

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

DISSERTATION

**Einfluss von Silberdiaminfluorid, Chlorhexidin und
Natriumfluorid auf die Entstehung von Wurzelkaries in-vitro**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anna Skopp geb. Kohls

aus Oldenburg

Datum der Promotion: 21. Juni 2020

Für Ole .

Einfach nur DANKE für alles !!!

Vorwort

Hiermit weise ich, Anna Skopp geb. Kohls, darauf hin, dass Ergebnisse aus meiner Dissertation in folgender Vorabpublikation bereits veröffentlicht wurden.

Göstemeyer G, Kohls A, Paris S, Schwendicke F. Root caries prevention via sodium fluoride, chlorhexidine and silver diamine fluoride in vitro. *Odontology*. 2018 Jan 31. doi: 10.1007/s10266-018-0341-x.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abstrakt (Deutsch).....	VI
Abstract (Englisch)	VII
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Kariesentstehung	2
2.2 Wurzelkaries	7
2.2.1 Ätiologie und Pathogenese.....	7
2.3 Epidemiologie der Wurzelkaries	9
2.4 Prävention von Wurzelkaries	12
2.4.1 Fluoride	12
2.4.2 Chlorhexidindigluconat	14
2.4.3 Silberdiaminfluorid.....	15
3 In-vitro-Kariesmodelle	16
3.1 Chemische Modelle	16
3.2 Biofilmmodelle	16
4 Fragestellung	18
5 Methodik.....	19
5.1 Übersicht.....	19
5.2 Probenherstellung.....	20
5.3 Definieren der Oberflächenbereiche der Dentinproben	23
5.4 Vorbereitung des Mundmodells	23
5.5 Applikation der Lacke.....	24
5.6 Versuchsvorbereitung und –aufbau.....	26
5.6.1 Vorbereitung der Medien.....	26
5.6.2 Installation des Biofilmmodells.....	26
5.7 Versuchsablauf.....	27
5.8 Auswertung	29

5.8.1	Bestimmung der koloniebildenden Einheiten.....	29
5.8.2	Transversale Mikroradiographie (TMR)	31
5.8.2.1	Vorbereitung der Proben	31
5.8.2.2	Durchführung der TMR-Analyse	33
5.8.3	Statistische Auswertung	33
6	Ergebnisse.....	34
6.1	Bakterienzahl	34
6.2	Mineralverlust.....	35
6.3	Läsionstiefe	36
7	Diskussion.....	38
7.1	Diskussion der Methodik	38
7.1.1	Herstellung der Proben	38
7.1.2	Biofilmmodell	39
7.1.3	Analyseverfahren	42
7.1.3.1	Messung der Bakterienzahl	42
7.1.3.2	Messung von Mineralverlust und Läsionstiefe	43
7.2	Diskussion der Ergebnisse	43
7.2.1	Bakterienzahlen.....	43
7.2.2	Mineralverlust und Läsionstiefe	45
8	Schlussfolgerung	48
9	Literaturverzeichnis	49
10	Anhang.....	61
10.1	Methodik und Ergebnisse der Vorversuche.....	61
10.1.1	Methodik.....	61
10.1.2	Ergebnisse.....	62
10.1.2.1	Flächenrauheitsmessung	65
10.2	Zahlenwerte der Studienergebnisse	66
10.3	Rezeptur DMM (modified Defined Mucine Medium).....	72
10.4	Zusammensetzung MRS-Bouillon mit 1 % Saccharose.....	72
10.5	Ablauf der Filmentwicklung	73
11	Eidesstattliche Erklärung	74
11.1	Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen.....	75

12	Lebenslauf	76
13	Komplette Publikationsliste	78
14	Danksagung	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Venn-Diagramm von Keyes nach P. Shellis¹.

Abbildung 2: Verlauf der Stephan-Kurve nach D.I. Hay, E.C. Moreno² und P. Marsh und M. Martin³.

Abbildung 3: Gleichgewicht zwischen Demineralisation und Remineralisation.

Abbildung 4: Die Veränderung des dentalen Biofilms durch Zuckerkonsum nach P. Shellis⁴.

Abbildung 5a: Röntgenaufnahme der Zähne 24-26.

Abbildung 5b: Klinisches Bild zweier Oberkieferfrontzähne mit aktiven Kariesläsionen (ICDAS W2) an der Wurzeloberfläche.

Abbildung 6: Altersverteilung der Bevölkerung in Deutschland 1990 (schwarze Linie) im Vergleich zu 2013 (gelbe Fläche)⁵.

Abbildung 7: Schematische Darstellung des Fluorhydroxylapatits.

Abbildung 8: Strukturformel von Chlorhexidindigluconat.

Abbildung 9: Studiendesign.

Abbildung 10 (a, b, c): Die Verarbeitung der Rinderzähne.

Abbildung 11: 7 Probenblöcke á 20 Einzelproben.

Abbildung 12: Darstellung des Deckels eines Kunststoffbehälters.

Abbildung 13: Versuchsaufbau.

Abbildung 14: Versuchsablauf.

Abbildung 15: Schematische Darstellung des Ablaufs zur Erstellung der Verdünnungsreihen.

Abbildung 16: Agarplatten im CO₂-Begasungsbrutschrank.

Abbildung 17: Kolonien auf den Agarplatten einer Verdünnungsreihe (links 10⁻⁵, rechts 10⁻⁷) nach der Kultivierung im Brutschrank.

Abbildung 18 (a, b): Darstellung der Probenverarbeitung für die TMR-Aufnahmen.

Abbildung 19: Beispiel eines Bildausschnittes aus der Gruppe 7.

Abbildung 20: Box-and-Whisker-Plots für die Bakterienzahl [$\log_{10}(\text{CFU/ml})$] im Biofilm auf den Proben der einzelnen Gruppen.

Abbildung 21: Box-and-Whisker-Plots für den Mineralverlust ΔZ [$\text{vol}\% \times \mu\text{m}$] der einzelnen Gruppen.

Abbildung 22: Box-and-Whiskers-Plots für die Läsionstiefe [μm] der einzelnen Gruppen.

Abbildung 23: REM-Bild einer gebrochenen Probe.

Abbildung 24 (a, b, c): Vergleich der Mineralverluste / Mineralgehalte nach Erstellen von TMR-Aufnahmen.

Abbildung 25: REM-Bild der EDX-Analyse (linescan) einer gesägten Probe im Bereich der SDF-Applikation und anschließend abgespült.

Abbildung 26: REM-Bild der EDX-Analyse (Punkt-Scan) einer gebrochenen Probe.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Entwicklung der Wurzelkaries (65- bis 74-Jährige).

Tabelle 2: Anteil der älteren Senioren mit mindestens einer Wurzelkaries⁶.

Tabelle 3: Internationaler Vergleich der Wurzelkariesprävalenz jüngerer Senioren⁷⁻⁹.

Tabelle 4: Name, Hersteller, Konzentration und Applikationsmethode der verwendeten Substanzen.

Tabelle 5: Bakterienzahlen [$\log_{10}(\text{CFU/ml})$] aus dem Biofilm der Probenoberflächen.

Tabelle 6: p-Werte für die paarweisen Vergleiche der Bakterienzahl im Biofilm der einzelnen Gruppen.

Tabelle 7: ΔZ [$\text{vol}\% \times \mu\text{m}$] der einzelnen Gruppen.

Tabelle 8: p-Werte für die paarweisen Vergleiche des Mineralverlustes der einzelnen Gruppen.

Tabelle 9: Läsionstiefe [μm] der einzelnen Gruppen.

Tabelle 10: p-Werte für die paarweisen Vergleiche der Läsionstiefen der einzelnen Gruppen.

Abstrakt (Deutsch)

Ziel: Bei Senioren, besonders bei pflegebedürftigen, wird heutzutage vermehrt Wurzelkaries aufgefunden. Daher ist bei dieser Patientengruppe der Bedarf an effektiven Maßnahmen zur Kariesprävention hoch. Das Ziel dieser Untersuchung war es, den Effekt von unterschiedlichen zur Kariesprävention eingesetzten Substanzen in verschiedenen Darreichungsformen auf die Entstehung von Wurzelkaries in einem kariogenen Biofilmmodell zu untersuchen.

Methoden: Aus Rinderzahnwurzeln wurden 140 Dentinproben gewonnen und randomisiert sieben Gruppen, mit je 20 Proben, zugeteilt. In vier Gruppen wurde einmalig vor Versuchsbeginn jeweils eine der nachfolgenden Substanzen appliziert: Silberdiaminfluorid (SDF), Chlorhexidinlack (CHXV), Natriumfluoridlack (NaFV) und Placebolack (PV). In zwei weiteren Gruppen wurden im Biofilmmodell einmal täglich Spüllösungen (Natriumfluorid (NaFR) oder Chlorhexidinlösung (CHXR)) hinzugegeben. Die letzte Gruppe wurde nicht behandelt und diente als Kontrollgruppe. In einem *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) Monokultur Biofilmmodell wurden die kariogenen Bedingungen erzeugt. Dabei wurden die LGG-Kulturen einmal täglich auf die Probenoberflächen appliziert und im Anschluss mehrmals täglich durch Spülungen mit Saccharoselösung, gefolgt von künstlichem Speichel, umspült. Nach 12 Tagen wurden die koloniebildenden Einheiten aus den Biofilmen der Probenoberflächen bestimmt. Ebenfalls wurde der Mineralverlust (ΔZ) und die Läsionstiefe (Ld) der Kariesläsionen unter den kariespräventiv behandelten Probenoberflächen durch Transversale Mikroradiografie ermittelt. Bei den Proben aus den ersten vier Gruppen wurden zusätzlich die an die aufgetragene Substanz angrenzenden unbehandelten Dentinoberflächen untersucht.

Ergebnisse: Bei den Proben aus der NaFR Gruppe waren ΔZ und Ld signifikant geringer als bei allen anderen Gruppen ($\Delta Z = 4687,05 \pm 391,31 \text{ vol}\% \times \mu\text{m}$; Ld = $136,22 \pm 21,72 \mu\text{m}$). Bei den Proben der SDF-, NaFV- und PV-Gruppe war ΔZ und bei den Proben der SDF- und PV-Gruppe Ld signifikant geringer im Vergleich zur Kontrollgruppe. CHXV und CHXR hatten keinen signifikanten Effekt auf ΔZ und Ld. Keine der Substanzen hatte einen Effekt auf die Bakterienzahl. Ebenfalls hatte keiner der Lacke einen Effekt auf die angrenzende Dentinoberfläche.

Schlussfolgerung: Die regelmäßige Anwendung einer Fluoridlösung scheint für die Prävention von Wurzelkaries wirksamer zu sein als der einmalige Gebrauch von Lacken. Zwar wiesen auch drei der vier Lacke eine kariespräventive Wirkung auf, jedoch scheint sich dieser Effekt auf den Applikationsort zu begrenzen. Chlorhexidin hatte, unabhängig von der Applikationsform, keinen bakterienhemmenden Effekt auf LGG im Mundmodell.

Abstract (Englisch)

Objectives: Elderly patients, especially those in need of care, are often diagnosed with root caries. Therefore, the demand for effective caries prevention measures is high in this patient group. The aim of this study was to investigate the effect of different caries prevention agents in different application forms on the development of root caries in a cariogenic biofilm model.

Methods: From bovine tooth roots, 140 dentine samples were obtained and randomized into seven groups (n= 20 samples per group). In four groups, the following substances were applied once before the start of the cariogenic challenge in the biofilm model: silver diamine fluoride (SDF), chlorhexidine varnish (CHXV), sodium fluoride varnish (NaFV) and a placebo varnish (PV). Rinsing solutions (sodium fluoride (NaFR) or chlorhexidine (CHXR)) were added once daily within the biofilm model for two groups. One group was left untreated and served as a control group. A *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) monoculture biofilm model was used to generate cariogenic conditions. The LGG cultures were applied once a day to the surfaces of the samples and then rinsed several times a day with sucrose solution, followed by artificial saliva. After 12 days, colony forming units were determined from the biofilm on the surface of the samples. Mineral loss (ΔZ) and the lesion depth (Ld) of the carious lesions under the treated surfaces were also determined by transverse microradiography. For the samples from the varnish groups, the untreated dentin surfaces adjacent to the applied agents were additionally examined.

Results: For the samples from the NaFR group, ΔZ and Ld were significantly lower than in all other groups ($\Delta Z = 4687,05 \pm 391,31 \text{ vol}\% \times \mu\text{m}$; Ld = $136,22 \pm 21,72 \mu\text{m}$). For the SDF, NaFV and PV groups ΔZ and for the SDF and PV groups Ld was significantly lower compared to the control group. ΔZ and Ld of CHXV and CHXR did not differ significantly compared to the control group. None of the substances reduced the bacterial counts. There was no caries-protective effect of the varnishes to their adjacent dentin surface.

Conclusions: Regular use of a fluoride rinse seems to be more effective for the prevention of root caries than once applied varnishes. Although three of the four varnishes had a caries-preventive effect, this effect seems to be limited to the area of their application. Irrespective of application method, chlorhexidine had no bacteriostatic effect on LGG.

1 Einleitung

Aufgrund von Fortschritten in der Zahnmedizin behalten Senioren in Industrieländern ihre eigenen Zähne heutzutage häufig bis ins hohe Lebensalter. Im Zuge dieser Entwicklung haben orale Erkrankungen wie Parodontitis und Karies in dieser Altersgruppe an Bedeutung gewonnen. Durch pathologischen und physiologischen Rückgang des Zahnfleisches kommt es dabei meist zu einer Freilegung der Wurzeloberflächen^{10,11}. Diese unterliegen einem erhöhten Kariesrisiko, da das Wurzelentin während eines Säureangriffs, zum Beispiel durch kariogene Keime, schon bei einem höheren pH-Wert in Lösung geht als der Zahnschmelz¹².

Insbesondere freigelegte Wurzeloberflächen bei Senioren weisen ein hohes Kariesrisiko auf: Bei vielen dieser Patienten kommt die vor Karies schützende Funktion des Speichels nicht mehr zum Tragen, da sie vielfach, bedingt durch Medikamente oder durch physiologische Alterungsprozesse, einen reduzierten Speichelfluss haben. Weiterhin können Senioren im höheren Alter häufig aufgrund körperlicher oder geistiger Beeinträchtigungen keine adäquate Mundhygiene mehr durchführen. Vor allem bei pflegebedürftigen Senioren findet man häufig eine starke Plaqueakkumulation auf den Zähnen und unbehandelte Kariesläsionen¹³⁻¹⁵. Der Grund hierfür ist vielfach, dass die Durchführung effektiver Mundhygienemaßnahmen bei der täglichen Pflege durch das Pflegepersonal nur einen untergeordneten Stellenwert hat. Zudem ist es bei unkooperativen pflegebedürftigen Senioren häufig gar nicht möglich eine zufriedenstellende Mund- und Zahnpflege zu betreiben oder den Zustand der Zähne zu kontrollieren. Daher besteht bei diesen Senioren ein hoher Bedarf an effektiven, gleichzeitig aber auch leicht anzuwendenden Maßnahmen zur Kariesprävention. Um die kariesprotektive Wirksamkeit unterschiedlicher Produkte zur Kariesprävention einschätzen zu können ist es erforderlich deren Einfluss auf die Entstehung von Wurzelkaries genauer zu untersuchen.

2 Literaturübersicht

2.1 Kariesentstehung

Im Allgemeinen lässt sich die Karies als ein langsamer, über mehrere Monate und Jahre andauernder dynamischer Prozess beschreiben und nicht als eine akute Erkrankung¹⁶. Die Kariesentstehung ist dabei als ein multifaktorielles Geschehen anzusehen, bei dem das Herauslösen von Mineralien aus der Zahnhartsubstanz zu einer Kariesläsion führen kann. Dabei ist die Entstehung von Säuren aus Kohlenhydraten der Nahrung, die durch Bakterien des dentalen Biofilms erzeugt werden, essentiell. Zur Veranschaulichung der Ätiologie der Kariesentstehung bietet sich das in Abbildung 1 dargestellte Venn-Diagramm von Keyes an¹.

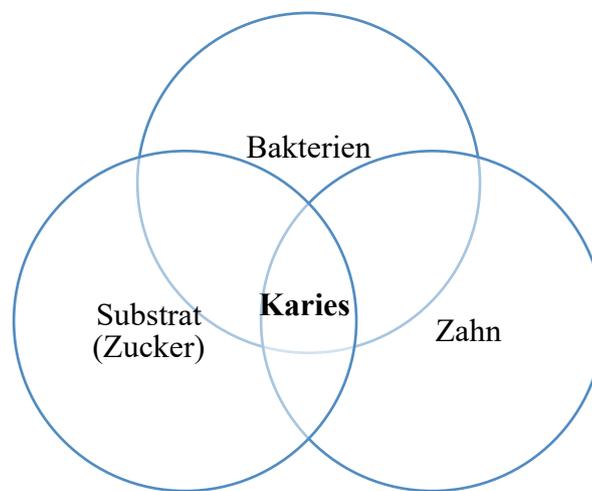


Abbildung 1: Venn-Diagramm von Keyes nach P. Shellis¹.

Karies entsteht nur bei einem gleichzeitigen Vorhandensein von Mikroorganismen (Bakterien), Substrat (fermentierbare Kohlenhydrate) und dem Wirt (Zahn) und wird durch viele weitere Faktoren, wie zum Beispiel der Zusammensetzung des dentalen Biofilms, Ernährung (Art der Kohlenhydrate), Mundhygiene und der Zusammensetzung des Speichels beeinflusst. Die Zahnhartsubstanzen (Schmelz und Dentin) bestehen zu unterschiedlichen Anteilen aus Mineralkristallen, die den Apatiten angehören. Das hauptsächlich vorhandene Hydroxylapatit $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})]$ ist im Vergleich zu anderen nicht fluoridierten Kalziumphosphaten bei einem neutralen pH-Wert am geringsten löslich¹⁷. Bei einem Abfall des pH-Wertes, zum Beispiel aufgrund von bakterieller Säurebildung, kann es zu einem Lösen von Kalzium- und Phosphat-Ionen aus dem Hydroxylapatit und damit zur Entstehung einer Kariesläsion kommen.

Die in der Mundhöhle vorhandenen Mikroorganismen lagern sich in einer Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen an der Zahnoberfläche an. Dabei bilden die Bakterien eine dreidimensionale Anordnung und interagieren in dieser auch untereinander. Diese Struktur wird

dentaler Biofilm genannt^{18,19}. Essentiell für die Kariesentstehung ist das Vorhandensein von fermentierbaren Kohlenhydraten, wie zum Beispiel Zucker. Durch die Metabolisierung dieser Kohlenhydrate produzieren kariogene Bakterien Säuren, die letztendlich zur Karies führen. Bei einem kariogenen Säureangriff kommt es zunächst zu einem schnellen pH-Wert Abfall und anschließend wieder zu einem langsamen pH-Wert Anstieg, was durch den Verlauf der Stephan-Kurve beschrieben wird (Abbildung 2)^{2,3}.

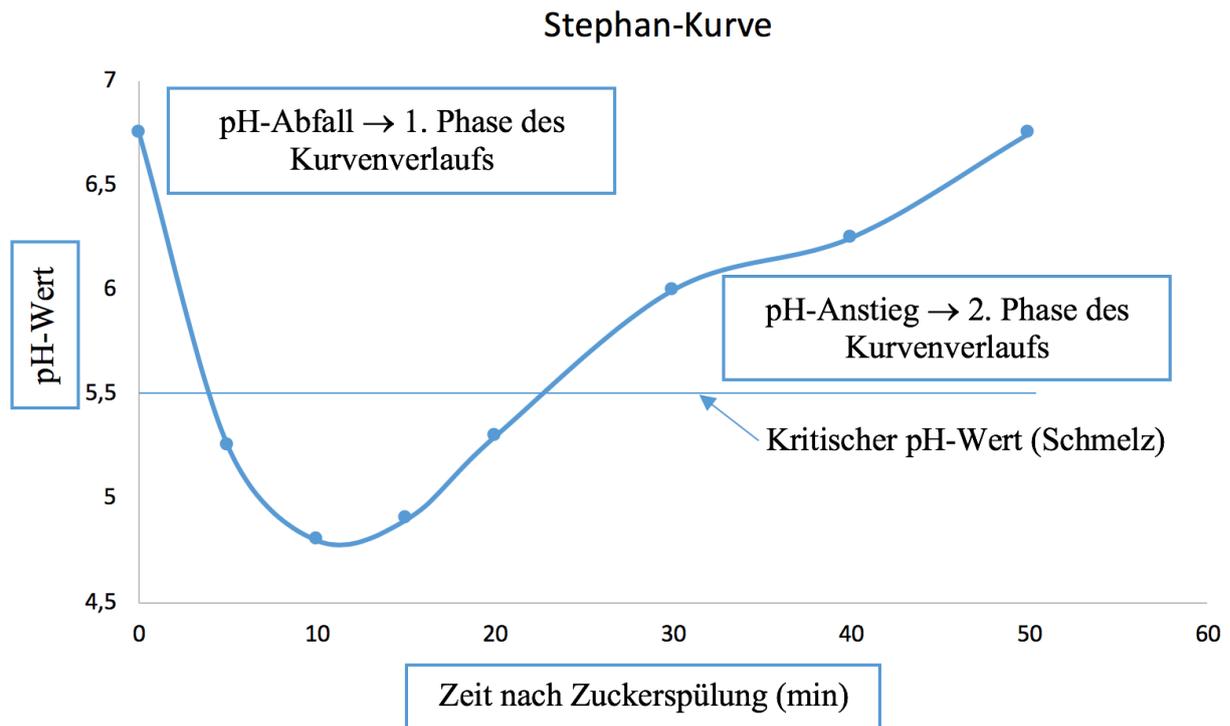


Abbildung 2: Verlauf der Stephan-Kurve nach D.I. Hay, E.C. Moreno² und P. Marsh und M. Martin³.

Durch die Mikroorganismen entsteht bei der Metabolisierung der Kohlenhydrate ein Überschuss an Protonen (H^+ -Ionen). Diese können zunächst durch die Puffersysteme im Speichel, Bikarbonat- und Phosphatpuffer, abgefangen werden. Dabei ist die Konzentration des pH-Wertes ausschlaggebend, wann welches System greift. Phosphat ist als Dihydrogen- und Monohydrogenphosphat bei einem pH-Wert von 7,5-6 aktiv und kann so überschüssige H^+ -Ionen binden. Bikarbonat ist hingegen bei einem geringeren pH-Wert (circa pH-Wert von 6) als Puffersystem aktiv²⁰. Auch die im Speichel vorkommenden Statherine haben zunächst einen Einfluss auf die Entwicklung des pH-Wertes. Statherine besitzen die Eigenschaft im neutralen pH-Bereich stark Kalzium zu binden und dadurch den übersättigten Zustand zunächst aufrecht zu erhalten und gleichzeitig eine spontane Kristallisation von Kalziumphosphat zu verhindern. Wenn die neutralisierenden Systeme allerdings ausgeschöpft sind und ein Überschuss an

H⁺-Ionen nicht mehr abgefangen werden kann, stellt sich ein kritischer pH-Wert (Schmelz 5,5; Dentin 6,5-6,8) ein, der zur Demineralisation der Zahnhartsubstanz führt (1. Phase der Stephan-Kurve)¹⁷. Durch die erhöhte Konzentration von H⁺-Ionen werden Mineralien an der Zahnoberfläche herausgelöst bis der Protonenüberschuss wieder ausgeglichen ist. Hierdurch steigt der pH-Wert wieder an (2. Phase der Stephan-Kurve).

Auch der Spülfunktion des Speichels (sogenannte Clearance) kommt bei der Neutralisation des pH-Wertes eine wichtige Rolle zu²¹. Je besser die Clearance ist, desto schneller kann das saure Milieu neutralisiert und so einer Demineralisation entgegengewirkt werden. Eine Beeinträchtigung der Clearance kann gerade bei Senioren beobachtet werden, bei denen häufig ein verminderter Speichelfluss (Hyposalivation) vorliegt^{22,23}. Die kann durch unterschiedliche Faktoren, wie zum Beispiel altersbedingte reduzierte Aktivität der Speicheldrüsen, die Einnahme bestimmter Medikamente, Speichelsteine oder Bestrahlung aufgrund von Tumoren, bedingt sein²⁴.

Die Aufnahme von Kohlenhydraten als normaler Bestandteil der Nahrung muss nicht zwangsläufig zu einer Karies führen. Die Absenkung des pH-Wertes und damit der „kariogene Säureangriff“ ist vielmehr von Menge, Zufuhrfrequenz und Aufbau der Kohlenhydrate abhängig¹. Erst wenn regelmäßig fermentierbare Kohlenhydrate in größeren Mengen aufgenommen werden, verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen der De- und Remineralisation zu Gunsten der Demineralisation (Abbildung 3). Die Remineralisation kann durch eine Erhöhung des pH-Werts aufgrund der Puffersysteme im Speichel, die Clearance, erreicht werden oder auch durch die Anwesenheit von Fluoriden gefördert werden (siehe auch Abschnitt 2.4.1 Fluoride).

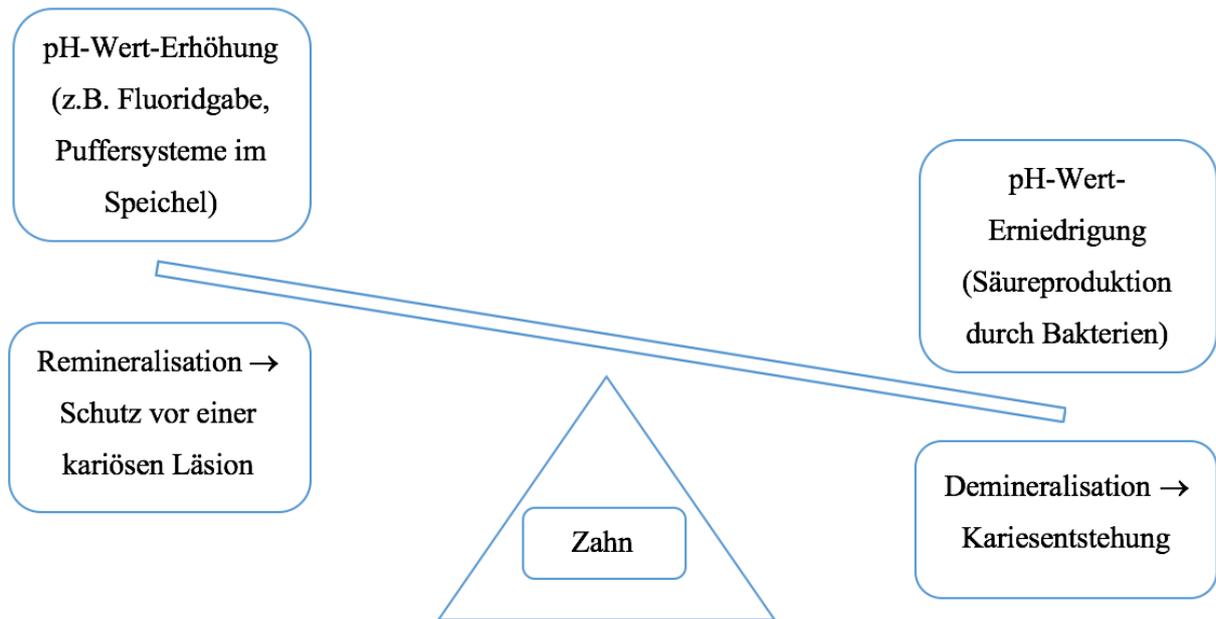


Abbildung 3: Gleichgewicht zwischen Demineralisation und Remineralisation. Sobald das Gleichgewicht sich zugunsten der Demineralisation verschiebt kann sich eine Kariesläsion bilden.

Die Zusammensetzung des Biofilms spielt nach heutiger Auffassung die zentrale Rolle bei der Kariesentstehung. Die ökologische Plaquehypothese beschreibt dabei die Kariesentstehung als einen Prozess, bei dem sich die Zusammensetzung und die Eigenschaften der Plaquemikroflora aufgrund der Umgebungsbedingungen verändern²⁵. Das bedeutet also, dass ein ökologisches System vorliegt, welches sich seinem Umfeld, abhängig von den äußeren Bedingungen, anpasst. Für die Kariesentstehung heißt das, dass bei vermehrter Aufnahme fermentierbarer Kohlenhydrate sich das ökologische System seinem neuen Umfeld anpasst. Dadurch wird das Wachstum von kariogenen Mikroorganismen gefördert, die bevorzugt Kohlenhydrate verstoffwechseln (Abbildung 4).

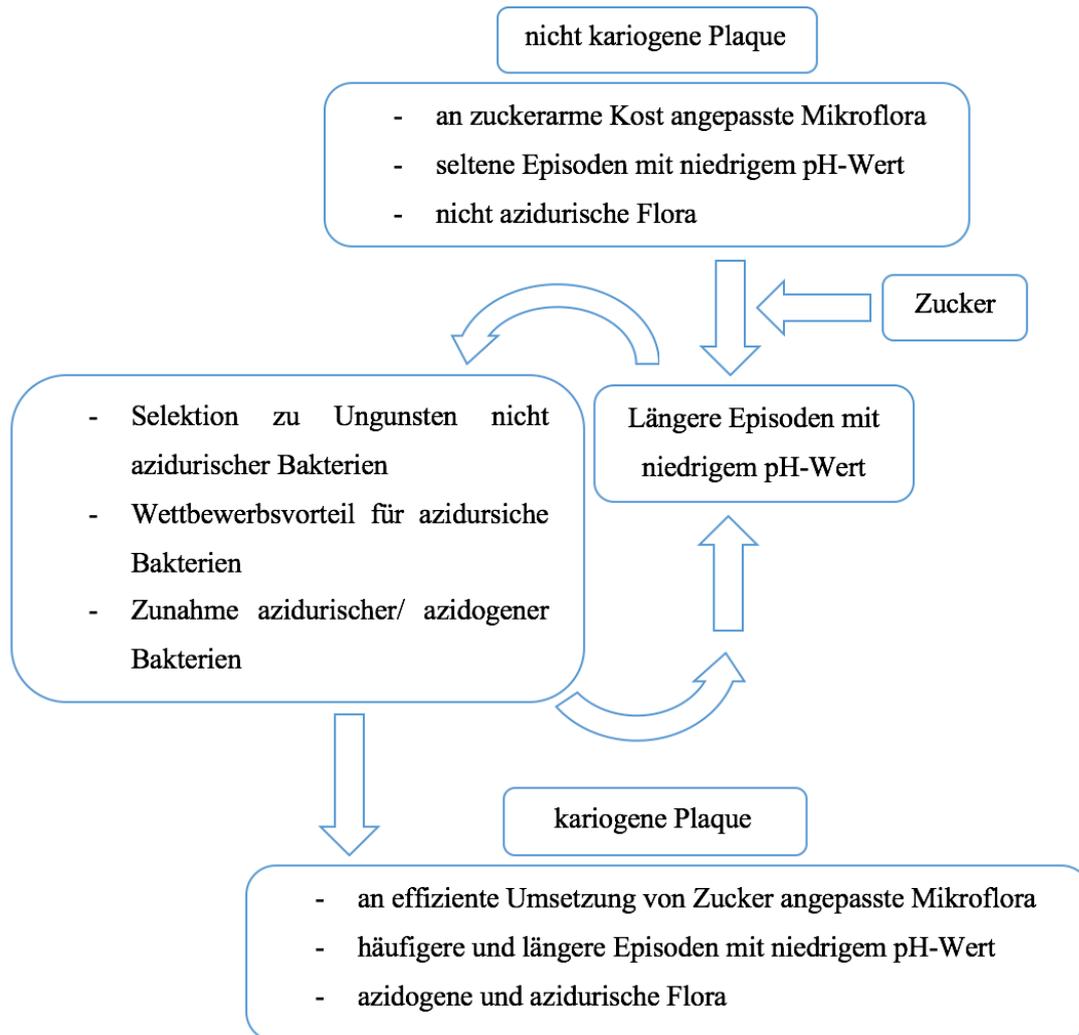


Abbildung 4: Die Veränderung des dentalen Biofilms durch Zuckerkonsum nach P. Shellis⁴.

Aus der graphischen Darstellung wird ersichtlich, dass die Entstehung von Karies keine typische Infektionskrankheit ist, wie zum Beispiel ein grippaler Infekt. Aufgrund von veränderbaren Faktoren, wie eine Zunahme der Zuckierzufuhr, wird das Gleichgewicht zu azidogenen (aus Zucker Säure produzierenden) und azidurischen (säureresistenten oder säuretoleranten) Mikroorganismen verschoben²⁶. Mikroorganismen der physiologischen Flora auf der Zahnoberfläche haben unter solchen Voraussetzungen schlechtere Lebensbedingungen. Als besonders kariogener Keim gilt *Streptococcus mutans*, welcher vermehrt bei Patienten mit einem erhöhten Kariesrisiko auftritt^{4,27}. Aber auch Laktobazillen und Candida sind mit der Kariesentstehung assoziiert und treten bei einer erhöhten Zuckierzufuhr vermehrt auf^{4,28}.

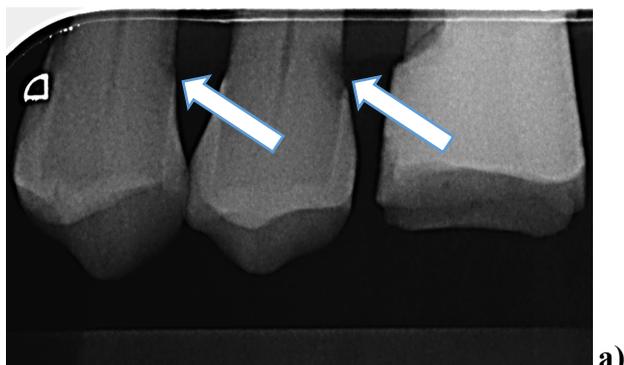
Neben der bakteriellen Zusammensetzung von Biofilmen, spielt auch die Dicke und die Zusammensetzung der Matrix, die die Bakterien umgibt, eine wichtige Rolle. Dabei tragen vor

allem die extrazellulären Polysaccharide (EPS) zur Kariesentstehung bei. Die EPS werden durch die Bakterien gebildet und in die unmittelbare Umgebung abgegeben. Diese sind nicht löslich und dienen aufgrund ihrer klebrigen Substanz zur Adhäsion der Bakterien auf der Zahnoberfläche. Bakterien, die sich nahe der Zahnoberfläche befinden, können so geschützt Säure metabolisieren und so eine stark kariogene Umgebung erzeugen²⁹.

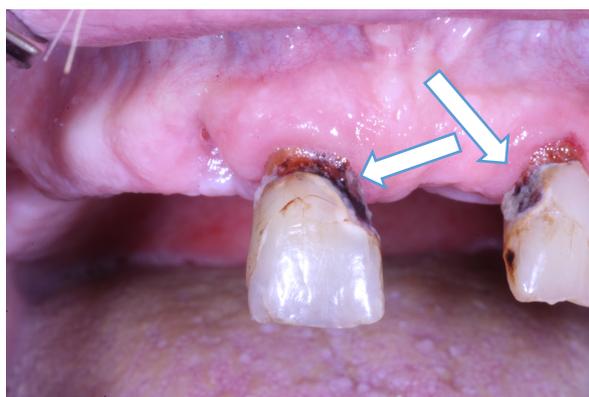
2.2 Wurzelkaries

2.2.1 Ätiologie und Pathogenese

Als Voraussetzung zur Entstehung einer Wurzelkaries muss durch einen Rückgang des Zahnfleisches (Gingivarezession) die Wurzeloberfläche freiliegen. Die vorangegangene Gingivarezession kann aufgrund von physiologischen (altersbedingten) oder pathologischen Prozessen (zum Beispiel (z.B.) Parodontitis) entstanden sein. Die exponierte Wurzeloberfläche ist initial durch Wurzelzement bedeckt. Der Zement nutzt sich jedoch in der Regel nach einiger Zeit ab und das Wurzelzement liegt frei.



a)



b)

Abbildung 5a: Röntgenaufnahme der Zähne 24-26. Wurzelkaries im Approximalraum an den Zähnen 24 und 25 distal. **5b: Klinisches Bild zweier Oberkieferfrontzähne mit aktiven Kariesläsionen (ICDAS W2) an der Wurzeloberfläche.** Trotz weitgehend intaktem Schmelz ist die Karies auf der Wurzeloberfläche schon deutlich vorangeschritten (Quelle: Gerd Göstemeyer, Charité Berlin).

In den meisten Fällen breitet sich die Wurzelkaries entlang der Dentin-/ Zementoberfläche aus und dringt erst im späteren Stadium der Wurzelkaries in die Tiefe³⁰. Dadurch erscheinen Wurzelkariesläsionen im Querschnitt eher flach und sind häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium auf Röntgenbildern zu erkennen (Abbildung 5a). Dentin ist bei einem Säureangriff deutlich anfälliger für eine Demineralisation als der Zahnschmelz³¹, so dass Kariesläsionen im Wurzelbereich schneller entstehen und voranschreiten können als im Schmelz (Abbildung 5b).

So gibt es wesentliche Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung und Struktur zwischen Dentin und Schmelz: Zahnschmelz besteht zu 96-97 Gewichtsprozent aus anorganischer Substanz (vor allem Hydroxylapatit). Die Hydroxylapatitkristalle haben einen Durchmesser von ca. 40 Nanometer (nm) und können eine Länge von 100-1000 nm besitzen. Diese Kristalle sind in Prismen angeordnet, die wiederum einen Durchmesser von 4-5 Mikrometern (μm) bilden^{32,33}. Das Dentin hingegen besteht nur zu circa 70 Gewichtsprozent aus anorganischer Substanz, die hier auch vorhandenen Hydroxylapatitkristalle sind zudem kürzer und haben einen geringeren Durchmesser³². Durch die kleineren Kristallstrukturen ist Dentin anfälliger gegenüber Säureangriffen im Vergleich zum Schmelz. Im Dentin sind zudem mehr Unreinheiten als im Zahnschmelz vorhanden, was dazu führt, dass hier Kariesläsionen mehr als doppelt so schnell voranschreiten können als im Schmelz³⁴. Das Dentin der Zahnwurzel hat aufgrund eines längeren Einflusses auf äußere Reize einen reiferen Zustand als koronales Dentin. So besitzt es weniger Dentinkanälchen und ist daher häufig sklerosiert³⁵.

Bei der Entstehung einer Kariesläsion im Dentin wird dessen organische Matrix durch das Herauslösen der Mineralien freigelegt. Die organische Matrix im Dentin besteht zu 90 % aus Kollagenfasern des Kollagentyps I³⁶. Die freiliegende Matrix wird anschließend durch hydrolytische und proteolytische Enzyme abgebaut. Solche Enzyme, die die Peptidbindungen zwischen einzelnen Aminosäuren durch Hydrolyse aufbrechen, werden Proteasen genannt. Die dafür notwendigen Kollagenasen, eine Untergruppe der Matrix-Metalloproteasen (MMP), können entweder durch die Bakterien gebildet und freigesetzt werden oder sind vom Zahn stammende Enzyme, die in der mineralisierten Dentinmatrix natürlicherweise vorkommen. Auch beim Einsatz von Adhäsivsystemen im Rahmen der Füllungstherapie können diese Enzyme freigesetzt und iatrogen aktiviert werden³⁷. In kariösem Dentin wurden vor allem MMP-2, MMP-8 und MMP-9 festgestellt, die bei einem niedrigen pH-Wert aktiviert werden und so zum Abbau der organischen Matrix beitragen³⁸. Dies hat eine irreversible Veränderung der Dentinmatrix zur Folge, was die Fähigkeit des Dentins zur Remineralisation reduziert³⁹.

Auch die bakterielle Zusammensetzung des Biofilms der kariogenen Plaque auf der Wurzeloberfläche unterscheidet sich von der kariogenen Plaque auf dem Schmelz. Hier kommen neben den typischen Keimen wie *Streptococcus mutans* vor allem auch Laktobazillen, wie zum

Beispiel *Lactobacillus rhamnosus* vor^{40,41}. Laktobazillen sind im Vergleich zu *Streptococcus mutans* stärker azidogen und azidurisch⁴¹.

2.3 Epidemiologie der Wurzelkaries

Anhand von bevölkerungsrepräsentativen, sozialepidemiologischen Querschnittsstudien lassen sich verschiedene Daten und Trends in Bezug auf Wurzelkaries auf Populationsebene identifizieren. Eine solche Querschnittsstudie ist die Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS), die etwa alle 8 Jahre Daten zur Mundgesundheit bei einer großen Zahl von Patienten in Deutschland erhebt. Die Datenerhebung zur aktuellen fünften Deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS V) wurde zwischen 2013 und 2014 durchgeführt.

Nach der DMS V haben fast alle Patienten der Altersgruppe der jüngeren Senioren (65- bis 74-Jährige, Jahrgang 1940 - 1949) Karieserfahrung, also mindestens eine behandelte oder unbehandelte Kariesläsion. Im Durchschnitt sind in dieser Altersgruppe pro Person 17,7 Zähne betroffen, ein totaler Zahnverlust liegt bei 12 % der Patienten dieser Kohorte vor⁴². 28 % der jüngeren Senioren haben mindestens eine kariöse beziehungsweise gefüllte Wurzeloberfläche. Wenn nur bezahnte Studienteilnehmer einbezogen werden, macht dies eine Wurzelkariesprävalenz von 32 % aus, wobei Frauen (21,9 %) seltener betroffen sind als Männer (35 %)⁹. Der RCI (root caries index) beschreibt das Verhältnis von Kariesläsionen beziehungsweise Füllungen auf der Zahnwurzeloberfläche bezogen auf die Anzahl aller freiliegenden Wurzeloberflächen⁴³. Dieser Wert liegt bei jüngeren Senioren bei insgesamt 13,6 %. Auch hier ist der RCI-Wert bei Männern (14,8 %) höher als bei Frauen (12,4 %)⁹. Dem allgemeinen Trend bei der abnehmenden Kariesprävalenz bei Kindern und Erwachsenen folgend, ist auch bei der Prävalenz von Wurzelkaries im Vergleich zu früheren Studien ein Rückgang bei den jüngeren Senioren zu verzeichnen⁴⁴⁻⁴⁶ (Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht der Entwicklung der Wurzelkaries (65- bis 74-Jährige).

DMS	Jahr	Wurzelkaries	RCI
III	1997	29 %	12,6 %
IV	2005	45 %	17,0 %
V	2014	28 %	13,6 %

Bei jüngeren Senioren mit einer Schwerbehinderung liegt der prozentuale Anteil von Wurzelkaries bei 27,8 % und der RCI bei 15,2 %. Es ist also kein wesentlicher Unterschied zwischen den Werten bei jüngeren Senioren mit und ohne Schwerbehinderung auszumachen. Der Sanierungsgrad (= prozentualer Anteil sanierter Zähne im Verhältnis zur Gesamtzahl

saniertes und kariöser Zähne) hingegen liegt bei schwerbehinderten jüngeren Senioren bei 81,7 % (allgemein 90,6 %)⁴⁷.

In der Gruppe der älteren Senioren (75-100 Jahre) kann bei fast allen Patienten Karies diagnostiziert werden. Die durchschnittliche Karieserfahrung liegt bei 21,6 Zähne und der Anteil von Senioren mit totalem Zahnverlust bei 33 %⁴². Der Sanierungsgrad liegt in dieser Altersgruppe bei 83,0 %⁴⁸. Die Gründe für die höhere Kariesprävalenz der älteren Senioren sind unterschiedlich: So ist die Fähigkeit eine adäquate Mundhygiene zu betreiben bei 11,6 % der älteren Senioren deutlich reduziert⁴⁹ und bei 20,9% dieser Patienten werden keine regelmäßige Kontrolluntersuchungen durch den Zahnarzt durchgeführt, da dieser nur bei Beschwerden aufgesucht wird⁴⁹.

Bei den älteren Senioren haben Frauen signifikant weniger Wurzelkaries als Männer (Tabelle 2). Ebenfalls liegt ein signifikanter Unterschied bei der Prävalenz zwischen West- und Ostdeutschland vor. Der RCI-Wert liegt bei den älteren Senioren insgesamt bei 16,4 %⁶. Das bedeutet, dass circa jede fünfte freiliegende Wurzeloberfläche entweder mit einer Füllung versorgt ist oder eine unbehandelte Kariesläsion aufweist. In Bezug auf den RCI-Wert lassen sich ebenso signifikante Unterschiede zwischen West- (18,7 %) und Ostdeutschland (7,3 %) aufzeigen⁶. Auch unterscheidet sich der RCI-Wert signifikant zwischen den 75- bis 84-Jährigen (15,6 %) und den 84- bis 100-Jährigen (19,2 %)⁶.

Tabelle 2: Anteil der älteren Senioren mit mindestens einer Wurzelkaries⁶.

Gesamt	26 %
Männer	31,0 %
Frauen	22,8 %
75 - 84 Jahre	28 %
85 - 100 Jahre	20 %
Westdeutschland	27,9 %
Ostdeutschland	18,4 %

Insbesondere bei pflegebedürftigen älteren Senioren tritt Karies vermehrt auf⁴⁸. Die durchschnittliche Karieserfahrung liegt in dieser Kohorte bei 24,6 Zähnen und 54 % haben keine natürlichen Zähne mehr⁴². Im Vergleich zu gleichaltrigen Patienten, die nicht pflegebedürftig sind, besteht auch ein schlechterer Versorgungsgrad (Sanierungsgrad liegt bei 69,2 %⁴⁸) und damit eine schlechtere Mundgesundheit. Die Prävalenz von Wurzelkaries bei pflegebedürftigen älteren Senioren liegt bei 18,0 %, der RCI-Wert bei 26,4 %⁴⁸. Bei pflegebedürftigen älteren Senioren sind zudem häufig unzureichende Mundhygienebedingungen (Putzfrequenz 2-mal

täglich 51,8 %, 1-mal täglich 27,2 %) im Vergleich zu den nicht Pflegebedürftigen vorzufinden (allgemeine Putzfrequenz der 75- bis 100-Jährigen 2-mal täglich 57,6%, 1-mal täglich 21,1 %)⁴⁸. Schaut man sich die Entwicklung im Vergleich zu den früheren Erhebungen an, lässt sich bei den jüngeren Senioren (65- bis 74-Jährige) ein Rückgang von Zahnextraktionen verzeichnen, was umgekehrt eine Zunahme an vorhandenen Zähnen bedeutet. Dieser positive Wandel beinhaltet aber gleichzeitig den möglichen Anstieg des Risikos für die erhaltenen Zähne später an Karies zu erkranken. Im Vergleich zur DMS IV hat sich der Anteil an zahnlosen jüngeren Senioren in der DMS V halbiert⁴². Eine Aussage über die Entwicklung der Wurzelkariesprävalenz bei den älteren Senioren kann nicht getroffen werden, da in den früheren Erhebungen diese Kohorte nicht explizit berücksichtigt worden ist. Auch können die Werte zwischen den Studienergebnissen von 2005 (jüngere Senioren, Wurzelkariesprävalenz 45 %, Tabelle 1) mit den Ergebnissen von 2014 (ältere Senioren zwischen 75-84 Jahre, Wurzelkariesprävalenz 28 %, Tabelle 2) aufgrund der unterschiedlichen Anzahl der vorhandenen Zähne nicht direkt miteinander verglichen werden⁶.

Das Morbiditätsprofil für Karies und Parodontitis bei älteren Senioren ist jedoch fast deckungsgleich mit demjenigen der jüngeren Senioren von vor 10 Jahren. So hat sich insgesamt die Krankheitslast nicht reduziert, sondern lediglich in ein höheres Patientenalter verschoben⁴². Dieses Phänomen wird auch als Morbiditätskompression bezeichnet.

Für einen internationalen Vergleich epidemiologischer Daten zu Wurzelkaries liegen aktuelle Ergebnisse nur in der Altersgruppe der jüngeren Senioren vor (Tabelle 3). Deutlich wird, dass auch in anderen Ländern eine hohe Wurzelkariesprävalenz besteht. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die Daten zu unterschiedlichen Zeiten erhoben worden sind und dadurch ein direkter Vergleich mit Daten aus Deutschland nur eingeschränkt möglich ist.

Tabelle 3: Internationaler Vergleich der Wurzelkariesprävalenz jüngerer Senioren⁷⁻⁹.

Land	Jahr	Wurzelkaries	RCI
Brasilien	2010	12,4 %	10 %
Deutschland	2014	28,0 %	13,6 %
	2005	45,0 %	17,0 %
Griechenland	2005	38,3 %	9,7 %

Auch der demografische Wandel beeinflusst den zu erwartenden Versorgungsbedarf für Wurzelkaries. So ist in den letzten Jahren eine deutliche Veränderung bei der Altersverteilung in der Bevölkerung zu verzeichnen (Abbildung 6). Insgesamt ist zu erwarten, dass der Anteil älterer Patienten im Vergleich zur Gesamtbevölkerung deutlich zunehmen wird. Daher kann erwartet

werden, dass allein durch die Zunahme der Anzahl von Patienten höheren Alters der Bedarf an Präventions- und Behandlungsmaßnahmen bei Wurzelkaries deutlich wachsen wird.

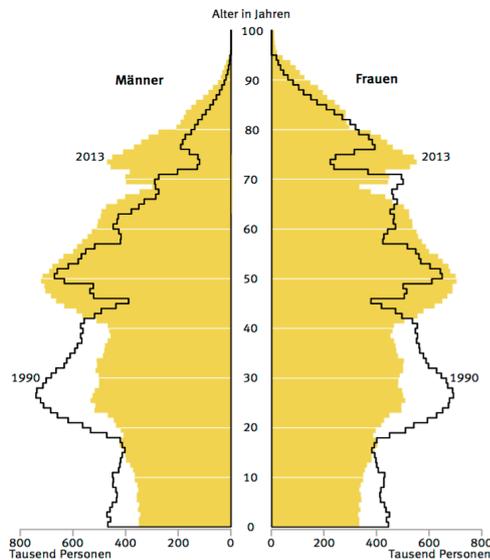


Abbildung 6: Altersverteilung der Bevölkerung in Deutschland 1990 (schwarze Linie) im Vergleich zu 2013 (gelbe Fläche)⁵. Die graphische Darstellung wurde durch das Statistische Bundesamt, Wiesbaden, erstellt.

2.4 Prävention von Wurzelkaries

Prävention von Wurzelkaries kann im Rahmen der häuslichen Mundhygiene oder durch zahnmedizinisches Fachpersonal erfolgen. Diese Präventionsmaßnahmen zielen entweder auf die Beeinflussung des Biofilms durch antibakterielle Substanzen oder auf die Beeinflussung der Mineralisation durch remineralisierende Substanzen ab. Beide Substanzgruppen können auf unterschiedliche Art (z.B. als Lack, Gel oder Spüllösung) appliziert werden. Nachfolgend werden verschiedene Substanzen beschrieben, die zur Kariesprävention häufig eingesetzt werden.

2.4.1 Fluoride

Die Wirkung von Fluorid beruht auf unterschiedlichen Wirkmechanismen: Zum einen können Fluoride in die Hydroxylapatitkristalle der Zahnhartsubstanz aufgenommen werden und ersetzen dort die Position einiger Hydroxidionen⁵⁰. Dadurch wird ein festeres Mineralgerüst gebildet, da ein dichter Verbund zwischen den Ionen erzeugt werden kann. Das so entstandene Fluorhydroxylapatit (Abbildung 7) ist so bei dem nächsten Säureangriff resistenter gegenüber einer Demineralisation⁵⁰. Zusätzlich bilden sich Wasserstoffbrücken zwischen nebeneinander liegenden Hydroxidionen und Fluoridionen aus⁵¹.

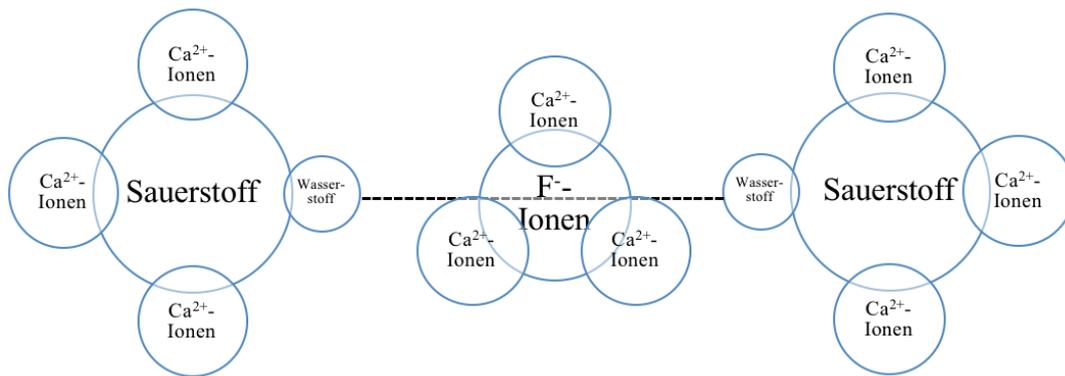


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Fluorhydroxylapatits. Die Fluoridionen nehmen im Kristallgitter weniger Platz ein als die Hydroxidionen. Die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Fluorid- und Hydroxidionen (gestrichelte Linien) sorgen dafür, dass die Struktur des Fluorhydroxylapatits zusätzlich stabilisiert wird.

Zum anderen haben gelöste Fluoride in einer Flüssigkeit eine positive Auswirkung auf die Kristalloberfläche der Zahnhartsubstanz⁵²⁻⁵⁴. Hydroxylapatit beziehungsweise Fluorhydroxylapatit wird in einer sauren Lösung, die Fluoridionen enthält, weniger stark gelöst als ohne Anwesenheit von Fluorid^{52,54}. Der Grund hierfür ist der Austausch von oberflächlichen Hydroxidionen durch Fluoridionen auch bei pH-Werten, die niedriger sind, als der kritische pH-Wert für Schmelz bzw. Dentin⁵³. Diese neu gebildete Struktur der Kristalloberfläche ist in einem sauren Milieu weniger löslich als reines Hydroxylapatit^{16,54-56}. Je höher die Fluoridkonzentration in der Umgebung der Zahnoberfläche ist, desto größer ist dieser Effekt, da mehr Hydroxidionen durch Fluoridionen ausgetauscht werden. Fluoride fördern dadurch nicht nur die Remineralisation, sondern reduzieren gleichzeitig die Demineralisation beim nächsten Säureangriff. Das Fluorid lagert sich zudem in einer ähnlichen Form des Kalziumfluorids an der Zahnoberfläche an⁵⁵. In dieser Form steht es, aufgrund seiner guten Löslichkeit, als Fluoridreservoir zur Verfügung⁵⁰.

In hohen Konzentration können Fluoride auch bakterienhemmend wirken⁵⁷. So können sich Fluoride an bakterielle Zellbestandteile, wie Enolasen und Adenosintriphosphatasen (ATPasen), binden und so deren Wirkmechanismus unterbrechen. ATPasen sind wichtige Enzyme azidogener oraler Bakterien. Die Anlagerung von Fluoriden an die ATPasen führt zur Hemmung der Zuckeraufnahme und des Kohlenhydratstoffwechsels der Bakterien⁵⁸. Ob dieser Effekt jedoch in klinisch erreichten Fluoridkonzentrationen einen Einfluss auf die Kariesentstehung hat ist fraglich⁵⁹.

Fluoride können in unterschiedlichen Darreichungsformen zugeführt werden. Während die systemische Zufuhr, z.B. über Fluoridtabletten, heute eine eher untergeordnete Rolle spielt, ist

die lokale Applikation zur Kariesprävention entscheidend. Diese kann durch die Verwendung von fluoridierten Zahnpasten, aber auch durch ergänzende Therapiemittel in Form von Spüllösungen, Gelen oder Lacken erfolgen.

2.4.2 Chlorhexidindigluconat

Chlorhexidindigluconat (CHX), auch häufig nur Chlorhexidin genannt, ist der am besten untersuchte antibakterielle Wirkstoff in der Zahnmedizin⁶⁰. Es ist ein kationisches Bisbiguanid, das hydrophile und hydrophobe Eigenschaften besitzt (Abbildung 8).

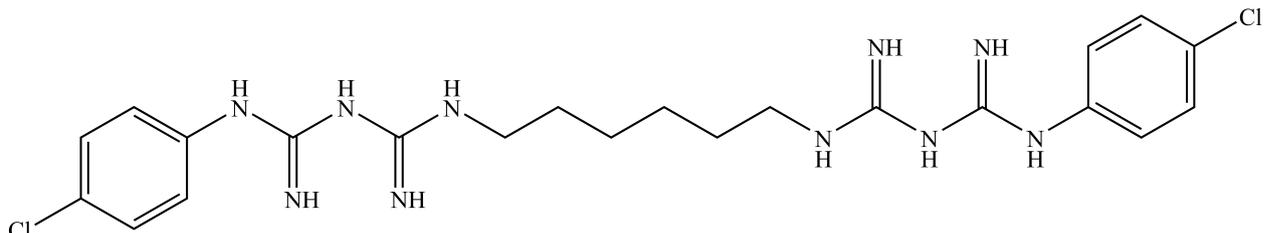


Abbildung 8: Strukturformel von Chlorhexidindigluconat. Chemischer Name: 1,1-Hexamethylenbis [5-(4-chlorphenyl)biguanid].

Hierbei ist der Gluconatanteil der hydrophile Bestandteil des Moleküls und die Benzolringe mit den Chloridionen stellen den hydrophoben Anteil dar. Der hydrophobe Anteil von CHX führt zu einer Schädigung der Zellmembran von Bakterien. Je nach Konzentration des CHXs kann hierdurch eine bakterizide oder bakteriostatische Wirkung erzielt werden⁶¹. Die bakteriostatische Wirkung bei niedriger CHX-Konzentration beeinflusst das osmotische Gleichgewicht und führt so zum Verlust von niedermolekularen Zellbestandteilen wie Kalium und Phosphor. Bei der bakteriziden Wirkung unter hoher CHX-Konzentration wird die Permeabilität der Zellmembran erhöht, so dass der Zelltod herbeigeführt wird. Dabei werden die intrazellulären Hauptbestandteile so verändert, dass eine Koagulation der zytoplasmatischen Proteine erreicht wird⁶¹. Das positiv geladene Bisbiguanid kann sich zudem an die negativ geladenen Teilchen in der Mundschleimhaut binden, so dass eine Art CHX-Reservoir gebildet wird⁶².

Zur Kariesprävention findet CHX eher in Form von Lacken Verwendung, in der Parodontologie hingegen auch als Gel und Spüllösung⁶³. Bei der Verwendung von CHX als Lack bleiben unerwünschte Nebenwirkungen, wie Zahnverfärbungen, Epithelabschuppungen, Geschmacksirritationen oder eine Haarzunge aus⁶³. Einige klinische Studien konnten einen positiven Effekt von CHX bei der Prävention von Wurzelkaries zeigen⁶⁴⁻⁶⁶.

2.4.3 Silberdiaminfluorid

Silberdiaminfluorid (SDF) besteht aus Silberfluorid und Ammoniaklösung. Durch den Fluoridanteil soll die Mineralisation an der Zahnoberfläche beeinflusst werden, während der Silberanteil antibakterielle Eigenschaften aufweisen soll. Die Fluoridwirkung des SDFs unterscheidet sich nicht von der bereits beschriebenen (Abschnitt 2.4.1) Fluoridwirkung anderer Fluoridpräparate. Daher wird im Folgenden nur auf den Wirkmechanismus der im SDF enthaltenen Silberionen Bezug genommen. Silberionen wirken als bakterizide Metallkationen und können so das Wachstum des Biofilms hemmen⁶⁷. Dabei wird das Glycosyltransferaseenzym inaktiviert⁶⁷. So wird die Bildung von löslicher und unlöslicher Glukose verhindert, wodurch die bakterielle Produktion von zellulären Polysacchariden beeinflusst wird⁶⁸. Auch können die Silberionen auf die Sulfhydrylgruppen bakterieller Proteine sowie auf die DNA der Bakterien Einfluss nehmen, wodurch die Zellwandsynthese und die Zellteilung gehemmt werden kann⁵⁷.

Es konnte gezeigt werden, dass eine SDF-Therapie die Mikrohärtigkeit von kariösem Dentin erhöht⁶⁹. Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass sich schwer lösliches beziehungsweise unlösliches Kalziumfluorid, Silberphosphat sowie Silberproteine auf der Dentinoberfläche ablagern⁷⁰. Diese Ablagerungen werden als eine Art Schutzschicht oder auch Oberflächenversiegelung angesehen. SDF hat außerdem eine Auswirkung auf das Kollagengerüst im Dentin sowie einen inhibitorischen Einfluss auf MMPs und schützt daher vor dem Abbau von Kollagen (vgl. Kapitel 2.2.1)⁷¹.

SDF wird üblicherweise einmalig oder in mehrmonatigen Abständen durch einen Zahnarzt oder durch entsprechend geschultem Personal in einer Konzentration von 38 % auf die Kariesläsionen appliziert. Dabei kommt es zu einer Schwarzverfärbung der behandelten Zahnoberfläche. Diese Verfärbung tritt ein, da nach der Applikation auf Karies Silberphosphat ausfällt⁷². Um diese chemische Reaktion zu verhindern kann unmittelbar nach dem Auftragen des SDFs eine übersättigte Kaliumjodidlösung appliziert werden. Die Silberionen reagieren dann mit den Jodidionen und es bildet sich Silberjodid. Die Applikation des Kaliumjodids beeinflusst den therapeutischen Effekt des SDFs nicht⁷³. Die kariespräventive und karieshemmende Wirkung bei aktiven Läsionen durch SDF ist schon in verschiedenen klinischen Studien gezeigt worden^{74,75}.

3 In-vitro-Kariesmodelle

Die In-vitro-Kariesmodelle können grob in chemische Kariesmodelle und Biofilmmodelle unterteilt werden. Die Eigenschaften, sowie die Vor- und Nachteile der verschiedenen Kariesmodelle werden nachfolgend näher erläutert.

3.1 Chemische Modelle

Bei chemischen Modellen wird durch die Applikation von sauren Lösungen ein niedriger pH-Wert auf Zahnproben erzeugt. Dadurch wird die Oberfläche der Zahnhartsubstanz demineralisiert, was zur Entstehung künstlicher Kariesläsionen führt. Als demineralisierende Substanz kann zum Beispiel die Demineralisationslösung nach Buskes dienen (pH-Wert = 5)⁷⁶. Aber auch eine Suspension bestehend aus Calciumchlorid (1,5 Millimolar (mM) CaCl_2), Kaliumdihydrogenphosphat (0,9 mM KH_2PO_4) und Essigsäure (50 mM CH_3COOH) kann eingesetzt werden (pH-Wert = 4,8)⁷⁷. In der Regel enthalten solche Suspensionen ein chemisches Puffersystem. Das Puffersystem hat zum Ziel den pH-Wert über einen gewissen Zeitraum stabil zu halten.

Chemische Kariesmodelle sind weniger komplex, wodurch die Kontrolle der experimentellen Bedingungen einfacher gewährleistet werden kann⁷⁸. Eine Demineralisation kann meist schneller erzeugt werden im Vergleich zu einer Läsion, die durch die Säureproduktion von Bakterien entsteht⁷⁹. Allerdings entsprechen die Bedingungen in diesen Modellen weniger der klinischen Situation, da z.B. neutralisierende Substanzen wie Speichel fehlen. Durch die fehlende Simulation des kariogenen Biofilms kann zudem der Effekt antibakterieller Substanzen auf die Kariesentstehung in einem chemischen Kariesmodell nicht untersucht werden.

3.2 Biofilmmodelle

Bei einem Biofilmmodell wird die Karies durch Bakterien erzeugt. Die demineralisierenden Säuren werden dabei durch den Stoffwechsel der Bakterien produziert. Biofilmmodelle können in geschlossene und offene Systeme unterteilt werden⁸⁰. Die Wahl des entsprechenden Modells richtet sich nach der Fragestellung der Untersuchung.

Bei geschlossenen Systemen wird der Biofilm in einem geschlossenen Behälter erzeugt. Während des Versuchsablaufs verändert sich in diesem System die Zusammensetzung des Nährmediums für die Bakterien, da die Nährstoffe allmählich verbraucht werden. Die Folge ist eine Ansammlung von Stoffwechselprodukten bis das Nährmedium ausgetauscht wird⁸¹. Ein Vorteil dieser Systeme ist, dass Versuchsaufbau und Materialbedarf im Vergleich zu offenen Biofilmmodellen weniger umfangreich sind. Damit verbunden ist jedoch auch eine stärkere

Abweichung der simulierten Bedingungen von der klinischen Situation im Vergleich zur kariogenen Umgebung in offenen Systemen⁸¹.

Die offenen Biofilmmodelle lassen sich in zwei Kategorien weiter unterteilen: das künstliche Mundmodell und die Durchflusszelle⁸⁰. Das künstliche Mundmodell wird normalerweise zur Simulation oraler Bedingungen verwendet. Durch periodische oder kontinuierliche Zufuhr von Nährstoffen werden Stoffwechselfvorgänge im Biofilm simuliert, wie sie auch in der Mundhöhle vorzufinden sind⁸². Auch andere Parameter wie zum Beispiel Temperatur oder Speichelfluss können nachgeahmt und je nach Mundmodell variiert werden⁸⁰. Der Biofilm kann dabei aus einer oder mehreren vorher definierten Bakterienspezies zusammengesetzt sein oder es wird ein von einem Probanden entnommener Biofilm mit nicht definierten Bakterien (sogenanntes mikrokosmisches Mundmodell) genutzt⁸⁰. Bei dem mikrokosmischen Mundmodell ist jedoch die anschließende Analyse der Bakterien deutlich komplizierter und führt häufig zu ungenaueren Ergebnissen verglichen mit Modellen mit definierten Spezies. Im Vergleich zu geschlossenen Biofilmmodellen ist der Aufwand zum Betreiben eines offenen Biofilmmodells deutlich erhöht. Künstliche Mundmodelle bieten die Möglichkeit das Wachstum und die Struktur der Plaque unter dem Einfluss unterschiedlicher Parameter zu analysieren.

Die Durchflusszelle stellt die zweite Variante der offenen Biofilmmodelle dar. Bei dieser Art des Biofilmmodells fließt eine flüssige Phase lediglich in eine Richtung. Durch Diffusion erfolgt das Mischen verschiedener Substanzen im Modell⁸⁰. Durch die Fließrate in nur eine Richtung können die erzeugten Bedingungen innerhalb des Modells an verschiedenen Stellen variieren⁸¹. Diese Art des Biofilmmodells findet hauptsächlich Anwendung bei der Untersuchung der Entstehung von Biofilmen und deren Morphologie. Dabei kann, ohne das Wachstum des Biofilms zu stören, die sequentielle Kolonisierung der Mikroorganismen in Echtzeit mittels mikroskopischer Analyse untersucht werden⁸¹.

4 Fragestellung

Derzeit sind erst wenige Studien verfügbar, welche die verschiedenen kariespräventiv wirksamen Substanzen in unterschiedlichen Applikationsformen bei Wurzelkaries miteinander verglichen haben. So ist eine Abschätzung des relativen Effekts verschiedener Präparate zur Wurzelkariesprävention nur begrenzt möglich. Die wenigen klinischen Studien zu diesem Thema sind an Patienten durchgeführt worden, bei denen gleichzeitig auf die Aufrechterhaltung zufriedenstellender Mundhygienebedingungen geachtet wurde. In der Praxis haben aber gerade diejenigen Senioren ein hohes Wurzelkariesrisiko, bei denen unzureichende Mundhygienebedingungen vorherrschen. Eine Simulation solcher Bedingungen im Rahmen klinischer Studien wäre aus ethischen Gründen nur eingeschränkt möglich. Daher war es das Ziel dieser In-vitro-Studie den Effekt unterschiedlicher zur Kariesprävention eingesetzter Substanzen (Fluoridlack und -spülung, Chlorhexidinlack und -spülung und Silberdiaminfluorid) auf die Entstehung von Wurzelkaries in einem Biofilmmodell zu untersuchen. Zusätzlich wurde untersucht, inwiefern durch die Trägersubstanz der Lacke ein kariespräventiver Effekt bewirkt wird und ob die Lacke auch unbedeckte, angrenzende Dentinoberflächen vor Kariesentstehung schützen können.

Unsere Nullhypothesen lauteten:

1. Keine der verwendeten Substanzen hat einen antibakteriellen Effekt auf *Lactobacillus rhamnosus* in dem Bereich, der mit der Substanz in Kontakt steht, beziehungsweise bei den Lacken auch im angrenzenden Dentin im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.
2. Keine der verwendeten Substanzen hat einen Einfluss auf Mineralverlust und Läsionstiefe der künstlich erzeugten Kariesläsionen in dem Bereich, der mit der Substanz in Kontakt steht, beziehungsweise bei den Lacken auch im angrenzenden Dentin im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.
3. Die Trägersubstanz des Lackes hat keinen antibakteriellen Effekt auf *Lactobacillus rhamnosus* im Biofilmmodell im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.
4. Die Trägersubstanz des Lackes hat keinen Einfluss auf Mineralverlust und Läsionstiefe im Biofilmmodell im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

5 Methodik

5.1 Übersicht

Aus den Wurzeln von Rinderzähnen wurden 140 Dentinproben gewonnen und randomisiert einer von sieben Gruppen, mit je 20 Proben, zugeteilt (Abbildung 9). Je nach Gruppe wurden die Proben wie folgt behandelt: Gruppe 1 bis 4 erhielten zu Beginn des Versuchs eine einmalige Applikation der jeweiligen Testsubstanz. Dabei handelte sich bei Gruppe 1 um Silberdiaminfluorid (SDF), bei Gruppe 2 um Chlorhexidinlack (CHXV), bei Gruppe 3 um Natriumfluoridlack (NaFV) und bei Gruppe 4 um einen Placebolack (PV). Gruppe 5 und 6 erhielten eine tägliche Spülung mit einer Natriumfluoridlösung (NaFR) beziehungsweise einer Chlorhexidinlösung (CHXR). Gruppe 7 erhielt keine kariespräventive Behandlung und diente als Kontrollgruppe (Control).

In einem künstlichen Mundmodell wurde durch Inkubation mit einer Monokultur von *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG, DSM 20021, DSZM, Braunschweig, Deutschland), über einen Zeitraum von 12 Tagen, Karies auf den Probenoberflächen erzeugt. Dabei wurde täglich künstlicher Speichel und Saccharoselösung in definierten Intervallen appliziert.

Zur Auswertung wurden die koloniebildenden Einheiten (engl.: colony forming unit (CFU)) aus dem Biofilm an den Probenoberflächen ermittelt. Zudem wurde durch transversale Mikroradiografie (TMR) der Mineralverlust und die Läsionstiefe der entstandenen Kariesläsionen bestimmt.

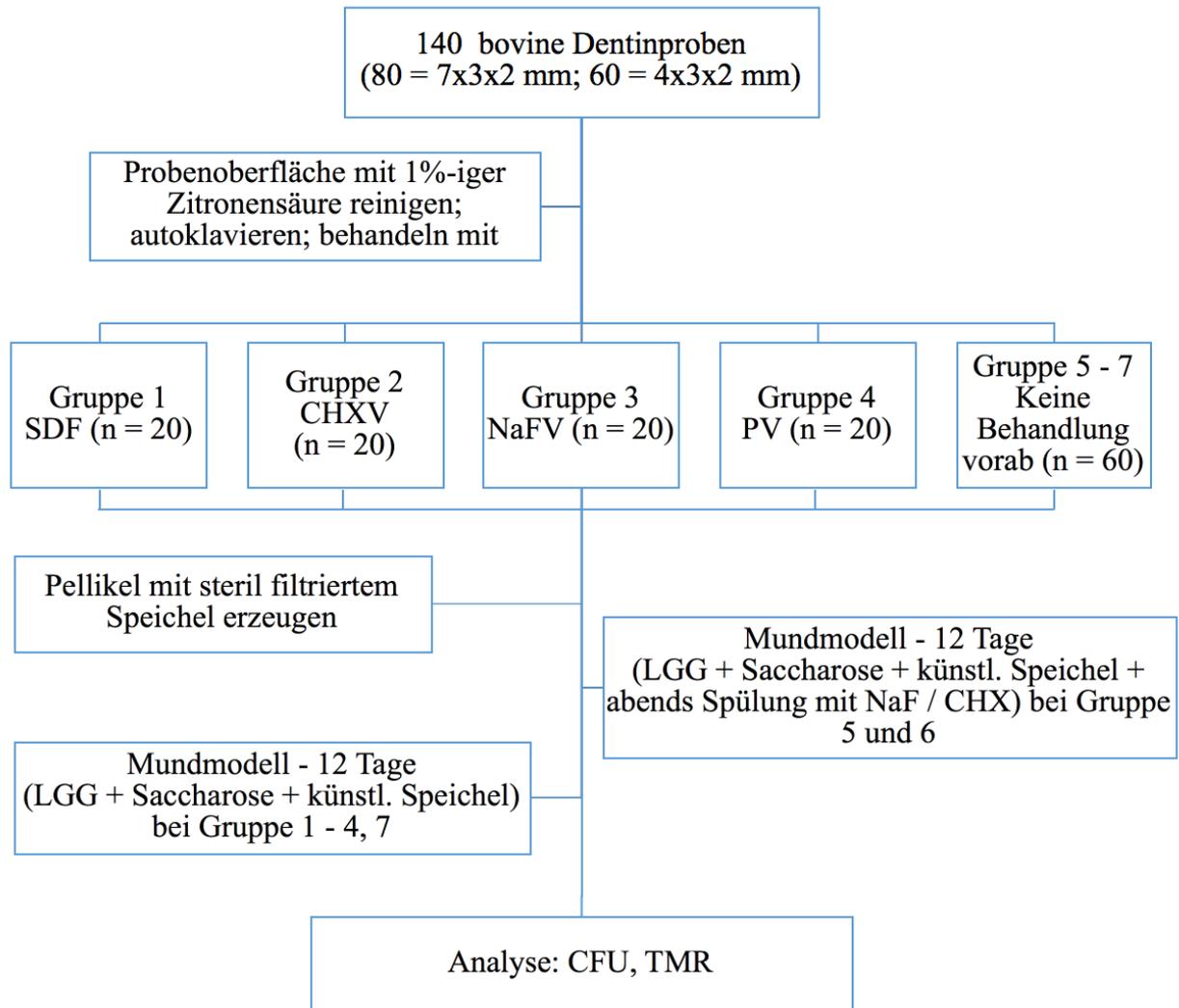
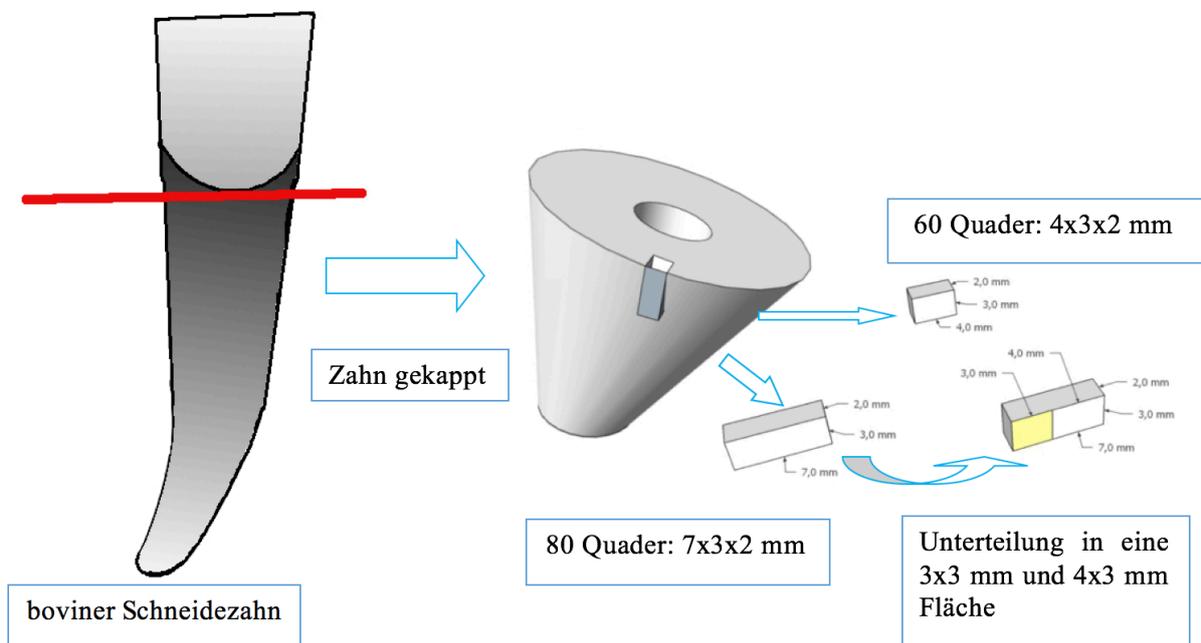


Abbildung 9: Studiendesign.

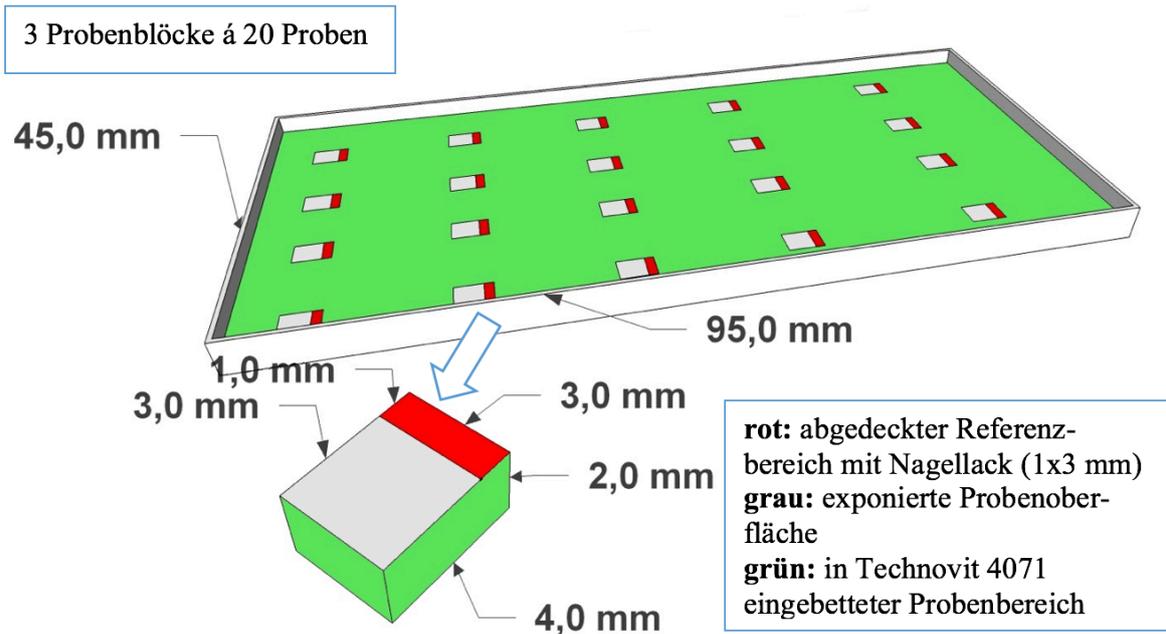
5.2 Probenherstellung

Bei Rindern (Alter 48 bis 52 Monate; Schlachthof Perleberg, Perleberg, Deutschland) wurden aus dem Unterkiefer die Schneidezähne (= bovine Schneidezähne) unmittelbar nach der Schlachtung extrahiert. Die Zähne wurden sorgfältig gesäubert, die Wurzeln vom Desmodont befreit und in Aqua dest. ("Ampuwa" Spüllösung, steriles pyrogenfreies Aqua ad iniectabilia, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) kühl gelagert. Zur Probenherstellung wurden aus den Schneidezahnwurzeln 2x3x4 mm (Gruppe 5 bis 7) und 2x3x7 mm (Gruppe 1 bis 4) große Blöcke gesägt (0,1 mm und 0,2 mm Diamantbandsäge, EXAKT Trennschleifsystem 300 CL, Fa. EXAKT Vertriebs GmbH, Norderstedt, Deutschland) (Abbildung 10a). Die von der Pulpa abgewandten Oberflächen wurden mit verschiedenen Schleifpapieren (Korngrößen P 320 → P 600 → P 1200 → P 4000) geglättet und auf Hochglanz poliert (Labo Pol 25, Struers GmbH, Ballerup, Dänemark / Willich, Deutschland; Schleifpapier, SiC, P 320 – 4000, Buehler GmbH,

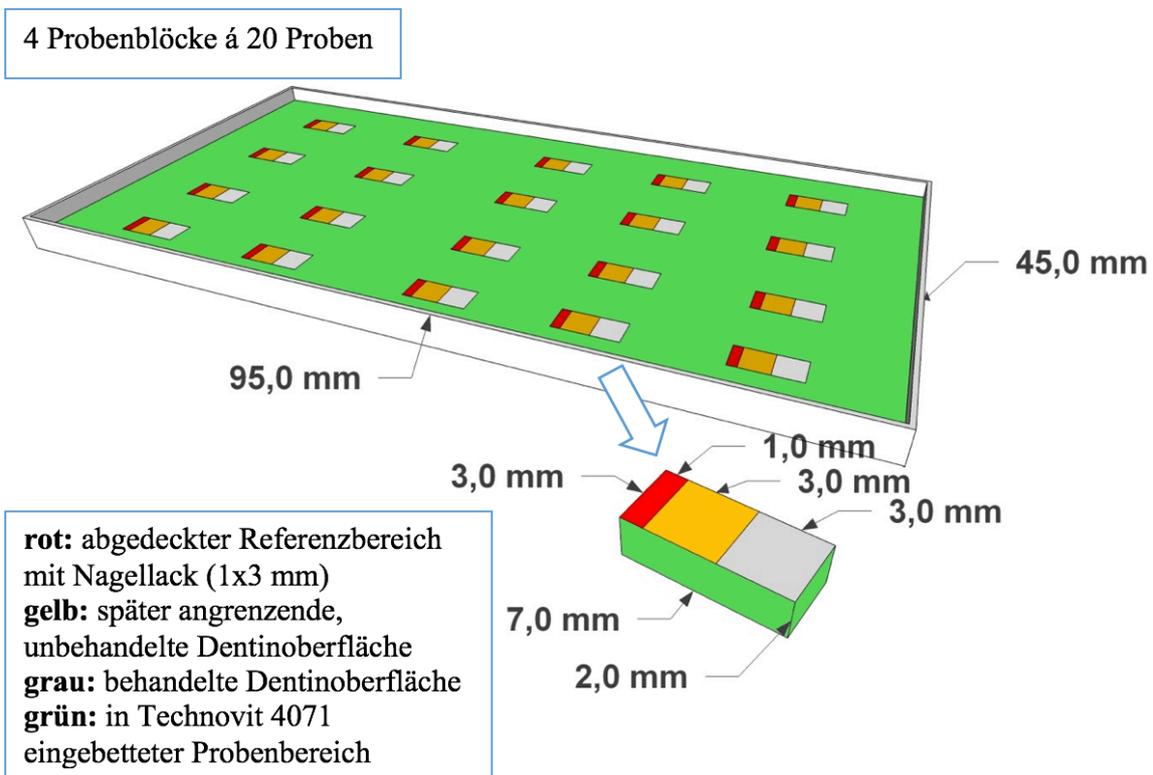
Düsseldorf, Deutschland). So wurde bei allen 140 Proben eine standardisierte, plane Oberfläche von 3x4 mm, beziehungsweise 3x7 mm geschaffen. Die 2x3x7 mm großen Proben erhielten mit einer Diamantbandsäge eine Oberflächenmarkierung um die Oberfläche in zwei Bereiche aufzuteilen. Auf die eine Hälfte wurden die verschiedenen Substanzen später appliziert (graue Oberfläche in Abbildung 10c) und die andere stellte die angrenzende unbehandelte Kontrollfläche dar (gelbe Oberfläche in Abbildung 10c). Nachfolgend wurden jeweils 20 Proben zusammen in einen 4,5x9,5 cm großen Probenblock mit Technovit 4071 (Schnellhärtendes 2-Komponenten-Einbettmittel auf Basis von hochvernetztem Methylmethacrylat, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) eingebettet, so dass nur noch die Oberfläche der Proben exponiert war (Abbildung 10b und 10c, Abbildung 11). Die Oberflächen der Blöcke wurden erneut poliert (Körnung P 1200 → P 4000) um so eine glatte Oberfläche zu erzeugen. Anschließend wurden die Blöcke jeweils mit einer Schicht aus Technovit 4071, welches eine Höhe von 2 bis 3 mm hatte, eingefasst. Diese Schicht stellte später bei dem Versuch sicher, dass die Proben im Mundmodell jederzeit mit Flüssigkeit bedeckt waren. Bis zur weiteren Verarbeitung lagen die Proben kühl bei 8-10 °C in Aqua dest.



a)



b)



c)

Abbildung 10 (a, b, c): Die Verarbeitung der Rinderzähne. 10a: Darstellung der Probengewinnung aus den Rinderzähnen. **10b:** Schematische Darstellung der Probenblöcke für die Gruppen 5 bis 7. **10c:** Schematische Darstellung der Probenblöcke für die Gruppen 1 bis 4.

5.3 Definieren der Oberflächenbereiche der Dentinproben

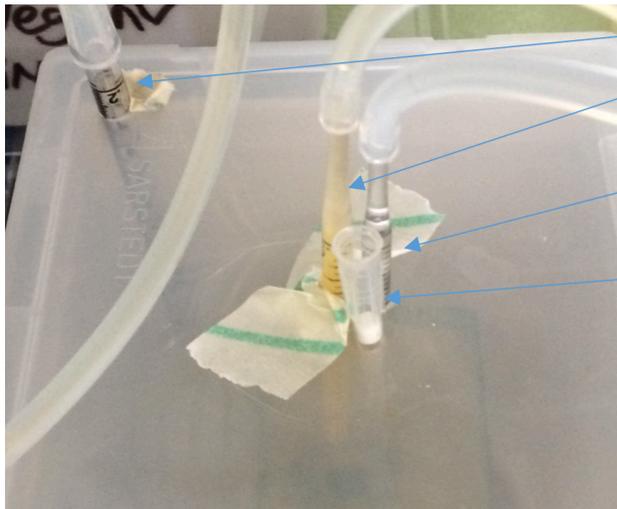
Zur Entfernung der Schmierschicht wurden die Probenoberflächen mit 1-prozentiger Zitronensäure behandelt. Nach einer Einwirkzeit von 5 Minuten wurden die Oberflächen gründlich mit Aqua dest. abgespült. Ein 1x3 mm großer Referenzbereich wurde bei allen Proben mit Nagellack (Long Lasting Nail Colour, Rival de Loop, Berlin) abgedeckt (Abbildung 10b und 10c). Bei den Proben der Gruppen 5 bis 7 ergab sich so jeweils ein exponierter Bereich von 3x3 mm. In den Gruppen 1 bis 4 war jeweils ein exponierter Bereich von 3x6 mm vorhanden, der durch die Oberflächenmarkierung in zwei aneinander liegende 3x3 mm große Bereiche unterteilt wurde (Abbildung 10b und 10c, 11).



Abbildung 11: 7 Probenblöcke á 20 Einzelproben.

5.4 Vorbereitung des Mundmodells

Das Mundmodell wurde in Kunststoffbehältern (Leerpäckung für Tip StackPack, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) mit einer Größe von 9,5x11,5x6,5 cm betrieben. Die Deckel der Behälter erhielten drei Bohrungen in der Mitte und eine im Randbereich. Die Bohrungen in der Mitte dienen als Zulauf für den künstlichen Speichel (DMM, modified Defined Mucine Medium)⁸³, für das Nährmedium (de-Man-Rogosa-Sharpe (MRS) Bouillon mit 1% Saccharose (MRS-S) (MRS-Bouillon / -Agar, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)) und als Applikationszulauf für die LGG Flüssigkultur beziehungsweise für die NaF- oder CHX-Lösung. Die Bohrung im Randbereich diente als Abfluss für die überlaufende Flüssigkeit von dem jeweils im Mundmodell positionierten Probenblock. Um später einen geraden Weg der Schlauchenden von den Pumpen gewährleisten zu können, wurden die Schläuche im Deckelbereich durch gekürzte serologische Pipetten (1 und 2 ml; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) verstärkt (Abbildung 12).



Abfluss (gekürzte serologische Pipette)

Zulauf für MRS-S (gekürzte serologische Pipette)

Zulauf für DMM (gekürzte serologische Pipette)

Zulauf für die *LGG* Flüssigkultur bzw. der NaF- oder CHX-Lösung. Mit einer Pipettenspitze mit Filter (Firma Sarstedt) wurde der Zugang zwischen den Applikationen verschlossen.

Abbildung 12: Darstellung des Deckels eines Kunststoffbehälters.

Die Probenblöcke wurden auf kleinen Sockeln (Deckel von Urinbechern, Öffnungsdurchmesser 62 mm, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) fixiert und parallel zum Packungsboden der jeweiligen Mundmodelle ausgerichtet und befestigt. Die Deckel wurden mit autoklavierbarem Klebeband (Sterilisations-Klebeband für Autoklav, 19 mm x 50 m, HENRY SCHEIN Medical GmbH, Berlin, Deutschland) fixiert und die Bohrungen im Deckel mit dem Klebeband vorübergehend verschlossen. Zur Schaffung eines feuchten Milieus in den Kammern wurde Aqua dest. appliziert. Anschließend wurden die Probenblöcke im Kunststoffbehälter bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert (Tuttnauer Vertikallaborautoklav 3870 ELV, biomedis Laborservice GmbH und biomedis Kalibrierservice GmbH & Co. KG, Gießen, Deutschland).

5.5 Applikation der Lacke

Unter einer sterilen Werkbank (Mikrobiologische Sicherheitskabine, Typ ASW-UP IV-1270, Bleyemehl Reinraumtechnik GmbH, Inden, Deutschland) wurden die Substanzen der Gruppe 1 bis 4 nach Herstellerangaben aufgetragen (Tabelle 4). Nach fünfminütiger Einwirkzeit wurden sie mit einer sterilen Zahnbürste wieder entfernt. Anschließend wurden die Mundmodelle der Gruppe 1 bis 4 über drei Stunden mit 37 Grad warmen Aqua dest. im Wärmeschrank (Venticell 404, MMM Medcenter GmbH, Planegg, Deutschland) umspült, um den Effekt einer oralen Clearance durch Speichel zu simulieren. Danach war auf allen Proben noch eine dünne Lackschicht mit bloßem Auge erkennbar. Im Anschluss wurde auf die Probenoberflächen aller Gruppen steril filtrierter Speichel 2 Stunden vor dem eigentlichen Versuchsablauf zur Erzeugung eines Pellikels appliziert. Der Speichel wurde von zwei Probanden (männlich 23 Jahre, weiblich

28 Jahre, geringes Kariesrisiko) zu gleichen Mengenanteilen vermischt, steril filtriert und bis zur Nutzung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 4: Name, Hersteller, Konzentration und Applikationsmethode der verwendeten Substanzen.

Gruppe	Name	Hersteller	Konzentration	Anwendung
SDF	Riva Star™	SDI Limited, Bayswater, Australien	Phase 1: Silberfluorid (35-40 %), Ammon- iaklösung (15-20 %) Phase 2: gesättigtes Kaliumjodid	Einmaliges Auftragen vor dem Beginn der Biofilmerzeugung
CHXV	EC40™	Biodent BV, Nijmegen, Niederlande	Chlorhexidin- digluconat (35 %)	Einmaliges Auftragen vor dem Beginn der Biofilmerzeugung
NaFV	Fluoridin N5™	Voco, Cuxhaven, Deutschland	Natriumfluoridlösung (22600 ppm)	Einmaliges Auftragen vor dem Beginn der Biofilmerzeugung
PV	eigene Herstellung, Sandarac (Kremer Pigmente GmbH & Co. KG, Aichstetten, Deutschland)		Sandarac : Ethanol im Verhältnis von 27 : 73 (71 mg : 191 µl)	Einmaliges Auftragen vor dem Beginn der Biofilmerzeugung
NaFR	eigene Herstellung, 500 ppm NaF- Lösung; steril filtriert.		999,5 g Aqua dest. : 0,5 g NaF	Einmal täglich während der Biofilmerzeugung
CHXR	Chlorhexamed® Fluid 0,1 %	GlaxoSmithKline, Consumer Healthcare GmbH & Co. KG, Bühl, Deutschland	Chlorhexidinlösung (0,1 %)	Einmal täglich während der Biofilmerzeugung
Control	Keine Behandlung			

5.6 Versuchsvorbereitung und –aufbau

5.6.1 Vorbereitung der Medien

Für den kompletten Versuch wurden insgesamt circa 10,1 Liter MRS-S und 10,5 Liter DMM benötigt. Die MRS-Bouillon (Anhang 10.4) wurde nach Herstellerangaben angefertigt. Unter sterilen Bedingungen wurde 10 g Saccharose in 0,8 Liter MRS-Bouillon gelöst und anschließend das Medium mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt, um eine MRS-Bouillon mit 1 % Saccharose-Gehalt (MRS-S) zu erhalten. Anschließend wurde die MRS-S Lösung autoklaviert. Das DMM wurde nach der beschriebenen Rezeptur (Anhang 10.3) hergestellt und ebenfalls autoklaviert. Neben diesen Flüssigkeiten wurden zusätzlich 102 ml einer 500 ppm haltigen NaF-Lösung hergestellt und steril filtriert. Die Konzentration von 500 ppm wurde gewählt, um das tägliche Zähneputzen mit einer durch Speichel verdünnten normal fluoridhaltigen Zahnpasta (1500 ppm F⁻) während des Versuchs zu simulieren. Bis zur jeweiligen Verwendung wurden die Flüssigkeiten unter sterilen Bedingungen im Kühlschrank gelagert.

LGG-Kulturen wurden für 48 h bei 37 °C auf MRS Agar kultiviert. Alle zwei Tage wurde eine Kolonie entnommen, in 75 ml MRS-S gelöst und für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert, so dass in der Flüssigkultur circa 7×10^6 CFU/ml *LGG* vorhanden waren.

5.6.2 Installation des Biofilmodells

Die Schlauchsysteme (Standard-Schläuche, ISMATEC, IDEX Health & Science GmbH, Wertheim, Deutschland) wurden entsprechend des Versuchsaufbaus (Abbildung 13) vorbereitet und über Adapter (Standard-Schlauchverbinder, ISMATEC, IDEX Health & Science GmbH, Wertheim, Deutschland) miteinander verbunden. Anschließend wurden sie in autoklavierbaren Tüten bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert.

Insgesamt wurden zwei Multikopfpumpen (ISMATEC Pumpe = MCP Standard Pumpe mit MS / CA 8-6 Pumpenkopf; ISMATEC, IDEX Health & Science GmbH, Wertheim, Deutschland) benötigt. Zum einen als Zulauf für DMM und zum andern als Zulauf für die MRS-S (Abbildung 13). Dadurch konnte erreicht werden, dass alle sieben Versuchskammern gleichzeitig das DMM, beziehungsweise die MRS-S, erhielten. Sieben Peristaltikpumpen (Peristaltic Pumps, SEKO Deutschland GmbH, Mainz, Deutschland) wurden eingesetzt um überlaufende Flüssigkeiten von den Probenblöcken in den Versuchskammern abzupumpen. Die abgepumpten Flüssigkeiten wurden in zwei großen Behältern aufgefangen und alle drei Tage geleert.

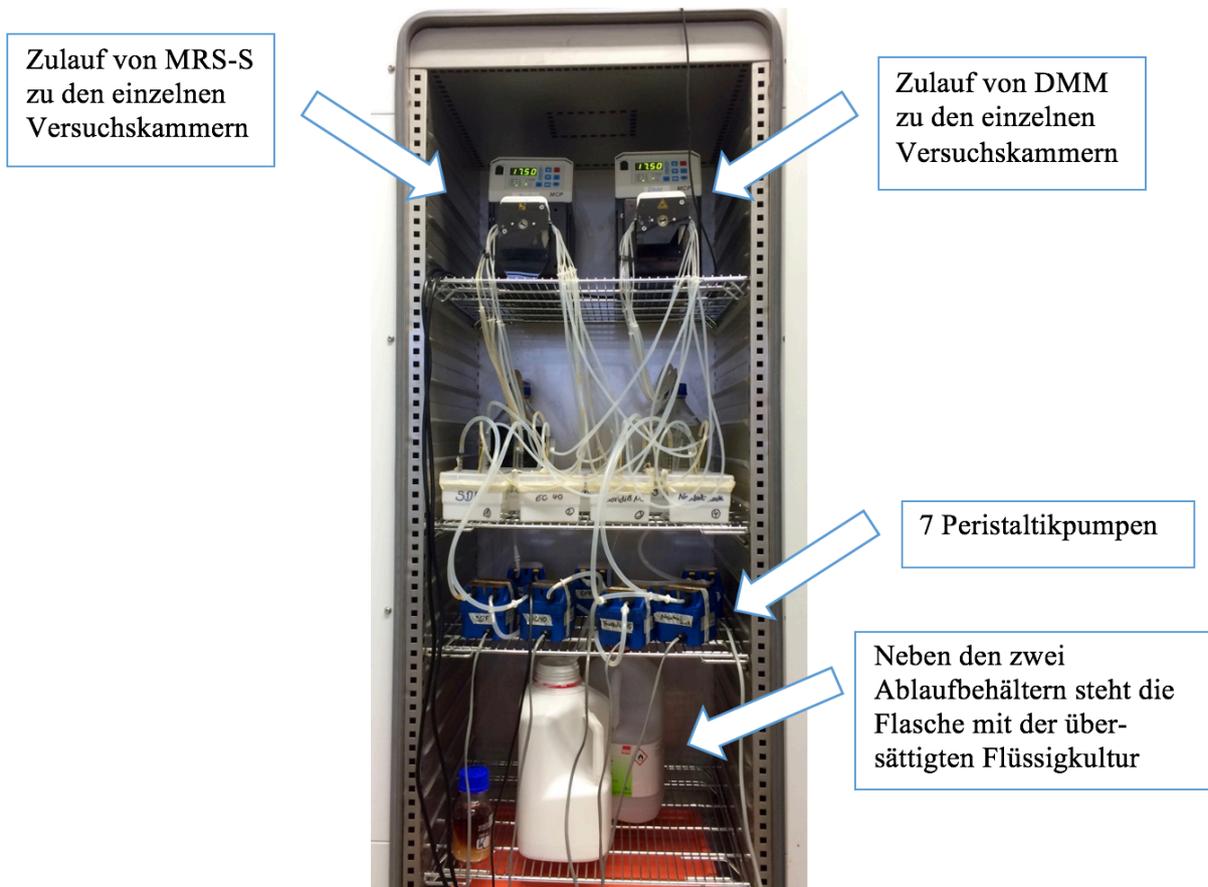


Abbildung 13: Versuchsaufbau. Aufnahme am Ende einer Nachtruhe.

5.7 Versuchsablauf

Der komplette Versuch fand im Brutschrank statt, so dass eine durchgehende Temperatur von 37-38 °C gewährleistet werden konnte. Der nachfolgend beschriebene Ablauf wiederholte sich täglich über 12 Tage (Abbildung 14):

15 Minuten bevor die erste Multikopfpumpe anfang zu pumpen, wurden auf jeden Probenblock mit einer sterilen serologischen Pipette über den freien Zugang im Deckel 5 ml der Flüssigkultur appliziert. Der Flüssigkulturansatz wurde regelmäßig alle zwei Tage erneuert.

1. Über 15 Minuten pumpte die erste Multikopfpumpe 15 ml der MRS-S in jede Versuchskammer.
2. 10 Minuten Pause.
3. Über 15 Minuten pumpte die zweite Multikopfpumpe 15 ml des DMM in jede Versuchskammer.
4. 100 Minuten Pause.
5. Die Sequenz (1.-4.) wiederholte sich 7-mal täglich.

6. Nachdem zum achten Mal die Sequenz 1.- 3. durchgelaufen war, wurde bei Gruppe fünf 8,5 ml NaF-Lösung (Tabelle 4) und bei Gruppe sechs 8,5 ml CHX-Lösung (Tabelle 4) über den Zugang im Deckel mit einer sterilen serologischen Pipette innerhalb von 2 Minuten kontinuierlich appliziert.
7. 10 Minuten Pause.
8. Über 15 Minuten pumpte die zweite Multikopfpumpe 15 ml des DMMs in die Versuchskammer 5 und 6.
9. Im Anschluss wurde eine 6 h 45 min (Gruppe 1 bis 4 und 7) beziehungsweise 6 h 18 min (Gruppe 5 und 6) dauernde Ruhepause (zur Simulation der Nachruhe) eingehalten.

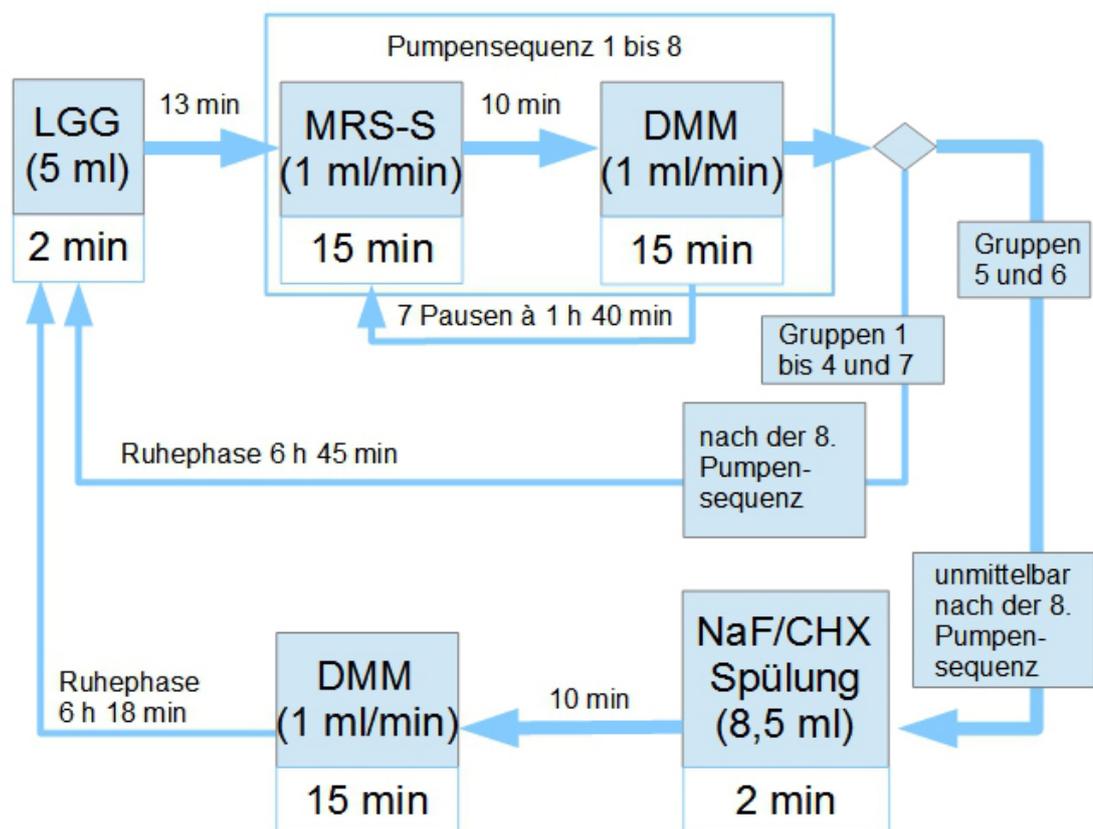


Abbildung 14: Versuchsablauf. Ablaufschemata der Gruppen 1 bis 7. Bei den Gruppen 5 und 6 erfolgte vor Beginn der Ruhephase die Applikation der jeweiligen Spüllösung.

5.8 Auswertung

5.8.1 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten

Um den Biofilm von jeder Probe einheitlich abnehmen zu können, wurde zunächst mit einer Pipette die überschüssige Flüssigkeit von den Probenblöcken entfernt. Daraufhin wurde mit einem Skalpell von den Bereichen, die mit den kariespräventiven Substanzen Kontakt hatten, der Biofilm von der 3x3 mm großen Probenoberfläche entnommen. Bei den Proben der Gruppe 1 bis 4 wurden zusätzlich Biofilmproben im angrenzenden unbehandelten Bereich der Dentinoberfläche, ebenfalls 3x3 mm, entnommen. Die Biofilmproben wurden mit 1000 µl 0,9-prozentiger NaCl-Lösung (physiologische Kochsalzlösung, Spüllösung, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) versetzt und mittels Vortexer (Vortex Genie 2, BENDER & HOBEIN, Zürich, Schweiz) gemischt. 100 µl der entstandenen Verdünnung wurden abpipettiert (Pipettenspitzen: SafeSeal-Tips Professional 200 µl, #770280X Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland), in 900 µl 0,9-prozentige NaCl-Lösung appliziert und mittels Vortexer gemischt. Diese Abfolge wurde so lange wiederholt bis von jeder Biofilmprobe eine Verdünnungsreihe von 10^{-7} erreicht wurde (Abbildung 15).

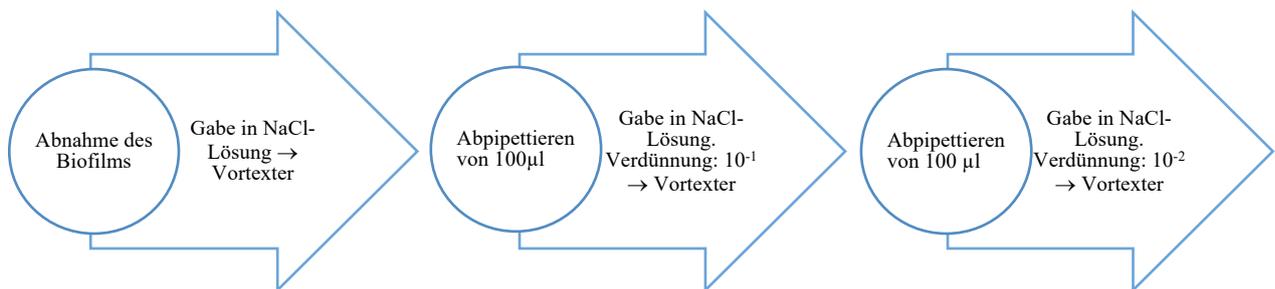


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Ablaufs zur Erstellung der Verdünnungsreihen. Diese Abfolge wiederholte sich bis eine Verdünnung von 10^{-7} erreicht wurde.

Von den Verdünnungen 10^{-5} und 10^{-7} wurden je 100 µl mit einer Pipette entnommen und jeweils auf eine MRS-Agarplatte ausplattiert (Petrischalenspatel Delta™, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Insgesamt resultierten aus diesem Vorgehen 440 beimpfte Agarplatten. Die Agarplatten wurden anschließend für 48 Stunden in einem Brutschrank unter CO₂ Atmosphäre (CO₂- Begasungsbrutschrank, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) bei 37°C inkubiert (Abbildung 16).



Abbildung 16: Agarplatten im CO₂-Begasungsbrutschrank.

Nach den 48 Stunden wurden die Kolonien auf den Agarplatten in die Kategorien „auszählbare Kolonien“ und „nichts / zu wenig gewachsen“ unterteilt (Abbildung 17). In allen Fällen wurde die Verdünnungsreihe 10^{-7} als „nichts / zu wenig gewachsen“ klassifiziert und somit die Verdünnungsreihe 10^{-5} ausgezählt. Die Anzahl der Kolonien auf den Platten mit auszählbaren Kolonien wurden zur weiteren Berechnung herangezogen. Der CFU-Wert bezog sich jeweils auf einen Milliliter, da der von den Proben entnommene Biofilm in 1 ml NaCl-Lösung gelöst wurde (siehe Abbildung 15). Vor der anschließenden statistischen Auswertung wurden die ermittelten CFU-Werte logarithmiert. Um auch den Logarithmus bei Proben ohne Bakterienwachstum bilden zu können (CFU = 0) wurde bei jeder Probe zum CFU-Wert 1 addiert.

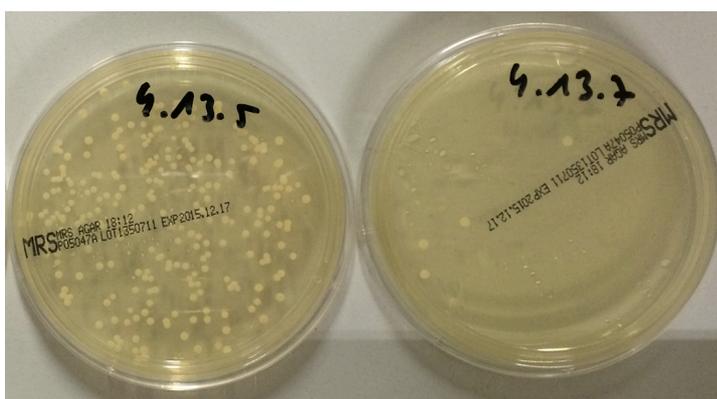


Abbildung 17: Kolonien auf den Agarplatten einer Verdünnungsreihe (links 10^{-5} , rechts 10^{-7}) nach der Kultivierung im Brutschrank. Die Kolonien der Verdünnung 10^{-5} wurden der Kategorie „auszählbare Kolonien“ zugeordnet und ausgezählt.

5.8.2 Transversale Mikroradiographie (TMR)

Im Rahmen von Vorversuchen wurde evaluiert, inwiefern die Silberpartikel aus dem SDF die TMR-Auswertung beeinflussen (Anhang 10.1 Methodik und Ergebnisse der Vorversuche). Die Vorversuche ergaben, dass die Silberpartikel keinen Einfluss auf die TMR-Aufnahmen hatten und sich somit dieses Analyseverfahren für die Auswertung eignete.

5.8.2.1 Vorbereitung der Proben

Die Proben wurden aus dem Probenblock gesägt (0,1 mm und 0,2 mm Diamantbandsäge, EXAKT Trennschleifsystem 300 CL, Fa. EXAKT Vertriebs GmbH, Norderstedt, Deutschland) und die Oberflächen der Proben wurden mit einem lichthärtenden Kunststoff (ICON-Infiltrant (Acrylat.-Harz), DMG Chemisch-Pharmazeutische Fabrik GmbH, Hamburg, Deutschland) abgedeckt, damit diese bei den darauffolgenden Arbeitsschritten nicht verletzt werden konnten. Anschließend wurden die Proben mit der gleichen Säge längs halbiert, so dass auf jeder Hälfte der Referenzbereich und die exponierte Oberfläche zu erkennen waren (Abbildung 18a). Die Schnittoberflächen wurden mit dem Schleifgerät bei einer Korngröße von P 1200 und P 4000 poliert. Jeweils eine der Hälften wurde mittels Sekundenkleber (Cyanacrylatkleber, UHU dent, UHU GmbH, Bühl (Baden), Deutschland) an den Technovit-Flächen auf einem Objektträger (Plexiglas-Objektträger (25x75x2 mm), Fa. dia-plus, Oststeinbek, Deutschland) fixiert, wobei die polierte Oberfläche zum Objektträger zeigte (Abbildung 18b). Auf einen Objektträger passten vier bis fünf Proben nebeneinander. Mit einer 0,1 mm Diamantbandsäge wurden die aufgeklebten Proben zunächst in 400 µm dicke Schliffe gesägt, bevor sie an einem Schleifgerät für Dünnschliffe (EXAKT Mikroschleifsystem 400 CS, Fa. EXAKT Vertriebs GmbH, Norderstedt, Deutschland) auf die benötigte Dicke von 100 – 115 µm (± 10 µm) geschliffen wurden. Der Schleifvorgang erfolgte bis zu einer Korngröße von P 4000. Die exakte Stärke der Dünnschliffe wurde durch eine Bügel-Messschraube (Digimatic MDC-Lite, Fa. Mitutoyo, Kawasaki, Japan) überprüft.

Nach dem Erreichen der benötigten Dicke wurden die Proben aus dem Kunststoff mit einem Skalpell herausgelöst, auf den TMR-Probenhaltern (Charité Facility Management GmbH, Mechanische Werkstätten (Campus Benjamin Franklin), Berlin, Deutschland) mit einem Klebeband („Leukofix“, BSN medical GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland) fixiert und bis zum Anfertigen der TMR – Bilder in Aqua dest. gelagert (Abbildung 18b).

Bevor die TMR-Aufnahmen gemacht wurden, wurden die Proben mit Ethylenglycol (Etylene glycol, 99+%, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) benetzt, um einer Austrocknung während der Anfertigung der Aufnahmen vorzubeugen. Der Filter an der Röntgenröhre (Feinstruktur-Feinfokus-Röntgenröhre (FF), Type: PW 2213/20, Fa. Panalytical, Kassel,

Deutschland) wurde auf Nickel (Ni) eingestellt und das Röntgengerät (Röntgenstrahlengenerator PW 1730/10, Philips, Eindhoven, Niederlande) hochgeheizt. Die Anfertigung der TMR-Bilder geschah bei 20 kV, 10 mA und einer Belichtungszeit von 10 sec auf einen Film (Motion Picture safety film Fuji fine grain positive film 71337, FUJIFILM Corporation, Tokyo, Japan). Die anschließende Filmentwicklung wurde in der Dunkelkammer nach Herstellerangaben durchgeführt (10.5 Ablauf der Filmentwicklung).

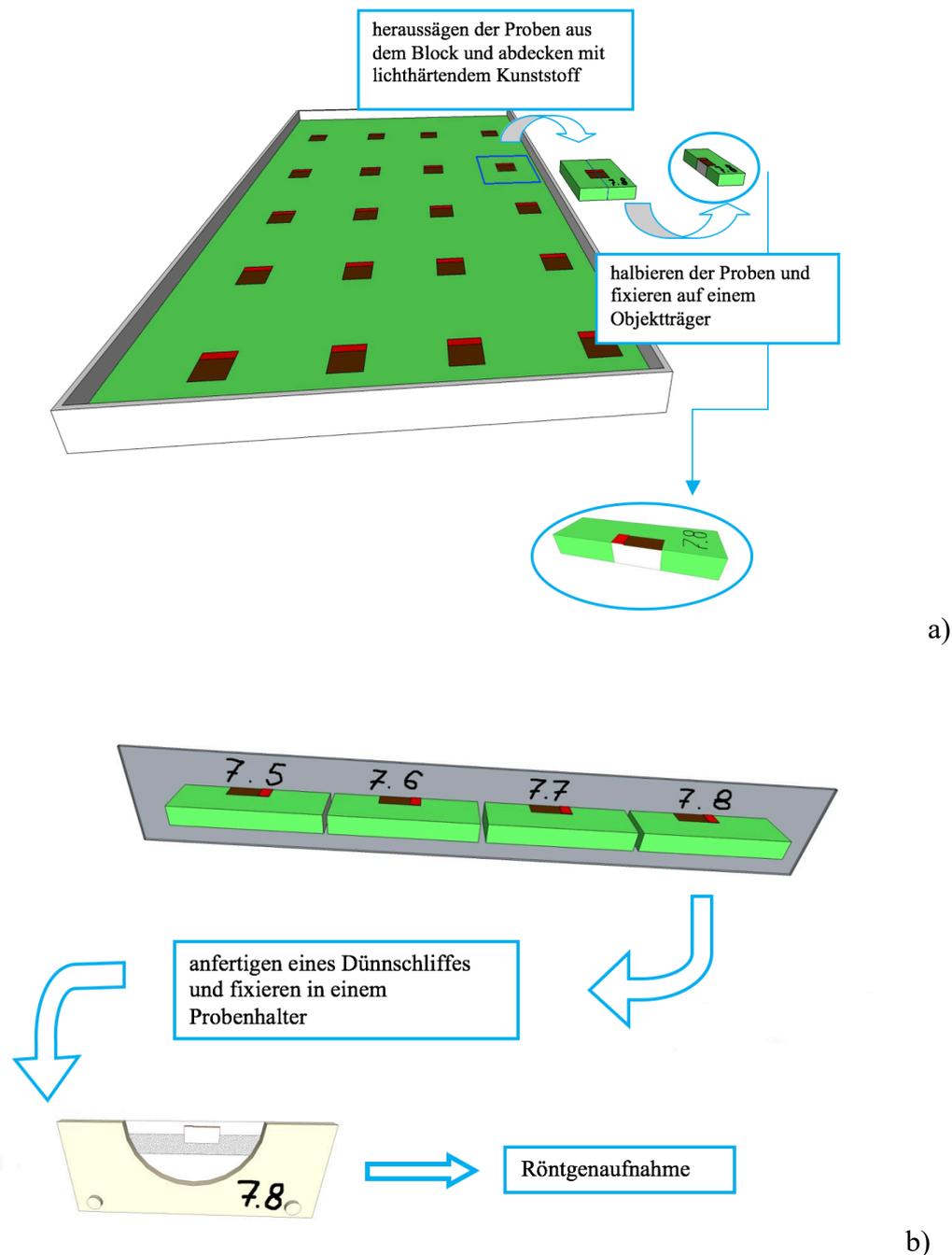


Abbildung 18 (a, b): Darstellung der Probenverarbeitung für die TMR-Aufnahmen.

5.8.2.2 Durchführung der TMR-Analyse

Der zu untersuchende Bildausschnitt der TMR-Aufnahmen wurde durch das Mikroskop (Durchlichtmikroskop "Axioskop 2", Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 10-facher Vergrößerung identifiziert und mit einer angeschlossenen Digitalkamera erfasst (CCD-Videokamera Modul XC 77 CE, Sony, Tokyo, Japan). Die Auswertung erfolgte mittels der Software TMR-WIM Program 2008 (TMR for Windows, Version 2.0.27.2, Inspektor Research, Amsterdam, Holland). Dabei wurden nach vorgegebener Anleitung die Läsionstiefen (L_d [μm]) und der Mineralverlust (ΔZ [$\text{vol}\% \times \mu\text{m}$]) anhand der unterschiedlichen Grauabstufungen zwischen Läsionen und Dentin unterhalb des Referenzbereichs ermittelt. Der Bildausschnitt wurde dabei so gewählt, dass auf jedem Bild ein Bereich außerhalb der Probe, der demineralisierte Dentinbereich und gesundes Dentin zu erkennen war (Abbildung 19).

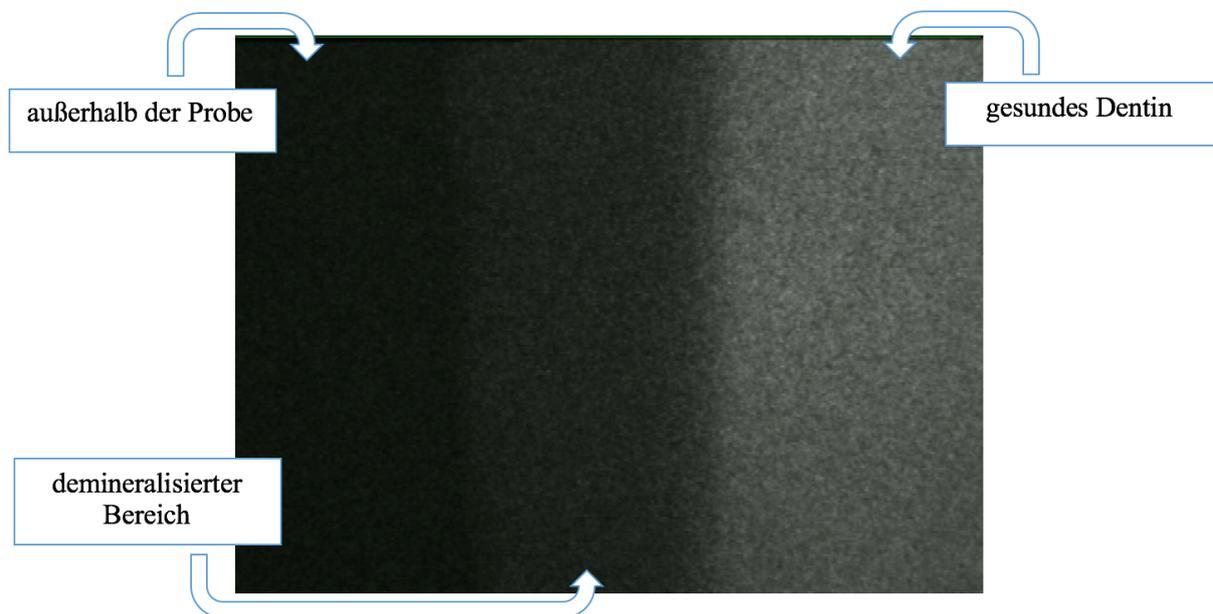


Abbildung 19: Beispiel eines Bildausschnittes aus der Gruppe 7. (Kontrollgruppe, Probennummer 20).

5.8.3 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde die Statistik- und Analyse-Software SPSS 22 (IBM, Armonk, USA) verwendet. Die Messwerte der Gruppen wurden mithilfe des Shapiro-Wilk-Test und Levene-Test auf Normalverteilung geprüft. Die Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich Mineralverlust, Läsionstiefe und CFU wurden mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA = analysis of variance) evaluiert. Da die Varianzen der Daten homogen verteilt waren, wurde der post-hoc Tukey Test durchgeführt, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu ermitteln. Das Signifikanzniveau wurde bei $\alpha = 0,05$ festgelegt.

6 Ergebnisse

6.1 Bakterienzahl

Zur Ermittlung der Bakterienzahl wurden die CFU im Biofilm unter der Verdünnung von 10^{-5} ermittelt. Unter der Verdünnung 10^{-7} waren entweder vereinzelt oder gar keine Kolonien gewachsen. Insgesamt waren in jeder Gruppe vereinzelt Agarplatten vorhanden, auf denen keine oder, im Vergleich zu den anderen Proben der Gruppe, eine große Anzahl Kolonien gewachsen waren.

Insgesamt gab es nur geringe Unterschiede bei den Bakterienzahlen zwischen den einzelnen Gruppen (Abbildung 20, Anhang 10.2: Tabelle 5). Die höchsten Bakterienzahlen wurden für NaFR (Mittelwert: 1,79 [$\log_{10}(\text{CFU/ml})$]) ermittelt (Abbildung 20, Anhang 10.2: Tabelle 5). Die niedrigsten Bakterienzahlen für NaFV und PV (beide 0,98). Die Proben der NaFR-Gruppe hatten signifikant höhere Bakterienzahlen als alle anderen Gruppen außer NaFVadj, PVadj und Control (Abbildung 20, Anhang 10.2: Tabelle 6). Insgesamt ließ sich in keiner Gruppe eine signifikant geringere Bakterienzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen, so dass die erste und dritte Nullhypothese bestätigt werden konnten.

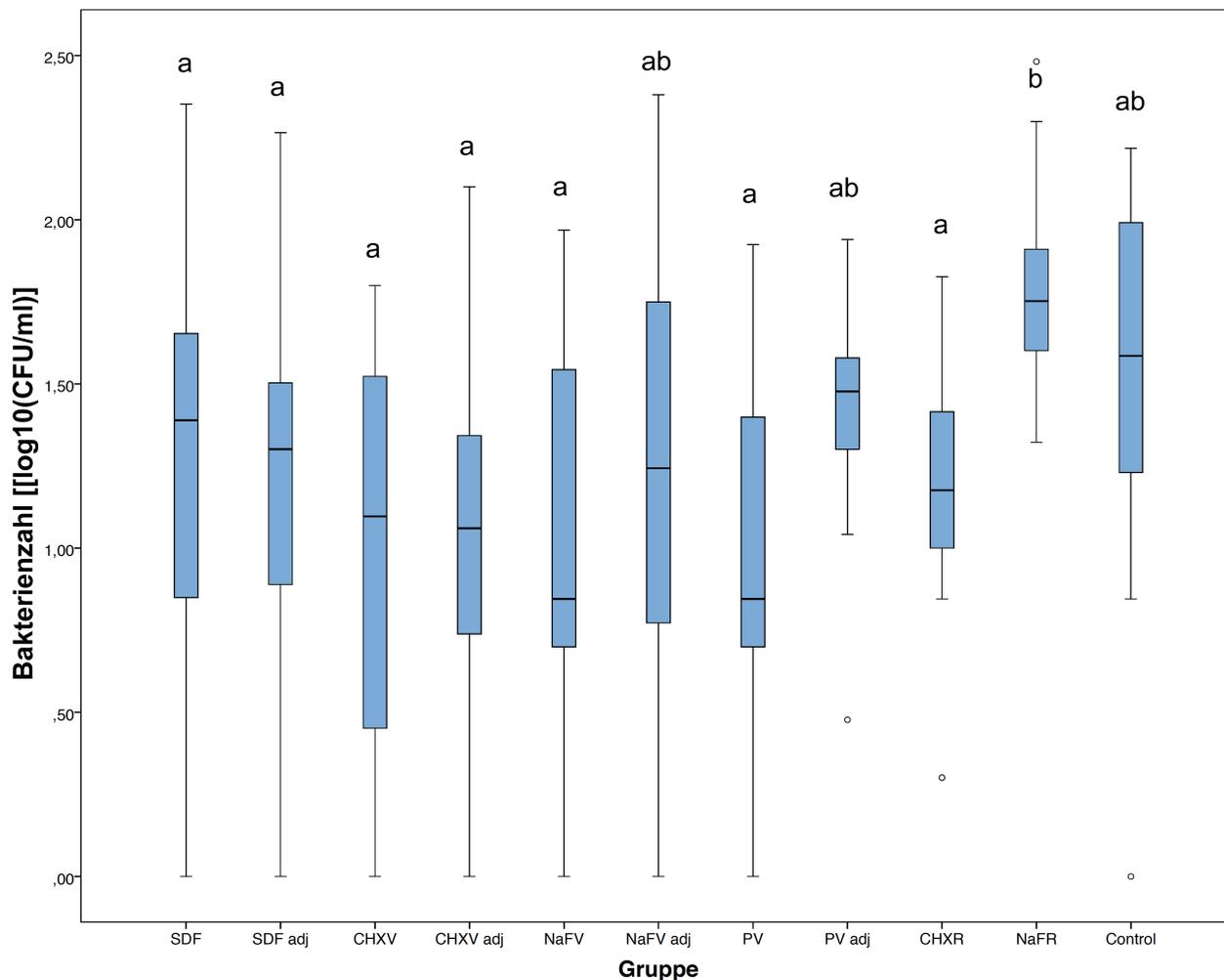


Abbildung 20: Box-and-Whisker-Plots für die Bakterienzahl [$\log_{10}(\text{CFU/ml})$] im Biofilm auf den Proben der einzelnen Gruppen. Angegeben sind Median, innere Quartile, Extremwerte und Ausreißer. Gruppen, die mit den gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Die Abkürzungen „V“ (varnish = Lack) und „R“ (rinse = Spülung) beschreiben, ob die Substanz in Form eines Lackes oder einer Spülung appliziert wurde. Die Abkürzung „adj“ (=adjacent) bei den Gruppen 1 bis 4 steht für den unbehandelten, an den Lack angrenzenden Dentinbereich.

6.2 Mineralverlust

Von den 140 hergestellten Proben konnten 5 Proben, aufgrund von Beschädigungen während der Herstellung der Dünnschliffe für die anschließende Auswertung nicht verwendet werden: eine Probe aus der PV / PV adj-Gruppe, zwei Proben aus der CHXR-Gruppe, zwei Proben aus der Kontrollgruppe.

Die Proben der NaFR-Gruppe hatten den geringsten Mineralverlust (Mittelwert: 4687,05 [$\text{vol}\% \times \mu\text{m}$]) (Abbildung 21, Anhang 10.2: Tabelle 7). Die Proben der Kontrollgruppe

(Control) hatte den stärksten Mineralverlust (11486,44). Die Werte für ΔZ an den Flächen, die an den Lacken angrenzten (-adj), sowie für CHXV und CHXR waren nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Kontrollgruppe. NaFR hatte einen signifikant geringeren Mineralverlust als alle anderen Gruppen ($p < 0,05$). NaFR, SDF, NaFV und PV hatten einen signifikant geringeren Mineralverlust im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 21, Anhang 10.2: Tabelle 8). Die zweite und vierte Nullhypothese konnten daher in Bezug auf den Mineralverlust nicht bestätigt werden.

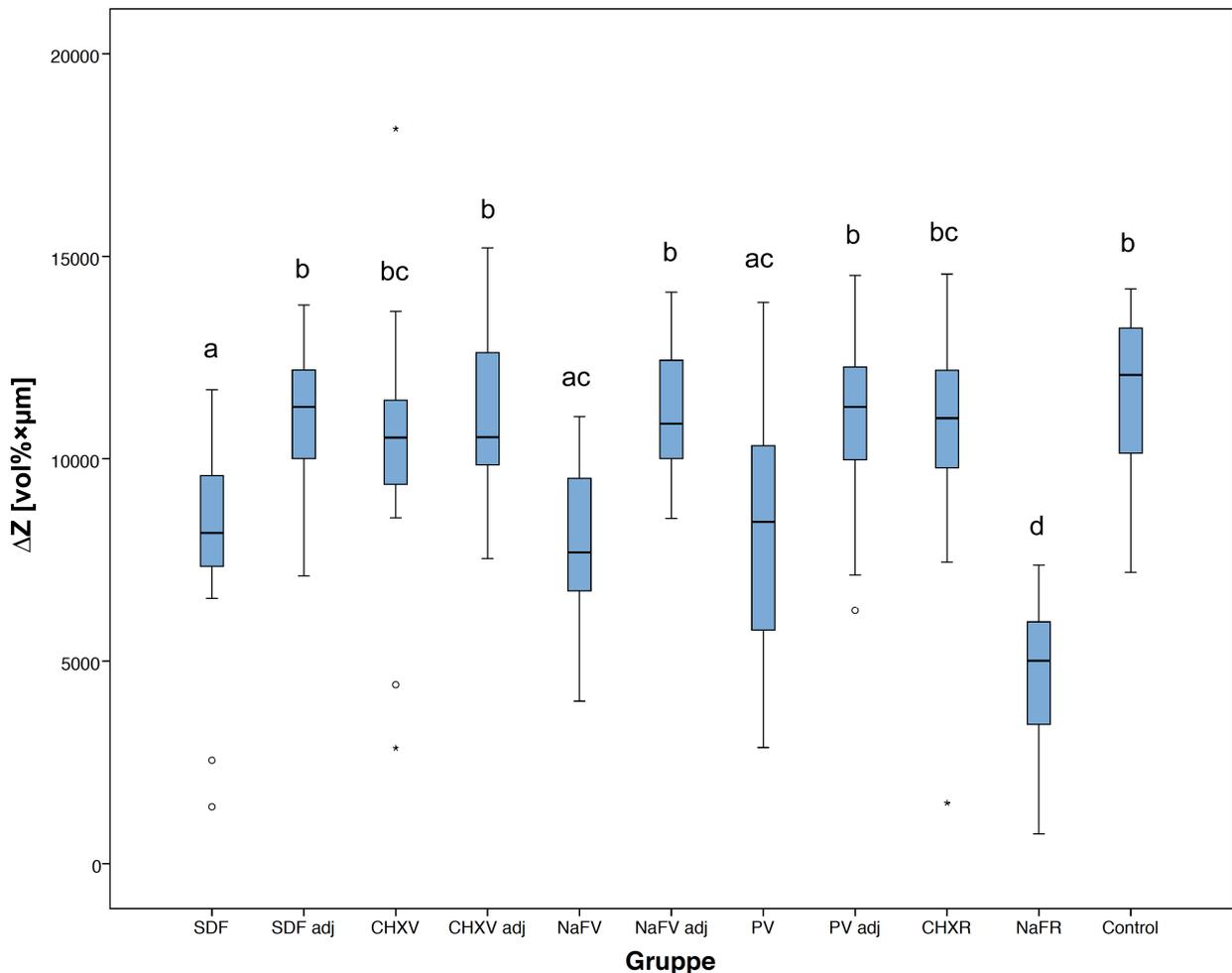


Abbildung 21: Box-and-Whisker-Plots für den Mineralverlust ΔZ [vol% $\times\mu\text{m}$] der einzelnen Gruppen. Angegeben sind Median, innere Quartile, Extremwerte und Ausreißer. Gruppen, die mit den gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

6.3 Läsionstiefe

Die Läsionstiefe wurde mit den TMR-Aufnahmen ermittelt, die auch für die Bestimmung des Mineralverlustes verwendet worden sind. Daher war auch hier aufgrund von Beschädigungen

während der Probenherstellung die Messung der Läsionstiefe bei 5 Proben (eine Probe aus der PV / PV adj-Gruppe, zwei Proben aus der CHXR-Gruppe, zwei Proben aus der Kontrollgruppe) nicht möglich.

Die Proben der NaFR-Gruppe hatten die geringsten Läsionstiefen (Mittelwert: 136,22 [μm]) (Abbildung 22, Anhang 10.2: Tabelle 9). In der Kontrollgruppe wurden die größten Läsionstiefen gemessen (Mittelwert: 496,38) (Abbildung 22, Anhang 10.2: Tabelle 9). Die Werte für die Kontrollgruppe waren nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den Läsionstiefen in der NaFV- (399,64 [μm]), CHXV- (439,02 [μm]) und CHXR-Gruppe (456,97 [μm]), sowie im Vergleich zu den an die Lackflächen angrenzenden Dentinoberflächen (-adj)-Gruppen. NaFR hatte signifikant geringere Läsionstiefen als alle anderen Gruppen ($p < 0,05$ (post-hoc Tukey)). NaFR, SDF und PV hatten signifikant geringere Läsionstiefen als die Kontrollgruppe (Abbildung 22, Anhang 10.2: Tabelle 10). Die zweite sowie die vierte Nullhypothese konnten daher auch in Bezug auf die Läsionstiefe nicht bestätigt werden.

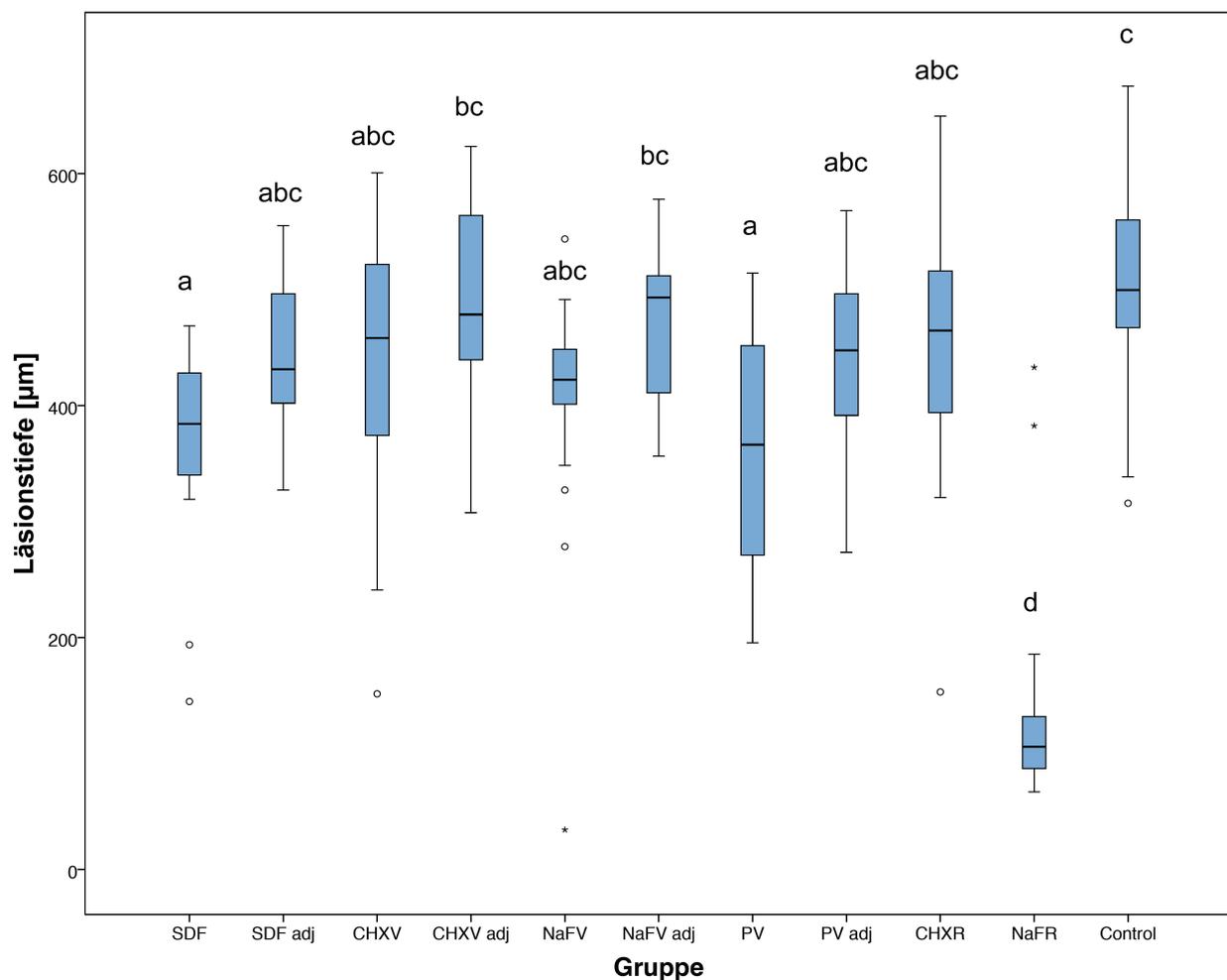


Abbildung 22: Box-and-Whiskers-Plots für die Läsionstiefe [μm] der einzelnen Gruppen. Angegeben sind Median, innere Quartile, Extremwerte und Ausreißer. Gruppen, die mit den gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

7 Diskussion

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel den Effekt verschiedener Substanzen zur Kariesprävention in unterschiedlichen Applikationsformen auf die Entstehung von Wurzelkaries zu untersuchen. Keine der Substanzen sowie auch die Trägersubstanz des Lackes hatten einen antibakteriellen Effekt gegenüber *LGG*. Daher wurden die erste und dritte Nullhypothese bestätigt. Einige der Substanzen und auch die Trägersubstanz des Lackes hatten jedoch einen signifikanten Einfluss auf den Mineralgehalt und die Läsionstiefe der im Biofilmmodell erzeugten Kariesläsionen. Daher wurden die zweite und vierte Nullhypothese verworfen.

7.1 Diskussion der Methodik

7.1.1 Herstellung der Proben

Aufgrund der zur Durchführung des Versuchs notwendigen Probengeometrie und –größe wurden Rinderzähne verwendet. Da menschliche Zähne um einiges kleiner sind, wäre deren Verwendung für diese Untersuchung problematisch gewesen. Rinderzähne sind jedoch in ihrer Struktur und in ihrem Verhalten unter kariogenen Bedingungen den menschlichen Zähnen sehr ähnlich^{84,85}. Da die Zähne von Rindern gleichen Alters stammen, bei denen zudem angenommen werden kann, dass sie mit ähnlicher Nahrung versorgt worden sind, bieten diese den Vorteil, dass Schwankungen im Mineralgehalt zwischen den Zähnen von unterschiedlichen Rindern gering sind^{85,86}.

Die Oberflächen der Dentinproben wurden bei der Probenherstellung begradigt und poliert. Diese Art der Oberflächenbeschaffenheit kommt bei natürlichen Zähnen im Mund nicht vor. Ohne die Politur hätten jedoch keine vergleichbaren Ausgangsbedingungen für die Kariesentstehung auf den Probenoberflächen vorgelegen. Auch wäre die Ermittlung des Mineralverlustes und der Läsionstiefe mittels TMR nicht möglich gewesen, da durch die natürliche Krümmung einer unbehandelten Wurzeloberfläche die Analyse, im Vergleich zu standardisierter Probengeometrie, zu Messfehlern hätte führen können. Proben mit vergleichbaren Geometrien wie in der vorliegenden Untersuchung wurden auch in einer Reihe anderer In-vitro-Studien verwendet^{68,87-91}.

Nach dem Polieren der Proben wurden die Dentinoberflächen für fünf Minuten mit 1-prozentiger Zitronensäure behandelt. Diese Maßnahme diente zur Entfernung der Schmierschicht. Die Schmierschicht besteht aus mikroskopisch kleinen Zahnfragmenten und bildet sich auf beschliffenen oder polierten Zahnoberflächen. Das Entfernen dieser Rückstände war notwendig, um eine Oberflächenversiegelung zu vermeiden und für alle Proben eine standardisierte Ausgangssituation zu schaffen. Diese Art der Vorbehandlung wurde ebenfalls in einer anderen In-vitro-Studie durchgeführt⁸⁷.

7.1.2 Biofilmmodell

Der Aufbau des Biofilmmodells war angelehnt an ein Biofilmmodell aus einer Studie von Sissons et al. von 1991⁹². Dieses Modell wurde modifiziert auch in anderen Studien zur Untersuchung von Maßnahmen zur Prävention von Karies eingesetzt^{88,93}. Für die Fragestellung der vorliegenden Untersuchung war es entscheidend, die kariogenen Bedingungen durch Bakterien zu erzeugen, da auch potentiell antibakteriell wirksame Substanzen (z.B. CHX und SDF) untersucht werden sollten. Dies wäre mit einem chemischen Modell nicht möglich gewesen.

Obwohl bereits einige klinische Studien verfügbar sind in denen der Effekt unterschiedlicher, auch in der vorliegenden Untersuchung verwendeter, Substanzen auf die Entstehung von Wurzelkaries untersucht worden sind^{66,94-97}, war es notwendig diese Substanzen auch unter In-vitro-Bedingungen zu testen. Dies hat mehrere Gründe: Zum einen weichen die Rahmenbedingungen unterschiedlicher klinischer Studien häufig deutlich voneinander ab, was einen Vergleich der Ergebnisse aus den verschiedenen Studien nicht immer uneingeschränkt erlaubt. Dabei werden in klinischen Studien die Testsubstanzen meist nur innerhalb der gleichen Darreichungsform (also z.B. nur Lack A vs. Lack B oder nur Spülung A vs. Spülung B) miteinander verglichen. Daher lassen die Ergebnisse bisher verfügbarer klinischer Untersuchungen keine klare Aussage über den relativen Effekt der einzelnen hier getesteten Substanzen in ihren unterschiedlichen Applikationsformen zu^{95,96}. Zum anderen ist es aus ethischen Gründen problematisch, die Substanzen unter so stark kariogenen Bedingungen zu testen, wie sie in der vorliegenden Studie simuliert worden sind. Solche Bedingungen sind jedoch bei pflegebedürftigen Senioren wahrscheinlich, bei denen nur eingeschränkt Mundhygienemaßnahmen durchgeführt werden können.

Insgesamt unterliegt die Aussagekraft von In-vitro-Studien jedoch Limitationen. So können nicht alle unter realen Bedingungen bei der Kariesentstehung involvierten Faktoren, wie zum Beispiel Mundhygienemaßnahmen oder Aufnahme und Abgabe der kariespräventiven Substanzen durch die orale Mukosa, im Biofilmmodell simuliert werden. An der oralen Mukosa, aber auch am Zahn, im Speichel oder im Biofilm ist unter realen Bedingungen ein Fluoridreservoir vorhanden⁹⁸. Dabei sind die Fluoride im Speichel die Hauptquelle für die Fluoridreservoirs der Mundhöhle⁹⁹. Die Simulation dieser Reservoirs ist unter In-vitro-Bedingungen bisher noch nicht gelungen.

Jedoch wurde in der vorliegenden Studie die Verdünnung des Fluorids durch den Speichel in einer Gruppe simuliert. Neben der täglichen Spülung mit künstlichem Speichel wurde in NaFR-Gruppe Fluorid in einer Konzentration von 500 ppm verwendet, um die Fluoridzufuhr durch einmal tägliches Zähneputzen zu simulieren. Diese Konzentration entspricht, durch den

verdünnenden Effekt des Speichel, in etwa der Fluoridkonzentration in der Mundhöhle beim Zähneputzen mit einer handelsüblichen Zahnpasta (ca. 1500 ppm)⁸⁵.

Neben der Fluoridlösung wurde auch der Einfluss einer CHX-Spülung untersucht. CHX wird vor allem in Form von Lacken oder Gelen zur Kariesprävention eingesetzt. In Form von Spüllösungen kommt diese Substanz eher zur Vorbeugung und Behandlung von Parodontalerkrankungen zum Einsatz und weist in dieser Applikationsform den Nachteil auf, dass es zu Verfärbungen von Zähnen und Zunge und zu Geschmacksirritationen kommen kann⁶³. Bei Patienten mit einem extremen Kariesrisiko wäre jedoch auch die Applikation als Spüllösung zur Kariesprävention zu rechtfertigen wenn diese wirksam wäre. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Untersuchung auch der Effekt von CHX in Form einer Spüllösung auf Wurzelkaries untersucht.

Die kariogenen Bedingungen im Biofilmodell wurden durch eine *LGG* Monokultur erzeugt. In klinischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Laktobazillen, dabei auch *LGG*, im Biofilm von Wurzelkariesläsionen bei älteren Patienten häufig vorhanden sind und damit bei der Entstehung und dem Fortschreiten von Wurzelkaries eine Rolle zu spielen scheinen⁴⁰. In einer In-vitro-Untersuchung konnte zudem gezeigt werden, dass *LGG* nicht nur direkt kariogene Bedingungen bei einer bereits bestehenden Kavität erzeugt, sondern auch die von anderen Mikroorganismen erzeugten kariogenen Bedingungen verstärkt⁸⁸. In kariogenen Biofilmen unter klinischen Bedingungen kommen jedoch eine Vielzahl unterschiedlicher Mikroorganismen vor und die Struktur des Biofilms ist deutlich komplexer. In diesen Biofilmen laufen unterschiedliche biochemische Prozesse ab und die bakterielle Zusammensetzung variiert je nach Situation und Gegebenheit stark sowohl intra- als auch interindividuell⁴⁰. Obwohl schon Biofilmodelle mit mehreren Bakterienspezies verfügbar sind, können natürliche karieserzeugende Bedingungen, wie sie bei Patienten vorzufinden sind, unter In-vitro-Bedingungen derzeit noch nicht vollständig simuliert werden⁸². Daher sollte weiter daran geforscht werden Mundmodelle zu entwickeln, die der klinischen Situation besser entsprechen, um die komplexen Abläufe oraler Biofilme besser simulieren zu können.

LGG stellte sich in unserer Untersuchung als stark kariogener Keim heraus, was auch bereits in einer anderen Untersuchung gezeigt wurde⁸⁸. Umso erstaunlicher ist es, dass dieser Keim auch für probiotische Anwendungen genutzt wird. So wird eine positive Wirkung von *LGG* bei bestehenden Atemwegserkrankungen bei Kindern diskutiert¹⁰⁰. Für Harn- und Geschlechtsorgane wird durch die Besiedlung von *LGG* versucht ein Schutz aufzubauen, der vor einer Ansiedlung von möglicherweise pathogenen Keimen schützen soll¹⁰¹. In Tierversuchen hat die Verwendung von Probiotika, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* und *Bifidobacterium lactis*, zu positiven Auswirkungen auf das Immunsystem geführt¹⁰². Eine

klinische Studie kam sogar zu dem Schluss, dass durch *LGG* angereicherte fluoridhaltige Milch das Kariesrisiko, ebenso wie das Risiko für andere bakteriell bedingte Erkrankungen (zum Beispiel Mittelohrentzündungen bei Kindern) gesenkt werden kann¹⁰³. Insgesamt ist der Nutzen der bisher verfügbaren Probiotika für die Prävention oraler Erkrankungen jedoch nicht ausreichend klinisch belegt¹⁰⁴. Die Tatsache, dass *LGG* in der vorliegenden Studie und auch in anderen Studien^{88,105,106} stark kariogene Bedingungen erzeugte, lassen einen kariespräventiven Nutzen dieses Keimes zweifelhaft erscheinen.

In der vorliegenden Untersuchung wurden die derzeit am häufigsten zur Kariesprävention eingesetzten Substanzen in ihren gängigen Applikationsformen (Spüllösungen und Lacke) untersucht. Bei den Lacken bestand eine Schwierigkeit darin einen möglichen Barriere-Effekt gegenüber Säuren, allein durch die Bedeckung mit dem Lack, zu minimieren. Dafür wurde ein Abtrag der Lacke von der Oberfläche simuliert, wie er auch unter klinischen Bedingungen denkbar wäre: die Lacke wurden nach einer Einwirkzeit von fünf Minuten mit einer Handzahnbürste entfernt. Wie sich in den Vorversuchen herausgestellt hatte, konnten die Lacke nach einer längeren Einwirkzeit nicht mehr kontrolliert mit der Handzahnbürste entfernt werden. Ein Abtrag mit einem Skalpell wäre möglich gewesen, hätte jedoch zu einer Beschädigung der polierten Oberfläche führen können. Die Schwierigkeit der Lackentfernung nach einer längeren Inkubationszeit wurde auch in einer anderen In-vitro-Untersuchung festgestellt¹⁰⁷. Um nach dem Abtrag mit der Handzahnbürste Unterschiede bei der Oberflächenrauigkeit, und dadurch mögliche Plaqueakkumulationsstellen, zwischen den jeweiligen Gruppen ausschließen zu können, wurde die Oberflächenrauigkeit an exemplarischen Proben jeder Gruppe gemessen (vgl. Kapitel 10.1.2.1). Es konnte gezeigt werden, dass sich die Rauigkeit der Zahnoberflächen nach dem Substanzabtrag mit der Zahnbürste nicht unterschieden.

Als Substrat wurde den *LGG*-Kulturen MRS-Bouillon zugeführt, der 1% Saccharose zugesetzt war. Das Kultivieren von *LGG* wurde ebenfalls auf MRS-Agar durchgeführt. Aufgrund des geringen pH-Wertes (pH-Wert: $6,2 \pm 0,2$)¹⁰⁸ bietet MRS zur Kultivierung von Laktobazillen Vorteile gegenüber Standardsubstraten, wie zum Beispiel Brain-Heart-Infusion (BHI, pH-Wert: $7,4 \pm 0,2$)¹⁰⁸, jedoch können beide Medien zur Kultivierung verwendet werden⁸⁸. Der Vorteil bei MRS besteht darin, dass *LGG* bei einem geringeren pH-Wert bessere Lebensbedingung hat als andere Bakterien und so die Gefahr einer Kontamination mit anderen Keimen reduziert werden kann. Der Zusatz von Saccharose in einer Konzentration von 1% erfolgte um für die *LGG*-Kulturen eine ausgeprägte Substratzufuhr zu simulieren und um so die kariogenen Bedingungen im Mundmodell zu verstärken^{109,110}. Die Gabe von zusätzlicher Saccharose in ähnlichen Konzentrationen (1 % bzw. 2 %) erfolgte auch in anderen Studien^{88,105,106}. Durch die hohe Frequenz der Substratzufuhr bei gleichzeitig fehlender Biofilmentfernung (Simulation einer

mechanischen Plaquekontrolle) wurden kariogene Bedingungen erzeugt, wie sie in der Klinik wahrscheinlich nur bei Patienten vorzufinden sind, die häufig niedermolekulare Kohlenhydrate zu sich nehmen und dabei keine Plaqueentfernung durchführen. Die Erzeugung dieser Umgebung im Rahmen unserer Studie war jedoch notwendig um in einem kontrollierbaren Zeitraum die Kariesläsionen zu erzeugen.

7.1.3 Analyseverfahren

In bisherigen In-vitro-Studien wurden meist entweder mineralisationsfördernde oder antibakterielle Substanzen zur Kariesprävention untersucht^{57,59,68,87,111-113}. In der vorliegenden Studie wurden beide Substanzarten eingesetzt und untersucht. Somit war es notwendig die Auswertung der Proben auf zwei Arten vorzunehmen: die Messung der Bakterienzahl zur Evaluation von antibakteriellen Effekten und die Messung von Mineralverlust und Läsionstiefe über die TMR, um mineralisationsfördernde Eigenschaften zu evaluieren.

7.1.3.1 Messung der Bakterienzahl

Nach Versuchsende wurde der Biofilm von den Proben der jeweiligen Gruppen abgetragen und für die Erstellung der CFU-Analyse verwendet. Um die CFU der einzelnen Proben mit einander vergleichen zu können, war ein definierter und gleichmäßiger Abtrag des Biofilms entscheidend, bei dem die Probenoberfläche nicht zerstört wurde. Dies wurde durch gezieltes Abtragen des Biofilms auf einer definierten Fläche mit einem Einmalskalpell gewährleistet. Durch Untersuchungen im Durchlichtmikroskop konnte gezeigt werden, dass die Oberfläche durch diese Vorgehensweise nicht beschädigt wurde.

Eine potentielle Gefahr bei Untersuchungen auf Basis von Biofilmmodellen ist eine Kontamination mit Fremdkeimen. Um sicherzustellen, dass es sich bei den Keimen im Biofilmmodell tatsächlich ausschließlich um *LGG* handelte und keine Kontamination durch andere Keime vorlag, wurden exemplarisch nach Versuchsende Kolonien mikroskopiert, gramgefärbt und eine phenotypische Beurteilung vorgenommen. Hierbei wurde keine Kontamination durch andere Mikroorganismen festgestellt. Durch die Verwendung von MRS, welches sich aufgrund des niedrigen pH-Wertes für eine spezifische Kultivierung von *LGG* eignet, konnte weiterhin die Gefahr einer möglichen Kontamination durch Fremdkeime minimiert werden.

Das Verfahren der CFU-Bestimmung ist ein Standardverfahren zur quantitativen Evaluation von Bakterien¹¹⁴. Ein weiteres Verfahren zur Bestimmung der Bakterienanzahl wäre zum Beispiel die Durchführung eines Polymerasekettenreaktionstests. Die Ausführung dieses Tests ist jedoch umfangreicher und ist erst bei der Verwendung verschiedener Bakterienspezies sinnvoll¹¹⁵.

7.1.3.2 Messung von Mineralverlust und Läsionstiefe

Der Mineralverlust sowie die Läsionstiefe wurden mittels TMR bestimmt. Da bei dieser Methode die Proben geröntgt werden, wäre es denkbar gewesen, dass die in SDF enthaltenen radioopaken Silberpartikel die Ergebnisse der TMR Auswertung hätten verfälschen können. Daher wurden in anderen In-vitro-Studien, in denen ebenfalls der Einfluss von SDF auf Kariesläsionen untersucht wurde, auch andere Analyseverfahren genutzt. Dabei handelte es sich zum Beispiel um die konfokale Mikroskopie, die Röntgenbeugung und der Mikro-CT-Test zur Ermittlung des Mineralverlustes^{57,87,90}. Dennoch stellt das Verfahren der TMR nach wie vor ein Standardverfahren für die Analyse des Mineralgehalts in Kariesläsionen im Rahmen von In-vitro-Studien dar¹¹⁶. Durch die in den Vorversuchen angefertigten Analysen mittels Energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) von mit SDF behandelten Proben konnte gezeigt werden, dass es in unserem Versuchsaufbau zu keiner relevanten Anreicherung von Silberpartikeln auf der Probenoberfläche und in den Kariesläsionen kam (Anhang, 10.1.2). Somit konnte eine potentielle Verfälschung der TMR-Aufnahmen durch Silberpartikel ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis wird auch durch eine andere In-vitro-Studie bestätigt¹¹⁷.

7.2 Diskussion der Ergebnisse

7.2.1 Bakterienzahlen

Keine der untersuchten Substanzen hatte einen antibakteriellen Effekt auf *LGG*, da es bei keiner Substanz zu einer signifikanten Keimreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe kam. Dementsprechend kam es auch in den angrenzenden Bereichen von den applizierten Lacken nicht zu einer Keimreduktion. Dieses Ergebnis war insbesondere für die Proben überraschend, die mit CHX behandelt worden waren. CHX gilt als eine stark antibakteriell wirksame Substanz, deren bakterienhemmender Effekt für viele kariespathogene Keime (unter anderem *Streptococcus mutans*) nachgewiesen ist⁶¹.

Der mangelnde antibakterielle Effekt von CHX in der vorliegenden Untersuchung kann durch die Verwendung von *LGG* als Monokultur erklärt werden. So scheinen verschiedene Keime unterschiedlich stark auf CHX zu reagieren. Eine andere In-vitro-Studie konnte eine signifikante Reduktion von anderen kariespathogenen Keimen wie *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* und *Actinomyces naeslundii* durch CHX finden. In der gleichen Studie zeigte CHX jedoch, analog zu den Ergebnissen unserer Untersuchung, keine Reduktion von *Lactobacillus rhamnosus* Kulturen¹¹⁸. So scheint CHX bei Keimen dieser Art nur begrenzt wirksam zu sein. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte mit einem durch Laktobazillen erzeugten geringen pH-Wert im Biofilm zusammenhängen. So ist bekannt, dass CHX im neutralen bis leicht alkalischen pH-Wert seine beste Wirksamkeit entfaltet¹¹⁹. Die ausgeprägt

azidogenen und azidurischen Eigenschaften von Laktobazillen⁴¹ können im Rahmen der vorliegenden Studie zu einem Biofilm mit sehr niedrigem pH-Wert geführt haben, in dem die Wirksamkeit des CHXs deutlich reduziert war^{95,120}. Weitere Studien sollten die pH-Werte in Biofilmen, verursacht von unterschiedlichen Bakterienspezies, und deren Einfluss auf die Wirkung von CHX, genauer analysieren.

Inwieweit unter klinischen Bedingungen eine selektive Keimreduktion in komplexen kariogenen Biofilmen präventiv wirksam wäre, kann derzeit nicht abschließend geklärt werden. Jedenfalls war CHX-Lack in einigen klinischen Studien effektiv bei der Prävention von Wurzelkaries⁹⁶. Andererseits ist es denkbar, dass kariespathogene Keime wie *Lactobacillus rhamnosus*, bei denen CHX nicht wirksam ist, sich weiter in Biofilmen organisieren und so weiterhin kariogene Bedingungen erzeugen. Unter diesen Voraussetzungen hätte CHX theoretisch keinen kariespräventiven Effekt. Weitere Studien unter Einsatz von Biofilmen mit komplexerer Zusammensetzung sollten daher untersuchen, inwieweit eine selektive Hemmung einiger kariespathogener Keime die Kariogenität des Biofilms insgesamt reduzieren kann.

Auch für die Proben der SDF-Gruppe konnte in der vorliegenden Studie kein antibakterieller Effekt gefunden werden. Jedoch sollte SDF durch das Vorhandensein von Silberionen theoretisch antibakteriell wirksam sein. Silberionen führen zu einer Behinderung des Zellstoffwechsels in den Bakterien und wirken gleichzeitig auf die Replikation der bakteriellen DNA ein⁵⁷. Andere Studien konnten einen entsprechenden antibakteriellen Effekt von SDF unter In-vitro-Bedingungen bereits nachweisen^{57,68,87,90}. Jedoch wurden in diesen Studien andere Keime untersucht als *LGG*. Außerdem wurden teilweise Dual- beziehungsweise Multispezies Biofilme in diesen Studien untersucht^{68,87}. So wäre es analog zu CHX auch für SDF möglich, dass es nicht bei allen Keimen wirksam ist.

Eine andere Erklärung für den mangelnden antibakteriellen Effekt des SDFs könnte sein, dass nach der Behandlung mit SDF keine relevante Menge Silberpartikel an der Probe nachgewiesen werden konnten (Anhang, 10.1.2 Ergebnisse). Dies könnte an der Art der Applikation des SDF-Produktes (Riva Star™) liegen. So wurden gemäß den Herstellerangaben nach der Applikation des SDFs die behandelten Probenoberflächen mit Kaliumjodid behandelt, um eine Schwarzfärbung der Zahnoberfläche zu verhindern¹²¹. Diese zusätzliche Behandlung könnte zu einer Reduktion des antibakteriellen Effekts von SDF geführt haben. Eine Nebenbeobachtung der Studie war, dass dieser entfärbende Effekt des Kaliumjodids nur temporär anhielt. Im Verlauf des Versuches trat die Schwarzfärbung der mit SDF behandelten Proben wieder auf, was auch in einer klinischen Studie beobachtet wurde¹²².

Klinisch scheint SDF zur Prävention, aber auch zur Arretierung von Wurzelkaries effektiv zu sein⁹⁶. Inwieweit der klinische Effekt des SDF auf antibakterielle Eigenschaften oder auf den

Einfluss des enthaltenden Fluorids auf die Mineralisation des Zahnes beruht, ist noch nicht abschließend geklärt. Weitere Studien sollten die antibakterielle Wirkung von SDF, appliziert mit oder ohne Kaliumjodid, auf komplexe Biofilme untersuchen.

Das in der vorliegenden Untersuchung verwendete Natriumfluorid zeigte weder in Form eines Lackes noch als Spüllösung eine antibakterielle Wirkung. Die Bakterienzahl im Biofilm bei der NaFR-Gruppe war sogar signifikant höher im Vergleich zur SDF-, SDFadj-, CHXV-, CHXVadj-, NaFV-, PV- und CHXR-Gruppe. Zwar kann theoretisch durch Fluoride der Kohlenhydratstoffwechsel von kariespathogenen Keimen beeinflusst und damit das Bakterienwachstum gehemmt werden⁵⁸. Jedoch zeigten auch andere Studien nur einen begrenzten antibakteriellen Effekt von Fluorid^{59,123,124}. Eine klinische Untersuchung fand jedoch zumindest bei einem hochkonzentrierten Fluoridlack einen antibakteriellen Effekt auf den Zahnoberflächen bei Kindern¹²⁵. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass sowohl die Anwendung von Fluoriden (als Lack appliziert) als auch die Anwendung von CHX (als Lack in Kombination mit einem Gel appliziert) die Anzahl von *Streptococcus mutans* und Laktobazillen im Biofilm auf den behandelten Zahnoberflächen reduzieren. Inwieweit dieses Ergebnis auf tatsächliche antibakterielle Eigenschaften von Fluoriden oder aber auf andere Effekte, wie zum Beispiel einen möglichen Einfluss der Trägersubstanz, dem Lack, zurückzuführen ist, kann anhand der Daten dieser klinischen Studie nicht geklärt werden. Insgesamt gilt es jedoch als erwiesen, dass die primäre Wirkung von Fluorid weniger auf antibakterielle Eigenschaften, sondern viel mehr auf die Beeinflussung der Mineralisation beruht¹²⁶.

7.2.2 Mineralverlust und Läsionstiefe

Bei der TMR-Analyse konnten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sowohl in Bezug auf den Mineralverlust als auch bei der Läsionstiefe gefunden werden. Beide Parameter waren bei den Proben der NaFR-Gruppe signifikant geringer als in den anderen Gruppen. Die tägliche Anwendung einer Fluoridlösung war also innerhalb der vorliegenden Studie am effektivsten zur Wurzelkariesprävention. Dieses Ergebnis stimmt mit einer Übersichtsarbeit von klinischen Studien überein, in der die regelmäßige Fluoridspülung zur Prävention von Wurzelkaries effektiver war im Vergleich zur Fluoridapplikation in Form von Lacken⁹⁴. Auch in anderen In-vitro-Untersuchungen konnte unter Nutzung eines chemischen Kariesmodells¹¹¹, beziehungsweise unter Verwendung eines Biofilmmodells mit *Streptococcus mutans*⁵⁹, ein kariespräventiver Effekt bei der regelmäßigen Anwendung einer Fluoridspüllösung auf die Entstehung von Wurzelkaries gezeigt werden. Dieser Effekt scheint umso größer zu sein, je höher die in der Lösung enthaltene Fluoridkonzentration ist^{59,111,127}.

Der in der vorliegenden Studie verwendete Fluoridlack hatte eine deutlich höhere Fluoridkonzentration (22600 ppm) im Vergleich zu der Fluoridlösung (500 ppm). Er hatte zwar einen kariespräventiven Effekt (Mineralverlust war signifikant geringer im Vergleich zur Kontrollgruppe), jedoch war dieser Effekt signifikant geringer als bei den Proben, welche die Fluoridlösung erhielten. Es kann daher vermutet werden, dass die nach der Applikation und dem anschließenden Entfernen des Fluoridlacks auf der Probenoberfläche vorhandene Fluoridkonzentration im Biofilmmodell geringer war als die Konzentration, die durch die regelmäßig zugeführte Fluoridlösung erreicht werden konnte.

Die Lacke wurden in unserem Versuch von den Probenoberflächen entfernt, um die Elimination einer Lackschicht unter natürlichen Bedingungen in der Mundhöhle, zum Beispiel durch Mastikation, nachzuahmen. In klinischen Situationen ist es jedoch auch denkbar, dass ein Fluoridlack, zumindest in schwer zugänglichen Bereichen, über längere Zeiträume verbleibt und so Fluorid in höheren Konzentrationen an den Zahn abgeben werden kann. Dass so geschaffene Fluoridreservoir könnte theoretisch auch angrenzende Zahnflächen vor einer Kariesentstehung schützen, indem kontinuierlich Fluorid abgegeben wird. Im Gegensatz zu dieser Annahme konnte in einer In-situ-Studie gezeigt werden, dass Fluoridlack unter klinischen Bedingungen nur die durch den Lack bedeckte Oberfläche vor Karies schützte¹²⁸. In der gleichen Studie schützte jedoch ein CHX-Lack auch den an den Applikationsort angrenzenden Bereich. Ein Fluoridlack scheint also vor allem in dem Bereich wirksam zu sein, den er bedeckt. Dabei ist nicht abschließend geklärt, worauf diese Wirkung beruht. Neben der Fluoridabgabe wäre auch die Schaffung einer mechanischen Barriere gegenüber Säuren oder kariogenen Mikroorganismen denkbar. Ein solcher Effekt konnte auch in der vorliegenden Studie beobachtet werden. Denn auch der verwendete Placebolack bot einen gewissen Schutz vor der Entstehung von Wurzelkaries. So waren Mineralverlust und Läsionstiefe bei den mit Placebolack bedeckten Proben signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. Dass bei den Proben in den Lack-Gruppen nach der Lackentfernung noch eine dünne Schicht Lack auf der Probenoberfläche vorhanden war, die als Barriere hätte wirken können, konnte durch die Inspektion unter dem Durchlichtmikroskop bestätigt werden. Dieses Ergebnis steht jedoch im Widerspruch zu einer klinischen Studie, in der ein Placebolack keinen kariesprotektiven Effekt hatte¹²⁸. In dieser Studie wurde jedoch ein Placebolack mit einer anderen Zusammensetzung verwendet als in der vorliegenden Studie. So ist es möglich, dass die Zusammensetzung der Trägersubstanz für den kariespräventiven Effekt von Lacken eine größere Rolle spielen könnte als bisher angenommen. In weiteren Studien sollte untersucht werden durch welche Parameter, wie zum Beispiel Lösungs- und Haftungsverhalten, ein potentieller kariespräventiver Effekt durch die Zusammensetzung der Trägersubstanz von Lacken moduliert werden kann.

Der in der vorliegenden Studie verwendete CHX-Lack bot keinen kariespräventiven Schutz. Mineralverlust und Läsionstiefe bei den Proben dieser Gruppe waren zwar geringer als bei den Proben der Kontrollgruppe, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Klinische Studien konnten im Gegensatz dazu zeigen, dass CHX-Lack bei der Prävention von Wurzelkaries wirksam ist⁹⁶. Wie bereits erwähnt, kann die mangelnde Wirksamkeit durch einen begrenzten antibakteriellen Effekt gegenüber den sauren Bedingungen der *LGG*-Monokultur erklärt werden. Aber auch beim CHX-Lack hätte es zumindest zu einem gewissen Schutz durch eine Barrierewirkung, wie auch bei den anderen Lacken, kommen können. Der Placebolack, der wahrscheinlich durch einen solchen Barriereeffekt einen signifikanten kariespräventiven Effekt aufwies, hatte, abgesehen von dem CHX, die gleichen Inhaltsstoffe wie der CHX-Lack. Es kann spekuliert werden, ob der CHX-Zusatz zum Lack zu einer Reduzierung physikalischer Eigenschaften der Trägersubstanz geführt haben könnte, die zu einer verminderten Barrierewirkung geführt haben könnte.

Die Proben der SDF-Gruppe hatten im Vergleich zur Kontrollgruppe einen signifikant geringeren Mineralverlust und eine signifikant geringere Läsionstiefe. Auch in anderen Studien wurde ein positiver Effekt von SDF auf die Mineralisation von Zahnhartsubstanz gefunden^{57,87,90}. Neben mineralisationsfördernden Eigenschaften schützt SDF auch vor dem enzymatischen Abbau der Dentinmatrix, was diese Substanz als vielversprechenden Kandidaten für die Prävention von Wurzelkaries erscheinen lässt⁷¹. Jedoch war der Effekt des SDFs auf Mineralverlust und Läsionstiefe signifikant geringer im Vergleich zur täglichen Spülung mit NaF. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass sich nach der Applikation des SDFs nur eine geringe Menge an Silber und Fluorid der Oberfläche angelagert hat. So zeigte die EDX-Analyse im Rahmen der Vorversuche, dass nach Applikation und Entfernung von SDF mit der Zahnbürste keine relevante Menge an Silberpartikeln in und auf den Proben vorhanden war (Anhang 10.1.2 Ergebnisse). Dass die Applikation zumindest die Oberfläche der Dentinproben verändert hat, kann jedoch angenommen werden, da alle Proben der SDF-Gruppe eine Schwarzfärbung nach der Biofilmphase aufwiesen. Diese Schwarzfärbung ist typisch für die Anwendung von SDF und muss beim klinischen Einsatz als Nebenwirkung in Kauf genommen werden. Inwieweit der begrenzte kariespräventive Effekt des SDFs in der vorliegenden Studie auf die Parameter des Versuchsaufbaus zurückzuführen ist oder ob die tägliche Anwendung von Fluorid in Form von Zahnpasta oder Spülung der einmaligen Applikation von SDF überlegen ist sollte weiter untersucht werden. Hierfür wären Studien sinnvoll, welche den Effekt von SDF und Fluoridlösung auf Wurzelkaries unter klinischen Bedingungen direkt miteinander vergleichen.

8 Schlussfolgerung

Innerhalb der Limitationen der vorliegenden In-vitro-Studie kann geschlussfolgert werden, dass die tägliche Anwendung einer Fluoridlösung den besten Effekt bei der Prävention von Wurzelkaries hat. Die einmalige Applikation von Silberdiaminfluorid, Placebolack oder Fluoridlack hat ebenfalls einen kariespräventiven Effekt, der jedoch geringer ausfällt. Dagegen wirkt CHX weder als Lack noch als Spüllösung kariespräventiv. Da keine der untersuchten Substanzen die Bakterienzahlen signifikant reduzierte, nehmen wir an, dass die gefundenen Effekte auf die Beeinflussung der Mineralisation und / oder im Fall der Lacke auf die Bildung einer die Zahnoberfläche schützende Barriere zurückzuführen sind. In weiteren Studien sollten diese gefundenen Effekte näher untersucht werden, um daraus klinische Empfehlungen ableiten zu können.

9 Literaturverzeichnis

1. Shellis P. Ätiologie und Pathogenese der Karies. In: Meyer-Lückel H, Paris S, Ekstrand K, eds. *Karies: Wissenschaft und klinische Praxis (ZMK-Praxis)*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012:23.
2. Hay DI, Moreno EC. Macromolecular Inhibitors of Calcium Phosphate Inhibition in human Saliva. Their Roles in Providing a Protective Environment for the Teeth. In: Kleinberg I, Ellison S, Mandel I, eds. *Saliva and Dental Caries*. New York: IRL Press; 1979:45–58.
3. Marsh P, Martin M. *Oral Microbiology*. 3 rd ed. London: Chapman Hall; 1992.
4. Shellis P. Ätiologie und Pathogenese der Karies. In: Meyer-Lückel H, Paris S, Ekstrand K, eds. *Karies: Wissenschaft und klinische Praxis (ZMK-Praxis)*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012:25-26.
5. Statistisches, Bundesamt, Wiesbaden. Bevölkerung Deutschlands bis 2060, 13. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung. pdf Dokument, Seite 11. Available at: https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressekonferenzen/2015/bevoelkerung/Pressebrochuere_Bevoelk2060.pdf?__blob=publicationFile. Accessed April 7, 2018.
6. Jordan AR, Micheelis W. Krankheits- und Versorgungsprävalenz bei älteren Senioren (75- bis 100-Jährige). Karies und Erosionen. *Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V)*. Köln: Institut der deutschen Zahnärzte (IDZ); 2016:485-486, 493.
7. Mamai-Homata E, Topitsoglou V, Oulis C, Margaritis V, Polychronopoulou A. Risk indicators of coronal and root caries in Greek middle aged adults and senior citizens. *BMC Public Health*. 2012;12:484.
8. Batista MJ, Rando-Meirelles MP, Sousa Mda L. [Prevalence of root caries among adults and the elderly in southeast Brazil]. *Rev Panam Salud Publica*. 2014;35(1):23-29.
9. Jordan AR, Micheelis W. Krankheits- und Versorgungsprävalenzen bei jüngeren Senioren (65- bis 74-Jährige). Karies und Erosionen. *Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V)*. Köln: Institut der deutschen Zahnärzte (IDZ); 2016:371-373.
10. Griffin SO, Griffin PM, Swann JL, Zlobin N. Estimating rates of new root caries in older adults. *J Dent Res*. 2004;83(8):634-638.

11. Bernabe E, Sheiham A. Age, period and cohort trends in caries of permanent teeth in four developed countries. *Am J Public Health*. 2014;104(7):e115-121.
12. Hoppenbrouwers PM, Driessens FC, Borggreven JM. The vulnerability of unexposed human dental roots to demineralization. *J Dent Res*. 1986;65(7):955-958.
13. Peltola P, Vehkalahti MM, Wuolijoki-Saaristo K. Oral health and treatment needs of the long-term hospitalised elderly. *Gerodontology*. 2004;21(2):93-99.
14. Zenthofer A, Rammelsberg P, Cabrera T, Hassel AJ. Increasing dependency of older people in nursing homes is associated with need for dental treatments. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2014;10:2285-2290.
15. Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tagami J, Tay FR. Antimicrobial efficacy of 3.8% silver diamine fluoride and its effect on root dentin. *J Endod*. 2010;36(6):1026-1029.
16. ten Cate JM, Featherstone JD. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1991;2(3):283-296.
17. ten Cate J, Larsen M, Pearce E, Fejerskov O. Chemical interactions between the tooth and oral fluids. In: Fejerskov O, Kidd E, eds. *Dental Caries. The Disease and its Clinical Management*. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2003:49-70.
18. Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev*. 2000;24(5):661-671.
19. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am*. 1978;238(1):86-95.
20. Ekstrand KR, Zero DT. Die Ökologie der Mundhöhle. In: Meyer-Lueckel H, Paris S, Ekstrand KR, eds. *Karies: Wissenschaft und klinische Praxis (ZMK-Praxis)*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012:12.
21. Bardow A, Hofer E, Nyvad B, ten Cate JM, Kirkeby S, Moe D, Nauntofte B. Effect of saliva composition on experimental root caries. *Caries Res*. 2005;39(1):71-77.
22. Scott J. Degenerative changes in the histology of the human submandibular salivary gland occurring with age. *J Biol Buccale*. 1977;5(4):311-319.

23. Baum B. Changes in salivary glands and salivary secretion with aging. In: P Holm-Pedersen, Løe H, eds. *Textbook of Geriatric Dentistry*. Copenhagen: Munksgaard; 1996:117-126.
24. Ekstrand KR, Zero DT. Die Ökologie der Mundhöhle. In: Meyer-Lückel H, Paris S, Ekstrand K, eds. *Karies: Wissenschaft und klinische Praxis (ZMK-Praxis)*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012:13.
25. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*. 2003;149(Pt 2):279-294.
26. Hayes ML, Carter EC, Griffiths SJ. The acidogenic microbial composition of dental plaque from caries-free and caries-prone people. *Arch Oral Biol*. 1983;28(5):381-386.
27. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ*. 2001;65(10):1028-1037.
28. Minah GE, Lovekin GB, Finney JP. Sucrose-induced ecological response of experimental dental plaques from caries-free and caries-susceptible Human volunteers. *Infect Immun*. 1981;34(3):662-675.
29. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res*. 2006;85(10):878-887.
30. Buchalla W. Histologisches und klinisches Erscheinungsbild der Karies. In: Meyer-Lückel H, Paris S, Ekstrand K, eds. *Karies: Wissenschaft und klinische Praxis (ZMK-Praxis)*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012:59.
31. Shellis RP. A scanning electron-microscopic study of solubility variations in human enamel and dentine. *Arch Oral Biol*. 1996;41(5):473-484.
32. Mjør I, Fejerskov O. *Human Oral embryology and histology*. Copenhagen: Munksgaard; 1986.
33. Wang L, Guan X, Yin H, al e. Mimiicking the self-organized microstructure of tooth enamel. *J Phys Chem*. 2008;112:5892–5899.

34. Ogaard B, Rolla G, Arends J. In vivo progress of enamel and root surface lesions under plaque as a function of time. *Caries Res.* 1988;22(5):302-305.
35. Schupbach P, Guggenheim B, Lutz F. Human root caries: histopathology of initial lesions in cementum and dentin. *J Oral Pathol Med.* 1989;18(3):146-156.
36. Karjalainen S, Soderling E, Pelliniemi L, Foidart JM. Immunohistochemical localization of types I and III collagen and fibronectin in the dentine of carious human teeth. *Arch Oral Biol.* 1986;31(12):801-806.
37. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res.* 2004;83(3):216-221.
38. Clarkson B, Czajka-Jakubowska A. Zukünftige Trends in der Kariesforschung. In: Meyer-Lückel H, Paris S, Ekstrand KR, eds. *Karies: Wissenschaft und klinische Praxis (ZMK-Praxis)*. Georg Thieme Verlag; 2012:355.
39. Shellis P. Ätiologie und Pathogenese der Karies. In: Meyer-Lückel H, Paris S, Ekstrand KR, eds. *Karies: Wissenschaft und klinische Praxis (ZMK Praxis)*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012:37.
40. Preza D, Olsen I, Aas JA, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *J Clin Microbiol.* 2008;46(6):2015-2021.
41. Kneist S, Callaway A, Borutta A. Notwendigkeit der Behandlung kariöser Milchzähne. *Zahnheilkunde Management Kultur*; 2013.
42. Jordan AR, Micheelis W. Kernergebnisse aus der DMS V. *Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V)*. Köln: Institut der deutschen Zahnärzte (IDZ); 2016:30-32.
43. Katz RV, Hazen SP, Chilton NW, Mumma RD, Jr. Prevalence and intraoral distribution of root caries in an adult population. *Caries Res.* 1982;16(3):265-271.
44. Schiffner U, Reich E. Prävalenzen zu ausgewählten klinischen Variablen bei den Senioren (65 - 74 Jahre). Kronenkaries/Wurzelkaries/Füllungen bei den Senioren. In: Micheelis W, Reich E, eds. *Dritte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS III) Ergebnisse, Trends und Problemanalysen auf der Grundlage bevölkerungsrepräsentativer Stichproben in Deutschland 1997*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 1999:337-365.

45. Schiffner U. Krankheits- und Versorgungsprävalenzen bei Senioren (65 - 74 Jahre). Zahnkaries. In: Micheelis W, Schiffner U, eds. *Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). Neuere Ergebnisse zu oralen Erkrankungsprävalenzen, Risikogruppen und zum zahnärztlichen Versorgungsgrad in Deutschland 2005*. Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV; 2006:307-333.
46. Splieth C, Schwahn C, Bernhardt O, John U. Prevalence and distribution of root caries in Pomerania, North-East Germany. *Caries Res.* 2004;38(4):333-340.
47. Jordan AR, Micheelis W. Krankheits- und Versorgungsprävalenzen bei jüngeren Senioren mit Schwerbehinderung. Karies. *Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V)*. Köln: Institut der deutschen Zahnärzte (IDZ); 2016:460.
48. Jordan AR, Micheelis W. Krankheits- und Versorgungsprävalenzen bei älteren Senioren mit Pflegebedarf. Karies. *Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V)*. Köln: Institut der deutschen Zahnärzte (IDZ); 2016:561-562, 564-565.
49. Jordan AR, Micheelis W. Krankheits- und Versorgungsprävalenzen bei älteren Senioren (75- bis 100-Jährige). Zahnmedizinische funktionelle Kapazität. *Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V)*. Köln: Institut der deutschen Zahnärzte (IDZ); 2016:552.
50. Shellis P. Ätiologie und Pathogenese der Karies. In: Meyer-Lueckel H, Paris S, Ekstrand KR, eds. *Karies: Wissenschaft und klinische Praxis (ZMK-Praxis)*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012:29.
51. Young R, Brown W. Structures of biological minerals. In: Nancollas G, ed. *Biological mineralization and demineralization*. Berlin: Springer; 1982:101-141.
52. Wong L, Cutress TW, Duncan JF. The influence of incorporated and adsorbed fluoride on the dissolution of powdered and pelletized hydroxyapatite in fluoridated and non-fluoridated acid buffers. *J Dent Res.* 1987;66(12):1735-1741.
53. de Leeuw N. Resisting the onset of hydroxyapatite dissolution through the incorporation of fluoride. *J Phys Chem B.* 2004;108:1809–1811.
54. Christoffersen MR, Christoffersen J, Arends J. Kinetics of Dissolution of Calcium Hydroxyapatite .7. The Effect of Fluoride Ions. *Journal of Crystal Growth.* 1984;67(1):107-114.

55. Arends J, Christoffersen J. Nature and role of loosely bound fluoride in dental caries. *J Dent Res.* 1990;69 Spec No:601-605; discussion 634-606.
56. Brown WE, Gregory TM, Chow LC. Effects of fluoride on enamel solubility and cariostasis. *Caries Res.* 1977;11 Suppl 1:118-141.
57. Chu CH, Mei L, Seneviratne CJ, Lo EC. Effects of silver diamine fluoride on dentine carious lesions induced by *Streptococcus mutans* and *Actinomyces naeslundii* biofilms. *Int J Paediatr Dent.* 2012;22(1):2-10.
58. Koo H. Strategies to enhance the biological effects of fluoride on dental biofilms. *Adv Dent Res.* 2008;20(1):17-21.
59. Fernandez CE, Tenuta LM, Cury JA. Validation of a Cariogenic Biofilm Model to Evaluate the Effect of Fluoride on Enamel and Root Dentine Demineralization. *PLoS One.* 2016;11(1):e0146478.
60. Adams D, Addy M. Mouthrinses. *Adv Dent Res.* 1994;8(2):291-301.
61. Varoni E, Tarce M, Lodi G, Carrassi A. Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatol.* 2012;61(9):399-419.
62. Scheie A, Petersen F. Antimicrobials in Caries Control. In: Kidd E, Fejerskov O, eds. *Dental Caries. The Disease and its Clinical Management.* Vol 2nd. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008:265-277.
63. Paris S, Dörfer C, Meyer-Lueckel H. Karieskontrolle durch Beeinflussung des Biofilms. In: Meyer-Lückel H, Paris S, Ekstrand KR, eds. *Karies: Wissenschaft und klinische Praxis (ZMK Praxis).* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012:169.
64. Baca P, Clavero J, Baca AP, Gonzalez-Rodriguez MP, Bravo M, Valderrama MJ. Effect of chlorhexidine-thymol varnish on root caries in a geriatric population: a randomized double-blind clinical trial. *J Dent.* 2009;37(9):679-685.
65. Brailsford SR, Fiske J, Gilbert S, Clark D, Beighton D. The effects of the combination of chlorhexidine/thymol- and fluoride-containing varnishes on the severity of root caries lesions in frail institutionalised elderly people. *J Dent.* 2002;30(7-8):319-324.

66. Tan HP, Lo EC, Dyson JE, Luo Y, Corbet EF. A randomized trial on root caries prevention in elders. *J Dent Res.* 2010;89(10):1086-1090.
67. Wu MY, Suryanarayanan K, van Ooij WJ, Oerther DB. Using microbial genomics to evaluate the effectiveness of silver to prevent biofilm formation. *Water Science and Technology.* 2007;55(8-9):413-419.
68. Mei ML, Li QL, Chu CH, Lo EC, Samaranayake LP. Antibacterial effects of silver diamine fluoride on multi-species cariogenic biofilm on caries. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2013;12:4.
69. Yokoyama K, Matsumoto K, Murase J. Permeability of the root canal wall and occlusion of dentinal tubules by Ag(NH₃)₂F: a comparison of combined use with pulsed Nd:YAG laser or iontophoresis. *J Clin Laser Med Surg.* 2000;18(1):9-14.
70. Yu DG, Kimura Y, Fujita A, Hossain M, Kinoshita JI, Suzuki N, Matsumoto K. Study on acid resistance of human dental enamel and dentin irradiated by semiconductor laser with Ag(NH₃)₂F solution. *J Clin Laser Med Surg.* 2001;19(3):141-146.
71. Mei ML, Li QL, Chu CH, Yiu CK, Lo EC. The inhibitory effects of silver diamine fluoride at different concentrations on matrix metalloproteinases. *Dent Mater.* 2012;28(8):903-908.
72. Chu CH, Lo EC. Promoting caries arrest in children with silver diamine fluoride: a review. *Oral Health Prev Dent.* 2008;6(4):315-321.
73. Knight GM, McIntyre JM, Craig GG, Mulyani. Ion uptake into demineralized dentine from glass ionomer cement following pretreatment with silver fluoride and potassium iodide. *Aust Dent J.* 2006;51(3):237-241.
74. Chu CH, Lo EC, Lin HC. Effectiveness of silver diamine fluoride and sodium fluoride varnish in arresting dentin caries in Chinese pre-school children. *J Dent Res.* 2002;81(11):767-770.
75. Llodra JC, Rodriguez A, Ferrer B, Menardia V, Ramos T, Morato M. Efficacy of silver diamine fluoride for caries reduction in primary teeth and first permanent molars of schoolchildren: 36-month clinical trial. *J Dent Res.* 2005;84(8):721-724.

76. Buskes JA, Christoffersen J, Arends J. Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions. A new technique with applications. *Caries Res.* 1985;19(6):490-496.
77. ten Cate JM, Buijs MJ, Miller CC, Exterkate RA. Elevated fluoride products enhance remineralization of advanced enamel lesions. *J Dent Res.* 2008;87(10):943-947.
78. Sung YH, Son HH, Yi K, Chang J. Elemental analysis of caries-affected root dentin and artificially demineralized dentin. *Restor Dent Endod.* 2016;41(4):255-261.
79. Joves GJ, Inoue G, Nakashima S, Sadr A, Nikaido T, Tagami J. Mineral density, morphology and bond strength of natural versus artificial caries-affected dentin. *Dent Mater J.* 2013;32(1):138-143.
80. Salli KM, Ouwehand AC. The use of in vitro model systems to study dental biofilms associated with caries: a short review. *J Oral Microbiol.* 2015;7:26149.
81. Coenye T, Nelis HJ. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 2010;83(2):89-105.
82. Tang G, Yip HK, Cutress TW, Samaranayake LP. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. *J Dent.* 2003;31(3):161-171.
83. Wong L, Sissons C. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Biol.* 2001;46(6):477-486.
84. Lippert F, Churchley D, Lynch RJ. Effect of Lesion Baseline Severity and Mineral Distribution on Remineralization and Progression of Human and Bovine Dentin Caries Lesions. *Caries Res.* 2015;49(5):467-476.
85. Lippert F, Juthani K. Fluoride dose-response of human and bovine enamel artificial caries lesions under pH-cycling conditions. *Clin Oral Investig.* 2015;19(8):1947-1954.
86. Lippert F, Butler A, Lynch RJ. Characteristics of methylcellulose acid gel lesions created in human and bovine enamel. *Caries Res.* 2013;47(1):50-55.

87. Mei ML, Chu CH, Low KH, Che CM, Lo EC. Caries arresting effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesion with *S. mutans* and *L. acidophilus* dual-species cariogenic biofilm. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18(6):e824-831.
88. Schwendicke F, Dorfer C, Kneist S, Meyer-Lueckel H, Paris S. Cariogenic effects of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in a dental biofilm model. *Caries Res*. 2014;48(3):186-192.
89. Al Dehailan L, Martinez-Mier EA, Lippert F. The effect of fluoride varnishes on caries lesions: an in vitro investigation. *Clin Oral Investig*. 2016;20(7):1655-1662.
90. Mei ML, Ito L, Cao Y, Li QL, Lo EC, Chu CH. Inhibitory effect of silver diamine fluoride on dentine demineralisation and collagen degradation. *J Dent*. 2013;41(9):809-817.
91. Schwendicke F, Horb K, Kneist S, Dorfer C, Paris S. Effects of heat-inactivated *Bifidobacterium* BB12 on cariogenicity of *Streptococcus mutans* in vitro. *Arch Oral Biol*. 2014;59(12):1384-1390.
92. Sissons CH, Cutress TW, Hoffman MP, Wakefield JS. A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque growth, metabolism, pH, and mineralization. *J Dent Res*. 1991;70(11):1409-1416.
93. Schwendicke F, Eggers K, Meyer-Lueckel H, Dorfer C, Kovalev A, Gorb S, Paris S. In vitro Induction of residual caries lesions in dentin: comparative mineral loss and nano-hardness analysis. *Caries Res*. 2015;49(3):259-265.
94. Gluzman R, Katz RV, Frey BJ, McGowan R. Prevention of root caries: a literature review of primary and secondary preventive agents. *Spec Care Dentist*. 2013;33(3):133-140.
95. Slot DE, Vaandrager NC, Van Loveren C, Van Palenstein Helderma WH, Van der Weijden GA. The effect of chlorhexidine varnish on root caries: a systematic review. *Caries Res*. 2011;45(2):162-173.
96. Wierichs RJ, Meyer-Lueckel H. Systematic review on noninvasive treatment of root caries lesions. *J Dent Res*. 2015;94(2):261-271.
97. Walls AW, Meurman JH. Approaches to caries prevention and therapy in the elderly. *Adv Dent Res*. 2012;24(2):36-40.

- 98.** Vogel GL. Oral fluoride reservoirs and the prevention of dental caries. *Monogr Oral Sci.* 2011;22:146-157.
- 99.** Zero DT, Raubertas RF, Pedersen AM, Fu J, Hayes AL, Featherstone JD. Studies of fluoride retention by oral soft tissues after the application of home-use topical fluorides. *J Dent Res.* 1992;71(9):1546-1552.
- 100.** Kumpu M, Kekkonen RA, Kautiainen H, Jarvenpaa S, Kristo A, Huovinen P, Pitkaranta A, Korpela R, Hatakka K. Milk containing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and respiratory illness in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur J Clin Nutr.* 2012;66(9):1020-1023.
- 101.** Abad CL, Safdar N. The role of lactobacillus probiotics in the treatment or prevention of urogenital infections--a systematic review. *J Chemother.* 2009;21(3):243-252.
- 102.** Gill HS, Rutherford KJ, Prasad J, Gopal PK. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br J Nutr.* 2000;83(2):167-176.
- 103.** Nase L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Ponka A, Poussa T, Korpela R, Meurman JH. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res.* 2001;35(6):412-420.
- 104.** Gruner D, Paris S, Schwendicke F. Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2016;48:16-25.
- 105.** Gostemeyer G, Schulze F, Paris S, Schwendicke F. Arrest of Root Carious Lesions via Sodium Fluoride, Chlorhexidine and Silver Diamine Fluoride In Vitro. *Materials (Basel).* 2017;11(1).
- 106.** Schwendicke F, Kniess J, Paris S, Blunck U. Margin Integrity and Secondary Caries of Lined or Non-lined Composite and Glass Hybrid Restorations After Selective Excavation In Vitro. *Oper Dent.* 2017;42(2):155-164.
- 107.** Thneibat A, Fontana M, Cochran MA, Gonzalez-Cabezas C, Moore BK, Matis BA, Lund MR. Anticariogenic and antibacterial properties of a copper varnish using an in vitro microbial caries model. *Oper Dent.* 2008;33(2):142-148.

- 108.** Carl, Roth, GmbH, +, Co., KG. Chemikalien, A - Z Chemikalien. <https://www.carlroth.com/de/de/Chemikalien>. Accessed April 7, 2018.
- 109.** Aires CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Klein MI, Koo H, Duarte S, Cury JA. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. *Caries Res.* 2008;42(5):380-386.
- 110.** Duarte S, Klein MI, Aires CP, Cury JA, Bowen WH, Koo H. Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23(3):206-212.
- 111.** Garcia-Godoy F, Flaitz C, Hicks J. Role of fluoridated dentifrices in root caries formation in vitro. *Am J Dent.* 2014;27(1):23-28.
- 112.** Hamama HH, Yiu CK, Burrow MF. Effect of silver diamine fluoride and potassium iodide on residual bacteria in dentinal tubules. *Aust Dent J.* 2015;60(1):80-87.
- 113.** Mei ML, Chu CH, Lo EC, Samaranayake LP. Preventing root caries development under oral biofilm challenge in an artificial mouth. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013;18(4):e557-563.
- 114.** Welch K, Cai Y, Stromme M. A method for quantitative determination of biofilm viability. *J Funct Biomater.* 2012;3(2):418-431.
- 115.** Takahashi M, Kita Y, Mizuno A, Goto-Yamamoto N. Evaluation of method bias for determining bacterial populations in bacterial community analyses. *J Biosci Bioeng.* 2017;124(4):476-486.
- 116.** Arends J, Ruben JL, Inaba D. Major topics in quantitative microradiography of enamel and dentin: R parameter, mineral distribution visualization, and hyper-remineralization. *Adv Dent Res.* 1997;11(4):403-414.
- 117.** Willershausen I, Schulte D, Azaripour A, Weyer V, Briseno B, Willershausen B. Penetration Potential of a Silver Diamine Fluoride Solution on Dentin Surfaces. An Ex Vivo Study. *Clin Lab.* 2015;61(11):1695-1701.
- 118.** Zheng CY, Wang ZH. Effects of chlorhexidine, listerine and fluoride listerine mouthrinses on four putative root-caries pathogens in the biofilm. *Chin J Dent Res.* 2011;14(2):135-140.

- 119.** Engelhard, Arzneimittel. Fachinformation (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels/SPC) Chlorhexidindigluconat-Lösung 2%. <http://www.engelhard.de/fileadmin/pdfs/Summaries/Chlorhexidindigluconat2Proz.pdf>. Accessed April 7, 2018.
- 120.** Autio-Gold J. The role of chlorhexidine in caries prevention. *Oper Dent.* 2008;33(6):710-716.
- 121.** Ngo HC. Wirkung von Silberdiaminfluorid (SDF). Klinischer Überblick. http://www.sdi.com.au/images/stories/casestudy/SDF_Clinical_Summary/SDF_Clinical_Summary_GER.pdf. Accessed April 7, 2018.
- 122.** Li R, Lo EC, Liu BY, Wong MC, Chu CH. Randomized clinical trial on arresting dental root caries through silver diammine fluoride applications in community-dwelling elders. *J Dent.* 2016;51:15-20.
- 123.** Randall JP, Seow WK, Walsh LJ. Antibacterial activity of fluoride compounds and herbal toothpastes on *Streptococcus mutans*: an in vitro study. *Aust Dent J.* 2015;60(3):368-374.
- 124.** Van Loveren C. Antimicrobial activity of fluoride and its in vivo importance: identification of research questions. *Caries Res.* 2001;35 Suppl 1:65-70.
- 125.** Baygin O, Tuzuner T, Kusgoz A, Senel AC, Tanriver M, Arslan I. Antibacterial effects of fluoride varnish compared with chlorhexidine plus fluoride in disabled children. *Oral Health Prev Dent.* 2014;12(4):373-382.
- 126.** Twetmann S, Ekstrand KR. Karieskontrolle durch Beeinflussung der De- und Remineralisation. In: Meyer-Lückel H, Paris S, Ekstrand KR, eds. *Karies: Wissenschaft und klinische Praxis (ZMK Praxis)*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012:202-203.
- 127.** Heijnsbroek M, Paraskevas S, Van der Weijden GA. Fluoride interventions for root caries: a review. *Oral Health Prev Dent.* 2007;5(2):145-152.
- 128.** Zaura-Arite E, ten Cate JM. Effects of fluoride- and chlorhexidine-containing varnishes on plaque composition and on demineralization of dentinal grooves in situ. *Eur J Oral Sci.* 2000;108(2):154-161.

10 Anhang

10.1 Methodik und Ergebnisse der Vorversuche

10.1.1 Methodik

In zwei Vorversuchen wurde analysiert inwieweit die Silberpartikel in dem SDF-Produkt die TMR-Auswertung beeinflussen. Bei dem ersten Vorversuch sind insgesamt sieben unbehandelte Probenoberflächen jeweils in drei Bereiche unterteilt worden: Unbehandelter Bereich und direkt mit Nagellack abgedeckt, SDF aufgetragen und nach kurzer Einwirkzeit (5 min) abgespült, SDF aufgetragen und direkt mit Nagellack abgedeckt. Die Proben wurden daraufhin längs durchgesägt. Die eine Hälfte diente zur Anfertigung von TMR-Aufnahmen und die andere zur Untersuchung mittels einer EDX-Analyse (Energiedispersive Röntgenspektroskopie, Detektor: XFlash 6|30; Software: Brunker Quantax 400/ESPRIT 1.9, beides: Fa. Bruker Nano GmbH, Berlin, Deutschland) im Rasterelektronenmikroskop (Camscan MaXim 2040S, Fa. Camscan, Cambridge, UK).

Im zweiten Vorversuch sollte die Frage geklärt werden inwieweit Silberpartikel beim Entstehen einer Kariesläsion im Biofilmmodell in die Tiefe diffundieren. Hierfür wurden die Proben aus der Vorversuchsreihe zum Testen der Parameter für das Biofilmmodell verwendet. Bei diesen Proben bestand der Referenzbereich aus zwei gleich großen Anteilen, jeweils 0,5x3 mm, die mit Nagellack vor dem Versuchsablauf abgedeckt wurden: unbehandelter Dentinbereich und ein Dentinbereich, auf den SDF appliziert worden war. Die Proben wurden daraufhin mit SDF behandelt und für 10 Tage kariogenen Bedingungen im Biofilmmodell ausgesetzt. Zusätzlich wurde tägliche eine 500 ppm konzentrierte Fluoridlösung hinzugegeben. Die Auswertung erfolgte wieder durch die Anfertigung von TMR-Aufnahmen. Zum anderen wurden vier exemplarische Proben längs gebrochen um mögliche Silberpartikel innerhalb der Läsion zu identifizieren. Auf die Anfertigung von Sägeschnitten wurde hierbei verzichtet um ein mögliches Verschleppen der Silberpartikel von der Oberfläche in den Bereich der Läsion zu vermeiden. Die gebrochenen Oberflächen der Proben wurden anschließend durch die EDX-Analyse im Rasterelektronenmikroskop ausgewertet. Diese Untersuchung erfolgte sowohl an einzelnen ausgewählten Punkten sowie durch Linescans. Abbildung 23 zeigt die Oberfläche einer gebrochenen Probe mit einzelnen markierten Punkten.

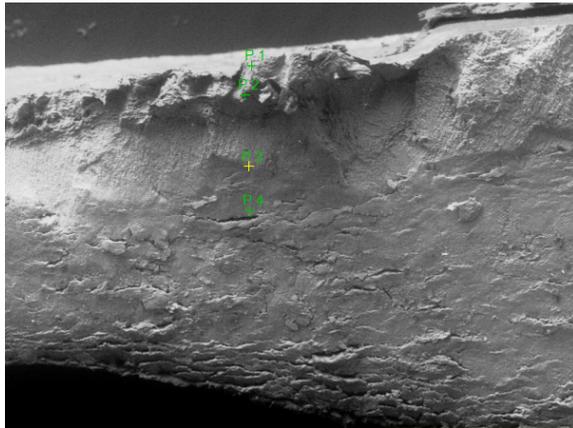


Abbildung 23: REM-Bild einer gebrochenen Probe. Die markierten Punkte wurden auf das Vorhandensein von Silberpartikel ausgewertet.

10.1.2 Ergebnisse

Die Auswertungen der TMR-Bilder des ersten Vorversuches ergaben keine relevanten Unterschiede im Mineralgehalt der unterschiedlich behandelten Dentinoberflächen (ohne SDF, SDF aufgetragen und abgespült, mit SDF) zueinander (Abbildung 24).

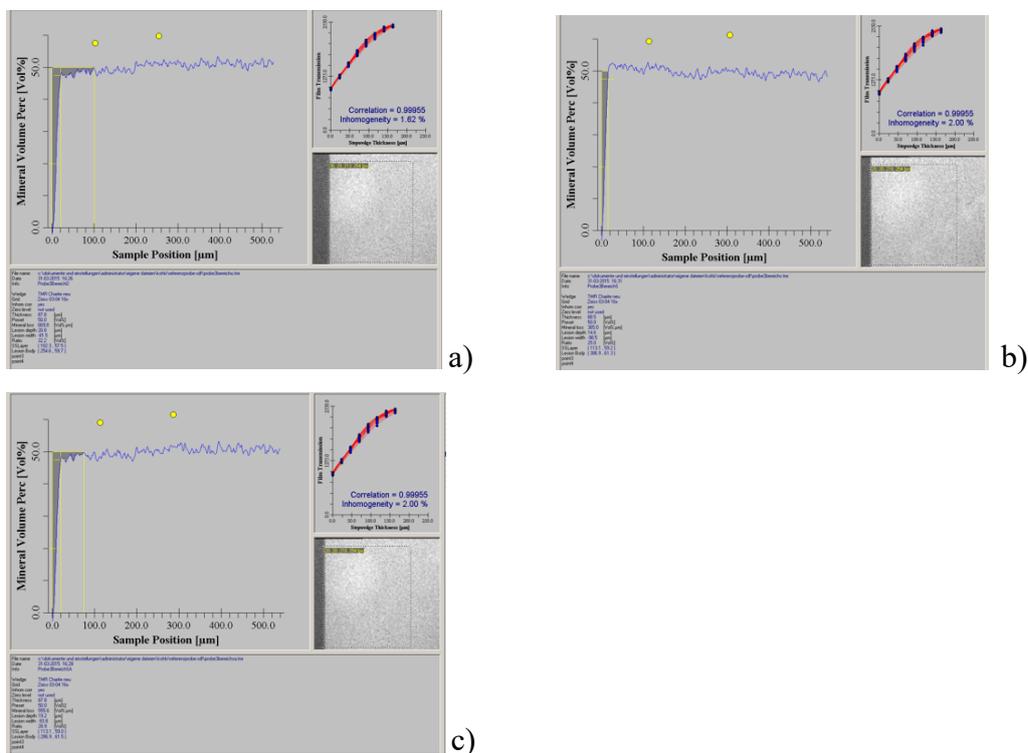


Abbildung 24 (a, b, c): Vergleich der Mineralverluste / Mineralgehalte nach Erstellen von TMR-Aufnahmen. 24a: ohne SDF; 24b: SDF aufgetragen und nach 5 min abgespült; 24c: SDF aufgetragen und mit Nagellack abgedeckt.

Der wesentliche Unterschied bei dem zweiten Vorversuch zu der vorangegangenen Vorversuchsreihe bestand darin, dass durch Zugabe von *LGG* Karies erzeugt wurde, wodurch Mineralien aus der Dentinoberfläche herausgelöst wurden. Auch hier ließ sich bei der anschließenden TMR-Auswertung der gesägten Proben keine Überlagerung durch Silberpartikel nachweisen. Da bei diesem Vorversuch zusätzlich im Mundmodell täglich 500 ppm NaF-Lösung appliziert wurde, ließ sich auf den TMR-Bildern nicht nur eine De- sondern auch eine Remineralisation feststellen. Hätten die Silberpartikel einen Einfluss auf die Auswertung gehabt, wäre ein stärkerer Mineralgehalt angezeigt worden als im gesunden Dentin.

Um auch eine quantitative Aussage über den Gehalt an Silberpartikeln in den Proben zu erhalten, wurden zufällig ausgewählte Proben aus beiden Vorversuchen im Rasterelektronenmikroskop untersucht. Die Untersuchungen erfolgten zum einen an gesägten Proben und zum anderen an gebrochenen Proben. Sowohl bei den gesägten als auch bei den gebrochenen Proben konnten keine Silberpartikel an der Säge- oder Bruchfläche nachgewiesen werden (Abbildung 25). Der Nachweis von Silberpartikeln bei einzeln gesetzten Punkten war entweder unterhalb der Nachweisgrenze oder so gering, dass er nicht mittels EDX eindeutig quantifizierbar war. Lediglich bei den Proben aus dem zweiten Vorversuch konnten im Biofilm Silberpartikel nachgewiesen werden (Abbildung 26), dieser wurde jedoch im Rahmen der Studie zur CFU-Bestimmung vorab abgetragen. Die Vorversuche konnten somit zeigen, dass die Silberpartikel des SDFs unter den Bedingungen der vorliegenden In-vitro-Studie die TMR-Aufnahmen nicht relevant verfälschen würden.

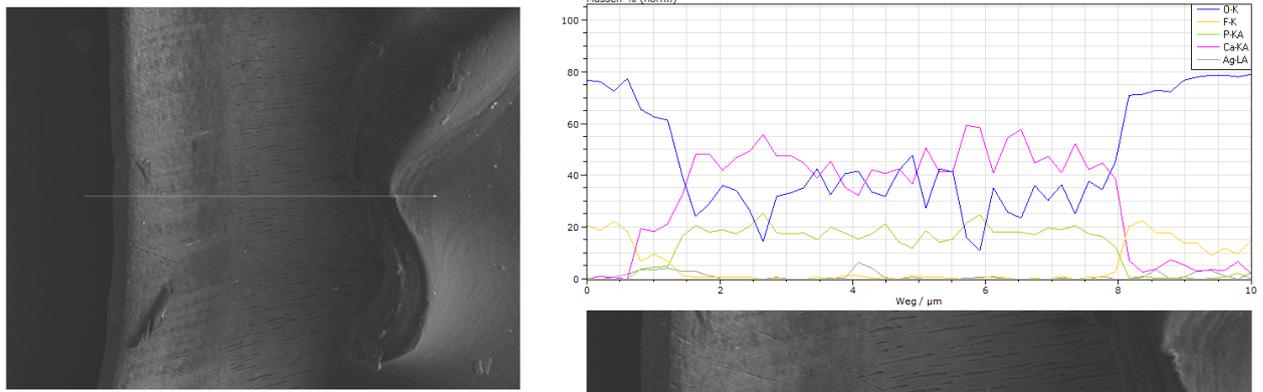
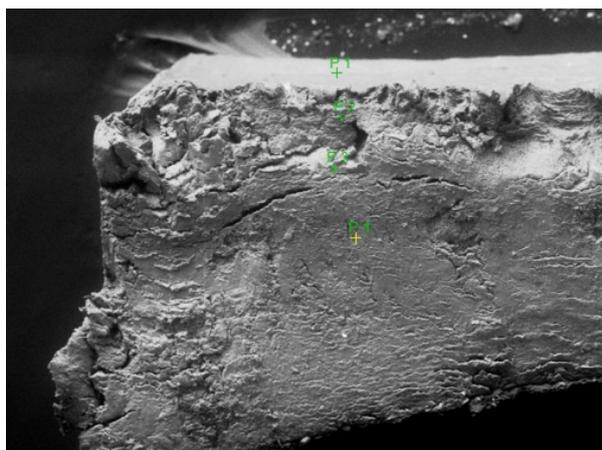


Abbildung 25: REM-Bild der EDX-Analyse (linescan) einer gesägten Probe im Bereich der SDF-Applikation und anschließend abgespült. Der Verlauf der grauen Linie stellt die Konzentration des Silberanteils dar (Probenoberfläche → Probtiefe).



El	OZ	Serie	Netto	unn. C	norm. C	Atom. C	Fehler(1 Sigma)
C	6	K-Serie	65791	76,25	54,91	64,75	8,84
N	7	K-Serie	1238	9,77	7,04	7,11	2,11
O	8	K-Serie	13510	37,04	26,68	23,61	5
Na	11	K-Serie	790	0,25	0,18	0,11	0,05
Mg	12	K-Serie	237	0,05	0,04	0,02	0,03
Al	13	K-Serie	8024	1,38	0,99	0,52	0,09
Si	14	K-Serie	107	0,01	0,01	0,01	0,03
P	15	K-Serie	22447	3,61	2,6	1,19	0,17
S	16	K-Serie	1617	0,28	0,2	0,09	0,04
Ca	20	K-Serie	38980	10,18	7,33	2,59	0,33
Ag	47	L-Serie	126	0,04	0,03	0	0,03
			Summe:	138,85	100,00	100,00	

Abbildung 26: REM-Bild der EDX-Analyse (Punkt-Scan) einer gebrochenen Probe. Die Tabelle zeigt die Auswertung für Punkt 1.

10.1.2.1 Flächenrauheitsmessung

Im Rahmen einer Flächenrauheitsmessung (alicon a InfiniteFocus, Raaba/Graz, Österreich. Software-Programm = Alicona – IF-MeasureSuite- FlächenTextureMessung) sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit die aufgetragenen Substanzen (SDF, CHX-Lack, Fluorid-Lack) als zusätzliche Retentionsstellen für die Bakterien dienen konnten. Die Begutachtung der Oberflächen im Vergleich zu den unbehandelten Oberflächen ließen allerdings keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Gruppen erkennen, so dass auch dies als mögliche Fehlerquelle für die weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden konnte.

10.2 Zahlenwerte der Studienergebnisse

Tabelle 5: Bakterienzahlen [log₁₀(CFU/ml)] aus dem Biofilm der Probenoberflächen.

Darstellung der Mittelwerte, der Minimal- und Maximalwerte, der Standardabweichung und des Standardfehlers. Die Abkürzungen „V“ (varnish = Lack) und „R“ (rinse = Spülung) beschreiben, ob die Substanz in Form eines Lackes oder einer Spülung appliziert wurde. Die Abkürzung „adj“ (adjacent) bei den Gruppen 1 bis 4 steht für den unbehandelten, an den Lack angrenzenden Dentinbereich.

Gruppe	Mittelwert	Min / Max	Standardabweichung	Standardfehler
SDF	1,22	Min.: 0,00	0,63	± 0,14
		Max.: 2,35		
SDF adj	1,20	Min.: 0,00	0,56	± 0,13
		Max.: 2,26		
CHXV	1,00	Min.: 0,00	0,58	± 0,13
		Max.: 1,80		
CHXV adj	1,03	Min.: 0,00	0,51	± 0,12
		Max.: 2,10		
NaFV	0,98	Min.: 0,00	0,60	± 0,14
		Max.: 1,97		
NaFV adj	1,25	Min.: 0,00	0,60	± 0,13
		Max.: 2,38		
PV	0,98	Min.: 0,00	0,60	± 0,14
		Max.: 1,97		
PV adj	1,25	Min.: 0,00	0,60	± 0,13
		Max.: 2,38		
NaFR	1,79	Min.: 1,32	0,29	± 0,06
		Max.: 2,48		
CHXR	1,18	Min.: 0,30	0,42	± 0,09
		Max.: 1,83		
Control	1,52	Min.: 0,00	0,52	± 0,12
		Max.: 2,22		

Tabelle 7: Mineralverlust ΔZ [vol% $\times\mu\text{m}$] der einzelnen Gruppen. Darstellung der Mittelwerte, der Minimal- und Maximalwerte, der Standardabweichung und des Standardfehlers.

Gruppe	Mittelwert	Min / Max	Standardabweichung	Standardfehler
SDF	8022,85	Min.: 1402	2519,54	$\pm 563,39$
		Max.: 11703		
SDF adj	11207,20	Min.: 7105	1608,73	$\pm 359,72$
		Max.: 13794		
CHXV	10412,80	Min.: 2852	3176,46	$\pm 710,28$
		Max.: 18147		
CHXV adj	11147,30	Min.: 7533	2211,94	$\pm 494,60$
		Max.: 15206		
NaFV	8033,45	Min.: 4012	1869,40	$\pm 418,01$
		Max.: 11042		
NaFV adj	11158,45	Min.: 8526	1482,61	$\pm 331,52$
		Max.: 14117		
PV	8304,53	Min.: 2866	3240,26	$\pm 743,37$
		Max.: 13860		
PV adj	10991,42	Min.: 6256	2191,24	$\pm 502,70$
		Max.: 14529		
NaFR	4687,05	Min.: 736	1749,98	$\pm 391,31$
		Max.: 7370		
CHXR	10489,00	Min.: 1497	2889,90	$\pm 681,16$
		Max.: 14561		
Control	11486,44	Min.: 7194	2103,91	$\pm 495,90$
		Max.: 14196		

Tabelle 8: p-Werte für die paarweisen Vergleiche des Mineralverlustes der einzelnen Gruppen (* = signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$); n.s. = nicht signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) (post-hoc Tukey)).

	p-Werte des paarweisen Mittelwertvergleichs der Mineralverluste										
Gruppe	SDF	SDF adj	CHXV	CHXV adj	NaFV	NaFV adj	PV	PV adj	NaFR	CHXR	Control
SDF	-	0,001	0,054	0,002	1,000	0,002	1,000	0,005	0,001	0,052	0,001
SDF adj	*	-	0,992	1,000	0,001	1,000	0,007	1,000	0,000	0,997	1,000
CHXV	n.s.	n.s.	-	0,996	0,056	0,995	0,161	1,000	0,000	1,000	9,72
CHXV adj	*	n.s.	n.s.	-	0,002	1,000	0,009	1,000	0,000	0,999	1,000
NaFV	n.s.	*	n.s.	*	-	0,002	1,000	0,005	0,001	0,054	0,001
NaFV adj	*	n.s.	n.s.	n.s.	*	-	0,008	1,000	0,000	0,998	1,000
PV	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	*	-	0,021	0,000	0,152	0,004
PV adj	*	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	*	-	0,000	1,000	1,000
NaFR	*	*	*	*	*	*	*	*	-	0,000	0,000
CHXR	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	-	0,987
Control	*	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	-

Tabelle 9: Läsionstiefe [μm] der einzelnen Gruppen. Darstellung der Mittelwerte, der Minimal- und Maximalwerte, der Standardabweichung und des Standardfehlers.

Gruppe	Mittelwert	Min / Max	Standardabweichung	Standardfehler
SDF	370,27	Min.: 144,80	82,52	$\pm 18,45$
		Max.: 468,70		
SDF adj	442,20	Min.: 327,10	62,62	$\pm 14,00$
		Max.: 555,00		
CHXV	439,02	Min.: 151,40	118,08	$\pm 26,40$
		Max.: 600,50		
CHXV adj	485,08	Min.: 307,60	82,95	$\pm 18,55$
		Max.: 623,30		
NaFV	399,64	Min.: 34,20	102,76	$\pm 22,98$
		Max.: 543,60		
NaFV adj	473,12	Min.: 356,40	66,21	$\pm 14,80$
		Max.: 577,80		
PV	366,20	Min.: 195,30	103,50	$\pm 23,74$
		Max.: 514,30		
PV adj	437,12	Min.: 273,40	81,51	$\pm 18,70$
		Max.: 568,00		
NaFR	136,22	Min.: 66,70	97,15	$\pm 21,72$
		Max.: 432,90		
CHXR	456,97	Min.: 153,00	114,03	$\pm 26,88$
		Max.: 649,40		
Control	496,38	Min.: 315,70	89,55	$\pm 21,11$
		Max.: 675,40		

Tabelle 10: p-Werte für die paarweisen Vergleiche der Läsionstiefen der einzelnen Gruppen (* = signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$); n.s. = nicht signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) (post-hoc Tukey)).

		p-Werte des paarweisen Mittelwertvergleichs der Läsionstiefe									
Gruppe	SDF	SDF adj	CHXV	CHXV adj	NaFV	NaFV adj	PV	PV adj	NaFR	CHXR	Control
SDF	-	0,333	0,402	0,005	0,995	0,022	1,000	0,466	0,000	0,134	0,002
SDF adj	n.s.	-	1,000	0,929	0,932	0,993	0,273	1,000	0,000	1,000	0,776
CHXV	n.s.	n.s.	-	0,890	0,959	0,985	0,334	1,000	0,000	1,000	0,709
CHXV adj	*	n.s.	n.s.	-	0,123	1,000	0,004	0,872	0,000	0,997	1,000
NaFV	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-	0,302	0,988	0,973	0,000	0,710	0,055
NaFV adj	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-	0,016	0,980	0,000	1,000	0,999
PV	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	*	-	0,394	0,000	0,105	0,001
PV adj	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-	0,000	1,000	0,683
NaFR	*	*	*	*	*	*	*	*	-	0,000	0,000
CHXR	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	-	0,971
Control	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	-

10.3 Rezeptur DMM (modified Defined Mucine Medium)

Stoff	Ansatz	Menge in g
Calciumchloriddihydrat	2 Liter	0,294
Magnesiumchloridhexahydrat	2 Liter	0,081
Kaliumdihydrogenphosphat	2 Liter	0,136
di-Kaliumhydrogenphosphat-trihydrat	2 Liter	0,228
Natriumchlorid	2 Liter	0,117
Kaliumchlorid	2 Liter	0,447
Ammoniumchlorid	2 Liter	0,021
Harnstoff – CO(NH₂)₂	2 Liter	0,060
Mucin (fr. porcine stomach, Type III)	2 Liter	5,0

Das Mucin wird mindestens einen Tag vorher in 200 ml Aqua dest. gelöst und für eine Stunde auf 80°C erwärmt. Nach der Abkühlung wird die Lösung über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag zusammen mit der erstellten Salzlösung bei 121°C (Flüssigkeitsprogramm) autoklaviert.

10.4 Zusammensetzung MRS-Bouillon mit 1 % Saccharose

Stoff	Menge in g / l
Pepton	10
Hefeextrakt	4
Rindfleischextrakt	8
Glucose	20
Dikaliumphosphat	2
Natriumacetat	5
Ammoniumcitrat	2
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	0,05
Mangansulfat	5,0
Tween 80	1,0

52 g der MRS-Bouillon (pH-Wert 6,2 ± 0,2) werden in 0,8 Liter destillierten Wassers gelöst und gut durchmischt. Nach der Zugabe von 10 g Saccharose wird alles langsam erhitzt, um das Medium vollständig zu lösen. Anschließend wird die Bouillon auf 1 Liter mit destilliertem Wasser aufgefüllt und bei 121°C für 12 Minuten autoklaviert.

10.5 Ablauf der Filmentwicklung

1. Entnehmen des Films aus der Filmkapsel in der Dunkelkammer bei absoluter Dunkelheit.
2. Film auf die Entwicklerspule fädeln und in die Entwicklerdose (lichtundurchlässig) einführen (weiterhin bei absoluter Dunkelheit).
→ Nachfolgend kann bei Rotlicht gearbeitet werden.
3. 20°C warmen Entwickler (Kodak Professional D-19, Eastman Kodak Company, Rochester, USA) in die Entwicklerdose, für 10 Minuten, geben. → In den ersten 30 Sekunden ständige Kippbewegungen, nachfolgend alle 30 Sekunden einmal kippen.
4. Stoppbad → Entwickler ausgießen und für 30 Sekunden bis 1 Minute mit 20°C warmen Wasser spülen.
5. 20°C warmen Fixierer (Tetenal Superfix Plus, TETENAL AG & CO. KG, Norderstedt, Deutschland) in die Entwicklerdose für 6 Minuten geben. Hierbei alle 30 Sekunden die Dose um 180° schwenken.
6. 20 Minuten bei 20°C warmen, fließenden Leitungswasser wässern.
7. 7 Minuten mit Spiritus spülen.
8. 40 Minuten mit Leitungswasser spülen.
9. Schlussbad → die Entwicklerdose mit Agepon (Agfa Agepon, Agfaphoto Holding GmbH, Leverkusen, Deutschland) füllen und für 2 Minuten hin und her bewegen.
10. Den Film aus der Entwicklerdose nehmen und abtropfen lassen und mit einer Gummilippenzange abstreifen.
11. Den Film für 15 Minuten im Trockenschrank trocknen lassen.

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Anna Skopp geb. Kohls, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss von Silberdiaminfluorid, Chlorhexidin und Natriumfluorid auf die Entstehung von Wurzelkaries in-vitro“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

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

Datum und Unterschrift Anna Skopp

11.1 Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Hiermit erkläre ich, Anna Skopp geb. Kohls, dass bereits Teile aus meiner Monographie publiziert worden sind. Ich habe alle Experimente selbstständig im Labor durchgeführt und die Ergebnisse mit den entsprechenden Analyseverfahren ermittelt (siehe 7 Methodik, 8 Ergebnisse). Aus meiner statistischen Auswertung sind die Tabellen 5, 6, 7, 8, 9 und 10 sowie die Abbildungen 20, 21 und 22 entstanden.

Ich, Anna Skopp geb. Kohls, hatte an der folgenden Publikation folgenden Anteil:

Göstemeyer G, Kohls A, Paris S, Schwendicke F. Root caries prevention via sodium fluoride, chlorhexidine and silver diamine fluoride in vitro. *Odontology*. 2018 Jan 31. doi: 10.1007/s10266-018-0341-x.

Dabei habe ich die Studie im Labor durchgeführt und die Auswertung der erhobenen Ergebnisse durch die Analyseverfahren CFU und TMR vollzogen.

Datum und Unterschrift Anna Skopp

12 Lebenslauf

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

13 Komplette Publikationsliste

Publikation 1:

Präsentation der Studienergebnisse „Root caries prevention via sodium fluoride, chlorhexidine and silver diamine fluoride in vitro.“ (Autoren: Göstemeyer G, Kohls A, Paris S, Schwendicke F.) auf dem 63. Kongress der „European Organisation for Caries Research“ (ORCA) in Athen, Griechenland. 06. – 09. Juli 2016.

Publikation 2:

Artikel in der Fachzeitschrift Zahnärztliche Mitteilungen (ZM) sowie in dem dazugehörigen online Portal www.zm-online.de: Artikel „Prophylaxestrategien gegen Wurzelkaries“ 2017; 107(5): 30-32 (Autoren: Göstemeyer G, Kohls A, Paris S, Schwendicke F.). <https://www.zm-online.de/archiv/2017/05/zahnmedizin/prophylaxestrategien-gegen-wurzelkaries/>.

(Stand 07.04.2018)

Publikation 3:

Veröffentlichung der Studienergebnisse unter dem Titel „Root caries prevention via sodium fluoride, chlorhexidine and silver diamine fluoride in vitro“ *Odontology*. 2018 Jul;106(3):274-81 (Autoren: Göstemeyer G, Kohls A, Paris S, Schwendicke F.).

14 Danksagung

Ein herzliches Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Paris für die Möglichkeit, diese interessante Studie unter seiner Leitung und unter Nutzung der Geräte und Materialien der Abteilung für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin durchführen zu können.

Besonders möchte ich mich nachfolgend bei Herrn Dr. Göstemeyer sowie Herrn PD Dr. Schwendicke bedanken, die mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Sei es bei der Durchführung des Versuchs, bei der Wahl der Analyseverfahren oder dem Publizieren meiner Arbeit.

Auch möchte ich mich für die freundliche Unterstützung im Labor bei Frau Schweynoch, Herrn Toll und Herrn Dr. Renz bedanken. Durch Ihre Hilfe, sei es beim Erstellen eines ausgetüftelten Plans für den Versuchsablauf, dem Zählen von tausenden Kolonien bei gefühlten 100 °C im Labor, dem Erstellen von vielen, vielen Dünnschliffen oder bei der EDX-Analyse von einigen Probenoberflächen, habe ich mich nie allein gelassen gefühlt und ich denke gerne an die Zeit im Labor zurück.

Ebenfalls möchte ich meiner Freundin und Kommilitonin Friederike Heinrich danken. Auch Du hast mir seelischen Beistand geleistet und in stressigen Phasen Deine wertvolle Zeit mir und meinen Bakterien geopfert.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinem Mitstreiter Felix Schulze bedanken. Durch Dich wurde das Zähne ziehen nur halb so schlimm und die anfänglichen Laborzeiten zu zweit waren mir immer eine Freude gewesen. Auch hast Du es mir ermöglicht, dass ich dieses interessante Thema bearbeiten konnte, da Du im richtigen Moment an mich gedacht hast. Danke.

Außerdem geht ein Dankeschön an den „Perleberger Schlachthof“, der es uns ermöglicht hat die Rinderzähne zu extrahieren, um dadurch das Probenmaterial für unsere Studie zu erhalten.

Abschließend möchte ich ein besonders großes Dankeschön an meine Familie aussprechen. Ihr habt mir zu jeder Tages- und Nachtzeit moralischen wie seelischen Beistand geleistet. Dabei möchte ich speziell meinem Vater Rudi Kohls sowie meinem Ehemann Ole Skopp danken. Ihr habt in düsteren Zeiten die Sonne wieder scheinen lassen und habt mich tatkräftig unterstützt.