

### 3 FRAGESTELLUNGEN UND HYPOTHESEN

Die Infiltration approximaler Schmelzläsionen mit Kunststoffen könnte zum einen die Progression initialer Schmelzläsionen (S1 und S2) verlangsamen und darüber hinaus, beim Auftreten einer Kavitation sowie einer Beteiligung des Dentins (D1, evtl. D2), eine kostengünstige, schmerzarme und begrenzt invasive Alternative zu der bisher praktizierten Restauration approximaler Flächen mit Füllungsmaterialien darstellen.

Bisherige Untersuchungen zu dieser Problematik beschränken sich auf die Betrachtung oberflächlicher Versiegelungen der kariösen Oberfläche im Sinne der seit vielen Jahren praktizierten Fissurenversiegelung. Hierbei ist jedoch unklar, ob die etablierbare Kunststoffschicht eine ausreichende Stabilität besitzt und somit eine effektive Verhinderung der Kariesprogression ermöglicht. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die bisherigen Ansätze zur Versiegelung approximaler Schmelzläsionen mit Adhäsivsystemen weiter zu entwickeln. Im Gegensatz zu der bisherigen Vorgehensweise sollte in der vorliegenden Arbeit die demineralisierte Zahnhartsubstanz durch einen niedrig-viskösen Kunststoff ersetzt werden, welcher in die Poren des demineralisierten Schmelzes infiltriert und dort ausgehärtet wird. Hierbei würde eine Diffusionsbarriere nicht auf der Oberfläche, sondern innerhalb der Zahnhartsubstanz geschaffen, womit eine Stabilisierung und Arretierung der Karies erreicht werden könnte. Folgende Fragestellungen und Hypothesen sollten hierbei untersucht werden:

1. Zunächst sollte eine Methode unter Anwendung des konfokalen Laser-Raster-Mikroskops (CSLM) entwickelt werden, die die gleichzeitige Visualisierung und Quantifizierung der kariösen Läsionen sowie eines infiltrierten Kunststoffes ermöglicht.

**Hypothese:** Die anhand von CLSM-Bildern gemessenen Läsionstiefen künstlicher Demineralisationen korrelieren gut mit den Werten des Goldstandards, der Mikroradiografie.

2. In den bisherigen Studien zur Versiegelung *in vitro* erzeugter Läsionen wurde der Einfluss jeweils nur einer der möglichen Parameter (Material, Applikationszeit bzw. -häufigkeit) von Adhäsivsystemen und Fissurenversiegeln hinsichtlich der Penetration in künstliche Läsionen sowie der Kariesprogression untersucht.

**Hypothesen:** Eine Verlängerung der Applikationszeit (2a) sowie eine zweimalige Applikation (2b) führen bei verschiedenen kommerziell erhältlichen Materialien zu einer erhöhten Penetrationstiefe in kariöse Läsionen und somit zu einer verbesserten Kariesinhibierung.

3. Die bisher verwendeten, hinsichtlich des adhäsiven Verbundes zu Schmelz und Dentin optimierten Materialien zur Versiegelung von Läsionen weisen niedrige Penetrationskoeffizienten (PK) auf, wodurch die Eindringtiefe in kariöse Läsionen limitiert sein könnte. Durch eine veränderte Zusammensetzung des Kunststoffes könnte der PK erhöht werden und somit die Penetrations- sowie kariesinhibierenden Eigenschaften dieses „Infiltranten“ in künstlichen Läsionen verbessert werden.

**Hypothesen:** Durch eine Veränderung der Zusammensetzung eines Monomergemisches kann der PK erhöht werden (3a). Solche „Infiltranten“ sind in der Lage, In-vitro-Läsionen in kürzerer Zeit tiefer zu penetrieren, wodurch eine verbesserte Inhibierung der Kariesprogression ermöglicht wird (3b).

4. Im Vergleich zu den pseudointakten Oberflächenschichten bei künstlichen Läsionen können natürliche Läsionen durch Remineralisationsvorgänge ausgebildete, dickere Oberflächenschichten besitzen, die eine Penetration eines Kunststoffes trotz Ätzung mit Phosphorsäure erschweren. Deshalb sollte zunächst ein alternatives Ätzverfahren evaluiert werden und hiernach die Infiltration eines Adhäsivsystems nach Ätzung mit unterschiedlichen Säuren überprüft werden. Darüber hinaus sollten verschiedene Läsionsmerkmale, die eine Infiltration beeinflussen könnten, untersucht werden.

**Hypothesen:** Eine Ätzung natürlicher Schmelzläsionen mit Salzsäure führt *in vitro* zu einer ausgeprägten Erosion der pseudointakten Oberflächenschicht, die mit der bisher angewendeten Phosphorsäureätzung nicht erzielt werden kann (4a). Die Infiltration des besten in Abschnitt 2 ermittelten Materials ist nach Ätzung mit Salzsäure im Vergleich zur Phosphorsäureätzung verbessert (4b). Die Läsionsmorphologie beeinflusst hierbei die Penetration eines Adhäsivsystems in natürliche Läsionen (4c).

5. Auch bei natürlichen Läsionen wird vermutet, dass der PK eines „Infiltranten“ einen Einfluss auf die Penetration hat.

**Hypothese:** Ein in Abschnitt 3 entwickelter experimenteller Infiltrant ist bezüglich der Penetrationseigenschaften in natürliche kariöse Läsionen dem in Abschnitt 5 verwendeten Adhäsivsystem überlegen.

6. In diesem Abschnitt soll die klinische Durchführbarkeit einer Infiltrationsbehandlung approximaler Zahnflächen an einem Fallbeispiel demonstriert werden.

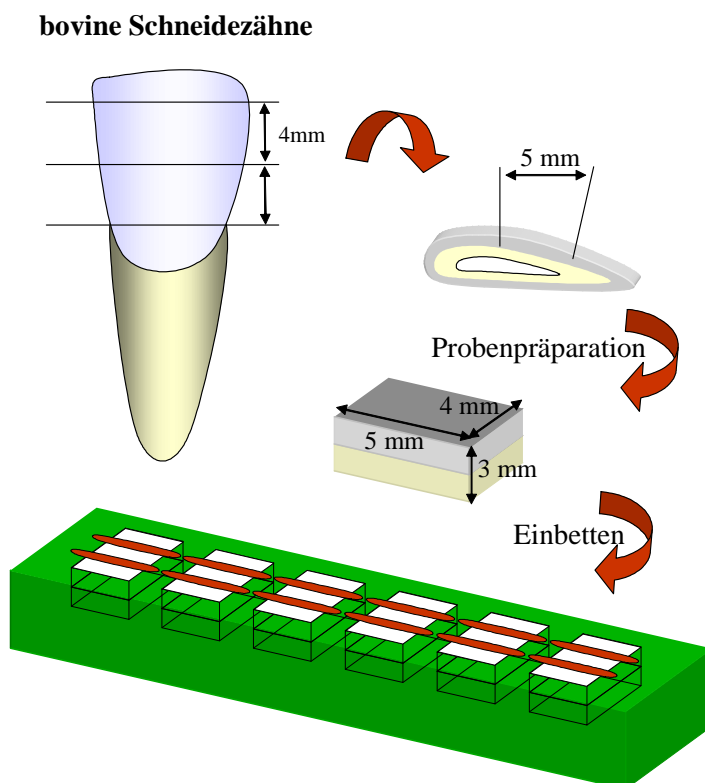
## 4 MATERIAL UND METHODE

### 4.1 Allgemeine Materialien und Methoden

#### 4.1.1. Herstellung der humanen und bovinen Schmelzproben

Für die Abschnitte 1-3 der vorliegenden Arbeit wurden bovine Zähne verwendet, die in einem Schlachthof (Fleischwaren Anklam, Anklam) extrahiert wurden. Die Humanzähne wurden von einer Entsorgungsfirma für Dentalmaterialien (Enretec, Velten) bezogen (Abschnitte 4 und 5). Die zuletzt genannten Zähne wurden in 20%igem Ethanol angeliefert und nach vorsichtiger Säuberung wie auch die bovinen Zähne standardisiert (NaCl-Lösung 0,9 %; Delta Select, Pfullingen) bei 4 °C gelagert.

Zur Herstellung der Schmelzproben wurden aus den Labialflächen boviner Oberkieferfrontzähne jeweils zwei Schmelzproben (5×4×3 mm) unter ständiger Wasserkühlung herauspräpariert (Bandsäge Exakt 300cl; Exakt Apparatebau, Norderstedt). Mit Hilfe von Silikonformen wurden jeweils sechs Proben zusammen in Kunststoff (Techno-



vit 4071; Heraeus Kulzer, Hanau) eingebettet. Anschließend wurden mit Hilfe einer Poliermaschine (Phoenix Alpha; Buehler, Düsseldorf) sowie Schleifpapier aufsteigender Körnung (Schleifpapier Körnung 1200, 2400, 4000; Exakt Apparatebau) die Probenoberflächen standardisiert und poliert. Auf der präparierten Probe konnten bis zu drei gesunde Schmelzbereiche mit Nagellack abgedeckt werden, um innerhalb einer jeden Probe den gesunden Schmelz als Kontrolle zu dokumentieren (Abb. 8).

**Abb. 8:** Herstellung der bovinen Schmelzproben

#### 4.1.2. Demineralisation der Schmelzproben

Zur Etablierung einer künstlichen Läsion wurden die Proben bei 37 °C (Wärmeschrank BR 6000; Heraeus Kulzer) je nach beabsichtigter Läsionstiefe für unterschiedliche Zeiträume (14-50 Tage) demineralisiert (pH = 4,95) (Tab. 4). Mit Hilfe eines pH-Meters (pH-Redox-Temperatur-Messgerät GMH 3510; Greisinger, Regenstauf) wurde täglich der pH-Wert überprüft und im Falle eines Abweichens vom Sollwert mit geringen Mengen Kaliumhydroxidlösung (10 M) nach unten sowie nach oben mit HCl (10 %) korrigiert.

**Tab. 4:** Zusammensetzung der Demineralisationslösung [Buskes et al. 1985]

Stoff	Ansatz	Konzentration in mmol/l	Molare Masse in g/mol	Menge ad 5 l
CaCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	zusammen 5 l	3	147	2,205 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		3	136	2,041 g
MHDP		0,006	176	5,3 mg
CH <sub>3</sub> COOH		50 (bovin)	60	15,012 g
KOH 10M		(ad pH 4,95)	56	ca. 23 ml
Thymol				in Spuren
Aqua dest.			56	18

MHDP = Methylhydrogendiphosphonat

#### 4.1.3. In-vitro-Methoden zur Visualisierung und Quantifizierung der Läsionstiefe mit Hilfe des konfokalen Laser-Raster-Mikroskops (CLSM)

Aufgrund der Fragestellungen der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Methoden zur Visualisierung der verschiedenen Strukturen (Läsionen, Penetrationskunststoffe) entwickelt. Diese unterschieden sich hinsichtlich der verwendeten fluoreszierenden Farbstoffe, die entweder zur Visualisierung des Porenvolumens bzw. der infiltrierten Kunststoffschicht zugesetzt wurden (Tab. 5).

**Tab. 5:** Methoden zur gleichzeitigen Visualisierung der Karies und der infiltrierten Kunststoffschicht mit dem CLSM

Methode	Porenvolumen	Infiltrant	Abschnitt
A	Spurr's Kunststoff + RITC	--	1, 2, 4a
B	Natriumfluorescein	TRITC	4b, 4c
		TRITC + Transmission	5
C	Natriumfluorescein	(Transmission)	1, 3

RITC = Rhodaminisothiocyanat, TRITC = Tetramethylrhodaminisothiocyanat, Abschnitt = Abschnitt der vorliegenden Schrift in der die jeweilige Methode verwendet wurde.

Generell wurden die Proben jeweils senkrecht zur Oberfläche in zwei Hälften getrennt (Bandsäge Exakt 300cl). Bei Methode A wurden die Probenhälften zur Visualisierung des Porenvolumens in einen sehr niedrig-viskösen Kunstharz eingebettet (Spurr Harz-Kit; Plano) [Spurr 1969], welchem der Fluoreszenzfarbstoff Rhoda-minisothiocyanat (RITC; Sigma Aldrich, Steinheim) zugegeben wurde (Tab. 6).

**Tab. 6:** Zusammensetzung des fluoreszierenden Kunstharzes (Spurr) zur Infiltration der Proben

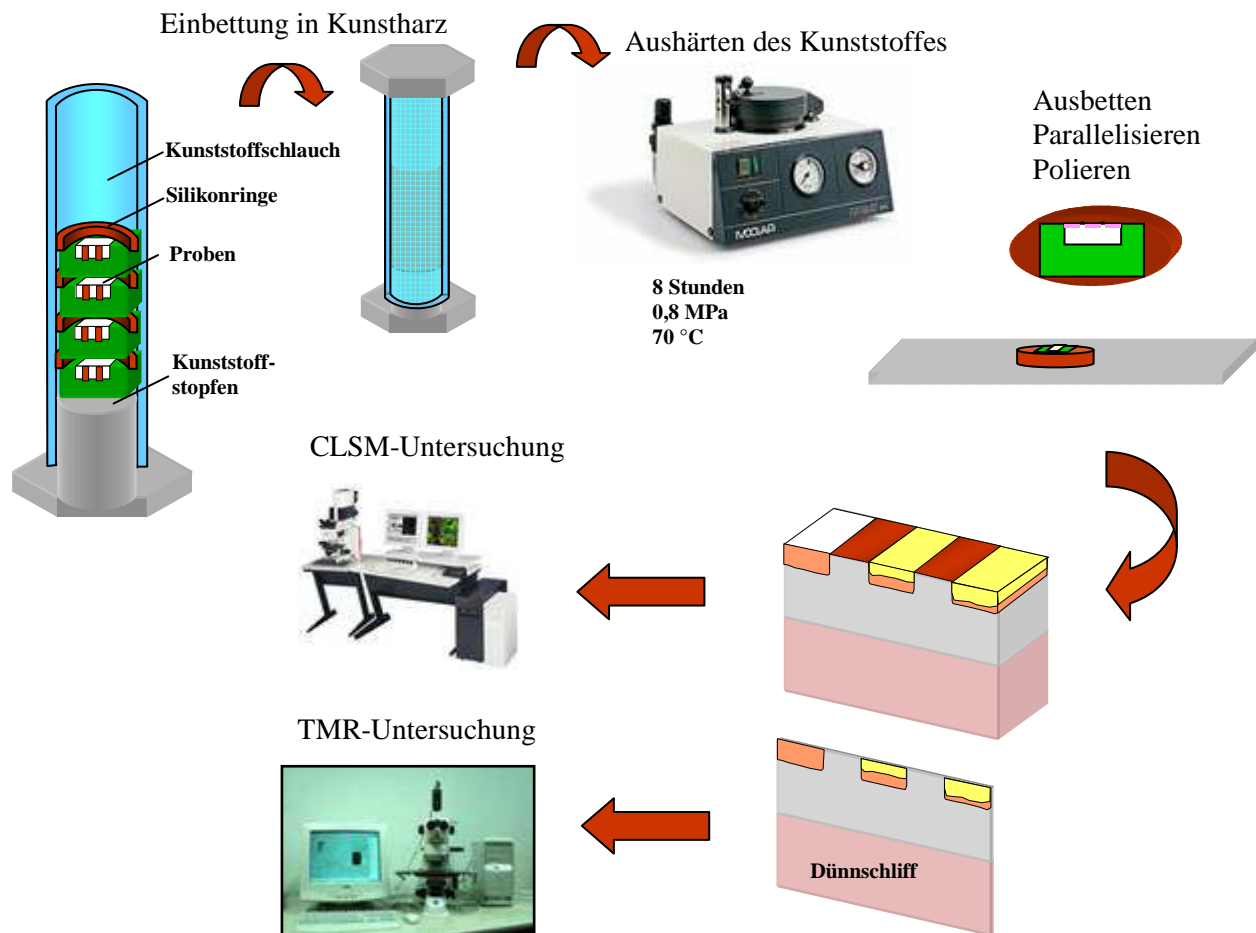
Bestandteil	Menge	Anteil
ERL 4206	10,0 g	23,6 %
DER 736	6,0 g	14,2 %
NSA	26,0 g	61,3 %
DMAE	0,4 g	0,9 %
RITC	100 $\mu$ mol/l	

ERL = Vinylzyklohexendioxid, DER = Diglycidyletherpolyethylenglykol, NSA Nonenylsukzinylanhydrid, DMAE = Dimethylaminoethanol, RITC = Rhodaminisothiocyanat

Zu diesem Zweck wurden die Proben in Kunststoffschläuchen gestapelt, die an einem Ende mit einem Kunststoffstopfen verschlossen und durch Kunststoffringe voneinander separiert waren (Abb. 9). Der gefärbte Kunststoff wurde über die Proben gegossen und die Schläuche mit einem zweiten Stopfen luft- und wasserdicht verschlossen (Abschnitt 2). In Versuch 1 und 5a wurden die Proben hingegen in einem Kunststoffschlauch unter Vakuum eingebettet (Vakuumerät, Severin Folio, Sundern). Die Polymerisation des Kunststoffes erfolgte in einem Polymerisationsofen (Ivomat IP3; Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) bei 70 °C und 0,8 MPa Druck über acht Stunden. Nach dem Ausbetten und Trennen (Bandsäge Exakt 300cl) wurden die Proben mit Schleifpapier (Körnung 500) zunächst grob zur Schnittfläche parallelisiert (Poliermaschine Phoenix Alpha) und mit Sekundenkleber (Henkel, Düsseldorf) auf Objektträger aus Plexiglas (diaplus, Oststeinbeck) geklebt. Anschließend wurden die Proben endgültig mit gewässertem Schleifpapier aufsteigender Körnung parallelisiert und poliert (Mikroschleifsystem; Exakt Apparatebau). Somit konnte die Schnittebene senkrecht zur Oberfläche im konfokalen Mikroskop betrachtet werden. Diese Methode wurde als ‚Visualization by resin infiltration‘ (VIRIN) bezeichnet (Abb. 9).

Bei Methode B wurden die Läsionen mit einer wässrigen Lösung, der 0,1%iges Natriumfluorescein (NaF; Sigma Aldrich) zugesetzt war, ohne Druck für drei Minuten imbibiert. Das Adhäsivsystem bzw. die zu penetrierenden experimentellen Kunststoffe (Infiltranten) wurden zuvor mit Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC 0,1 %; Sigma Aldrich) angefärbt. In Abschnitt 5 wurden zusätzlich noch Bilder im Transmissionsmodus angefertigt. Bei Methode C wurde auf die Anfärbung der infiltrierenden Kunststoffe

verzichtet; hier erfolgte lediglich eine Anfärbung der Mikroporositäten mit Natriumfluorescein (NaF) (Tab. 5).

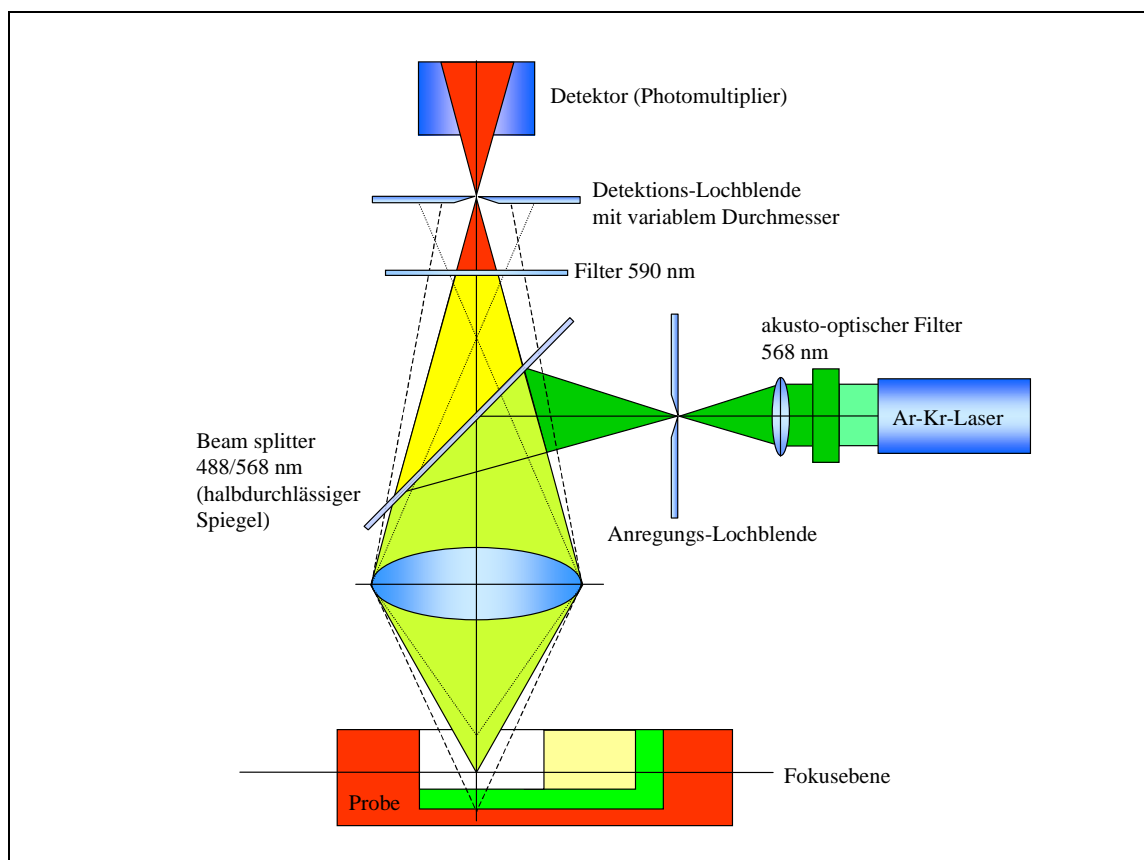


**Abb. 9:** Behandlung der Proben zur Visualisierung mit dem CLSM und der TMR (Methode A)

#### 4.1.4. Untersuchung mit dem CLSM

Die präparierten Proben wurden mit einem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (CLSM) (TCS NT; Leica, Heidelberg) untersucht. Das konfokale Prinzip basiert auf der Ausblendung von Streulicht durch Lochblenden (Pinholes). Bei herkömmlichen Mikroskopen wird sowohl das gewünschte Licht aus der Fokusebene als auch störendes Streulicht aus Ebenen über oder unterhalb der Fokusebene detektiert. Konfokale Laser-Raster-Mikroskope blenden alle Strukturen außerhalb der Fokusebene aus. Erreicht wird dies durch eine variable Detektionslochblende (Pinhole), die sich im Strahlengang an einer Stelle befindet, an dem Licht aus der Fokusebene erneut gebündelt wird. Konfokale Mikroskope ermöglichen daher eine zerstörungsfreie, detailreiche Darstellung von Strukturen auch unterhalb der

Probenoberfläche bis zu etwa 100  $\mu\text{m}$  Tiefe [Watson 1997]. Die Dicke der observierten Schicht hängt neben der Wellenlänge des observierten Lichtes und der numerischen Apertur des Objektivs vom Durchmesser der Lochblende ab. Die Dicke (xz-Wert) der abzutastenden Ebene konnte mit der Pinhole-Einstellung variiert werden. Um vergleichbare Bilder zu erzeugen, wurde der Pinhole-Wert auf den Wert 1 festgelegt. Das CLSM wurde je nach dem verwendeten Farbstoff (RITC oder NaF) im entsprechenden Fluoreszenzmodus betrieben. Dies bedeutet, dass nur das vom Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht, nicht aber das von der Probe reflektierte Licht, detektiert wurde. Das Anregungslicht [Wellenlängenmaximum/Bandbreite: 568/30 nm (RITC); 488/20 nm (NaF)] wurde mit einem Argon-Krypton-Laser erzeugt und über einen akusto-optischen Filter (AOTF) sowie einen halbdurchlässigen Spiegel (Beamsplitter) gelenkt. Das detektierte Licht wurde für RITC mit einem Langpassfilter mit einem Durchlässigkeitsmaximum bei 590 nm bzw. für NaF mit einem Bandpassfilter (525/50 nm) nach den entsprechenden Emissionsmaxima gefiltert, um reflektiertes Licht niedrigerer Wellenlänge auszublenden. Die jeweils observierte Schicht befand sich etwa 10  $\mu\text{m}$  unter der Probenoberfläche (Abb. 10).



**Abb. 10:** Schematische Darstellung der Funktionsweise des CLSM bei Verwendung von RITC.

Von den Läsionen wurden Aufnahmen mit einem 10×, 20× bzw. einem 40× Objektiv mit Ölimmersion (Immersol, Zeiss, Jena) angefertigt. Die Aufnahmen hatten eine Kantenlänge von 1000×1000 µm (10×), 500×500 µm (20×) bzw. 250×250 µm (40×) bei einer Bildauflösung von 1024×1024 Pixel. Darüber hinaus wurden in den Abschnitten 3 und 5 der vorliegenden Arbeit durchlichtmikroskopische Bilder von Dünnschliffen mit dem CLSM angefertigt (Transmissions-Modus). Sämtliche Aufnahmen wurden über den dynamischen Mittelwert von mindestens vier Einzelaufnahmen (Average-Funktion) gewonnen und im Tiff-Dateiformat gespeichert.

#### **4.1.5. Mikroradiografische Untersuchung**

Hierzu wurden die Proben mit der zuvor observierten Fläche mit Sekundenklebstoff (Henkel) auf Objektträger aus Plexiglas (diaplus) fixiert. Anschließend wurden unter ständiger Wasserkühlung mit einer 200 µm dicken, diamantierten Bandsäge (Bandsäge Exakt 300cl) planparallele Schnitte von 300 µm Dicke hergestellt, die mit einer Mikroschleifapparatur (Exakt Mikroschleifsystem) und gewässertem Schleifpapier aufsteigender Körnung (1200, 2400 und 4000) bis zu einer Schliffdicke von 100 µm parallelisiert wurden. Die Dicke der Proben wurde mit einem digitalen Mikrometer überprüft (Bügelmessschraube Digimatic; Mitutoyo, Kawasaki, Japan). Die so gewonnenen Dünnschliffe wurden auf Probenhalter (TMR Probenhalter; Plano) fixiert und anschließend in den Strahlengang eines Röntgenstrahlengenerators (PW 1730/10; Philips, Eindhoven, Niederlande) montiert. Die mikroradiografische Belichtung der Filme (High Speed Holographic Film SO 253; Kodak, Stuttgart) erfolgte bei einer Röhrenspannung von 20 kV, einem Röhrenstrom von 40 mA und einer Belichtungszeit von 12 Sekunden. Nach Entwicklung des Filmes wurden die Aufnahmen mit einem Durchlichtmikroskop (Durchlichtmikroskop 60318; Zeiss, Oberkochen), an dem eine Videokamera (CCD-Videokamera Modul XC 77CE; Sony, Tokio, Japan) angeschlossen war, untersucht. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Transversal Micro Radiography (TMR für Windows; Version 2.0.27.2, Inspektor Research System, Amsterdam, Niederlande). Die Läsionstiefe wurde als der Abstand von der Probenoberfläche (Beginn bei der Tiefe mit einem Mineralverlust von 20 Vol.%) bis zu dem Punkt, an welchem die Mineraldichte 95 % des gesunden Schmelzes (88 Vol.%) betrug, festgelegt.



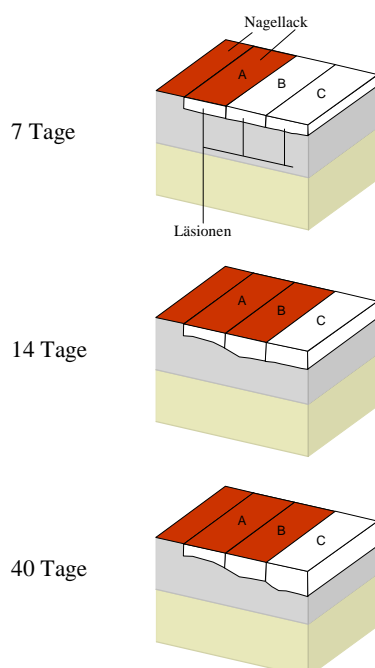
#### 4.1.6. Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung aller Daten der vorliegenden Arbeit erfolgte mit SPSS (Version 12.0 für Windows; SPSS GmbH, München). Zunächst wurden die Daten hinsichtlich ihrer Abweichung von einer Normalverteilung überprüft (Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest). Anschließend wurden diese entsprechend ihrer Verteilung entweder mit parametrischen (ANOVA, t-Test) oder nichtparametrischen Tests (Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-Test, Wilcoxon-Test) analysiert (Abschnitte 1-3, 4a, 4b und 5). Verschiedene Auswertungsparameter innerhalb eines Abschnittes wurden miteinander korreliert (Pearson) und bei gleicher Messgröße die Intraklassenkorrelation errechnet (Abschnitte 1, 3b). Für alle statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von 5 % angesetzt. In Abschnitt 4c erfolgte zunächst eine bivariate Analyse der Daten (Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-Test). Einflussfaktoren, die in der bivariaten Analyse die jeweilige Variable mit  $p < 0,025$  beeinflussten wurden anschließend mit Hilfe einer linearen Regression analysiert.

### 4.2. Abschnitt 1: Validierung der Auswertungsmethoden mit dem CLSM

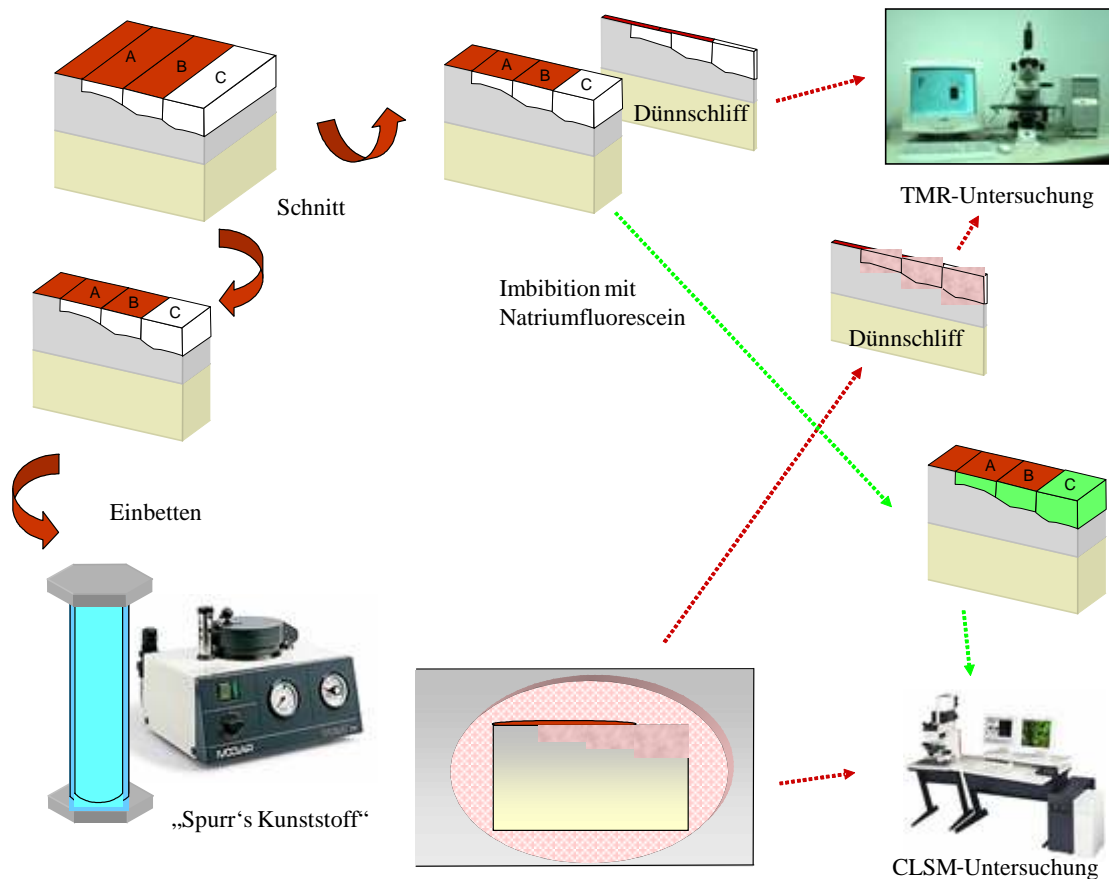
#### 4.2.1. Probenpräparation

Insgesamt 29 bovine Schmelzproben wurden für 40 Tage demineralisiert, wobei nach sieben bzw. 14 Tagen jeweils ein Teilbereich der Oberfläche mit Nagellack abgedeckt wurde, so dass sich bei den Proben drei unterschiedlich tiefe Bereiche ergaben (Abb. 11).



**Abb. 11:** Drei Schmelzbereiche der bovinen Proben wurden zunächst für sieben Tage der Demineralisationslösung ausgesetzt. Danach wurde einer der Teilbereiche mit Nagellack abgedeckt (C: Demineralisation: sieben Tage) und die Proben für weitere sieben Tage demineralisiert. Anschließend wurde die zweite Fläche der Proben (B: 14 Tage) abgedeckt. Nach 40 Tagen wurden alle Proben aus der Demineralisationslösung entnommen.

Nach 40-tägiger Demineralisation wurden die Proben senkrecht zur Oberfläche geschnitten (Bandsäge Exakt 300cl) und aus der einen Hälfte ein Dünnschliff (Mikroschleifsystem Exakt) für die mikroradiografische sowie die konfokal laser-raster-mikroskopische Auswertung nach Imbibition mit Natriumfluorescein angefertigt (Methode C). Die anderen Hälften wurden in mit RITC gefärbtem Spurr's Kunststoff eingebettet und mit dem CLSM (Methode A) anschließend untersucht. Ein Dünnschliff dieser Probenhälften wurde ebenfalls mikroradiografisch ausgewertet (Abb. 12).

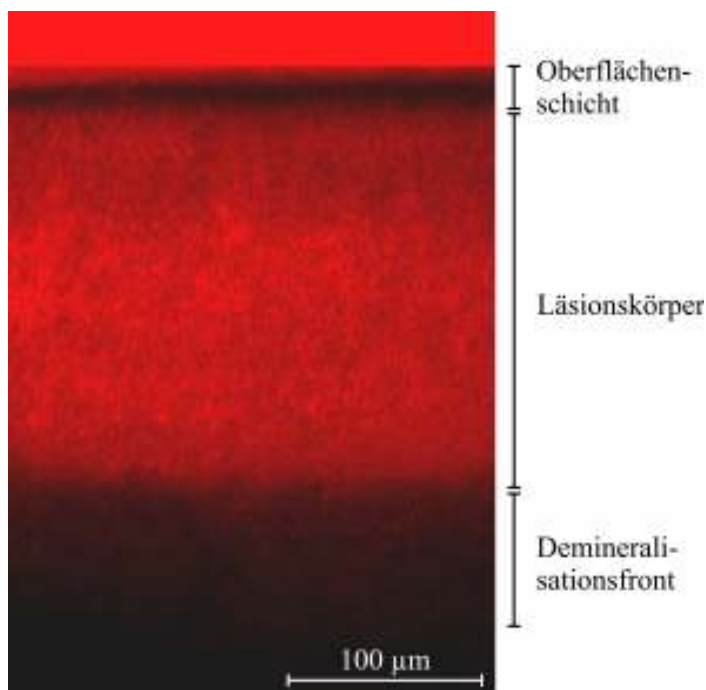


**Abb. 12:** Nach Demineralisation wurden die Proben senkrecht zur Oberfläche geschnitten. Aus der einen Hälfte wurde ein Dünnschliff für die mikroradiografische Auswertung angefertigt und die verbliebene Probenhälfte mit Natriumfluorescein imbibiert. Die anderen Hälften wurden in mit RITC gefärbtem Spurr's Kunststoff eingebettet. Dünnschliffe dieser Probenhälften wurde ebenfalls mikroradiografisch untersucht. Von den beiden verbliebenen, mit NaF bzw. Spurr's Kunststoff infiltrierte Probenhälften wurden CLSM-Aufnahmen angefertigt.

#### 4.2.2. Auswertung der CLSM-Bilder

Die mit der Methode A (VIRIN) am CLSM gewonnenen Bilder zeigten den Läsionskörper initialer Schmelzläsionen als rot fluoreszierenden Bereich, während weniger stark

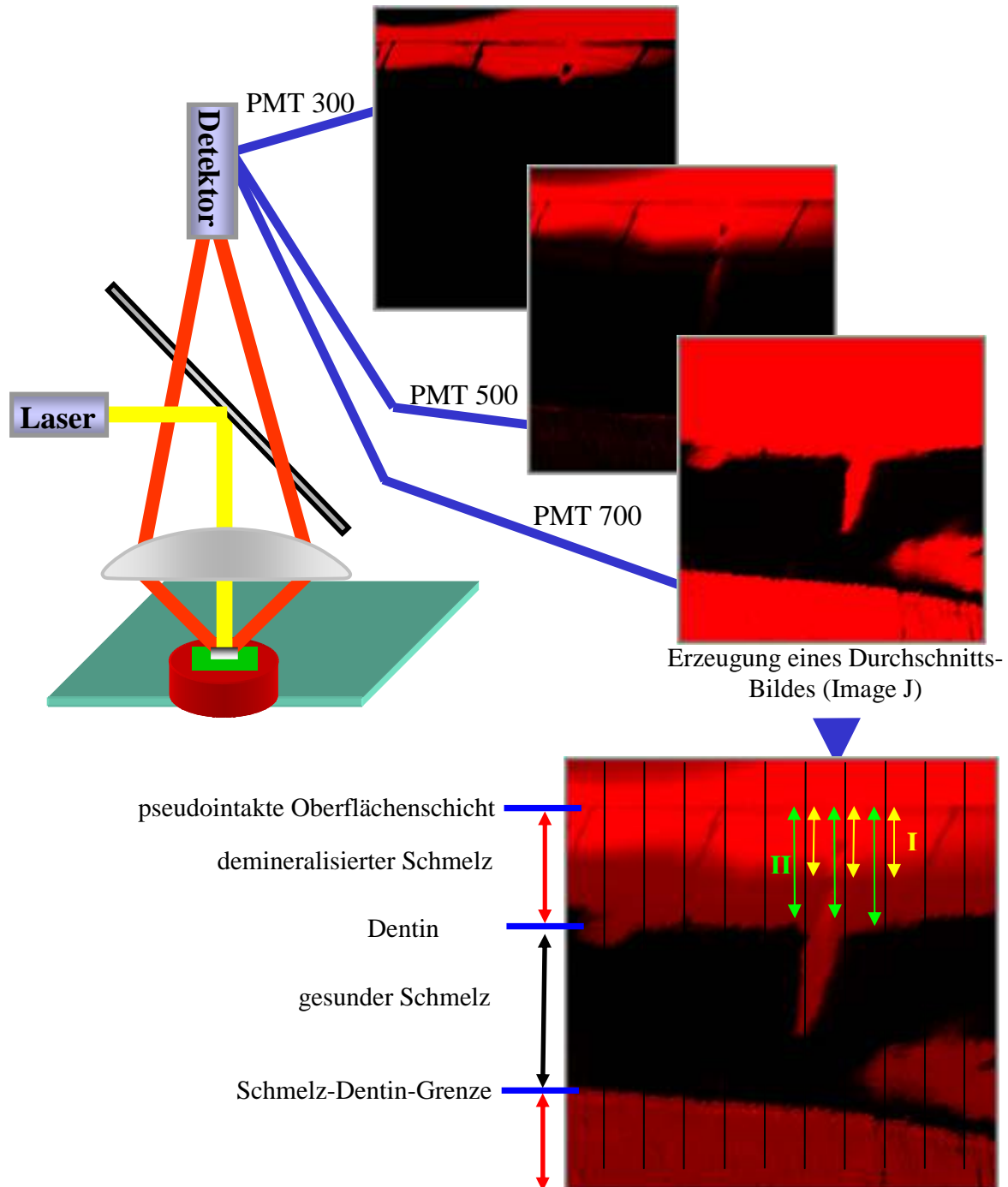
demineralisierte Bereiche dunkler sowie gesunder Schmelz schwarz erschienen. Wie im Kapitel 4.1.4 beschrieben, wurden CLSM-Bilder mit einem 20× sowie einem 10× Objektiv generiert. Die Auswertung der Läsionstiefen erfolgte bei den mit dem 20× Objektiv aufgenommenen Bilder mit Hilfe der Kalkulationssoftware des CLSM (LCS Lite Version 2.61; Leica) und bei den mit dem 10× Objektiv erstellten Bildern mit dem Programm ImageJ (ImageJ; National Institutes of Health, Rockville Pike, USA) bei abgedunkeltem Raum. Die Läsionstiefen wurden anhand der Aufnahmen mit dem 20× Objektiv (Methode A1; Abb. 13) als auch mit dem 10× Objektiv (Methode A2; Abb. 14) anhand unterschiedlicher anatomischer Merkmale bestimmt.



**Abb. 13:** Die Aufnahmen der mit Spurr's Kunststoff penetrierten Proben erfolgte bei Methode A1 mit dem 20× Objektiv. Die Läsionstiefe wurde als der Abstand von der Probenoberfläche bis zu der Schicht, in der das Innere der Schmelzprismen nicht mehr mit Kunststoff aufgefüllt war, definiert. Die jeweiligen Werte wurden bei jeder Läsion dreimal im Abstand von 100 µm (Raster) gemessen und aus diesen drei Messwerten der Mittelwert gebildet.

Darüber hinaus wurden CLSM-Aufnahmen mit dem 10× Objektiv angefertigt und ausgewertet (Methode A2). Hierzu wurden jeweils drei Bilder einer Läsion, die bezüglich des Bildausschnittes identisch waren, mit unterschiedlichen Detektorempfindlichkeiten [PhotoMultiPlier (PMT) Einstellungen] angefertigt. Das erste Bild erfolgte mit geringer Detektorempfindlichkeit (PMT ca. 300), so dass nur die Oberflächenschicht qualitativ sehr gut dargestellt wurde. Mit Hilfe der mittleren PMT-Einstellung (ca. 500) konnte der Läsionskörper dargestellt werden. Die dritte Aufnahme ergab bei einer PMT-Einstellung von etwa 700 ein gut beurteilbares Bild im Bereich der fortschreitenden Demineralisation unterhalb des Läsionskörpers, während gesunde Schmelzbereiche schwarz abgebildet wurden. Die drei Bilder wurden mit Hilfe des Programms ImageJ kombiniert, so dass ein einziges, neu berechnetes Bild entstand. Anhand der Durchschnittsbilder konnten im Bereich der Läsionskörper zwei unterschiedliche Bereiche differenziert werden. Der beginnend ab der

Schmelzoberfläche heller dargestellte Bereich der Läsion wurde als Tiefe des Läsionskörpers (Methode: A2) definiert. Die darunter liegende, wesentlich dunkler erscheinende Zone bildete die voranschreitende Läsionsfront und wurde, von der Läsionsoberfläche gemessen, als maximale Läsionstiefe (Methode: A2 b) definiert (Abb. 14).



**Abb. 14:** Die Aufnahmen mit dem 10× Objektiv wurden bei drei unterschiedlichen Detektorempfindlichkeiten angefertigt und hiernach softwaregestützt übereinander gelagert. Zwei voneinander abgrenzbare Helligkeitszonen können als Tiefen der Läsion definiert (Strecke I: Methode A2; Strecke II: Methode A2 b) und mit Hilfe eines Rasters (Schrittweite 100 µm) an jeweils drei benachbarten Messstellen ausgewertet werden.

Die mit Natriumfluorescein imbibierte Proben (Methode C) wurden nur mit dem 20× Objektiv visualisiert. Als Läsionstiefe wurde die Strecke von der Oberfläche der Proben bis zu den Bereichen in der Probe, die keine grüne Fluoreszenz aufwies, definiert. Die mikroradiografische Darstellung und Auswertung wurde wie unter 4.1.5. beschrieben durchgeführt.

Die mit den verschiedenen Methoden gemessenen Läsionstiefen wurden miteinander korreliert (Pearson, Intraklassenkorrelationskoeffizient). Der mit der TMR bestimmte Mineralgehalt wurde mit den Leuchtintensitäten der mit Spurr's Kunststoff imbibierte mit dem CLSM ausgewerteten Proben qualitativ verglichen.

### **4.3. Abschnitt 2a: Einfluss der Applikationszeit auf die Penetration verschiedener Adhäsivsysteme und eines Fissurenversiegler in künstliche kariöse Läsionen sowie die Läsionsprogression *in vitro***

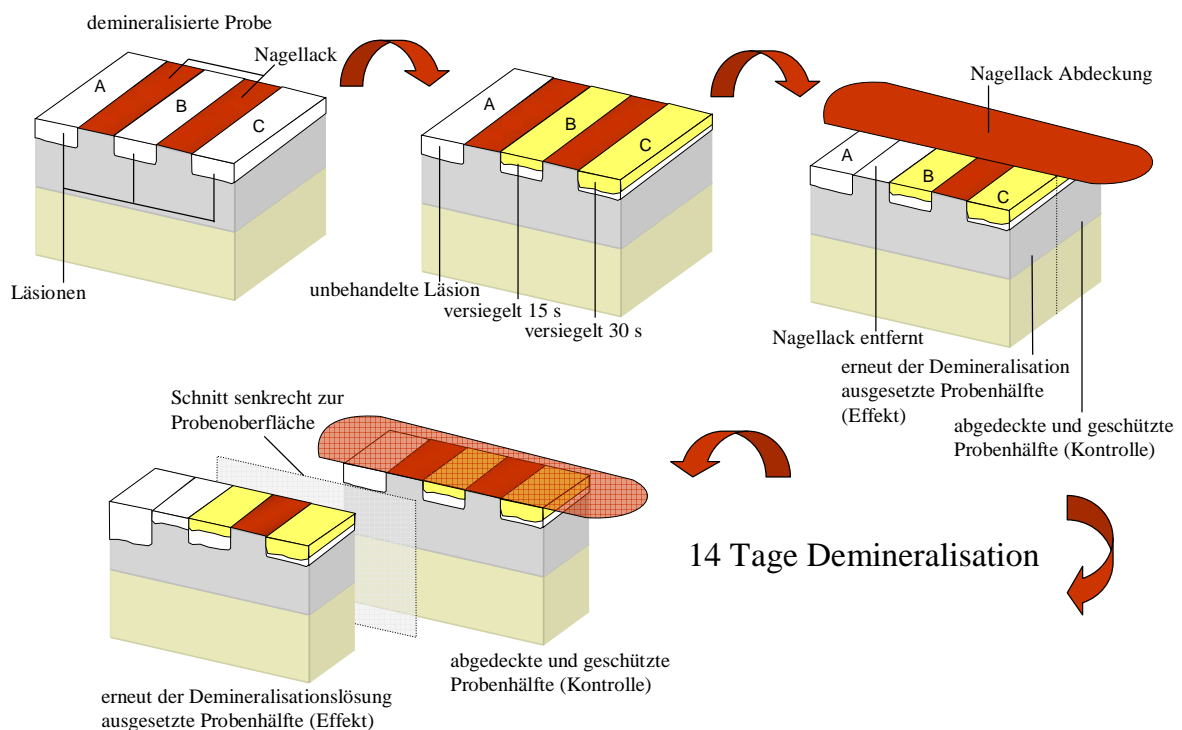
#### **4.3.1. Behandlung der Schmelzläsionen**

Die 54 bovinen Schmelzproben wiesen nach der Demineralisation (14 Tage) jeweils drei initiale künstliche Schmelzläsionen (A, B, C) auf, welche durch die vom Nagellack abgedeckten gesunden Flächen sicher abgrenzbar voneinander getrennt waren (Abb. 15). Läsion A diente jeweils als unbehandelte Kontrolle. Die Läsionen B und C wurden für fünf Sekunden mit 20%igem Phosphorsäuregel (Gluma Etch 20 Gel<sup>®</sup>; Haeraeus Kulzer) geätzt. Danach wurden die Proben mit Wasserspray (Wasser-Luftansatz Dentaleinheit) für 30 s von allen Säurerückständen gesäubert und randomisiert in sechs Gruppen (n = 9) aufgeteilt. Die verwendeten Materialien (Tab. 7) wurden mittels Microbrush (Vivabrush; Ivoclar Vivadent) auf die Läsionen B und C aufgetragen, ohne die Materialien in die Läsionen einzumassieren.

**Tab. 7:** Materialien zur Versiegelung der Läsionen

<b>Material</b>	<b>konventioneller Einsatz</b>	<b>Hersteller</b>
Helioseal <sup>®</sup>	lichthärtender Fissurenversiegler	Ivoclar Vivadent; Schaan, Liechtenstein
Heliobond <sup>®</sup>	lichthärtendes Schmelzadhäsiv	
Resulcin Monobond <sup>®</sup>	lichthärtendes Schmelzadhäsiv	Merz Dental; Lütjenburg, Deutschland
Excite <sup>®</sup>	Einkomponenten-Adhäsiv	Ivoclar Vivadent
Solobond M <sup>®</sup>	Einkomponenten-Adhäsiv	Voco; Cuxhaven, Deutschland
Adper Prompt L-Pop <sup>®</sup>	selbsttätendes Adhäsiv	3M Espe; Seefeld, Deutschland

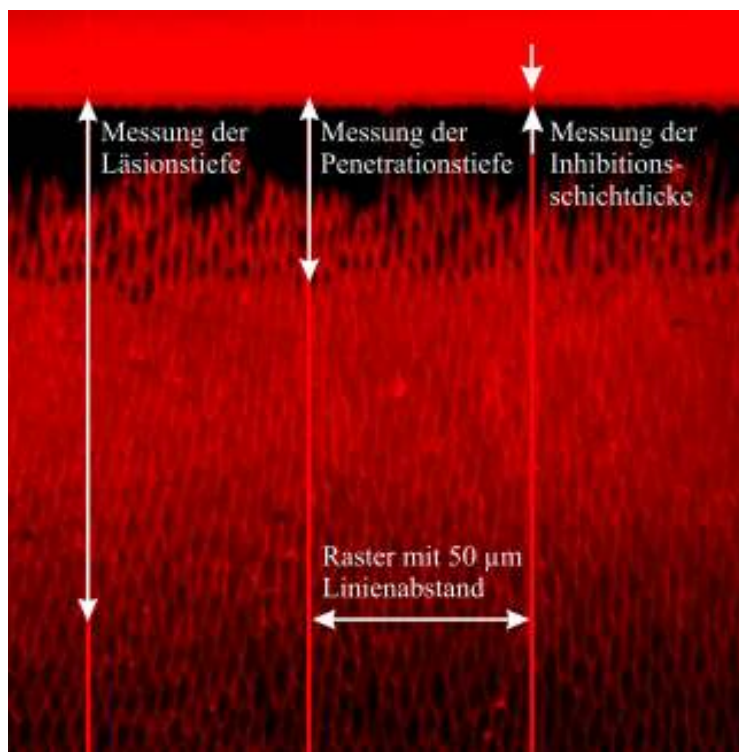
Nach 15 (B) bzw. 30 Sekunden (C) wurde überstehendes Material mit einer Watterolle vorsichtig entfernt und der Kunststoff für 20 s ausgehärtet (400 mW/cm<sup>2</sup>, Translux CL; Heraeus Kulzer). Nach Versiegelung wurde der Nagellack zwischen Läsion A und B vorsichtig mit einem Skalpell entfernt, um eine Kontrollfläche für die Demineralisation von ungeschütztem gesundem Schmelz zu schaffen. Eine Hälfte der Probe wurde mit säureresistentem Nagellack abgedeckt und die Proben für weitere 14 Tage der Demineralisationslösung ausgesetzt. Täglich wurde der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert (Abb. 15). Anschließend erfolgte die Probenherstellung für die mikroradiografische sowie die konfokalmikroskopische Darstellung.



**Abb. 15:** Versuchsablauf Abschnitt 2a: Jeweils zwei der drei demineralisierten Bereiche boviner Proben wurden mit einem der untersuchten Materialien für entweder 15 s oder 30 s behandelt. Ein Teilbereich der Proben (Kontrollhälfte) wurde mit Nagellack abgedeckt und die Proben für 14 Tage demineralisiert. Nach senkrechtem Schnitt durch die Oberfläche und anschließender Politur wurden sowohl von der Effekt- als auch von der Kontrollhälfte mit dem CLSM entsprechende Bilder generiert (Methode A1). Im Abschnitt 2b wurden die Läsionen zunächst für 90 s mit den entsprechenden Materialien behandelt. Nach Entfernung von Überschüssen sowie Lichthärtung wurde eine zweite Schicht appliziert, die ebenfalls nach 90 s Einwirkzeit ausgehärtet wurde.

### 4.3.2. Auswertung mit dem CLSM

Anhand von CLSM-Bildern erfolgte die Auswertung der Läsionstiefen (Methode A1; Definition siehe 4.2.2.) mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ bei 40facher Vergrößerung. Darüber hinaus wurde die Penetrationstiefe (Kontrollhälfte) als der Abstand von der Probenoberfläche bis zur einer Tiefe, in der nicht fluoreszierende Bereiche (schwarz) zu erkennen waren, definiert. Die Werte wurden anschließend in Relation zur Tiefe der jeweiligen Läsion gesetzt. Als Sauerstoffinhibitionsschicht wurde die Zone zwischen der Probenoberfläche und dem Beginn der nicht fluoreszierenden, versiegelten Schicht definiert. Diese wurde an Bildern der Kontrollgruppe ermittelt. Zur Ermittlung der Progression der Läsionstiefe nach der zweiten Demineralisationsperiode wurde für jede Probe die Differenz der Läsionstiefen der Kontroll- und der Effektgruppe berechnet und zur Läsionstiefe der Kontrollgruppe in Relation gesetzt (Abb. 16).

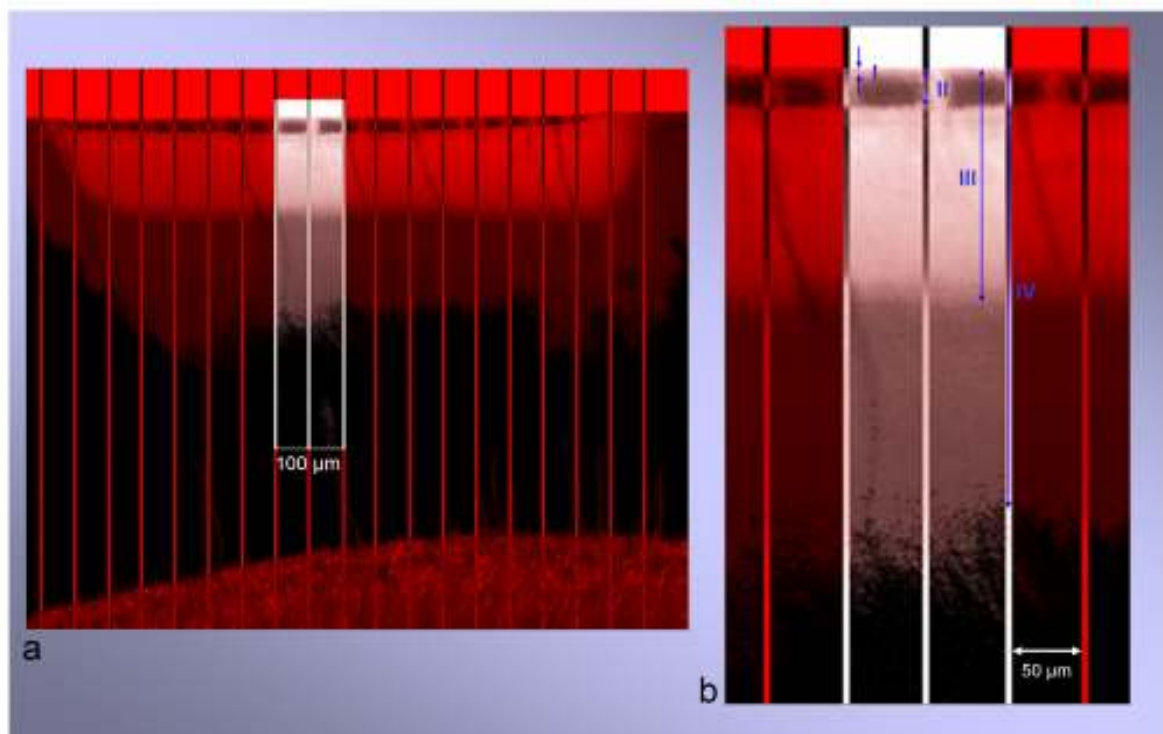


**Abb. 16:** Exemplarische Aufnahme (40× Objektiv) einer mit einem Adhäsivsystem penetrierten Läsion. Die Bilder wurden mit Hilfe eines Overlays (Rasterabstand: 50 µm) hinsichtlich der Läsionstiefen (Methode A1; Definition siehe 4.2.3.) der Penetrationstiefen des Adhäsivsystems sowie der Dicken der Sauerstoffinhibitionsschichten ausgewertet.

Die Variablen Läsionstiefe, Penetrationstiefe, Sauerstoffinhibitionsschicht sowie Läsionsprogression wurden hinsichtlich signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen überprüft (ANOVA, Bonferroni). Innerhalb der jeweiligen Gruppe wurde der t-Test zur Bestimmung signifikanter Unterschiede herangezogen. Das Signifikanzniveau wurde wie bereits beschrieben jeweils auf 5 % festgelegt.

#### 4.4. Abschnitt 2b: Einfluss der Applikationshäufigkeit auf die Penetration verschiedener Adhäsivsysteme und eines Fissurenversieglers in künstliche kariöse Läsionen sowie die Läsionsprogression *in vitro*

Der Versuchsaufbau unterschied sich geringfügig von dem unter 4.3. beschriebenen Abschnitt 2a. Zum einen wurden die Materialien (siehe Tab. 7 und vgl. Abb. 15, Kapitel 4.3.1.) erst nach einer Einwirkzeit von 90 Sekunden lichtgehärtet. Zum anderen wurde auf den Bereich C anschließend ein weiteres Mal das jeweilige Material für 90 Sekunden appliziert und lichtgehärtet. Ein eventuell vorhandener Überschuss wurde mit einem kleinen Abziehgummi (Gummichelch; Brasseler, Lemgo) vor der jeweiligen Lichthärtung (Translux CL; Heraeus Kulzer) entfernt. Die Hälfte der Proben wurde wiederum mit Nagellack abgedeckt und für weitere 14 Tage demineralisiert. Anhand von CLSM-Bildern erfolgte die Auswertung der in Abschnitt 2a genannten Variablen allerdings bei 10facher Vergrößerung (vgl. Kapitel 4.2.2.) (Abb. 17). Die statistische Auswertung erfolgte analog zu Abschnitt 2a.



**Abb. 17:** Die repräsentative CLSM-Aufnahme [10fache Vergrößerung (a)] sowie die Ausschnittsvergrößerung (b) einer mit Solobond M<sup>®</sup> behandelten Läsion verdeutlicht die Messungen der Läsionsausdehnung sowie der Penetrationstiefen des Adhäsivs. Auf das Bild des Probenquerschnitts wurde ein Raster mit einem Linienabstand von 50 µm vertikal zur Probenoberfläche gelegt. An drei benachbarten Linien erfolgten die Messungen des Läsionskörpers (III) (Methode A2) sowie der maximalen Läsionstiefen (IV) (Methode A2 b; Definition siehe 4.2.3.), der Penetrationstiefen des Adhäsivsystems (II) und der Dicke der dazugehörigen Sauerstoffinhibitionsschicht (I).



#### **4.5. Abschnitt 3: Einfluss physikalischer Parameter auf die Penetration verschiedener Infiltranten in künstliche kariöse Läsionen sowie die Kariesinhibierung *in vitro***

Anhand der drei Flüssigkeitsparameter Viskosität, Oberflächenspannung und Kontaktwinkel zu Schmelz wurden zunächst für die in Abschnitt 2 verwendeten kommerziellen Materialien sowie für die Monomere BisGMA, TEGDMA, UDMA und HEMA (Sigma Aldrich) bzw. diverser Mischungen dieser Methacrylate mit Alkohol die Penetrationskoeffizienten ermittelt. Für zwölf der insgesamt 66 gemessenen experimentellen Materialien wurden anschließend die Tiefe der Penetration in künstliche Läsionen sowie die Fähigkeit, eine weitere Progression der Läsion unter kariogenen Bedingungen zu verhindern, ermittelt.

##### **4.5.1. Abschnitt 3a: Penetrationskoeffizienten der in Abschnitt 2 verwendeten Materialien sowie der experimentellen Infiltranten**

Die Bestimmung der Penetrationskoeffizienten erfolgte bei den in Tabelle 7 (Seite 48) aufgeführten, kommerziell erhältlichen Materialien sowie bei 66 experimentellen Kunststoffen, die jeweils aus zwei der vier Monomere BisGMA, UDMA, TEGDMA and HEMA (Gewichtsverhältnisse: 100:0; 75:25, 50:50, 25:75, 0:100) sowie unterschiedlichen Konzentrationen an Ethanol bestanden (0 %, 10 % oder 20 %) (siehe Tab. 15, Seite 75). Darüber hinaus wurden der Initiator Kampferchinon sowie der Stabilisator Ethyl 4-dimethylaminobenzoat (DABE) hinzugegeben.

Die Oberflächenspannung wurde in einer dem Lösungsmittel des jeweiligen Materials entsprechenden gesättigten Umgebung mit einem Ringtensiometer (K12; Krüss, Hamburg) untersucht. Jeweils 5 ml des zu messenden Materials wurden in eine Teflonmulde appliziert und der Prüfring (Platin-Iridium-Legierung, RI 12; Krüss) in der Nähe der Oberfläche positioniert. Die automatischen Messungen erfolgten, bis ein zuverlässiger Wert ermittelt war (5- bis 20-mal); das Gerät schaltete sich anschließend selbsttätig ab.

Zur Ermittlung des Kontaktwinkels der Kunststoffe zu Zahnschmelz wurden 198 bovine Schmelzproben mit standardisierter Oberfläche hergestellt (vgl. Kapitel 4.1.1.). Die Schmelzoberfläche wurde auf Hochglanz poliert und direkt vor der Messung mit einem computergestützten Goniometer (G10; Krüss) mit 100%igem Ethanol gereinigt. Jeweils 1 µl des Materials wurde auf die gesunde Oberfläche mit Hilfe einer Mikropipette getropft und nach 10 s eine Aufnahme mit einer in das Messsystem integrierten digitalen Kamera

angefertigt. Die Bestimmung des mittleren Kontaktwinkels erfolgte anhand von drei Aufnahmen softwaregestützt (DSA 10; Krüss).

Die kinematische Viskosität der Stoffe wurde mit einem Ubbelohde-Viskosimeter (Schott; Mainz) bei 25 °C bestimmt. Für niedrig-visköse Kunststoffe wurden Glaskapillaren mit einer Kapillarkonstanten von  $0,1 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-2}$  verwendet, während die Konstante der Kapillaren bei höher-viskösen Materialien  $10 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-2}$  betrug. Anhand von drei Messungen wurde die mittlere kinematische Viskosität bestimmt und mit Hilfe der rechnerisch ermittelten Dichte (experimentelle Infiltranten) in die dynamische Viskosität umgerechnet. Die Dichte der kommerziell erhältlichen Materialien wurde hingegen mit einem Dichteoszillator bestimmt (DMA 5000; Anton Paar, Graz, Österreich).

Zur Prüfung der Aushärtung (visuell) wurden die Materialien in Mulden ( $7 \times 4 \times 2 \text{ mm}$ ) eingebracht und für 60 s (Translux CL; Heraeus Kulzer) gehärtet. Mit den Ergebnissen sollte ermittelt werden, welche Monomere bzw. Lösungsmittel die Penetrationseigenschaften laut *Washburn*-Gleichung (siehe Seite 35) positiv beeinflussen. Darüber hinaus sollte eine Vorauswahl der für einen Infiltranten in Frage kommenden Monomerkombinationen für den im folgenden Abschnitt 3b beschriebenen Versuch getroffen werden.

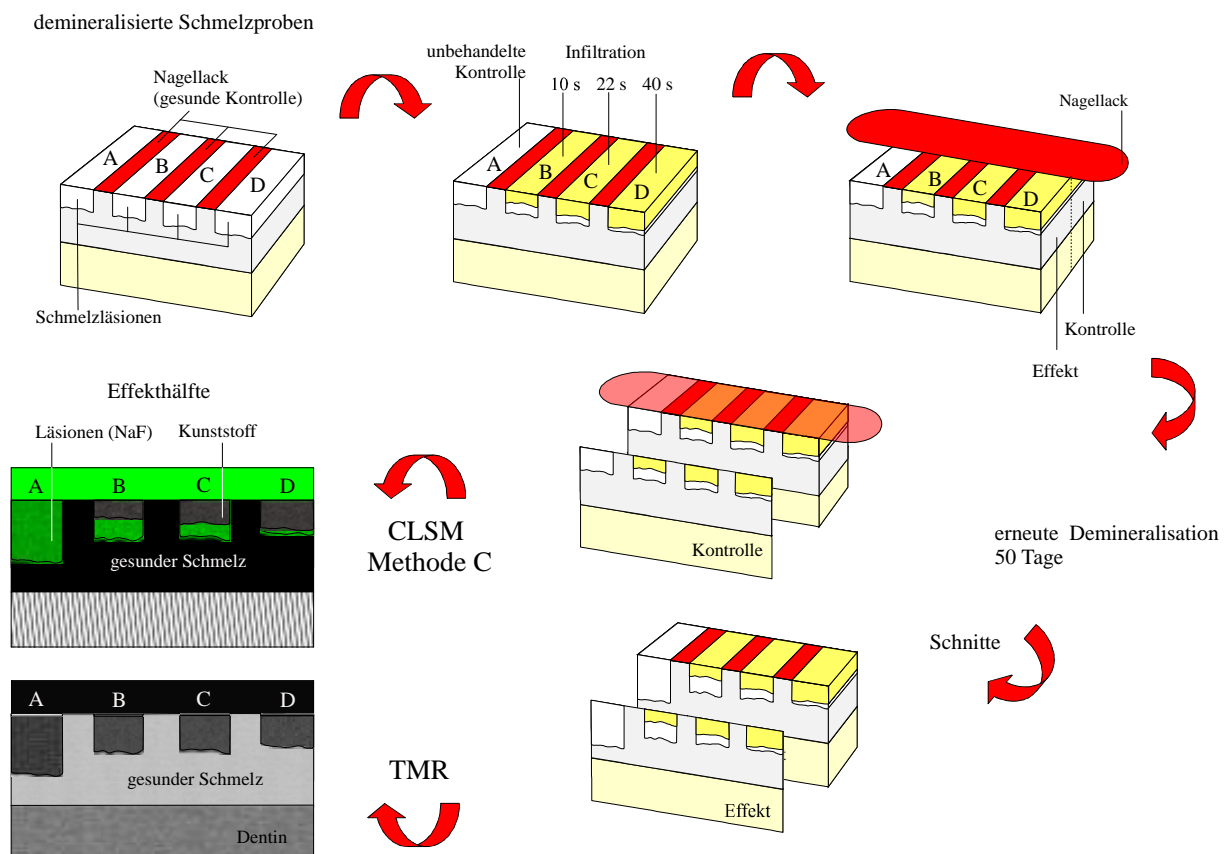
#### **4.5.2. Abschnitt 3b: Penetrationstiefen verschiedener experimenteller Infiltranten in künstliche kariöse Läsionen sowie deren Einfluss auf die Verhinderung der Kariesprogression *in vitro***

Bei 156 demineralisierten (50 Tage) bovinen Schmelzproben (vgl. Kapitel 4.1.1. und 4.1.2.) wurden drei der vier demineralisierten Bereiche der Probenoberflächen mit 5%iger Phosphorsäure für fünf Sekunden geätzt (Total Etch<sup>®</sup> Ätzgel, Ivoclar Vivadent). Hiernach wurden das Ätzgel abgesprüht und die gesamte Probe getrocknet (Wasser-Luftansatz Dentaleinheit). Die Proben wurden für 10 s in Ethanol (100 %; Sigma Aldrich) gelagert und wiederum getrocknet. Jeweils einer von zwölf experimentellen Infiltranten sowie das Material Excite<sup>®</sup> (Ivoclar Vivadent) wurden anschließend für entweder 10 s, 22 s oder 40 s appliziert (Tab. 8). Nach Entfernung oberflächlicher Überstände mit einer Watterolle wurden die Materialien für 30 s lichtgehärtet ( $530 \text{ mW/cm}^2$ ; Astralis 5, Ivoclar Vivadent). Eine Hälfte der Proben wurden anschließend mit Nagellack (Kontrolle) bedeckt und die Probe erneut für 50 Tage der Demineralisationslösung ausgesetzt. Nach Probenherstellung (Mikroschleifsystem Exakt) erfolgte (vgl. Kapitel 4.1.5.) die Auswertung der Läsionstiefen und der

Mineralverluste anhand mikroradiografischer Bilder (Abb. 18). Anhand von CLSM-Bildern (Methode C; Kapitel 4.1.2.) wurden die Läsionstiefen sowie die Penetrationstiefen der Materialien an vier benachbarten Messpunkten (Raster: 100  $\mu\text{m}$ ) bestimmt. (LCS Lite version 2.61). Die statistische Auswertung erfolgte analog zu Abschnitt 2.

**Tab. 8:** Zusammensetzung (Gew.%) der in Abschnitt 3 verwendeten Materialien

Gruppe	BisGMA	TEGDMA	Ethanol	Gruppe	BisGMA	TEGDMA	Ethanol
1	75	25		7	25	75	
2	67,5	22,5	10	8	22,5	67,5	10
3	60	20	20	9	20	60	20
4	50	50		10	0	100	
5	45	45	10	11	0	90	10
6	40	40	20	12	0	80	20
				13	Excite <sup>®</sup>		



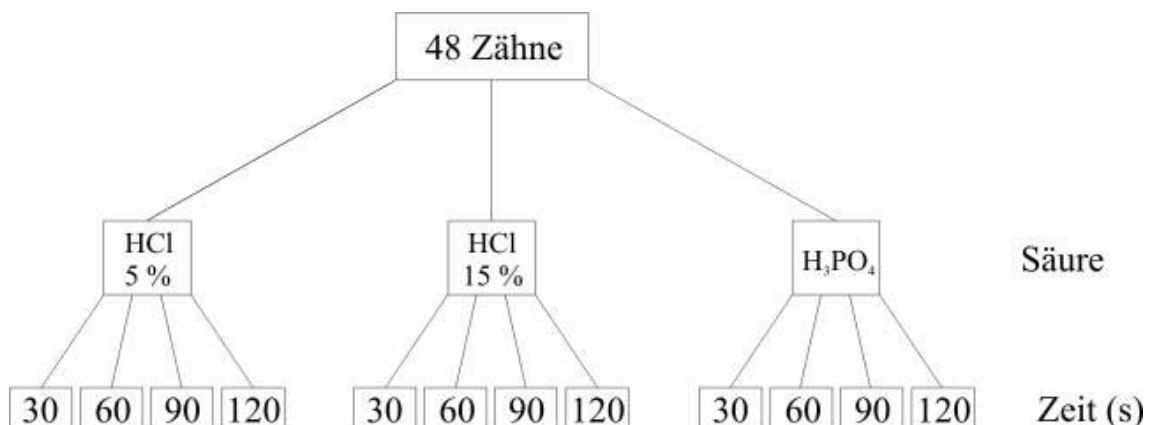
**Abb. 18:** Versuchsablauf Abschnitt 3b: Jeweils drei der vier demineralisierten Bereiche boviner Proben wurden mit einem der untersuchten Materialien für entweder 10 s, 22 s oder 40 s infiltriert. Ein Teilbereich der Probe (Kontrollhälfte) wurde mit Nagellack abgedeckt und die Proben anschließend für 50 Tage demineralisiert. Nach Herstellung von Dünnschliffen der Kontroll- sowie der Effekthälften erfolgte die Auswertung der Läsions- sowie Penetrationstiefen anhand von TMR- bzw. CLSM-Bildern.

#### 4.6. Abschnitt 4: Einflussfaktoren bei der Infiltration natürlicher kariöser Läsionen mit einem Adhäsivsystem *in vitro*

In Abschnitt 4 wurden im Gegensatz zu den bisher verwendeten künstlichen Läsionen natürliche humane Zähne untersucht. Zunächst sollte eine Möglichkeit gefunden werden, die im Vergleich zu den künstlichen Läsionen stärker ausgeprägte Oberflächenschicht zu verändern (4a), um die Penetration eines im Abschnitt 2 untersuchten Adhäsivsystems zu verbessern (4b). Hierbei war der Einfluss verschiedener Läsionsmerkmale auf die Penetrationstiefe dieses Materials ebenfalls von Interesse (4c).

##### 4.6.1. Abschnitt 4a: Einfluss verschiedener saurer Gele auf die Oberflächenschicht natürlicher kariöser Läsionen *in vitro*

Insgesamt 48 humane Prämolaren und Molaren, die histologisch (Beurteilung nach senkrechtem Schnitt durch die Mitte der Läsion; Bandsäge Exakt 300cl) eine approximale S1 Karies aufwiesen, wurden in drei Gruppen randomisiert aufgeteilt (Abb. 19). Die Hälfte einer jeden Läsion sowie ein Teil der gesunden approximalen Fläche wurden mit Nagellack abgedeckt (Kontrolle) (Abb. 20). Die Schnittflächen wurden ebenfalls mit Nagellack geschützt. Anschließend erfolgte in jeder Gruppe (n = 8) die Ätzung mit einer von drei Säuren [HCl 5 %, HCl 15 %, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 37 % (Total Etch<sup>®</sup> Ätzgel, Vivadent)] für 30 s, 60 s, 90 s oder 120 s. Das selbst hergestellte Salzsäuregel enthielt neben der entsprechenden Säurekonzentration einen Farbstoff (Methylenblau) sowie hochdisperses Silizumdioxid (Katalognr. 102520; Fagron, Barsbüttel) und Glycerin zur Verdickung (Tab. 9).

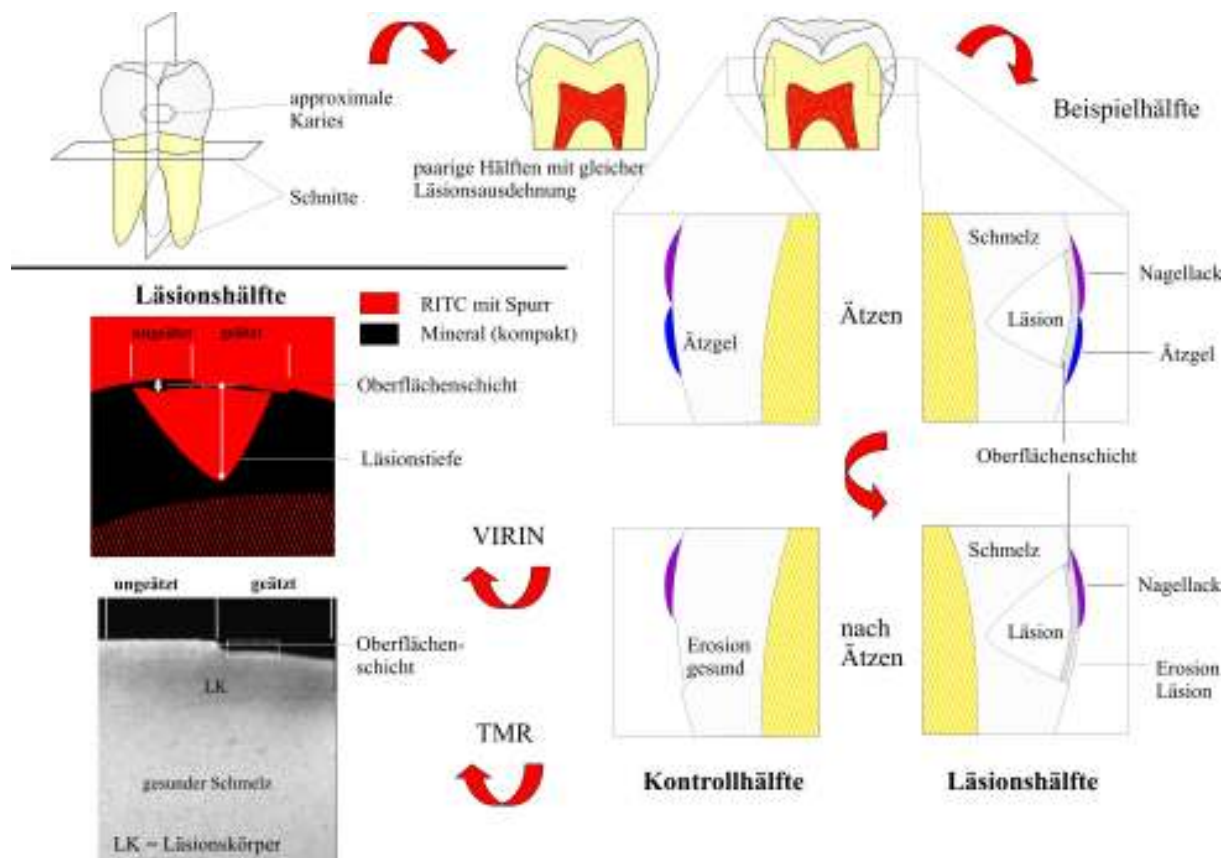


**Abb. 19:** Versuchsaufbau Abschnitt 4a: „Einfluss verschiedener saurer Gele auf die Oberflächenschicht natürlicher kariöser Läsionen“.

**Tab. 9:** Zusammensetzung der beiden Salzsäuregele

Bestandteil	5 % HCl	15 % HCl	Reihenfolge
Aqua dest.	40 g	-	1
Glycerin (85 %)	22 g	22 g	2
Methylenblau (1 %)	5 g	10 g	3
Salzsäure (25 %)	20 g	60 g	4
hoch disperses SiO <sub>2</sub>	8 g	8 g	5

Anhand von Dünnschliffen (Exakt Mikroschleifsystem) erfolgten die mikroradiografische Auswertung des Mineralverlustes der oberen 50 µm der Läsionen sowie die Läsionstiefe des Punktes der Oberflächenschicht (O.p.) mit dem höchsten Mineralgehalt. Darüber hinaus wurde das Ausmaß der Erosion sowie die Dicke der ursprünglichen sowie der verbliebenen Oberflächenschicht anhand von CLSM-Bildern an sechs benachbarten Messpunkten bestimmt (AxioVision LE; Zeiss, Oberkochen) (Abb. 20). Die statistische Auswertung der genannten Variablen wurde mit nichtparametrischen Tests durchgeführt.



**Abb. 20:** Versuchsablauf Abschnitt 4a: Der Effekt der Säuren wurde sowohl auf der Läsionsoberfläche (nur S1 Läsionen) als auch auf gesundem Schmelz evaluiert. Kontrollbereiche wurden mit Nagellack abgedeckt und folglich nicht geätzt. Nach Herstellung von Dünnschliffen erfolgte die Darstellung mit dem CLSM und der TMR.

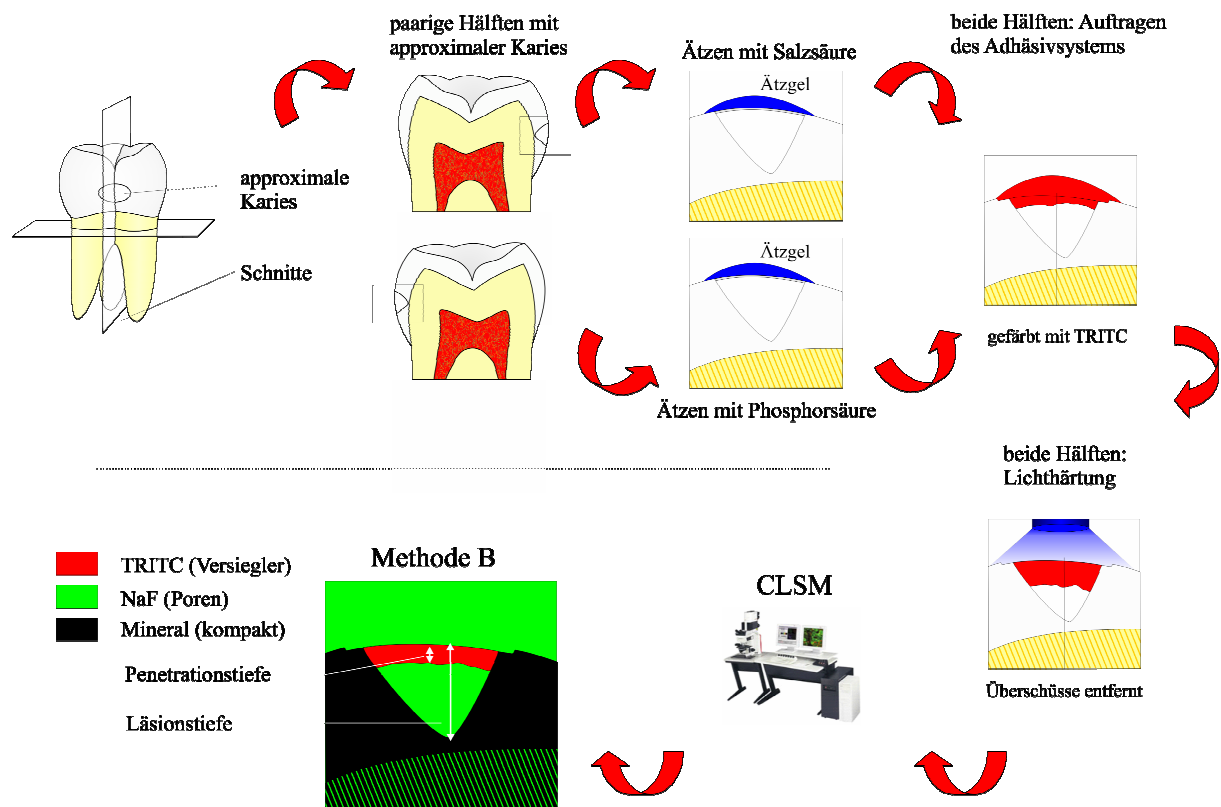
#### **4.6.2. Abschnitt 4b: Einfluss der Säureätzung auf die Infiltration eines Adhäsivsystems in natürliche kariöse Läsionen *in vitro***

In diesem Abschnitt wurden 45 Zähne mit approximaler Karies verwendet, die zunächst hinsichtlich der röntgenologischen Ausdehnung der Läsionen beurteilt wurden. Für die röntgenologische Untersuchung (Heliodent MD; Siemens, Bensheim) wurden die verwendeten Zähne mit Hilfe von Silikon auf einer festen Unterlage befestigt. Um die klinische Abschwächung durch umgebende Weichteile zu simulieren, wurde eine Plexiglasscheibe zwischen Zahn und Röntgenröhre positioniert. Röntgenfilme (Ektaspeed; Kodak, Stuttgart) wurden standardisiert (0,12 s; 60 kV; 7,5 mA) belichtet und anschließend entwickelt (XR 24-II; Dürr Dental, Bietigheim-Bissingen). Die radiografische Läsionsausdehnung wurde unabhängig von zwei Untersuchern anhand folgender Einteilung [Marthaler und Germann 1970] beurteilt: Keine Transluzenz (R0), Transluzenz in der äußeren Schmelzhälfte (R1), Transluzenz in der inneren Schmelzhälfte (R2), Transluzenz in der äußeren Dentinhälfte (R3), Transluzenz in der inneren Dentinhälfte (R4). Im Falle einer fehlenden Übereinstimmung wurde anschließend ein Konsens zwischen den beiden Untersuchern durch wiederholtes Betrachten des entsprechenden Bildes hergestellt.

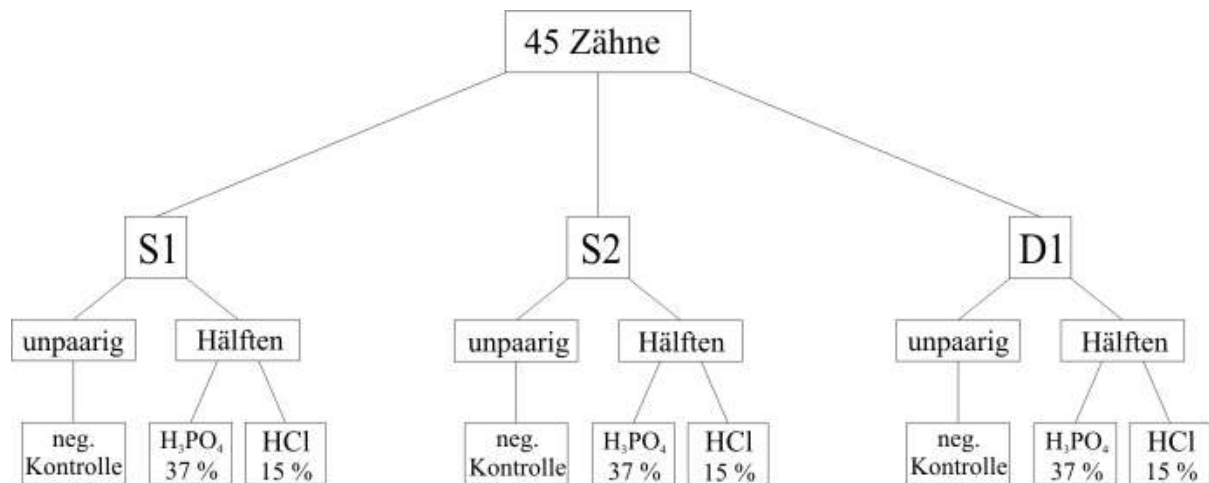
Die Wurzeln der Zähne wurden abgetrennt und die Zähne senkrecht mittig durch die Läsionen getrennt (Bandsäge Exakt 300c1) (Abb. 21). Anschließend wurden die Läsionen nach folgendem Schema von einem der beiden Untersucher klassifiziert [Marthaler und Germann 1970]: Ausdehnung bis in die äußere Schmelzhälfte (S1), Ausdehnung bis in die innere Schmelzhälfte (S2) Ausdehnung bis in die äußere Dentinhälfte (D1). Die Schnittflächen der beiden Hälften wurden hiernach mit Nagellack abgedeckt. Jeweils zehn korrespondierende, paarige S1, S2 sowie D1 Läsionen wurden anschließend entweder mit 37%iger Phosphorsäure (Total Etch<sup>®</sup> Ätzgel, Vivadent) oder mit 15%iger Salzsäure (Abb. 22) für zwei Minuten geätzt, mit Wasser abgeprüht und anschließend getrocknet (Wasser-Luftansatz Dentaleinheit). Nach Immersion in Ethanol (100 %; Sigma Aldrich) für 10 s wurden die Proben abermals getrocknet und anschließend für fünf Minuten das Adhäsivsystem Excite<sup>®</sup>, dem der fluoreszierende Farbstoff TRITC (0,1 %; Sigma Aldrich) zugesetzt war, appliziert. Jeweils zehn weitere unpaarige Läsionshälften der drei Läsionsausdehnungen dienten als Negativkontrolle (Abb. 22); diese wurden ohne vorherige Ätzung mit Excite<sup>®</sup> behandelt. Eventuell vorhandene Überschüsse wurden mit einer Watterolle abgewischt und die entsprechenden Bereiche für 30 s lichtgehärtet (Astralis 5, Ivoclar Vivadent). Nach Probenpräparation (Exakt Mikroschleifsystem) erfolgte die Darstellung mit Hilfe des CLSM (Methode B) sowie die Auswertung der Läsionstiefen im Schmelz, der Penetrationstiefen des

Adhäsivsystems und der verbliebenen pseudointakten Oberflächenschichten an zehn benachbarten Messpunkten (AxioVision LE Software). Die statistische Analyse der Variablen erfolgte mit nichtparametrischen Tests.

Darüber hinaus wurden exemplarische rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (CamScan MaXim 2040, Camscan, Cambridge, UK) nach Besputterung der Probenoberflächen mit Gold (SCD 040; Balzers, Wiesbaden) bei 2200facher Vergrößerung angefertigt.



**Abb. 21:** Versuchsablauf Abschnitt 4b: Zähne mit approximalen Läsionen wurden senkrecht durch die Karies geteilt und die Schnittflächen anschließend mit Nagellack abgedeckt. Korrespondierende paarige Hälften wurden entweder mit Salz- oder Phosphorsäure für zwei Minuten vorbehandelt. Nach Trocknung wurde ein mit TRITC angefärbtes Adhäsivsystem (Excite<sup>®</sup>) appliziert und nach Entfernung der Überschüsse lichtgehärtet. Die Visualisierung erfolgte mit der Methode B mit dem CLSM. Als Negativkontrollen wurden unpaarige Proben mit unterschiedlicher Läsionsausdehnung verwendet. Diese wurden ohne vorheriges Ätzen mit Excite<sup>®</sup> behandelt.



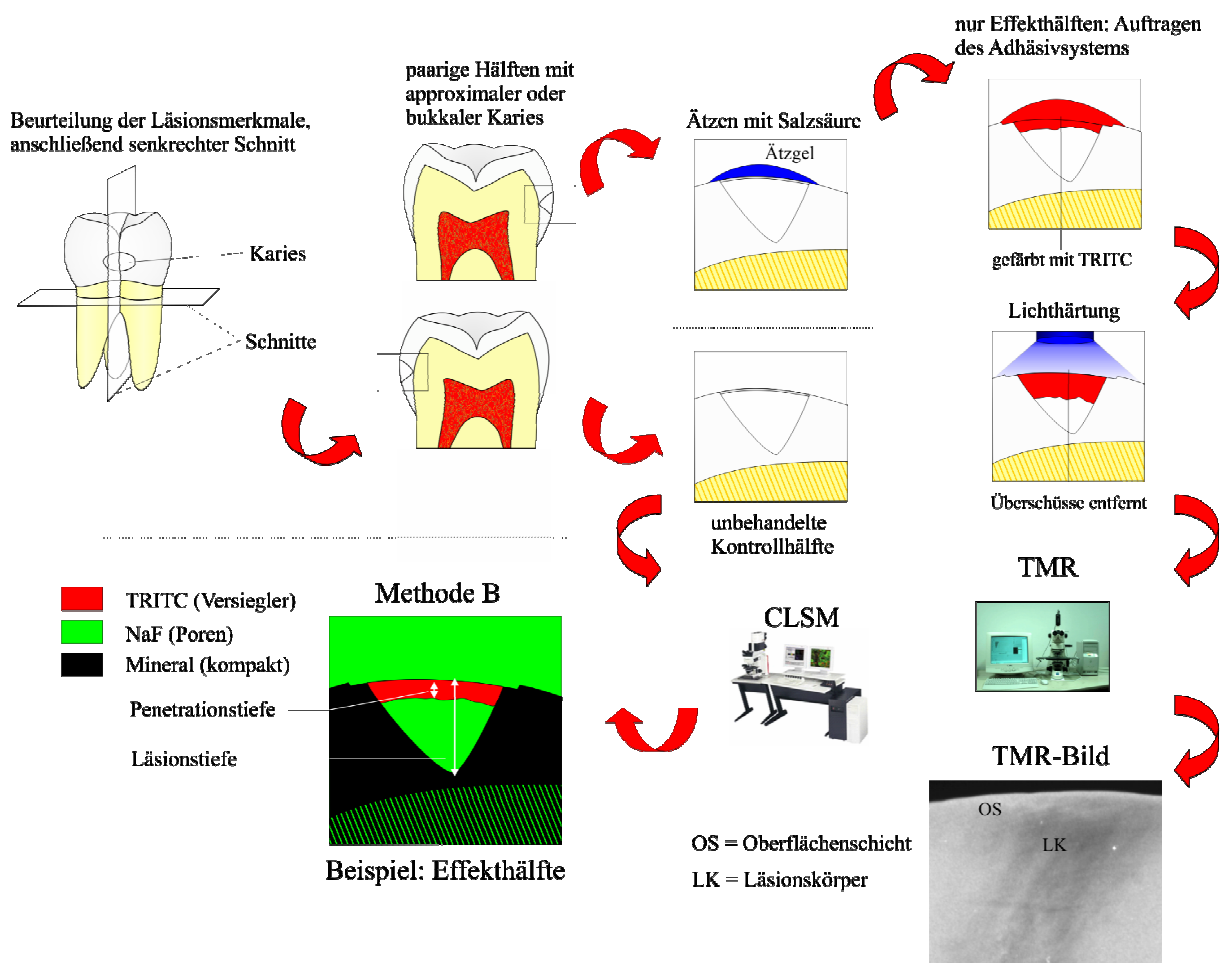
**Abb. 22:** Versuchsaufbau Abschnitt 4b: „Einfluss der Säureätzung auf die Infiltration eines Adhäsivsystems in natürliche kariöse Läsionen“

#### 4.6.3. Abschnitt 4c: Einfluss verschiedener Läsionsmerkmale natürlicher kariöser Läsionen auf die Infiltration eines Adhäsivsystems *in vitro*

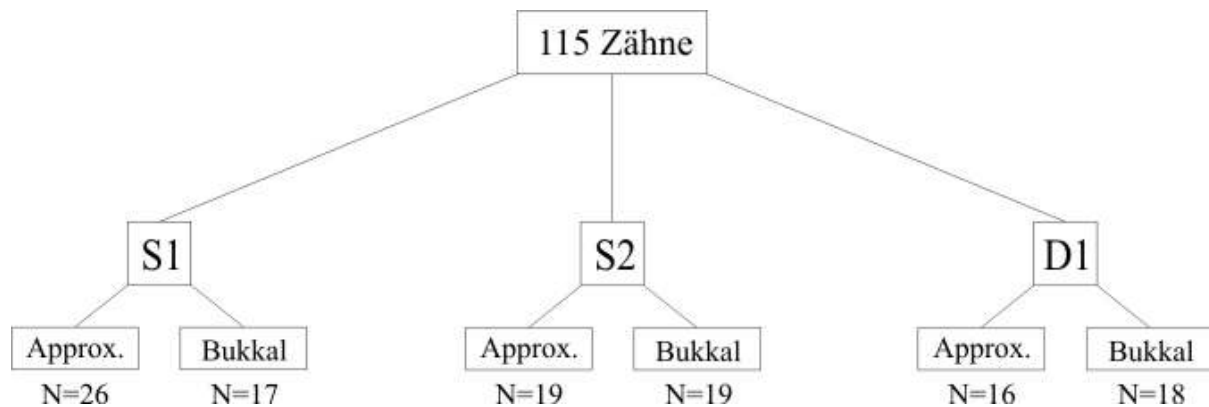
Insgesamt 115 permanente, kariöse Prämolaren und Molaren unterschiedlicher Läsionsausdehnung wurden hinsichtlich des Einflusses verschiedener klinischer Läsionsmerkmale auf die Penetrationstiefe eines kommerziellen Adhäsivsystems (Excite<sup>®</sup>) evaluiert. Hierbei wurde der Einfluss der Karieslokalisation (approximal/bukkal), des Oberflächenglanzes (glänzend/matt), des Vorhandenseins einer Verfärbung (ja/nein) bzw. einer Kavität (ja/nein), der Rauigkeit der Oberfläche (ja/nein) sowie der lichtreflektierenden Eigenschaften (hell/dunkel) auf die Läsionstiefe (LT), die Dicke der Oberflächenschicht (OS), den Mineralgehalt der obersten 50 µm der Läsionen sowie die Penetrationstiefe (PT) von Excite<sup>®</sup> in kariösen Läsionen mit unterschiedlicher Ausdehnung (S1/S2 oder D1) untersucht. Nach Beurteilung der Merkmale und Anfertigung der Röntgenbilder (vgl. Abschnitt 4b) wurden die Zähne in der Mitte der Läsionen getrennt (Bandsäge Exakt 300cl) und paarige Hälften nach der Kariesausdehnung in S1, S2 und D1 Läsionen eingeteilt [Marthaler und Germann 1970] (Abb. 24). Die Schnittflächen jeweils einer der beiden Hälften wurden mit Nagellack abgedeckt, die anderen diente als unbehandelte Kontrolle. Nach Ätzung mit HCl (15 %, 120 s) sowie anschließender Trocknung nach Lagerung in Ethanol (vgl. Abschnitt 4b) wurde Excite<sup>®</sup>, dem der fluoreszierende Farbstoff TRITC (0,1 %; Sigma Aldrich) zugegeben war, für fünf Minuten appliziert. Nachdem Überstände mit einer Watterolle entfernt worden waren, wurden das Adhäsivsystem für 30 s lichtgehärtet (Astralis 5, Ivoclar Vivadent). Anhand von Dünnschliffen (Exakt Mikroschleifsystem) erfolgte die mikroradiografische



Auswertung (Abb. 23) der Mineralverluste der oberen 50  $\mu\text{m}$  der Kontrollhälften. Die Läsionstiefen, die Penetrationstiefen, die Dicken der verbliebenen Oberflächenschichten wurden anhand der Effekthälften, die Dicken der ursprünglichen Oberflächenschichten der Kontrollhälften anhand von CLSM-Bildern (Methode B) an zehn benachbarten Messpunkten (Raster: 100  $\mu\text{m}$ ) bestimmt (AxioVision LE Software). Neben nichtparametrischen Tests erfolgte eine Bewertung der klinischen Determinanten mit Hilfe der schrittweisen linearen Regression, wobei nur Faktoren berücksichtigt wurden, die bei bivariater Testung einen p-Wert  $<0,25$  aufwiesen.



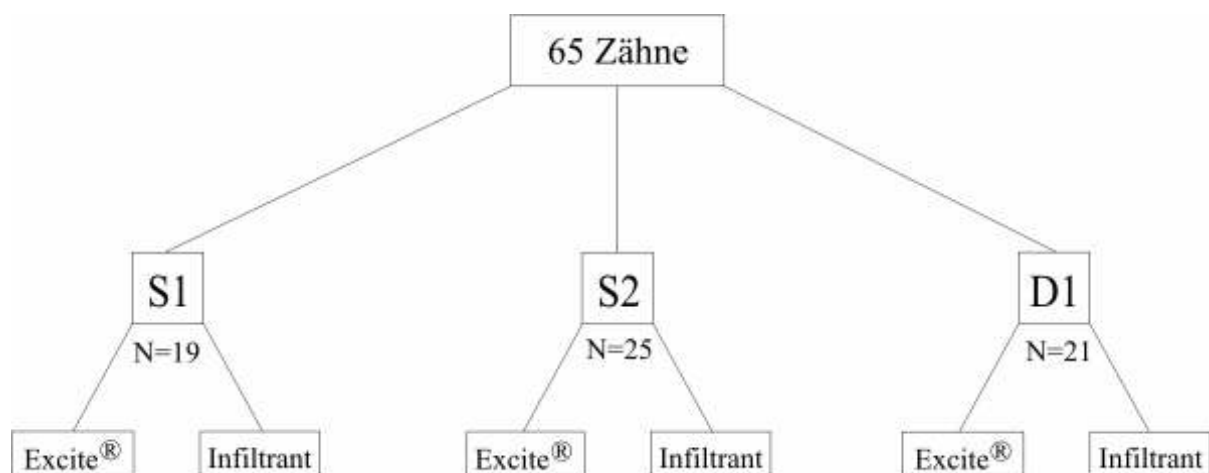
**Abb. 23:** Versuchsablauf Abschnitt 4c: Zunächst erfolgten die im Text beschriebenen Beurteilungen verschiedener Läsionsmerkmale der verwendeten Zähne mit approximaler oder bukkaler Karies. Anschließend wurden die Zähne möglichst mittig senkrecht durch die Karies geteilt und die Schnittflächen mit Nagellack abgedeckt. Eine der beiden Hälften wurde mit Salzsäure (15 %) für zwei Minuten geätzt und anschließend ein mit TRITC angefärbtes Adhäsivsystem (Excite®) appliziert (Effekt). Nach Entfernung von Überschüssen wurde das Adhäsiv lichtgehärtet. Die Visualisierung der Effekt- sowie der unbehandelten Kontrollhälften erfolgte mit der Methode B mit dem CLSM. Darüber hinaus wurden mikroradiografische Aufnahmen angefertigt.



**Abb. 24:** Versuchsaufbau Abschnitt 4c: „Einfluss der Läsionsmorphologie auf die Infiltration eines Adhäsivsystems in natürliche approximale Läsionen nach Ätzung mit Salzsäure“

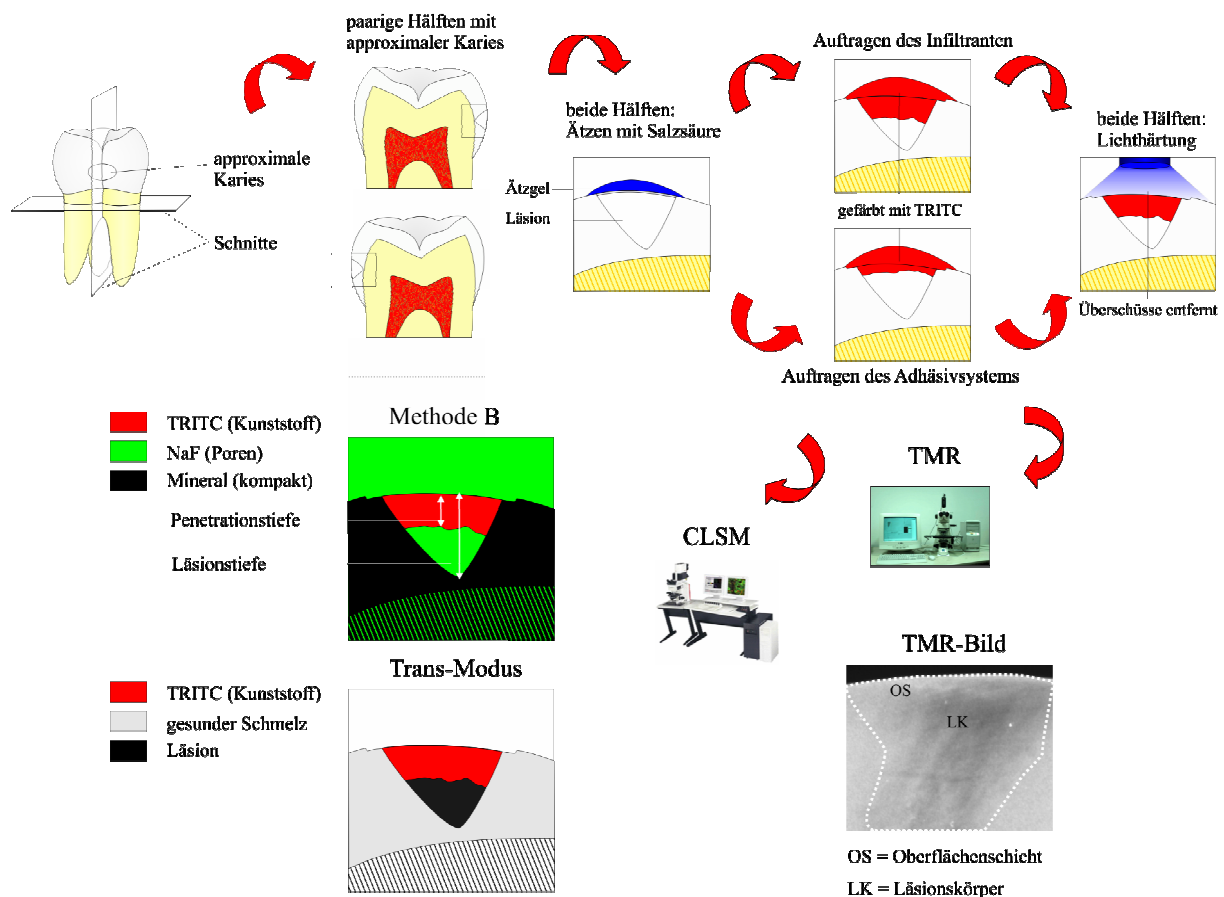
#### 4.7. Abschnitt 5: Vergleich der Penetrationstiefen nach Infiltration natürlicher kariöser Läsionen mit einem Adhäsivsystem sowie mit einem Infiltranten *in vitro*

Insgesamt 65 humane Zähne mit approximaler Karies wurden nach radiografischer Beurteilung der Läsionen (vgl. Abschnitt 4b) möglichst in der Mitte der Läsionen geteilt (Bandsäge Exakt 300cl) und anschließend die histologische Läsionsausdehnung (S1, S2 und D1) beurteilt (Abb. 25). Die Schnittflächen der paarigen Hälften wurden mit Nagellack abgedeckt und die Läsionsoberflächen mit 15%iger Salzsäure für zwei Minuten geätzt. Die Säure wurde abgesprüht, die Proben getrocknet (Wasser-Luftansatz Dentaleinheit), in Ethanol (Sigma Aldrich) für 10 s gelagert und anschließend wiederum getrocknet. Auf die eine Hälfte wurde für fünf Minuten das Adhäsivsystem Excite® appliziert, während die korrespondierende



**Abb. 25:** Versuchsaufbau Abschnitt 5: „Vergleich der Penetrationstiefen nach Behandlung mit Excite® sowie mit einem Infiltranten“

Hälfte mit einem der Infiltranten (Nr. 11; 90 % TEGDMA, 10 % Ethanol) behandelt wurde. Den beiden Kunststoffen wurde hierbei TRITC (0,1 %; Sigma Aldrich) zugesetzt. Eventuelle Überschüsse wurden mit einer Watterolle entfernt und die applizierten Kunststoffe hiernach lichtgehärtet (Astralis 5, Ivoclar Vivadent). Nach Herstellung von Dünnschliffen (Exakt Mikroschleifsystem) erfolgte anhand von CLSM-Bildern (Methode B und Transmissions-Bilder) die Auswertung (AxioVision LE Software) der Läsionstiefen im Schmelz, der Penetrationstiefen der Materialien sowie der verbliebenen pseudointakten Oberflächenschichten an zehn benachbarten Messpunkten (Raster: 100 µm). Darüber hinaus wurden zur qualitativen Abschätzung der pseudointakten Oberflächenschichten mikroradiografische Aufnahmen angefertigt (Abb. 26). Die statistische Auswertung der genannten Variablen erfolgte mit nichtparametrischen Tests.



**Abb. 26:** Versuchsablauf Abschnitt 5: Nach senkrechtem Schnitt durch die Läsionen wurden paarige Hälften mit vergleichbarer Ausdehnung ausgewählt. Die Schnittflächen wurden mit Nagellack abgedeckt und die Oberflächen mit Salzsäure (15 %) für zwei Minuten geätzt. Hiernach wurde das Ätzelgel abgesprüht und die Läsionen im Luftstrom sowie ein weiteres Mal nach Lagerung in Ethanol (100 %) getrocknet. Hiernach wurde entweder einer der Infiltranten (Nr. 11) oder das Adhäsivsystem appliziert (fünf Minuten). Nach Lichthärtung wurden Dünnschliffe der Probenhälften angefertigt. Diese wurden konfokalmikroskopisch (Trans-Modus und Methode B) sowie mikroradiografisch untersucht.