vivo-Situation übertragen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine absichtliche Infektion des Spaltes verzichtet, um den Anteil der indirekten Diffusion mitbeurteilen zu können. Außerdem wurde ein Zusammenhang zwischen der Äußeren Läsion und der Inneren Läsion beschrieben (s. Kap.6.2.2.). Eine durch die Äußere Läsion verstärkte Demineralisation im Spaltbereich konnte in der hier durchgeführten Studie nicht stattfinden, da die Oberfläche versiegelt war. Bei Totiam et al. fand zusätzlich eine Demineralisation an der Oberfläche statt. Dies kann nachfolgend zu einer unterschiedlich starken Demineralisation zwischen allen Gruppen (25, 250 und 1000 $\mu$ m) führen, da andere Komponenten, wie die Äußere Läsion oder eine vermehrte Plaqueanlagerung, möglicherweise einen verstärkten Einfluss bekommen.

Ungeachtet der statistischen Prüfung war innerhalb der Testgruppen eine Tendenz zum Anstieg der Läsionstiefen bei zunehmender Spaltbreite zu erkennen. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Söderholm et al. 1989, die ebenfalls einen schwachen Zusammenhang zwischen beiden Faktoren in vivo beschrieben. Auch sie fanden dabei im Dentin die stärker ausgeprägten Läsionen. Derand et al. zeigte 1991 ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Spaltbreite und Sekundärer Läsion in vitro, jedoch ohne statistische Auswertung auf Grund der geringen Probenanzahl. Interessant wäre für kommende Studien, ob daraus bei gleicher Versuchsanordnung mit höherer Probenanzahl eine statistische Signifikanz resultieren würde.

Hodges et al. 1995 beschrieben in vivo eine positive Korrelation zwischen breiten Spalten und Sekundärkaries im Schmelz. Diese Ergebnisse sind kritisch zu bewerten, da die Äußere Läsion wahrscheinlich in Kombination mit der Plaque einen massiven Einfluss, besonders auf die Innere Läsion im Schmelz hat (vgl. Kap. 6.2.2.). Besonders in vivo ist die Äußere Läsion starken Schwankungen durch interindividuelle

Unterschiede zwischen den Probanden ausgesetzt. So wäre es interessant gewesen, die Mundhygiene- und Ernährungsparameter dieser Untersuchung zu erfahren, denn deren maßgeblicher Einfluss wurde bereits nachgewiesen [Goldberg et al. 1981, Gilmour et al. 1990, Derand et al. 1991].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die eingangs aufgestellten Arbeitshypothesen: Die Innere Läsion der Sekundärkaries kann isoliert und unabhängig von einer Äußeren Läsion entstehen. Dabei kann ihr Ausmaß von der Äußeren Läsion, jedoch genauso auch von der Plaque an der Oberfläche abhängen. Eine Abhängigkeit von der Spaltbreite konnte für die Innere Läsion im Schmelz und im Dentin bei gleichzeitiger Inhibition der Bildung einer Äußeren Läsion aufgezeigt werden.

### 6.3 Klinische Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit zeigte, dass eine Innere Läsion ohne Anzeichen einer Äußeren Läsion an der Zahnoberfläche in vitro entsteht. Das Ausmaß der Inneren Läsion scheint dabei vom Vorhandensein einer Äußeren Läsion geprägt zu sein.

Zwar kann von den Ergebnissen dieser In-vitro-Studie nur bedingt auf die In-vivo-Situation geschlossen werden, jedoch hätte eine voneinander unabhängige Entwicklung von Innerer und Äußerer Läsion direkte klinische Konsequenzen für die Prävention, Diagnostik und Therapie der sekundären Karies. Entsteht nämlich eine Innere Läsion nur bei Koexistenz einer Äußeren Läsion könnten die diagnostischen und präventiven Maßnahmen auf die Äußere Läsion beschränkt werden. Entstehen aber beide Läsionsformen, wie in dieser Studie In-vitro gezeigt, unabhängig voneinander, ist eine „hidden caries“ im Spaltbereich denkbar. Dies erfordert dann spezielle Konzepte für eine zufrieden stellende Diagnostik der Wandläsion und deren Behandlung.

Der enge, hier gezeigte, Zusammenhang von Äußerer und Innerer Läsion deutet darauf hin, dass die Diagnose einer Äußeren Läsion eine Hilfe bei der Behandlungsplanung bzw. Prävention sein kann [Mjör & Qvist 1997]. Findet sich an der Oberfläche neben einer Restauration erweichte Zahnhartsubstanz, so kann gleichfalls besonders bei hoher mikrobieller Belastung durch eine insuffiziente Mundhygiene, von einer Inneren Läsion ausgegangen werden. Der Füllungsaustausch wäre der bisher übliche therapeutische Ansatz. Präventionsstrategien fehlen für die Sekundärkaries. Dabei wäre interessant, inwiefern sich eine rekurrente Karies bei Inhibition einer Äußeren Läsion in vivo entwickeln würde und ob dies einen Einfluss auf die Wandläsion („hidden caries“) hätte. Kann beispielsweise durch die Versiegelung der Oberfläche eines Zahnes das Ausmaß der Demineralisation an der Kavitätenwand reduziert bzw. inaktiviert werden? Für diesbezügliche Untersuchungen scheint eine getrennte Betrachtung beider Läsionsformen wichtig.

An defekten und verfärbten Restaurationsrändern sollte somit sorgfältig die Konsistenz der benachbarten Zahnhartsubstanz geprüft werden. Bei hartem Schmelz bzw. Dentin reicht dann ein minimalinvasives, präventiv orientiertes Handeln, wie Politur der Füllungsänder [Özer 1997], Füllungsreparaturen und/oder Fluoridierung aus. Ebenfalls sollte eine initiale Karies neben einer Restauration präventiv mit dem Ziel einer Inaktivierung und Remineralisation der Läsion therapiert werden [Noack et al. 2004].

In dem hier gezeigten biofilmbasierten Modell waren alle Proben dem gleichen kariogenen Milieu ausgesetzt – sowohl qualitativ, als auch quantitativ. Unter diesen standardisierten Bedingungen zeichnete sich eine Tendenz ab, dass bei größeren Spalten eine tiefere Demineralisation stattfand. Özer wiederum schrieb der Spaltbreite bei unterschiedlichen mikrobiellen Gegebenheiten eine untergeordnete Rolle in der Ätiologie der sekundären Karies zu [Özer 1997]. In den letzten Jahren übernehmen die Patienten immer mehr Verantwortung für ihre Zahn- und Mundgesundheit und nehmen an regelmäßigen Prophylaxesitzungen teil. So ist es denkbar, dass durch die Reduktion der Mikroorganismen in der Mundhöhle der Einfluss der Spaltbreite wieder steigt.

Die vorliegende Arbeit kann somit die Grundlage für weitere Untersuchungen bezüglich der Frage sein, wie speziell die Wandläsion inhibiert werden kann.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Pathohistologisch wird die Sekundärkaries als zweigeteilter Defekt mit einer Äußeren Läsion an der Zahnoberfläche und einer Inneren Läsion entlang der Kavitätenwand im Zahn-Restoration-Spaltraum beschrieben. Dabei entsteht die Äußere Läsion infolge eines primären kariösen Angriffs, während die Innere Läsion als Folge der Mikroleakage gilt. Letzteres ist umstritten. Klinische Untersuchungen zeigen nämlich, dass sich zwar an jeder Restauration im Laufe der Zeit eine Mikroleakage ausbildet, jedoch diese nicht zwangsläufig zu einer Sekundärkaries führt. Im Gegenteil, nur an klinisch besonders breiten Spalten fanden sich eindeutige Innere Läsionen. Dies führt zu der Frage, welcher Zusammenhang zwischen Spaltbreite und Sekundärkaries besteht. So wiesen einige Studien eine Abhängigkeit von Läsionstiefe und Spaltbreite nach. Andere Studien bestätigten dies wiederum nicht.

Eine Ursache für diese kontroversen Ergebnisse liegt in der Wahl eines geeigneten Studiendesigns für die Untersuchung der Sekundärkaries. Da die Karies ein multifaktorielles Geschehen ist, können in vitro Ergebnisse aus rein chemischen Modellen nur bedingt auf die Situation in der Mundhöhle übertragen werden. Insbesondere wird damit die Frage vernachlässigt, ob alle Spalten überhaupt von Mikroorganismen besiedelt werden können. In vivo wiederum ist die Herstellung standardisierter Spalten, die Messung der Inneren Läsion sowie die Differenzierung zwischen sekundärer und residualer Karies schwierig. Als ein weiterer Grund für die widersprüchlichen Ergebnisse vorheriger Studien ist die stets gleichzeitige Evaluation von Äußerer und Innerer Läsion denkbar, zumal der eigentlich interessante Aspekt der sekundären Karies in der klinisch nicht sichtbaren Inneren Läsion liegt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb zu untersuchen, ob eine Innere Läsion in einem biofilmbasierten In-vitro-Kariesmodell isoliert und somit unabhängig von einer Äußeren Läsion entstehen kann und inwiefern das Ausmaß dieser Inneren Läsion von der Spaltbreite und von der Äußeren Läsion abhängig ist.

Dazu wurden Rinderzähne in vier Teile gesägt und auf vier Gruppen verteilt. Alle Proben wurden in speziell für diese Untersuchung hergestellte Minischlitten eingebaut, die es erlaubten, verschiedene Spaltbreiten zwischen der Zahnprobe und einer Restaurationswand zu erzeugen: Testgruppe 50 (Spaltbreite 50µm), Testgruppe 100 (Spaltbreite 100µm), Testgruppe 250 (Spaltbreite 250µm), Kontrollgruppe (Spaltbreite 250µm). In den Testgruppen wurde die Oberfläche mit einem säureresistenten Lack

versiegelt, um eine Äußere Läsion zu verhindern. Anschließend wurden die 60 Proben in einem biofilmbasierten In-vitro-Modell für drei Wochen inkubiert.

Eine Innere Läsion bildete sich bei allen Proben unabhängig von der Koexistenz einer Äußeren Läsion. Dabei waren die Inneren Läsionen der Kontrollgruppe jeweils stärker ausgeprägt als diejenigen der drei Testgruppen. Hinsichtlich eines vermuteten Zusammenhangs zwischen Spaltbreite und Innerer Läsion zeigte sich im Schmelz ein statistisch signifikanter Unterschied ausschließlich zwischen der Testgruppe mit der kleinsten (50µm) und derjenigen mit der größten Spaltbreite (250µm) und im Dentin zwischen der Testgruppe 50 und 100.

Die vorliegende Arbeit konnte somit zeigen, dass sich Innere Läsionen unabhängig von einer Äußeren Läsion ausbilden können. Ihre Entstehung liegt somit potentiell in der Mikroleakage oder bei den Bakterien im Spalt und nicht in der Äußeren Läsion begründet. Inwiefern sich klinisch eine Innere Läsion ausbildet, hängt von anderen Faktoren, wie beispielsweise Zeit und Mundhygiene ab. Jedoch darf die Äußere Läsion und ihre Auswirkungen auf die Innere Läsion deshalb nicht unterschätzt werden. Dies demonstrierte die massiv stärkere Demineralisation der Inneren Läsion in der Kontrollgruppe im Vergleich mit der Testgruppe 250.

Das hier gewählte Studiendesign, bei dem ein Minischlitten in Kombination mit dem biofilmbasierten In-vitro-Kariesmodell verwendet wurde, liefert eine gute Basis für weitere Studien, die den Einfluss verschiedener Füllungsmaterialien auf die Innere Läsion bei verschiedenen Spaltbreiten und den Einfluss kariespräventiver Maßnahmen auf die Sekundärkaries untersuchen sollten.

Klinisch müssen Innere und Äußere Läsion getrennt betrachtet werden. Die von der Äußeren Läsion unabhängige Entstehung einer Inneren Läsion deutet darauf hin, dass eine „hidden caries“ im Spalt möglich ist. Dies erfordert spezielle, darauf abgestimmte Konzepte für die Diagnostik und Behandlung einer Wandläsion. Die Abhängigkeit der Inneren Läsion von der Spaltbreite konnte in vitro gezeigt werden, jedoch scheint die Mundhygiene in vivo einen stärkeren Einfluss zu haben. Da in den letzten Jahren die Prophylaxe in der zahnärztlichen Praxis zur Routine gehört, ist es denkbar, dass durch die Reduktion der Keimbelastung in der Mundhöhle der Einfluss der Spaltbreite wieder steigt.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abdalla AI, Davidson CL. Comparison of the marginal integrity of in vivo and in vitro Class II composite restorations. *J Dent* 1993; 21: 158-62.
2. Al-Khateeb S, Oliveby A, de Josselin de Jong E, et al. Laser fluorescence quantification of remineralization in situ of incipient enamel lesions: Influence of fluoride supplements. *Caries Res* 1997a; 31: 132-40.
3. Al-Khateeb S, ten Cate JM, Angmar-Manson B, et al. Quantification of formation and remineralization of artificial enamel lesions with a new portable fluorescence device. *Adv Dent Res* 1997b; 11: 502-6.
4. Almqvist H, Wefel JS, Lagerlöf F, et al. In vitro root caries progression measured by <sup>125</sup>I Adsorptiometry: comparison with chemical analysis. *J Dent Res* 1988; 67: 1217-20.
5. Arcoria CJ, Fisher MA, Wagner MJ. Microleakage in alloy-glass ionomer lined amalgam restorations after thermocycling. *J Oral Rehabil* 1991; 18: 9-14.
6. Axelsson P, Lindhe J. Effect of controlled oral hygiene procedures on caries and periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol* 1978; 5: 133-151.
7. Baume LJ. Fédération Dentaire Internationale: Special comission on oral and dental statistics: General principles concerning the international standardization of dental caries statistics. *Int Dent J* 1962; 12: 65.
8. Ben-Amar A, Cardash HS. The fluid-filled gap under amalgam and resin composite restorations. *Am J Dent* 1991; 4: 226-30.
9. Bentley CD, Broderius CA, Drake CW, et al. Relationship between salivary levels of Mutans Streptococci and restoration longevity. *Caries Res* 1990; 24: 298-300.
10. Bergenholtz G, Cox CF, Loesche WJ, et al. Bacterial leakage around dental restorations: its effect on the dental pulp. *Journal of Oral Pathology* 1982; 11: 439-50.
11. Bjørndal L, Thylstrup A. A structural analysis of approximal enamel caries lesions and subjacent dentin reactions. *Eur J Oral Sci* 1995; 103: 25-31.

12. Black GV. *In: Konservierende Zahnheilkunde von G.V. Black.* Berlin, Meusser, 1914.
13. Bortz J. *In: Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler.* Heidelberg, Springer Medizin Verlag, 2005.
14. Boyde A, Switsur VR, Fearnhead RW. Application of the scanning electron-probe x-ray microanalyser to dental tissues. *J Ultrastruct Res* 1961; 5: 201-7.
15. Brackett WW, Gunnin TD, Johnson WW, Conkin JE. Microleakage of light-cured glass-ionomer restorative materials. *Quintessence Int* 1995; 26: 583-5.
16. Brännström M, Nyborg H. The presence of bacteria in cavities filled with silicate cement and composite resin materials. *Swed Dent J* 1971; 64: 149-55.
17. Brännström M, Nyborg H. Cavity treatment with a microbicidal fluoride solution: growth of bacteria and effect on the pulp. *J Prosthet Dent* 1973; 30: 303-10.
18. Brännström M. Communication between the oral cavity and the dental pulp associated with restorative treatment. *Oper Dent* 1984; 9: 57-68.
19. Brännström M. Etiology of dentin hypersensitivity. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 88 Suppl 1: 7-13.
20. Brantley CF, Bader JD, Shugars DA, et al. Does the cycle of reresoration lead to larger restorations? *J Am Dent Assoc* 1995; 126: 1407-13.
21. Buchmann G, Klimm W, Geurtsen W. Der Füllungsrandspalt und dessen mikroökologische Bedeutung. *Dtsch Zahnärztl Z* 1992; 47: 188-91.
22. Buskes JAKM, Christoffersen J, Arends J. Lesion formation and Lesion remineralization in enamel under constant composition conditions. *Caries Res* 1985; 19: 490-6.
23. Charoenlarp P, Wanachantararak S, Vongsavan N, et al. Pain and the rate of dentinal fluid flow produced by hydrostatic pressure stimulation of exposed dentine in man. *Arch Oral Biol* 2007; 5: 625-31.

24. Clarkson BH, Wefel JS, Miller I. A model for producing caries-like lesions in enamel and dentin using oral bacteria in vitro. *J Dent Res* 1984; 63: 1186-9.
25. Cox CF, Keall CL, Keall HJ, et al. Biocompatibility of surface-sealed dental materials against exposed pulps. *J Prosthet Dent* 1987; 57: 1-8.
26. Crim GA, Chapman KW. Reducing microleakage in Class II restorations: an in vitro study. *Quintessence Int* 1994; 25: 781-5.
27. Dahl JE, Eriksen HM. Reasons for replacement of amalgam dental restorations. *Scand J Dent Res* 1978; 86: 404-7.
28. Dawes C, MacPherson LMD. The distribution of saliva and sucrose around mouth during the use of chewing gum and implications for the Site-specificity of caries and calculus deposition. *J Dent Res* 1993; 72: 852-7.
29. Deng DM, ten Cate JM. Demineralization of dentin by *Streptococcus mutans* biofilms grown in the constant depth film fermentor. *Car Res* 2004; 38: 54-61.
30. Derand T, Birkhed D, Edwardsson S. Secondary caries related to various marginal gaps around amalgam restorations in vitro. *Swed Dent J* 1991; 15: 133-8.
31. Dijkman GEHM, Arends J. Secondary caries in situ around fluoride-releasing light-curing composites: a quantitative model investigation on four materials with a fluoride content between 0 and 26 vol%. *Caries Res* 1992; 26: 351-7.
32. Dijkman GEHM, de Vries J, Arends J. Secondary caries in dentine around composites: a wavelength-independent microradiographical study. *Caries Res* 1994; 28: 87-93.
33. Dionysopoulos P, Kotsanos N, Koliniotou-Koubia E, Papagodiannis Y. Secondary caries formation in vitro around fluoride-releasing restorations. *Oper Dent* 1994; 19: 183-8.
34. Dionysopoulos P, Kotsanos N, Papagodiannis Y. Secondary caries formation in vitro around glass ionomer-lined amalgam and composite restorations. *J Oral Rehabil* 1996; 23: 511-9.

35. Edmunds DH, Whittaker DK, Green RM. Suitability of human, bovine, equine, and ovine tooth enamel for studies of artificial bacterial carious lesions. *Caries Res* 1988; 22: 327-36.
36. Eisenberg AD, Mundorff SA, Featherstone JD, et al. Association of microbiological factors and plaque index with caries prevalence and water fluoridation status. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6: 139-145.
37. Elderton RJ, Nuttal NM. Variations among dentists in planing treatment. *Br Dent J* 1983; 154: 201-6.
38. Ellis JM, Brown LR. Application of an in vitro cariogenic technic to study the development of carious lesions around dental restorations. *J Dent Res* 1967; 46: 403-8.
39. Emilson CG, Krasse B. Support for and implications of the specific plaque hypothesis. *Scand J Dent Res* 1985; 93: 96-104.
40. Eriksen HM, Pears G. In vitro caries related to marginal leakage around composite resin restorations. *J Oral Rehabil* 1978; 5: 15-20.
41. Featherstone JDB, Mellberg JR. Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. *Caries Res* 1981; 15: 109-14.
42. Federlin M, Thonemann B, Schmalz G, et al. Clinical evaluation of different adhesive systems for restoring teeth with erosion lesions. *Clin Oral Investig* 1998; 2: 58-66.
43. Fitzgerald RJ. Dental research in gnotobiotic animals. *Caries Res* 1968; 2: 139-146.
44. Flim GJ, Arends J. Diffusion of  $^{45}\text{Ca}$  in bovine enamel. *Calcif Tissue Res* 1977; 24: 59-64.
45. Fontana M, Dunipace Aj, Gregory RL, et al. An in vitro microbial model for studying secondary caries formation. *Caries Res* 1996; 30: 112-8.
46. Fontana M, Gonzáles-Cabezas C, Haider A, et al. Inhibition of secondary caries lesion progression using fluoride varnish. *Caries Res* 2002; 36: 129-35.

47. Friedl KH, Hiller KA, Schmalz G. Placement and replacement of composite restorations in Germany. *Oper Dent* 1995; 20: 34-38.
48. Gale MS, Darvell BW, Cheung GS. Three-dimensional reconstruction of microleakage pattern using a sequential grinding technique. *J Dent* 1994; 22: 370-5.
49. García-Godoy F, Flaitz CM, Hicks MJ. Secondary caries adjacent to amalgam restorations lined with a fluoridated dentin desensitizer. *Am J Dent* 1998; 11: 254-8.
50. Gilmour ASM, Edmunds DH, Dummer PMH. The production of secondary caries-like lesions on cavity walls and the assessment of microleakage using an in vitro microbial caries system. *J Oral Rehabil* 1990; 17: 573-8.
51. Gilmour ASM, Edmunds DH, Newcombe RG, et al. An in vitro Study into the effect of a bacterial artificial caries system on the enamel adjacent to composite and amalgam restorations. *Caries Res* 1993; 27: 169-75.
52. Going RE, Massler M, Dute HL. Marginal penetrations of dental restorations as studied by crystal violet dye and I 131. *J Am Dent Assoc* 1960; 61: 285-300.
53. Going RE, Myers HM, Prussin SG. Quantitative method for studying microleakage in vivo and in vitro. *J Dent Res* 1968; 47: 1128-32.
54. Going RE. Microleakage around dental restorations: a summarizing review. *J Am Dent Assoc* 1972; 84: 1349-57.
55. Goldberg J, Tanzer J, Munster E, et al. Cross-sectional clinical evaluation of recurrent enamel caries, restoration of marginal integrity, and oral hygiene status. *J Am Dent Assoc* 1981; 102: 635-41.
56. Goldberg AJ. Deterioration of restorative materials and the risk for secondary caries. *Adv Dent Res* 1990; 4: 14-18.
57. González-Cabezas C, Li Y, Noblin TW, Gregory RL, et al. Detection of Mutans Streptococci in secondary carious lesions using immunofluorescent techniques and confocal laser scanning microscopy. *Caries Res* 1995; 29: 198-203.

58. González-Cabezas C, Fontana M, Dunipace AJ, et al. Measurement of enamel remineralization using microradiography and confocal microscopy-a correlational study. *Caries Res* 1998; 32: 385-92.
59. González-Cabezas C, Li Y, Gregory RL, et al.. Distribution of three cariogenic bacteria in secondary carious lesions around amalgam restorations. *Caries Res* 1999; 33: 357-65.
60. González-Cabezas C, Li Y,, Gregory RL, et al. Distribution of cariogenic bacteria in carious lesions around tooth-coloured restorations. *Am J Dent* 2002; 15: 248-51.
61. González-Gabezas C, Fontana M, Gomes-Moosbauer D, et al. Early detection of secondary caries using quantitative, light-induced fluorescence. *Oper Dent* 2003; 28: 415-22.
62. Grieve AR, Jones JC. An in vitro study of marginal leakage associated with composite restorations using an acidified agar technique. *J Oral Rehabil* 1980; 7: 215-223.
63. Grossman ES, Matejka JM. Amalgam restoration and in vitro caries formation. *J Prosthet Dent* 1995; 73: 199-209.
64. Grossman ES, Matejka JM. Reliability of outer lesion secondary caries as a predictor of wall lesion. *Am J Dent* 1999; 12 31-6.
65. Guggenheim B, Guggenheim M, Gmur R, Giertsen E, Thurnheer T. Application of the Zürich biofilm model to problems of cariology. *Caries Res* 2004; 38: 212-222.
66. Gustafsson BE, Quensel CE, Lanke LS, et al. The Vipeholm dental caries study. The effect of different leves of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta Odontol Scand* 1954; 11: 232-264.
67. Hals E, Nernaes A. Histopathology of in vitro caries developing around silver amalgam fillings. *Caries Res* 1971; 5: 58-77.
68. Hals E, Nordervall I-T. Histopathology of experimental in vivo caries around silicate fillings. *Acta Odont Scand* 1973; 31: 357-67.
69. Hals E., Andreassen BH, Bie T. Histopathology of natural caries around silver amalgam fillings. *Caries Res* 1974; 8: 343-58.

70. Hamilton IR. Effects of fluoride on enzymatic regulation of bacterial carbohydrate metabolism. *Caries Res* 1977; 11: 262-291.
71. Hamilton JC, Moffa JP, Ellison JA, et al. Marginal fracture not a predictor of longevity for two dental amalgam alloys: a ten-year study. *J Prosthet Dent* 1983; 50: 200-202.
72. Hammersfahr PD, Huang CT, Shaffer SE. Microleakage and bond strength of resin restorations with various bonding agents. *Dent Mater* 1987; 3: 194-199.
73. Hay DI. Salivary factors in caries models. *Adv Dent Res* 1995; 9: 239-243.
74. Healey HJ, Phillips RW. A clinical study of amalgam failure. *J Dent Res* 1949; 28: 439-46.
75. Hickel R, Manhart J. Longevity of restorations in posterior teeth and reasons for failure. *J Adhes Dent* 2001; 3: 45-64.
76. Hicks MJ, Flaitz CM, Silverstone LM. Secondary caries formation in vitro around glass ionomer restorations. *Quintessence Int* 1986; 17: 527-32.
77. Hicks J, García-Godoy F, Milano M, et al. Compomer materials and secondary caries formation. *Am J Dent* 2000; 13: 231-4.
78. Hodges DJ, Mangum FI, Ward MT. Relationship between gap width and recurrent dental caries beneath occlusal margins of amalgam restorations. *Community Dent Oral Epidemiol* 1995; 23: 200-4.
79. Holtan JR, Nystrom GP, Douglas WH, et al. Microleakage and marginal placement of a glass-ionomer liner. *Quintessence Int* 1990; 21: 117-22.
80. Hotta M, Aono M. Adaption to the cavity floor of the light-cured glass ionomer cement base under a composite restoration. *J Oral Rehabil* 1994; 21: 679-85.
81. Hunt HR, Hoppert CA, Rosen S. Genetic factors in experimental rat caries. In: Sobnaes RF, editor. *Advances in Experimental Caries Research*. Washington DC: American Society of Advanced Science 1955, S. 66-81.

82. Irie M, Suzuki K. Marginal gap formation of light-activated base/liner materials: effect of setting shrinkage and bond strength. *Dent Mater* 1999; 15: 403-7.
83. Irie M, Suzuki K, Watts DC. Marginal gap formation of light-activated restorative materials: effects of immediate setting shrinkage and bond strength. *Dent Mater* 2002; 18: 203-10.
84. Iwami Y, Shimizu A, Hayashi M, et al. Three-dimensional evaluation of gap formation of cervical restorations. *J Dent* 2005; 33: 325-33.
85. Jahn K-R, Binus W. Die Sekundärkaries. *Stomatol DDR* 1980; 30: 280-96.
86. Johnson G, Olgard L, Brännström M. Outward fluid flow in dentin under a physiologic pressure gradient: experiments in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1973; 35: 238-248.
87. Jorgensen KD, Wakumoto S. Occlusal amalgam fillings: marginal defects and secondary caries. *Odontol Tidskr* 1968; 76: 43-54.
88. Kidd EAM. Mikroleakage in relation to amalgam and composite restorations. *Brit Dent J* 1976a; 141: 305-310.
89. Kidd EAM. Mikroleakage: a review. *J Dent* 1976b; 4: 199-206.
90. Kidd EAM, Joyston-Bechal S. Histopathological appearance of caries-like lesions in enamel created artificially in vitro in acidified gels containing fluoride. *Caries Res* 1980; 14: 40-4.
91. Kidd EAM. Caries diagnosis within restored teeth. *Adv Dent Res* 1990; 4: 10-3.
92. Kidd EAM, O'Hara JW. The caries status of occlusal amalgam restorations with marginal defects. *J Dent Res* 1990; 69: 1275-7.
93. Kidd EAM. The caries status of tooth-coloured restorations with marginal stain. *Br Dent J* 1991; 171: 241-3.
94. Kidd EAM, Toffenetti F, Mjör IA. Secondary caries. *Int Dent J* 1992; 42: 127-38.
95. Kidd EAM, Joyston-Bechal S, Beighton D. Microbiological validation of assessment of caries activity during cavity preparation. *Caries Res* 1993; 27: 402-8.

96. Kidd EAM, Beighton D. Prediction of secondary caries around tooth coloured restorations: a clinical and microbiological study. *J Dent Res* 1996; 75: 1942-6.
97. Kidd EAM, Ricketts DNJ, Beighton D. Criteria for caries removal at the enamel-dentine junction: a clinical and microbiological study. *Brit Dent J* 1996; 8: 287-91.
98. Kielbassa AM, Schulte-Monting J, García-Godoy F, et al. Initial in situ secondary caries formation: effect of various fluoride containing restorative materials. *Oper Dent* 2003; 28: 765-72.
99. König KG. Möglichkeiten der Kariesprophylaxe beim Menschen und ihre Untersuchung im kurzfristigen Rattenexperiment. Bern, Verlag Hans Huber, 1965.
100. Kristofferson K, Grondahl HG, Bratthall D. The more *Streptococcus mutans*, the more caries on approximal surfaces. *J Dent Res* 1985; 64: 58-61.
101. Kröncke A. Sekundärkaries. *Dtsch Zahnärztl Z* 1981; 36: 69-73.
102. Lobo MM, Goncalves RB, Ambrosano GMB, et al. Chemical or microbiological models of secondary caries development around different dental restorative materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005; 74: 725-31.
103. Mejare B, Mejare I, Edwarsson S. Bacteria beneath composite restorations - a culturing and histobacteriological study. *Acta Odontol Scand* 1979; 37: 267-75.
104. Mellberg JR, Loertscher KL. Comparison of in vitro fluoride uptake by human and bovine enamel from acidulated phosphate-fluoride solutions. *J Dent Res* 1974; 53: 64-7.
105. Merrett MCW, Elderton RJ. An in vitro study of restorative dental treatment decisions and dental caries. *Br Dent J* 1984; 157: 128-33.
106. Meyer JM, Dennison JB, Craig RG. Improved method of neutron activation analysis for microleakage studies. *J Dent Res* 1974; 53: 356-63.

107. Mileman P, Purdell-Lewis D, van der Weele L. Variation in radiographic caries diagnosis and treatment decisions among university teachers. *Community Dent Oral Epidemiol* 1982; 10: 329-34.
108. Miller WD. Die Mikroorganismen der Mundhöhle: Die örtlichen und allgemeinen Erkrankungen welche durch dieselben hervorgerufen werden. Leipzig: G. Thieme, 2. Auflage, 1892.
109. Mjör IA. Frequency of secondary caries at various anatomical locations. *Oper Dent* 1985; 10: 88-92.
110. Mjör IA, Ryge G. Comparison of technique for the evaluation of the marginal adaption of amalgam restorations. *Int Dent J* 1981; 31: 1-5.
111. Mjör IA. Problems and benefits associated with restorative materials: side-effects and long-term cost. *Adv Dent Res* 1992; 6: 7-16.
112. Mjör IA, Toffenetti F. Placement and replacement of amalgam restorations in Italy. *Oper Dent* 1992; 17: 70-3.
113. Mjör IA, Jokstad A. Five-year study of class II restorations in permanent teeth using amalgam, polyalkenoate (ionomer) cermet and resin-based composite materials. *J Dent* 1993; 21: 338-43.
114. Mjör IA, Qvist V. Marginal failure of amalgam and composite restorations. *J Dent* 1997; 25: 25-30.
115. Mjör IA. The location of clinically diagnosed secondary caries. *Quintessence Int* 1998; 29: 313-7.
116. Mjör IA, Toffenetti F. Secondary caries: a literature review with case reports. *Quintessence Int* 2000; 31: 165-79.
117. Mjör IA. Clinical diagnosis of recurrent caries. *J Am Dent Assoc* 2005; 136: 1426-33.
118. Möller B, Schröder U, Granath L. Effect of IRM on human dental pulp. *Scand J Dent Res* 1983; 91: 281-7.
119. Moura JS, Lima EM, Paes Leme AF, et al. Effect of luting cement on dental biofilm composition and secondary caries around metallic restorations in situ. *Oper Dent* 2004; 29: 509-14.
120. Mundorff SA, Eisenberg D, Leverett DH, et al. Correlations between numbers of microflora in plaque and saliva. *Caries Res* 1990; 24: 312-7.

121. Ngo H, Ruben J, Arends J, et al. Electron probe microanalysis and transverse microradiography studies of artificial lesions in enamel and dentin: a comparative study. *Adv Dent Res* 1997; 11: 426-32.
122. Noack MJ, Haak R, Wicht JW. Sekundärkaries - Prävention und Therapie. *Quintessenz* 2004; 10: 1073-1081.
123. Okuda M, Pereira PNR, Nikaido T, et al. Evaluation of in vitro secondary caries using confocal laser scanning microscope and x-ray analytical microscope. *Am J Dent* 2003; 16: 191-6.
124. Orstavik D, Orstavik J. In vitro attachment of *Streptococcus sanguis* to dental crown and bridge cements. *J Oral Rehabil* 1976; 3: 139-44.
125. Otto PF, Rule JT. Relationship between proximal cavity design and recurrent caries. *J Am Dent Assoc* 1988; 116: 867-70.
126. Özer L, Thylstrup A. What is known about caries in relation to restorations as a reason for replacement? A review. *Adv Dent Res* 1995; 9: 394-402.
127. Özer L. The relation between gap size, microbial accumulation and structural features of natural caries in extracted teeth with class II amalgam restorations. PhD Thesis 1997, Department of Cariology and Endodontics, University of Copenhagen, Denmark. 1995.
128. Papagiannoulis L, Kakaboura A, Eliades G. In vivo vs in vitro anticariogenic behaviour of glass-ionomer and resin composite restorative materials. *Dent Mater* 2002; 18: 561-9.
129. Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996; 7: 104-33.
130. Pereira PNR, Inokoshi S, Tagami J. In vitro secondary caries inhibition around fluoride releasing materials. *J Dent* 1998; 26: 505-10.
131. Pfaff P. *Abhandlung von den Zähnen des menschlichen Körpers und deren Krankheiten*. Berlin: Haude, 1756.
132. Pickard HM, Gayford JJ. Leakage at the margins of amalgam restorations. *Br Dent J* 1965; 119: 69-77.
133. Pigman W, Elliott HC, Laffre RO. An artificial mouth for caries research. *J Dent Res* 1952; 31: 627-33.

134. Pimenta LAF, de Lima Navarro MF, Consolaro A. Secondary caries around amalgam restorations. *J Prosthet Dent* 1995; 74: 219-22.
135. Pimenta LAF, Fontana UF, Aparecido Cury J, et al. Inhibition of demineralization in vitro around amalgam restorations. *Quintessence Int* 1998; 29: 363-7.
136. Pink FE, Minden NJ, Simmonds S. Decisions of practitioners regarding placement of amalgam and composite restorations in general practice settings. *Oper Dent* 1994; 19: 127-32.
137. Pioch T, Duschner H, Mayer T. Untersuchungen über die Verbundzone zwischen Dentin und Kunststoff mittels Konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie. *Stomatologie*. 1996; 93, S. 281-6.
138. Piwowarczyk A, Lauer H-C, Sorensen JA. Microleakage of various agents for full cast crowns. *Dent Mater* 2005; 21: 445-453.
139. Powis DR, Prosser HJ, Shortall AC, et al. Long-term monitoring of microleakage of composites. Part I: Radiochemical diffusion technique. *J Prosthet Dent* 1988; 60: 304-7.
140. Puckett AD, Fitchie JG, Bennett B, et al. Microleakage and thermal properties of hybrid ionomer restoratives. *Quintessence Int* 1995; 26: 577-81.
141. Qvist J, Qvist V, Lambjerg-Hansen H. Bacteria in cavities beneath intermediary base materials. *Scand J Dent* 1977; 85: 313-9.
142. Qvist V. Correlation between marginal adaption of composite resin restorations and bacterial growth in cavities. *Scand J Dent Res* 1980; 88: 296-300.
143. Qvist V, Thylstrup A, Mjör IA. Restorative treatment pattern and longevity of resin restorations in Denmark. *Acta Odontol Scand* 1986; 44: 351-6.
144. Qvist V, Qvist J, Mjör IA. Placement and longevity of tooth-coloured restorations in Denmark. *Acta Odontol Scand* 1990; 48: 305-11.
145. Qvist V. Resin restorations: Leakage, bacterial, pulp. *Endod Dent Traumatol* 1993; 9: 127-52.

146. Rezwani-Kaminski T, Kamann W, Gaengler P. Secondary caries susceptibility of teeth with long-term performing composite restorations. *J Oral Rehabil* 2002; 29: 1131-8.
147. Rigsby DF, Retief DH, Russell CM, et al. Marginal leakage and marginal gap dimensions of three dentinal bonding systems. *Am J Dent* 1990; 3: 289-94.
148. Rose EE, Lal J, Williams NB, et al. The screening of materials for adhesion to human tooth structure. *J Dent Res* 1955; 34: 577-88.
149. Rytömaa I, Järvinen V, Järvinen J. Variation in caries recording and restorative treatment plan among university teachers. *Community Dent Oral Epidemiol* 1979; 7: 335-9.
150. Sanderink RBA, Bernhardt H, Knoke M, Meyer J. *Curriculum Orale Mikrobiologie und Immunologie.*, Berlin: Quintessenz-Verlag, 2004.
151. Saunders WP, Strang R, Ahmad I. Effect of Mirage bond primer on microleakage of resin composite restorations. *Am J Dent* 1991; 4: 211-3.
152. Schiffner U, Schmeiser R. Eine Methode zur bakteriellen Erzeugung von Wurzelkaries in einer künstlichen Mundhöhle. *Dtsch Zahnärztl Zeitschr* 1995; 50: 45-48.
153. Schiffner U. Inhibition of enamel and root dentin demineralization by Ariston pHc: an artificial mouth study. *Am J Dent* 1999; 12 (Spec No): 10-2.
154. Seemann R. Untersuchungen zur Kariesprävention an einem In.vitro-Modell. [Habilitationsschrift]. 2005; Fachbereich Humanmedizin, Freie Universität Berlin, 2005.
155. Seemann R, Bizhang M, Klück I, Loth J, Roulet J-F. A novel in vitro microbial-based model for studying caries formation - Development and initial testing. *Caries Res* 2005a; 39: 185-190.
156. Seemann R, Klück I, Bizhang M, Roulet J-F. *Secondary caries-like lesions at fissure sealings with Xeno III and Delton--an in vitro study.* *J Dent* 2005b; 33: 443-449.
157. Seemann R, Klück I, Kage A. *An in vitro microbial-based model for studying caries-preventive agents.* *Acta Odontol Scand* 2006; 64: 27-30.

158. Seltzer S. The penetration of microorganism between the tooth and direct resin fillings. *J Am dent Assoc* 1955; 51: 560-566.
159. Shellis RP. A synthetic saliva for cultural studies of dental plaque. *Arch Oral Biol* 1978; 23: 485-9.
160. Silverstone LM. Observations on the dark zone in early enamel caries and artificial caries-like lesions. *Caries Res* 1967; 1: 260-274.
161. Silverstone LM. The surface zone in caries and caries-like lesions. *Br Dent J* 1968; 1: 145-157.
162. Sisson CH. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res* 1997; 11: 110-126.
163. Sisson CH. Plaque, plaque model systems and pH. *N Z Dent J* 1998; 97: 56-60.
164. Sisson CH, Wong L, Shu M. Factors affecting the resting pH of in vitro human microcosm dental plaque and *Streptococcus mutans* biofilms. *Arch Oral Biol* 1998; 43: 93-102.
165. Skjørland KK. Plaque accumulation on different dental filling materials. *Scand J Dent Res* 1973; 81: 538-42.
166. Skjørland KK, Hensten-Pettersen A, Orstavik D, et al. Tooth colored dental restorative materials: porosities and surface topography in relation to bacterial adhesion. *Acta Odontol Scand* 1982; 40: 113-20.
167. Söderholm K-J, Antonson DE, Fischlschweiger W. Correlation between marginal discrepancies at the amalgam/tooth interface and recurrent caries. In: Anusavice KJ ed. *Quality evaluation of dental restorations. Criteria for placement and replacement*. Berlin: Quintessence Publishing. 1989: 95-108.
168. Sønju T, Glantz P. Chemical composition of salivary integuments formed in vivo on solids with some established surface characteristics. *Arch Oral Biol* 1975; 20: 687-91.
169. Sønju-Clasen AB, Ogaard B, Duschner H, et al. Caries development in fluoridated and non-fluoridated deciduous and permanent enamel in situ examined by microradiography and confocal laser scanning microscopy. *Adv Dent Res* 1997; 11: 442-7.

170. Sønju-Clasen AB, Ogaard B. Experimental intra-oral caries models in fluoride research. *Acta Odontol Scand* 1999; 57: 334-41.
171. Splieth C, Bernhardt O, Heinrich A, et al. Anaerobic microflora under class I and class II composite and amalgam restorations. *Quintessence Int* 2003; 34: 497-503.
172. Svanberg M, Jacobson C, Hager B. Streptococcus mutans, Lactobacilli and Streptococcus sanguis in plaque from abutment teeth of cemented and of loose retainers. *Caries Res* 1987; 21: 474-480.
173. Svanberg M, Krasse B, Örnfeldt H-O. Mutans streptococci in interproximal plaque from amalgam and glass ionomer restorations. *Caries Res* 1990a; 24: 133-136.
174. Svanberg M, Mjör IA, Orstavik D. Mutans streptococci in plaque from margins of amalgam, composite and glass-ionomer restorations. *J Dent Res* 1990b; 69: 861-4.
175. Tang G, Yip H-K, Cutress TW, et al. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: A review. *J Dent* 2003; 31: 161-71.
176. Ten Bosch JJ, van der Mei HC, Borsboom PC. Optical monitor of in vitro caries. A comparison with chemical and microradiographic determination of mineral loss in early lesions. *Caries Res* 1984; 18: 540-7.
177. Ten Cate JM, Duijsters PPE. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res* 1982; 16: 201-210.
178. Thomas RZ, Ruben JL, ten Bosch JJ, et al. Approximal secondary caries lesion progression, a 20-week in situ study. *Caries Res* 2007; 41: 399-405.
179. Tjan AH, Tan DE. Microleakage at gingival margins of class V composite resin restorations rebonded with various low-viscosity resin systems. *Quintessence Int* 1991; 22: 565-573.
180. Totiam P, Gonzáles-Cabezas C, Fontana M, et al. Effect of gap size on secondary caries development using a new in vitro gap-model stage.

- 
- 52nd Orca Congress, July 6-9, 2005, Indianapolis, Indianapolis, USA;  
Poster abstract # 95, Caries Res 2005; 39, 287-340.
181. Totiam P, Gonzáles-Gabezas, Fontana MR et al. A new in vitro model to study the relationship of gap size and secondary caries. Caries Res 2007; 41: 467-73.
182. Wallman C, Krasse B. Mutans streptococci in margins of fillings and crowns. J Dent 1992; 20: 163-166.
183. Wallman-Björklund C, Svanberg M, Emilson C-G. Streptococcus mutans in plaque from conventional and from non-gamma-2 amalgam restorations. Scand J Dent 1987; 95: 266-9.
184. Wannenmacher E. Die Füllungstherapie. Dtsch Zahnärztl Z 1965; 20: 514-21.
185. White DJ. The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth. Adv Dent Res 1995; 9: 175-93.
186. Zickert I, Emilson CG, Krasse B. Correlation of level and duration of Streptococcus mutans infection with the incidence of dental caries. Infect Immun 1983: 982-5.

## 9 ANHANG

### Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ÄL	Äußere Läsion
BP	Bandpass
bzw.	beziehungsweise
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CLSM	Konfokale Laserscanning Mikroskopie (confocal laser scanning microscopy)
cm	Zentimeter
d	Durchmesser
d.h.	das heißt
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EM	Elektronenmikroskopie
FM	Fluoreszenzmikroskopie
GIZ	Glasionomorzement
HFT	Hauptfarbteiler
IL	Innere Läsion
IQB	Interquartilsbereich
IU	Internationale Einheit (international unit)

KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrophosphat
l	Liter
LP	Langpass
mA	Milliampere
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MO	Mikroorganismen
MR	Mikroradiografie
NaCl	Natriumchlorid
NFT	Nebenfarbteiler
Nm	Nanometer
PM	Polarisationsoptische Mikroskopie
REM	Rasterelektronenmikroskopie
Tab.	Tabelle
TSB	Tryptikase Soja Bouillon
U	Umdrehungen
QLF	Quantitative Lichtinduzierte Laserfluoreszenz Technik
SK	Sekundärkaries
XAM	Röntgenanalytisches Mikroskop

## **Danksagung**

Besonderer Dank gilt PD Dr. Rainer Seemann für die Überlassung eines Promotionsthemas, das mich erst neugierig und das ich anschließend stets gerne bearbeitet habe. Dank vor allem aber für seine ständige Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit.

Ein Dankeschön auch an Herrn Dannenberg, Stefanie Balz, Dr. Uwe Blunck, Helga Grundt, Heike Hochholdt und Marion von Zitzewitz für die Hilfe bei der Durchführung des experimentellen Anteils der Arbeit. Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Carsten Grötzinger für die Bereitstellung des CLSM und Herrn Orawa für die statistische Beratung bedanken.

Vielen Dank an meine Familie für den ständigen Rückhalt auf meinen Wegen, sowie den fleißigen Lesern Sally Bachmann, Sonja Halling und Valeska Wolff.

**Lebenslauf**

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

Berlin, 08.04.2009

**Publikation**

Diercke K, Lussi A., Kersten T, Seemann R. Isolated development of inner (wall) caries like lesions in a bacterial based in-vitro model. Clin Oral Invest. 2009 [Epub ahead of print].

## Erklärung

„Ich, Katja Diercke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Untersuchungen zur Inneren Läsion der Sekundärkaries in einem biofilmbasierten In-vitro-Modell 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, 08.04.2009

Unterschrift