

Aus der Abteilung für Orale Diagnostik, Digitale Zahnheilkunde und  
Versorgungsforschung der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin  
Berlin

DISSERTATION

**In-vitro-Modell zur Herstellung künstlicher  
Residualkaries im Dentin**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kerrin Nupnau geb. Eggers

aus Neumünster

Datum der Promotion: 04.06.2021

## **Vorwort**

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Schwendicke F, Eggers K, Meyer-Lueckel H, Dörfer 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.

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

## Vorwort

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abstract</b> .....	<b>1</b>
1.1 Abstract (englisch) .....	1
1.2 Abstract (deutsch) .....	2
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>3</b>
2.1 Dentin .....	3
2.1.1 Zusammensetzung.....	3
2.1.2 Histologie des Pulpa-Dentin-Komplexes .....	3
2.2 Karies .....	5
2.2.1 Ätiologie .....	5
2.2.2 Histologie der Dentinkaries .....	6
2.3 Epidemiologie .....	8
2.4 Therapiekonzepte bei Dentinkaries .....	9
2.4.1 Klassische invasive Therapie .....	9
2.4.2 Selektive Exkavation .....	10
<b>3. Fragestellung</b> .....	<b>11</b>
<b>4. Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
4.1 Studiendesign .....	13
4.2 Selektive Exkavation natürlicher kariöser Läsionen .....	13
4.3 Herstellung künstlicher kariöser Läsionen .....	14
4.3.1 Probenherstellung .....	14
4.3.2 Demineralisationsmethoden .....	16
4.4 Auswertung .....	20
4.4.1 Vorbereitung der Proben .....	20
4.4.2 Lichtmikroskopische Auswertung .....	21
4.4.3 Transversale Mikroradiographie (TMR) .....	21
4.4.4 Messung der Nanohärte .....	25
4.4.5 Statistische Auswertung .....	27
<b>5. Ergebnisse</b> .....	<b>28</b>
5.1 Läsionstiefen (LT) .....	28
5.1.1 Natürliche kariöse Läsionen .....	28
5.1.2 Künstlich erzeugte Läsionen .....	28

<b>5.2 Mineralverlust (<math>\Delta Z</math>)</b> .....	29
5.2.1 Natürliche Residualkaries .....	29
5.2.2 Künstlich erzeugte Läsionen .....	30
<b>5.3 Nanohärte (nach Berkovich)</b> .....	33
<b>6. Diskussion</b> .....	<b>34</b>
<b>6.1 Diskussion von Material und Methode</b> .....	34
6.1.1 Durchführung in vitro .....	34
6.1.2 Zähne .....	35
6.1.3 Selektive Exkavation .....	36
6.1.4 Erzeugung künstlicher Karies .....	36
6.1.5 Transversale Mikroradiographie .....	37
6.1.6 Nanohärtemessung .....	38
<b>6.2 Diskussion der Ergebnisse</b> .....	39
6.2.1 Natürliche Karies .....	39
6.2.2 Ethylendiamintetraazetat (EDTA) .....	40
6.2.3 Azetatbasierte Lösung und Carboxymethylcellulose-Gel.....	40
6.2.4 Ausblick .....	42
<b>7. Schlussfolgerung</b> .....	<b>44</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>45</b>
<b>9. Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>51</b>
Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen .....	52
<b>10. Lebenslauf</b> .....	<b>53</b>
<b>11. Danksagung</b> .....	<b>54</b>

## 1. Abstract

### 1.1 Abstract (englisch)

Sealing caries lesions is an accepted management concept. Whilst the analysis of natural sealed, residual lesions allows to gauge the variability regarding the lesions' composition and mechanical properties, it is practically limited by availability of appropriate teeth and ethical concerns. Hence, protocols to induce artificial dentin residual lesions *in vitro* are required, as working with such artificial lesions allows a more standardized investigation of the mechanical properties of the teeth, their remineralization capabilities or different restorative approaches. In this study different demineralization protocols were compared for their suitability to mimic natural residual lesions. First, twelve natural deep lesions were excavated to leave leathery dentin, then analyzed regarding their mineral loss ( $\Delta Z$ ), lesion depth (LD), mineral loss ratio (R), the slope of the mineral gradient and their nano-hardness profile. Four different demineralization protocols were used for the induction of artificial lesions (acetic acid pH = 4.95; 0.1 M lactic acid gel pH = 5.0; 0.5 M ethylenediaminetetraacetic acid pH = 7.2; *Streptococcus mutans* biofilm models). Lesion depths were monitored over different demineralization times. Lesions with similar depths as the natural ones were further analyzed using transversal microradiography. Acetic-acid-induced lesions did not significantly differ with regards to LD,  $\Delta Z$  and mineral profile, so this protocol underwent further modification. Seven dentin specimens were submitted to a moderately acidic (pH = 5.3) methylhydroxydiphosphonat-buffered acetate demineralization solution for 12 weeks. Natural and artificial lesions showed similar LD (mean  $\pm$  SD = 626  $\pm$  212 and 563  $\pm$  88  $\mu$ m), demineralization (R = 19.5  $\pm$  4.7 and 29.8  $\pm$  4.1 %), mineral gradient (slope = 0.10  $\pm$  0.05 and 0.13  $\pm$  0.06 vol%/μm) and nano-hardness profiles. The described protocol is suitable to induce lesions with mineral content and mechanical properties similar to natural residual lesions.

### 1.2 Abstract (deutsch)

Die adhäsive Versorgung einer kariösen Läsion stellt eine akzeptierte Behandlungsmethode dar. Während die Analyse natürlicher, adhäsiv versorgter Läsionen ermöglicht, hohe interindividuelle Schwankungen in mechanischen Eigenschaften und Zusammensetzung aufzuzeigen, stößt sie, bedingt durch die begrenzte Verfügbarkeit geeigneter Zähne und durch ethische Konflikte, an ihre Grenzen. Daher sind Methoden zur Herstellung künstlicher Residualkaries *in vitro* notwendig. Diese ermöglicht die standardisierte Untersuchung der mechanischen Eigenschaften der Zähne, deren Remineralisationsverhalten oder verschiedener restaurativer Behandlungsmöglichkeiten, unabhängig von der Patientencompliance und etwaigem ethischen Konflikt. In dieser Studie wurden mehrere Demineralisationsprotokolle zur Imitation einer Residualkaries miteinander verglichen. Zunächst wurden zwölf tiefe, kariöse Läsionen selektiv exkaviert, sodass Dentin von ledriger Beschaffenheit verblieb, und auf ihren Mineralverlust ( $\Delta Z$ ), Läsionstiefe (LT), Mineralverlustintensität (R), Mineralanstieg innerhalb der Läsion und ihr Nanohärteprofil analysiert. Vier verschiedene Demineralisationsmethoden wurden zur Induktion künstlicher Residualkaries angewandt (azetatbasierte Lösung mit Methylhydroxydiphosphonat-Putter pH = 4,95; 0,1 M Carboxymethylcellulose-Laktat-Gel; 0,5 M Ethylendiamintetraazetat pH = 7,2; Biofilm-Modell mit *Streptococcus mutans*) und ihre Läsionstiefen über verschiedene Zeiträume kontrolliert. Läsionen mit ähnlicher Tiefe wie die natürlichen wurden mittels transversaler Mikroradiografie weitergehend analysiert. Läsionen, die mittels azetatbasierter Lösung induziert wurden, unterschieden sich nicht signifikant in LT,  $\Delta Z$  und Mineralprofil, sodass dieses Protokoll weiter modifiziert wurde. Sieben weitere Proben wurden über zwölf Wochen in azetatbasierter Lösung mit weniger saurem pH-Wert (5,3) gelagert. Die so induzierten Läsionen zeigten, verglichen mit den natürlichen, eine ähnliche Tiefe (Mittel  $\pm$  Standardabweichung =  $626 \pm 212$  und  $563 \pm 88$   $\mu\text{m}$ ), Demineralisation ( $R = 19,5 \pm 4,7$  und  $29,8 \pm 4,1$  %), der Mineralanstieg war flach und stetig (Anstieg =  $0,10 \pm 0,05$  und  $0,13 \pm 0,06$  Vol.-%/ $\mu\text{m}$ ) und die Nanohärteprofile unterschieden sich nicht signifikant. Die beschriebene Methode eignet sich zur Induktion von Läsionen mit ähnlichem Mineralgehalt und mechanischen Eigenschaften wie natürliche Residualkaries.

## 2. Einleitung

### 2.1 Dentin

#### 2.1.1 Zusammensetzung

Neben dem Zahnschmelz und dem Wurzelzement bildet das Dentin den größten Anteil der Zahnhartsubstanzen. Es umschließt die Pulpahöhle im koronalen sowie im radikulären Bereich des Zahns. Im Gegensatz zum Zahnschmelz ist das Dentin als lebendes Gewebe anzusehen, das zeitlebens weiter gebildet wird. Es besteht zu ca. 70 Gew.-% aus anorganischer Substanz, zu 18 Gew.-% aus organischer Matrix und zu 12 Gew.-% aus Wasser [Mjör and Fejerskov, 1986]. Die anorganische Substanz besteht wie im Schmelz hauptsächlich aus Kalziumphosphat, das durch variable Einschlüsse von Karbonat, Fluorid, Natrium und verschiedenen Spurenelementen in Form von nichtstöchiometrischem Hydroxylapatit vorliegt [Hellwig et al., 2010]. Das Hydroxylapatit bildet im Dentin Kristalle mit einer Größe von 20 nm Länge, <20 nm Breite und 3,5 nm Dicke, die somit kleiner sind als die des Schmelzes [Meyer-Lueckel et al., 2012]. Die organische Matrix besteht hauptsächlich aus Kollagen und kollagenähnlichen Verbindungen [Kawasaki and Featherstone, 1997].

#### 2.1.2 Histologie des Pulpa-Dentin-Komplexes

Das Dentin ist durchsetzt von Dentinkanälchen, die im koronalen Anteil von der Pulpa in die Peripherie geschwungen, im Bereich der Wurzel geradlinig bis zum Schmelz verlaufen, sodass das Dentin ein hohes Porenvolumen von durchschnittlich 36.000/mm<sup>2</sup> aufweist. Der Kanaldurchmesser verringert sich im zunehmenden Abstand zur Pulpa, so liegt er pulpanah bei 2-3 µm und nahe der Schmelz-Dentin-Grenze bei 0,5-0,9 µm, sodass auch das Porenvolumen pulpawärts deutlich ansteigt [Pashley, 1991]. In diesen Tubuli befinden sich Zellfortsätze der dentinbildenden Odontoblasten, den sogenannten Tomes-Fasern, deren Zellkörper sich im Pulpakavum an das Dentin angelagert in einer Reihe anordnen. Sie ermöglichen die Kommunikation zwischen Dentin und Pulpa, wodurch diese eine funktionelle Einheit bilden [Lee et al., 2006]. Die Odontoblasten sind zeitlebens dazu in der



Lage, Dentin zu produzieren, sodass die Menge an sich im Kanal befindenden peritubulärem Dentin im Laufe des Lebens zunimmt und sich der Kanaldurchmesser stetig verringert [Baume, 1980]. Gleiches geschieht mit der Pulpahöhle durch Apposition von Sekundärdentin.

Neben den Odontoblasten finden sich in der Pulpa u.a. Fibroblasten, Stammzellen und Kollagen sowie eine Matrix, die sich vor allem aus Proteoglykanen und Fibronectin zusammensetzt. Diese Bestandteile bilden mit 25 Gew.-% den organischen Anteil der Pulpa, die restlichen 75 Gew.-% bestehen aus Wasser. Über Arteriolen und Venen wird die Pulpa stark vaskularisiert, die Nerven folgen den Blutgefäßen und finden gemeinsam den Weg ins periphere Gewebe durch das Foramen apicale an der Wurzelspitze des Zahns [Mjör and Fejerskov, 1986].

Das Dentin ist histologisch in mehrere Schichten unterteilt. Unmittelbar an die Pulpa angrenzend befindet sich das hypomineralisierte Prädentin, das die jüngste Dentinschicht darstellt. Ihm folgt in die Peripherie das stärker mineralisierte Zwischendentin, das zirkumpulpale Dentin und das mit dem Schmelz in geschwungenen Grenzlinien verlaufende, weniger stark mineralisierte Manteldentin [Hellwig et al., 2010].

Das sogenannte reaktive oder Tertiärdentin wird nur aufgrund von Reizeinwirkungen, wie Karies, Erosion, Attrition oder iatrogenen Traumata, gebildet und ist als Schutz- bzw. Reparaturmechanismus der Pulpa zu werten [Baume and Treccani, 1983]. Entsprechend erfolgt die Bildung des Tertiärdentins durch Odontoblasten oder odontoblastenähnliche Zellen ausschließlich in dem Pulpenbereich, der dem Reiz über die Verbindung durch die Tubuli ausgesetzt ist [Kuttler, 1959]. Strukturell variiert es je nach Reizstärke von regulär über irregulär aufgebautem bis hin zu atubulärem Dentin; je stärker der Reiz, desto irregulärer ist das Tertiärdentin aufgebaut [Smith et al., 1995].

Die Dicke des gesamten Dentinmantels variiert also interindividuell stark und ist von verschiedenen Faktoren, wie dem Alter des Patienten oder der Häufigkeit und Intensität einer Reizeinwirkung auf den Zahn, zum Beispiel aufgrund von Karies oder Hitzeeinwirkung bei Präparation, abhängig.

### 2.2 Karies

#### 2.2.1 Ätiologie

Karies gilt als die häufigste orale Erkrankung [Marcenes et al., 2013]. Die heute allgemein anerkannte Vorstellung zur Kariesentstehung besteht in einer Modifikation der erstmals 1898 durch Miller aufgestellten sogenannten chemoparasitären Theorie. Diese besagt, dass kariogene Mikroorganismen der Mundhöhle (Plaque) bei einem Überangebot an kariogenem Substrat (speziell niedermolekulare Kohlenhydrate) organische Säuren (v.a. Milchsäure) produzieren, die in der Lage sind, die Zahnhartsubstanzen zu demineralisieren und so Karies herbeizuführen [Hellwig et al., 2010]. Das damals aufgestellte Modell wurde durch König um den Faktor Zeit erweitert, da es erst bei entsprechender Einwirkdauer der Säuren auf den Zahn zur Demineralisation kommt [König, 1987]. Dem Modell wurden im Laufe der Zeit viele weitere Sekundärfaktoren hinzugefügt, wie beispielsweise Speichelqualität und -fließrate, Ernährungsgewohnheiten und sozioökonomischer Status [Menaker, 1980].

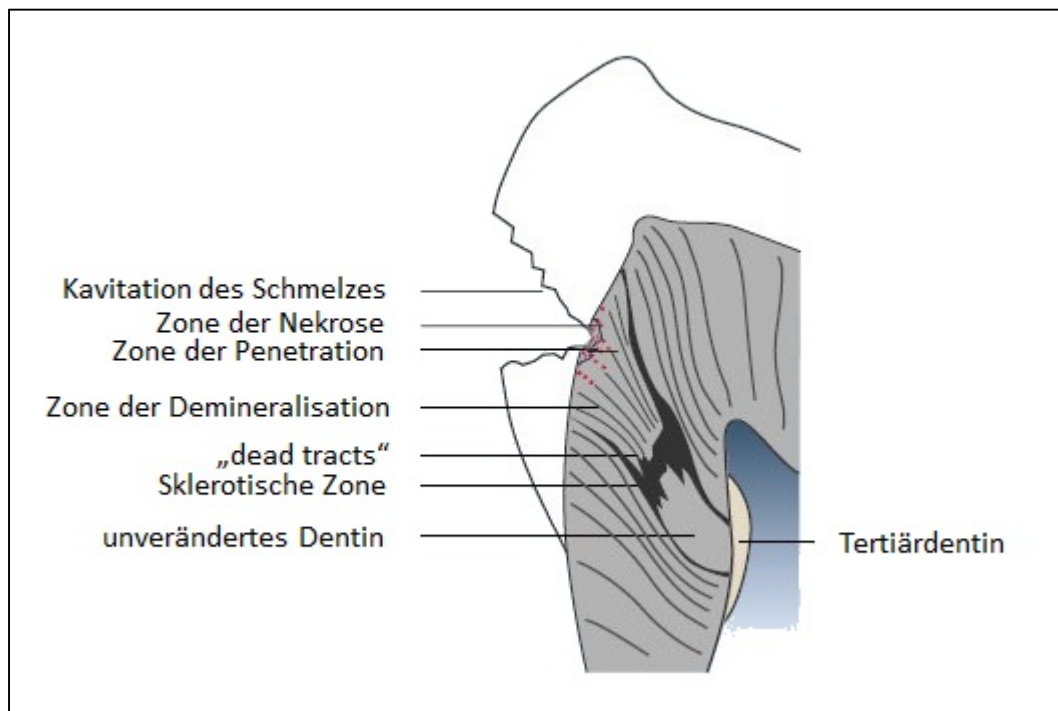
Potenziell pathogene Mikroorganismen der Mundhöhle bilden bei Substratbereitstellung über die Nahrung organische Säuren, die ein Absinken des pH-Werts in der Plaque bewirken [Stephan and Miller, 1943]. Die Löslichkeit von Hydroxylapatit korreliert stark mit dem vorherrschenden pH-Wert und ist umso größer, je niedriger dieser vorliegt [Dawes, 2003]. Die für die Zahnhartsubstanzen kritischen pH-Werte differieren individuell in Abhängigkeit der Kalzium- und Phosphationen-Konzentrationen im Speichel, Durchschnittswerte werden bei 5,2 - 5,7 für Schmelz und 6,2 - 6,7 für Dentin angegeben [Dawes, 2003; Hellwig et al., 2010]. Unterhalb dieser Grenzwerte geht der Hydroxylapatit des Zahns in Lösung, der Zahn wird demineralisiert; oberhalb der Werte kann eine Remineralisation stattfinden.

Unter physiologischen Umständen herrscht im Mund ein Gleichgewicht zwischen De- und Remineralisierungsprozessen, vor allem bedingt durch den Speichel, der binnen einiger Minuten in der Lage ist, den gefallen pH nach der Nahrungsaufnahme abzupuffern und zu neutralisieren [Stephan and Miller, 1943]. Bei andauernd unzureichender Entfernung des Biofilms durch schlechte Mundhygiene oder bei häufiger Substratzufuhr verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung Demineralisation, und es kommt zur Karies [Gustafsson et al., 1954]. Ist zunächst nur eine oberflächliche Läsion feststellbar (ICDAS 1 und 2) [Ismail et al.,

2007], kommt es bei Nicht-Beseitigung der kariogenen Umstände jedoch bald zu Schmelzeinbrüchen und später zur Ausbreitung ins Dentin. Da das Dentin weniger stark mineralisiert ist als der Schmelz, laufen die Demineralisierungsprozesse hier effizienter ab, und die Karies schreitet mehr als doppelt so schnell voran wie im Schmelz [Ogaard et al., 1988].

### 2.2.2 Histologie der Dentinkaries

Histologisch lassen sich von der Pulpa in die Peripherie fünf Schichten im Dentin selbst unterscheiden (Abb. 2-1); hinzu kommt die Bildung von Tertiärdentin seitens der Pulpa [Schroeder, 1991; Silverstone and Hicks, 1985].



**Abb. 2-1:** Histologische Zonen der Dentinkaries (modifiziert aus [Meyer-Lueckel et al., 2012])

### Tertiärdentin

Schon lange bevor die Bakterien das Dentin erreichen, dringen die von ihnen produzierten Säuren und Toxine bis dorthin vor und rufen über die in den Dentintubuli enthaltenen Tomes-Fasern eine Reaktion der Odontoblasten hervor [Cooper et al., 2010]. Auf einen kariösen Reiz hin beginnen sie mit der Bildung von Tertiärdentin (Reizdentin). Dieses ist je nach Reizstärke und Ausbreitungsgeschwindigkeit der Karies regulär ähnlich dem Primär- oder Sekundärdentin oder irregulär bis atubulär aufgebaut. Bei sehr ausgeprägtem Reiz auf die Odontoblasten können diese untergehen. Es differenzieren sich dann odontoblastenähnliche Zellen aus Stammzellen der Pulpa, die ebenfalls zur Produktion von Tertiärdentin, dann Reparaturdentin genannt, fähig sind [Smith et al., 1995; Smith et al., 1994]. In frühen Stadien einer Karies folgt der Schicht des Tertiärdentins eine Schicht gesundes, histologisch unverändertes Dentin.

### Zone der Sklerose

Als erste Reaktion auf eine sich nähernde Karies erfolgt die langsame Obliteration der betroffenen Dentinkanälchen durch die vermehrte Produktion intratubulären Dentins [Bjorndal and Thylstrup, 1995] und Einlagerung von Apatit- und wenigen Whitlockitkristallen in den Kanallumina [Zavgorodniy et al., 2008]. Dies verlangsamt das weitere Fortschreiten der Karies in Richtung Pulpa [Bjorndal and Mjor, 2001].

### „dead tracts“

Die Zone der „dead tracts“ zeichnet sich durch die Abwesenheit von Tomes-Fasern in den Dentintubuli aus, die durch die Zone der Sklerose zurückgehalten werden [Ten Cate, 1994]. Sie besitzt eine höhere Permeabilität als sklerotisches und gesundes Dentin und bieten dem Fortschritt einer kariösen Läsion wenig Widerstand [Hellwig et al., 2010; Meyer-Lueckel et al., 2012].

### Zone der Demineralisation

Sobald die Schmelzdemineralisation bis zum Dentin fortgeschritten ist, findet auch hier eine Demineralisation statt. In dieser Phase haben die von den Bakterien produzierten Säuren das

Dentin erreicht; die Bakterien selbst sind allerdings noch nicht vorzufinden [Hellwig et al., 2010].

### Zone der Penetration

Bei weiterem Voranschreiten der Karies wird eine Zone der Penetration feststellbar. Sie ist durch das Vorhandensein von Bakterien in den Tubuli gekennzeichnet; sie sind also bis in die Zahnhartsubstanz vorgedrungen [Takahashi and Nyvad, 2016].

### Zone der Nekrose

In späten Stadien kommt es zum Abbau der demineralisierten Dentinmatrix durch hydrolytische und proteolytische Enzyme der Bakterien. Es verbleibt weiches Material, das sich aus Resten demineralisierten Dentins und Plaque zusammensetzt [Schroeder, 1991].

## **2.3 Epidemiologie**

Seit Beginn der Menschheitsgeschichte existiert Karies. Während sie aber zu vorindustriellen Zeiten nur in geringer Prävalenz vorkam und sich dieser Zustand in Ländern mit überwiegender Besiedelung durch Naturvölker zunächst hielt, stieg die Zahl der von Karies betroffenen Zähne mit Beginn der Industrialisierung in den westlichen Ländern rapide an [Burt and Eklund, 2005]. Dies ist auf die veränderten Ernährungsgewohnheiten und den vermehrten Konsum von zuckerhaltigen Lebensmitteln während dieser Zeit zurückzuführen [Sheiham, 1984]. Während es zu Zeiten der Weltkriege durch Lebensmittelknappheit zu einem Absinken der Kariesinzidenz kam, stieg sie später wieder an, um in Europa schließlich in den 1960er-Jahren ihren Höhepunkt zu erreichen [James, 1975; Sognaes, 1948]. Seit Mitte der 1970er-Jahre ist diese Entwicklung wieder rückläufig und hat sich schließlich auf dem heute erreichten Wert eingependelt [Marthaler, 2004; WHO, 2011]. Als Ursache für den Rückgang können präventive Maßnahmen, wie etwa der Einsatz fluoridhaltiger Produkte bei der Mundhygiene oder die Fissurenversiegelung angesehen werden [Reich, 2001; Schiffner et al., 2009]. Parallel zum Rückgang der Kariesinzidenz in den westlichen Industrienationen ist seit Anfang der 80er-Jahre ein rapider Anstieg in den nichtindustrialisierten Nationen zu

erkennen, der auf die gleichen oben genannten Mechanismen zurückzuführen ist [Sheiham, 1984].

### **2.4 Therapiekonzepte bei Dentinkaries**

Neben präventiven und mikroinvasiven Maßnahmen wie der Fluoridierung oder Fissurenversiegelung, um die Entstehung einer Karies zu verhindern, ist eine Füllungstherapie oftmals dann indiziert, wenn eine Kavitation der Oberfläche vorliegt, da diese Läsionen für die betroffene Person nur unzureichend zu reinigen sind und schnell voranschreiten [Mejare et al., 2004]. Eine Kavitation ist bei einem Drittel aller röntgenologisch bis in das Dentin vorgedrungenen Läsionen der Fall [Hintze et al., 1998; Pitts and Rimmer, 1992] und liegt bei tieferen Dentinläsionen nahezu immer vor.

#### **2.4.1 Klassische invasive Therapie**

Lange Zeit galt die non-selektive, „vollständige“ Kariesexkavation als konventionelle Therapie der Wahl zur Behandlung von Dentinkaries. Ziel hierbei ist die Entfernung allen erweichten und infizierten Dentins, um ausschließlich hartes, nicht infiziertes Gewebe zurückzulassen. So sollen die auf den Zahn wirkenden Noxen vollständig entfernt werden. Erst danach wird eine Restauration platziert. Da die Dicke des Dentinmantels und die Ausdehnung der Pulpahöhle je nach Alter des Patienten und individuell variiert, ist eine Einschätzung der Restzahnschubstanz nach der Exkavation für den Behandler nur schwer möglich. Besonders bei profunden kariösen Läsionen birgt diese Therapieform das hohe Risiko einer iatrogenen Eröffnung der Pulpa. Eine solche „kariöse“ Eröffnung der Pulpa geht mit geringen Erfolgsraten der oft gewählten Folgetherapie, der direkten Überkappung, einher [Barthel et al., 2000]. So wird die Wurzelkanalbehandlung, als Erhaltungsversuch, häufig unumgänglich [Bjorndal et al., 2010; Leksell et al., 1996]. Die vollständige Entfernung aller in der Kavität befindlichen Mikroorganismen ist auch bei dieser non-selektiven Kariesexkavation nicht gegeben, was die Frage aufwirft, welchen Nutzen diese Methode wirklich birgt [Lager et al., 2003].

### 2.4.2 Selektive Exkavation

Vor dem Hintergrund der geschilderten Erkenntnisse zur Kariespathogenese, dem Wissen zu den Risiken einer Pulpaeröffnung sowie den technischen Möglichkeiten, randdichte adhäsive Restaurationen zu platzieren, wurde die selektive, „unvollständige“ Exkavation als Alternative zum konventionellen non-selektiven Vorgehen entwickelt. Hierbei wird das kariöse Dentin nur peripher entfernt, jedoch pulpanah belassen, um eine akzidentielle Eröffnung der Pulpa und somit eventuelle Traumata, einhergehend mit der Auslösung einer irreversiblen Pulpitis, zu verhindern. Sofern eine suffiziente, randdichte Restauration in der Kavität gelegt wird, konnte nachgewiesen werden, dass sich das belassene, zuvor erweichte Dentin unterhalb der Füllung wieder erhärtet, ein Anstieg des zuvor erniedrigten Mineralgehalts röntgenologisch zu erkennen ist und die Karies nicht weiter voranschreitet [Bjorndal and Thylstrup, 1998; Maltz et al., 2011; Maltz et al., 2002; Ricketts et al., 2013; Schwendicke et al., 2013]. Des Weiteren wurde eine Reduktion der Mikroorganismen festgestellt, die auf die Isolation der Mikroorganismen gegenüber dem Substrat zurückzuführen ist [Maltz et al., 2012]. Die Zahl der Pulpaeröffnungen bei der selektiven Exkavation ist gegenüber der kompletten Kariesentfernung signifikant reduziert [Schwendicke et al., 2013].

#### 2.4.2.1 Residualkaries

Da eine genaue Einschätzung der tatsächlichen Läsionstiefe sowie der Restdicke des Dentinmantels bei der Exkavation klinisch so gut wie unmöglich ist und somit individuell behandlerabhängig unterschiedlich viel kariöses Dentin belassen wird, wird der Begriff der Residualkaries klinisch definiert. Sie liegt dann vor, wenn verändertes, erweichtes Dentin nach erfolgter Exkavation in der Kavität belassen wird, unabhängig von der Schichtdicke oder der histologischen Zuordnung der Schichtung der Dentinkaries [Meyer-Lueckel et al., 2012].

### 3. Fragestellung

Die selektive Kariesexkavation ist geeignet, die Zahl der iatrogenen Schädigungen der Zähne während der restaurativen Therapie gegenüber der non-selektiven Methode deutlich zu senken [Uribe, 2006]. Dennoch bestehen noch zahlreiche offene Punkte, die einer Klärung bedürfen. Beispielsweise ist der Einfluss der Schichtdicke der verbleibenden Karies auf die Restauration und auf deren langfristigen Therapieerfolg derzeit noch nicht bekannt. In diesem Zusammenhang wäre eine Evaluationsmethode für den klinischen Praxisalltag wünschenswert, die die praktische Anwendbarkeit erleichtert. Eine weitere Problematik, die es in Zukunft zu lösen gilt, ist das röntgenologische Erscheinungsbild der belassenen Karies, die sich im Röntgenbild nicht von einer Sekundärkaries unterscheiden lässt [Schwendicke et al., 2014b]. Bei einem Behandlerwechsel könnten so fälschlicherweise suffiziente Füllungen als insuffizient identifiziert und einem Austausch unterzogen werden, was erneut die Gefahr eines Zahntraumas birgt. Um weitere Forschung auf diesem Gebiet unabhängig von etwaigen ethischen Konflikten durchführen zu können, ist die Erzeugung einer künstlich herbeigeführten Residualkaries *in vitro* unabdingbar. Gegenüber *in vivo* durchgeführten Versuchen bergen sie nicht die Gefahr, ein Individuum potenziell zu schädigen, und erlauben weitreichende Analysen, da auch destruktive Verfahren angewandt werden können. Die Herstellung künstlicher Residualkaries ermöglicht standardisierte Läsionen vorhersagbarer Tiefe in großer Zahl, unabhängig von der subjektiven Einschätzung durch einen Behandler bei individueller Exkavation.

Im Bereich der künstlichen Karies im Schmelz sind in der Vergangenheit bereits einige Methoden ausführlich beschrieben und analysiert worden [Magalhaes et al., 2009; Margolis and Moreno, 1992], nicht so für die künstliche Residualkaries im Dentin. Zwar liegen einige Ansätze zur Karieserzeugung im Dentin vor [Marquezan et al., 2009; Moron et al., 2013], keine dieser Studien befasst sich allerdings mit der Anwendung und Eignung einer Methode für die Induktion künstlicher Residualkaries. So liegen keine Analysen der Nanohärte und des Mineralgehalts und kein Vergleich mit den Eigenschaften der natürlichen Residualkaries vor. Beides könnte für den Therapieerfolg und das Remineralisationsverhalten nach Platzierung einer Restauration von großer Wichtigkeit sein und bedarf daher weiterer Aufmerksamkeit.



### 3. Fragestellung

---

Das Ziel dieser Studie war es, ein *In-vitro*-Modell unter Modifikation bestehender Methoden zu erstellen, welches ermöglicht, standardisierte künstliche Residualkaries vorhersagbarer Tiefe zu kreieren, die der natürlichen in ihren Eigenschaften möglichst ähnlich ist. Anhand einer Analyse der Parameter Läsionstiefe, Mineralgehalt und Nanohärte in Abhängigkeit zur Demineralisationsdauer wurde die Eignung der getesteten Demineralisationsmethode festgestellt und diese mit den Eigenschaften der natürlichen Residualkaries verglichen.

### **4. Material und Methoden**

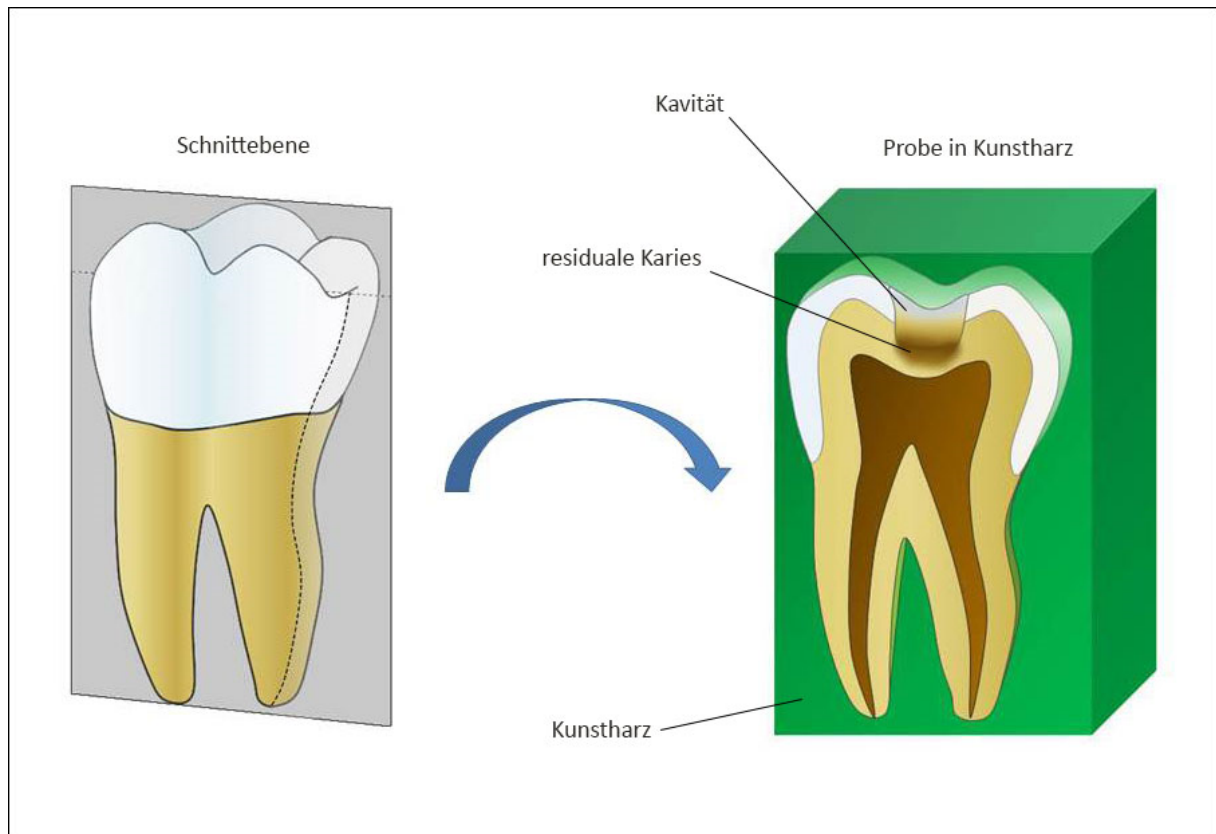
#### **4.1 Studiendesign**

Die Studie setzte sich aus mehreren Teilbereichen zusammen. Erstens wurde natürliche Residualkaries auf ihre Läsionstiefe, ihren Mineralgehalt und ihre Nanohärte analysiert. Zweitens fand die Analyse verschiedener Demineralisationsmethoden und der durch sie induzierten Läsionen statt. Es wurden Läsionstiefen in Abhängigkeit der Demineralisationszeit ermittelt und ihr Mineralgehalt mit dem der natürlichen Läsionen verglichen. Drittens wurde die Methode, deren Läsionseigenschaften denen der natürlichen Karies am nächsten kamen, modifiziert und die Proben neben den oben genannten Eigenschaften außerdem auf ihre Nanohärte untersucht.

#### **4.2 Selektive Exkavation natürlicher kariöser Läsionen**

Zur Analyse der Eigenschaften natürlicher kariöser Läsionen wurden zunächst zwölf extrahierte menschliche Molaren der zweiten Dentition mit profund ausgedehnter Karies der Klasse ICDAS 6 [Ismail et al., 2007] von verschiedenen Zahnärzten unter Einverständniserklärung der Patienten und Zustimmung der Ethikkommission des UKSH Kiel (D444/10) bereitgestellt. Die Lagerung erfolgte direkt nach der Extraktion in 0,08 %-Thymollösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Die Läsionen wurden selektiv exkaviert; hierbei wurde erweichtes Dentin peripher entfernt und in Pulpennähe Dentin von ledriger Beschaffenheit belassen. Durchgeführt wurde die Exkavation von einem erfahrenen Behandler, die Kontrolle geschah durch eine zuvor kalibrierte Person. Zur Analyse der Karies wurden die Zähne mittels diamantierter Bandsäge (Bandsäge Exakt 300cl, Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) unter ständiger Wasserkühlung entlang ihrer Längsachse in zwei Hälften geteilt und beide Hälften, die Schnittfläche freiliegend, in Kunstharz eingebettet (Technovit 4071 / Technovit 4071 the fast, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland) (Abb. 4-1). Anschließend erfolgte die Parallelisierung und Politur der Proben mittels Poliermaschine (Saphir 360 E, ATM, Mammelzen, Deutschland) und Silikonscheiben

aufsteigender Körnung (400, 1200, 2400, 4000; Siliziumkarbid-Nassschleifpapier, ATM, Mammelzen, Deutschland) bei 300 U/min und stetiger Wasserkühlung, bis mikroskopisch keine Schleifspuren mehr nachweisbar waren (Wild M3, Wild Heerbrugg, Zürich, Schweiz) und die Oberflächen homogen glänzten.



**Abb. 4-1:** Vorbereitung der Zähne mit natürlicher Karies zur weiteren Analyse

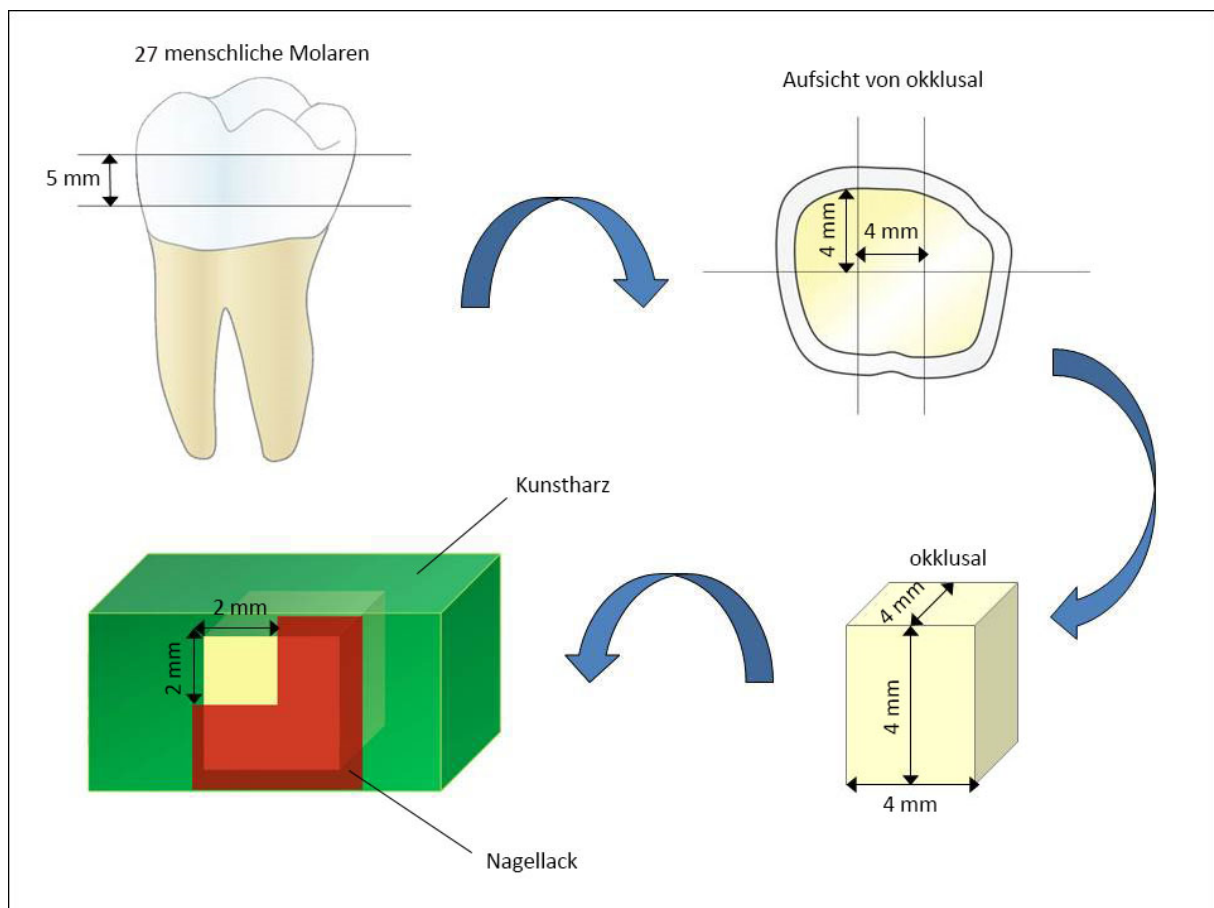
### 4.3 Herstellung künstlicher kariöser Läsionen

#### 4.3.1 Probenherstellung

Für die Proben zur Herstellung künstlicher Karies wurden 20 und später für den Folgeversuch sieben weitere kariesfreie menschliche Molaren der zweiten Dentition verwendet, die ebenfalls von verschiedenen Zahnärzten unter Einverständniserklärung der Patienten bereitgestellt wurden. Die Beurteilung der Zähne erfolgte visuell nach Trocknung. Auch hier erfolgte die Lagerung direkt nach der Extraktion in 0,08 %-Thymollösung. Mittels Bandsäge

#### 4. Material und Methoden

(Bandsäge Exakt 300cl, Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) wurde jeweils transversal eine Scheibe aus der Zahnkrone gefräst, die wiederum, je nach Größe der Fläche, in vier bis sechs Stücke von ca.  $5 \times 4 \times 4$  mm Größe zerteilt wurden. Stücke, die aus Bereichen oberhalb der Pulpa stammten und somit Pulpa-Anschnitte enthielten, fielen entsprechend weniger dick aus. Wie oben beschrieben, wurden diese Proben, mit ihrem okklusalen Anteil freiliegend, ebenfalls in Kunstharz eingebettet und poliert. Anschließend wurde ein Teil des Dentins mit säureresistentem Nagellack abgedeckt (long lasting nail colour, Rossmann, Burgwedel, Deutschland), sodass ein unbedecktes Fenster von ca.  $2 \times 2$  mm verblieb und den späteren Vergleich zwischen mit Demineralisationslösung behandelter und unbehandelter Fläche ermöglichte (Abb. 4-2).



**Abb. 4-2:** Herstellung der Dentinproben für die künstliche Demineralisation

### 4.3.2 Demineralisationsmethoden

Um zu ermitteln, welche Demineralisationsmethode innerhalb welcher Lagerungsdauer wie viel Läsionstiefe kreiert und vor allem vielversprechende Ergebnisse im Hinblick auf ihren Mineralverlauf im Vergleich zur natürlichen Residualkaries liefert, wurde zunächst ein Screening mit vier verschiedenen unten aufgeführten Methoden durchgeführt, die bereits in der Vergangenheit Gegenstand verschiedener Studien waren [Kawasaki et al., 2000; Magalhaes et al., 2009; Marquezan et al., 2009; Moron et al., 2013; Schwendicke et al., 2014a]. Dabei handelte es sich um drei verschiedene chemische Demineralisationsmethoden und ein Bakterienmodell. Jeweils 20 Dentinproben wurden auf die drei chemischen Ansätze verteilt (s.u.), nach Ablauf definierter Zeitintervalle erfolgte dann die Entnahme von je vier Proben. Das Bakterienmodell wurde mit insgesamt 18 Proben bestückt, bei einer wöchentlichen Entnahme von jeweils sechs Proben.

Die Lagerung der Proben in den jeweiligen chemischen Ansätzen erfolgte im Rotationsbrutkasten (C24 Incubator shaker, New Brunswick Scientific, Edison, USA) bei 37,4 °C und 65 U/min, um erstens die Temperaturbedingungen im menschlichen Mund zu imitieren und zweitens die Bildung einer stärker mineralisierten Oberflächenschicht zu verhindern [Kawasaki et al., 2000]. Lediglich das Bakterienmodell unterschied sich hierin (s. 4.3.2.4 Mikrobiologisches Bakterienmodell). Wenn nicht anders angegeben, stammten alle verwendeten Chemikalien von der Firma Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.

#### 4.3.2.1 Ethylendiamintetraazetat-Lösung (EDTA)

Es wurde eine 0,5 M (15 %) EDTA-Lösung hergestellt, deren pH-Wert mittels Zitronensäure (Roth, Karlsruhe, Deutschland) ad 7,2 titriert wurde [Kawasaki et al., 2000]. Die Lagerung der Proben erfolgte in ca. 500 ml Lösung, wobei die Entnahme von je vier Proben alle 24 Stunden über einen Zeitraum von 120 Stunden stattfand.

#### 4.3.2.2 Carboxymethylcellulose-Laktat-Gel

Zur Herstellung des Laktatgels wurde Milchsäure (0,1 M) mit KOH (5 M) titriert und ad pH 5,0 gebracht. Dann wurden unter ständigem Rühren 3 % Carboxymethylcellulose hinzugefügt [Kawasaki et al., 2000]. Die Proben wurden mit 0,5 cm Gel bedeckt gelagert, was einem Volumen von ca. 1,5 ml Gel pro Probe entsprach. Eine Erneuerung des Gels fand wöchentlich statt. Jeweils vier Proben wurden in wöchentlichem Abstand über einen Zeitraum von 35 Tagen aus dem Gel entnommen und bis zur weiteren Bearbeitung und Analyse in demineralisiertem Wasser gelagert.

#### 4.3.2.3 Azetatbasierte Lösung

Die Proben wurden in 1 l azetatbasierter Demineralisationslösung [Buskes et al., 1985] (Tab. 4-1) gelagert. Es erfolgte die tägliche Kontrolle des pH-Werts (InLab micro, Mettler-Toledo, Gießen, Germany) und bei Abweichung vom Sollwert eine Korrektur mittels Zugabe von Kaliumhydroxidlösung (10 M) nach unten bzw. mit Eisessig nach oben. Die Entnahme von je vier Proben erfolgte, wie oben beschrieben, wöchentlich über einen Zeitraum von 35 Tagen. Einmal pro Woche erfolgte hier ebenfalls ein Austausch mit frischer Lösung.

**Tab. 4-1:** Zusammensetzung der azetatbasierten Demineralisationslösung [Buskes et al., 1985]

Stoff	Ansatz	Konzentration in mmol	Molare Masse in g/mol	Menge
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	Insg. 5 l	3	147,02	2,205 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		3	136,09	2,041 g
MHDP		0,006	176,00	5,28 g
Eisessig (CH <sub>3</sub> COOH 100 %)		50	60,05	15,012 g
KOH 10 M (28,055 g / 50 ml H <sub>2</sub> O)		Ad pH 4,95	56,11	ca. 23 ml
Aqua dest.		55,6	18	Ad 5 l

Als sich bei Analyse dieser Demineralisationsmethode herausstellte, dass vor allem der Mineralverlauf innerhalb der Läsion dem der natürlichen Residualkaries entsprach, wurden weitere Versuche mit variiertem pH-Wert durchgeführt. Bei einem pH-Wert von 5,3 waren die Ergebnisse besonders überzeugend, sodass eine weitere Versuchsreihe über zwölf Wochen initiiert wurde und die entstandenen Läsionen neben ihrer Läsionstiefen und ihrem Mineralgehalt auch auf ihre Nanohärten analysiert wurden.

### **4.3.2.4 Mikrobiologisches Bakterienmodell**

Im mikrobiologischen Bakterienmodell wurden die Dentinproben mit Bakterien der Gattung *Streptococcus mutans* beimpft und über einen Zeitraum von drei Wochen mittels eines Pumpsystems in regelmäßigen Zeitabständen mit einer definierten Menge selektiven Nährmediums [Takada and Hirasawa, 2005] betropft [Schwendicke et al., 2014a]. Der genaue Ablauf ist im Folgenden dargestellt.

#### **4.3.2.4.1 Probenherstellung**

Für das Bakterienmodell wurden insgesamt 18 Proben verwendet, die in Gruppen von jeweils sechs Proben gemeinsam erneut in Kunstharz (Technovit 4071 / Technovit 4071 the fast) eingebettet, parallelisiert und poliert wurden. Um die entstandenen Scheiben wurde je ein Randwall aus Silikon (Honigum-light, DMG, Hamburg, Deutschland) geformt, der die Nährflüssigkeit auf den Scheiben halten und so eine Austrocknung der Proben während der Ruhephasen verhindern sollte. Anschließend erfolgte, in einem Becherglas mit demineralisiertem Wasser gelagert, die Sterilisation der Proben (Dampfsterilisator Modell CS-V-Lab-HW, Webeco, Selmsdorf, Deutschland; 134 °C für 10 min).

#### **4.3.2.4.2 Herstellung des selektiven Nährmediums**

Als Nährlösung wurde ein Selektivmedium für *Streptococcus mutans* (BHI-S) verwandt, um die Gefahr einer Kontamination und Besiedelung durch andere Bakterien zu minimieren. Hierfür wurden 900 ml sterilisierte (Dampfsterilisator Modell CS-V-Lab-HW; 121 °C für 20 min) Hirn-Herz-Bouillon (BHI) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit 100 ml sterilfiltrierter Saccharose-Lösung (Saccharose und Sterilfilter Millipore Express Plus; beides, Merck) versetzt, was einem Zuckergehalt von 2 % entspricht, und pro Liter 5 mg Bacitracin (Serva,

Heidelberg, Deutschland), 5 mg Valinomycin und 1,25 mg Amphotericin (Merck) beigefügt [Takada and Hirasawa, 2005].

### **4.3.2.4.3      Beimpfung der Proben**

Zur Beimpfung der Proben wurden die Probenkörper in ca. 30 ml BHI-S mit Zugabe von tiefgefrorenem *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (DSMZ, Göttingen, Germany) bei 37 °C (Brutkasten Typ B5042, Heraeus, Hanau, Deutschland) über Nacht gelagert. Außerdem wurde eine Kontrollprobe der BHI-S hinzugegestellt. Morgens zeigte sich die kontaminierte BHI-S trüb und die Kontrollprobe klar und in ihrem Erscheinungsbild unverändert.

### **4.3.2.4.4      Versuchsaufbau**

Der Versuchsaufbau ist in Abb. 4-3 zusammengefasst. Die Lagerung der Proben erfolgte in einem Kunststoffbehälter, der zuvor der Aufbewahrung steriler Pipettenspitzen (filter tip 200, Greiner Labortechnik, Kremsmünster, Österreich) diente. In den Deckel des Behälters wurden mittels einer Wachssonde (Thomas Color, Henry Schein, Melville, USA) Löcher geschmolzen, sodass jeweils ein Schlauch der verwendeten Peristaltikpumpen (Type PR4, Seko, Mainz-Kastel, Deutschland) pro Probengruppe hineinpasste. Eventuell vorhandene Zwischenräume zwischen Lochwand und Schlauch wurden mit Silikon (Honigum-light) abgedichtet. Sowohl der präparierte Behälter als auch die zu- und abführenden Pumpenschläuche wurden vor der Inbetriebnahme des Modells heißluftsterilisiert (Melag Vacuklav 24, Berlin, Deutschland; 121 °C für 10 min). Auch der weitere Aufbau erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer Sterilwerkbank (Herasafe Thermo KS12, Heraeus, Hanau, Deutschland).

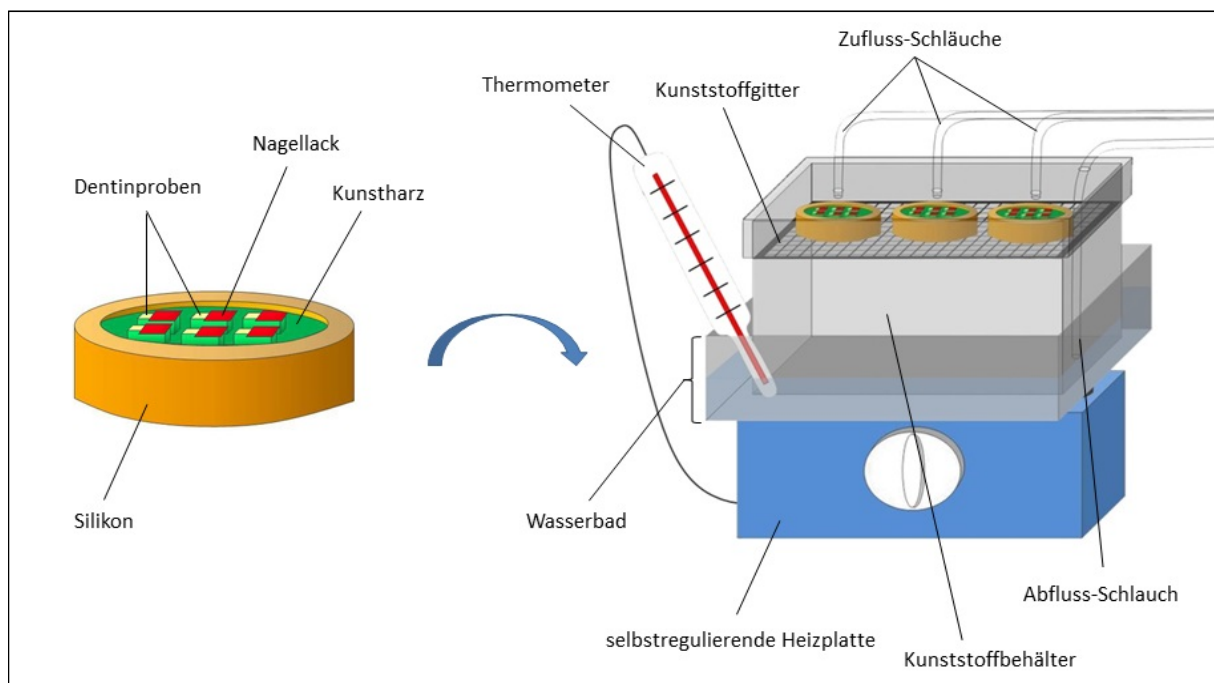
Auf einem sich im Behälter befindenden Kunststoffgitter wurde jeweils eine Probengruppe unterhalb eines Loches platziert, in das jeweils ein Schlauch so eingelassen wurde, dass er knapp oberhalb der Probenoberfläche endete, um ein hartes Aufprallen des BHI-S-Tropfens zu vermeiden. Ein weiteres Loch nahm den Abflussschlauch auf, der bis zum Boden der Box reichte. Die Box selbst wurde in ein Wasserbad platziert, das mit sterilem Aqua dest. (Ampuwa, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) gefüllt wurde. Die Wassertemperatur wurde mittels Heizplatte (RCT Classic, IKA, Staufen, Deutschland) auf 37 °C gebracht. Ein an die Heizplatte angeschlossenes Thermometer (VT-5, VWR, Radnor, USA), das kontinuierlich



## 4. Material und Methoden

die Wassertemperatur maß, sicherte die Konstanz dieses Werts, indem es den Betrieb der Heizplatte regulierte.

Das Betropfen mit BHI-S erfolgte nun stündlich mittels der Peristaltikpumpen für eine Minute mit einer Durchflussmenge von 1,25 ml/min. Der Abfluss der Lösung wurde ebenfalls stündlich durch ein sechsminütiges Abpumpen gewährleistet. Die Zeitabstände wurden mittels einer computerprogrammierbaren Mehrfachsteckdose (energenie EG-PM2, Gembird Europe, Almere, Niederlande) reguliert. Die Entnahme von jeweils einer Probengruppe erfolgte wöchentlich unter sterilen Bedingungen.



**Abb. 4-3:** Aufbau des Bakterienmodells

## 4.4 Auswertung

### 4.4.1 Vorbereitung der Proben

Nach Entnahme der jeweiligen Proben erfolgte ihre Durchtrennung senkrecht zur Oberfläche quer durch die mit Nagellack bedeckte und unbedeckte Fläche mittels diamantierter Bandsäge (Exakt 300cl, Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland), sodass ein gleichzeitiger Querschnitt der entstandenen Läsion und der gesunden Fläche erreicht wurde. Anschließend wurde je eine Hälfte, wie oben beschrieben, planparallelisiert und poliert. Zur

Herstellung von Dünnschliffen wurden die Proben mittels dünnfließenden Sekundenklebers (Loctite 493 Instant Adhesive, Henkel, Düsseldorf, Deutschland) auf Plexiglas-Objektträger (patho-service, Oststeinbek, Deutschland) geklebt, die zuvor mit einer abziehbaren Trägerfolie (Gudy Clear, Neschen Coating GmbH, Bückeberg, Deutschland) präpariert wurden. Auf diese Weise konnten die Proben zunächst für die lichtmikroskopische Auswertung und später für die transversale Mikroradiographie (TMR) genutzt werden. Mithilfe der Bandsäge wurden die Proben anschließend auf eine Dicke von ca. 200  $\mu\text{m}$  gebracht, eine weitere Reduktion auf ca. 100  $\mu\text{m}$  erfolgte dann mittels Parallelschleifmaschine (EXAKT, Exakt Apparatebau) mit Silikonscheiben mittlerer Körnung (1200) mit anschließender Politur (4000) (Siliziumkarbid-Nassschleifpapier, ATM). Die Dicke der Proben wurde unter Zuhilfenahme eines digitalen Mikrometers überprüft (Bügelmessschraube IP65, Mitutoyo, Kawasaki, Japan). Zu jeder Zeit während der Probenherstellung war die Feuchthaltung der Proben gewährleistet.

### **4.4.2 Lichtmikroskopische Auswertung**

Die Evaluation der Läsionstiefen im Zeitverlauf erfolgte am Durchlichtmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) [Almqvist et al., 1990]. Hierzu wurden die Läsionen bei 5-facher Vergrößerung mit einer Schwarz-Weiß-Kamera (CFW-1312M, Scion Corporation, Frederick, USA) fotografiert und anschließend mittels Software (AxioVs 40 V4.8.2.09) vermessen. Die Distanz zwischen der Läsionsoberfläche und dem Beginn des Bereichs, in dem unverändertes, homogen erscheinendes Dentin anzutreffen war, wurde als Läsionstiefe definiert.

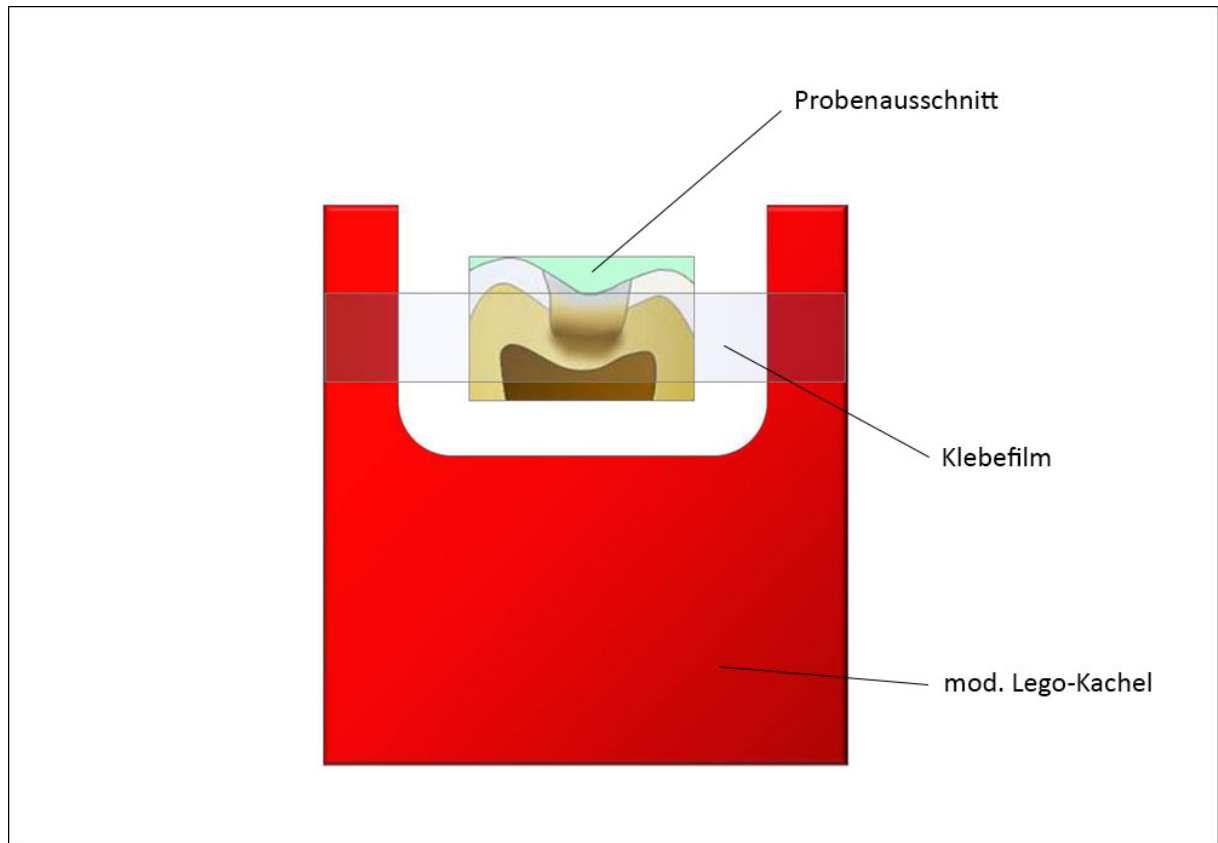
### **4.4.3 Transversale Mikroradiographie (TMR)**

Die TMR stellt eine Methode zur präzisen Ermittlung des Mineralgehalts bzw. –verlaufs innerhalb einer kariösen Läsion dar. Hierzu werden Zahnproben von ca. 80-100  $\mu\text{m}$  Dicke gemeinsam mit einem Graustufenkeil aus Aluminium, der der Kalibrierung des Gerätes dient, parallel zueinander vor einem röntgensensitiven Spezialfilm in einer Röntgenapparatur

platziert. Die Belichtung des Films erfolgt mittels  $\text{CuK}\alpha$ -Röntgenstrahlen, die senkrecht auf Probenkörper und Film auftreffen. Bei anschließender Betrachtung und Auswertung des entwickelten Films unter dem Lichtmikroskop kann durch den Vergleich der Grauwerte des Aluminiumstufenkeils und mit denen des Zahn-Abbildes eine Aussage über den Mineralverlust ( $\Delta Z$ , Vol.-%\* $\mu\text{m}$ ) der Probe getroffen werden. Bereiche mit hohem Mineralgehalt erscheinen röntgenopaker, also heller, als solche mit niedrigem. Anhand dieser Daten und den zuvor ermittelten Läsionstiefen lässt sich die Mineralverlustintensität ( $R = \Delta Z/LT$ , Vol.-%) innerhalb der Läsionen berechnen und sich eine Aussage über den Anstieg des Minerals innerhalb der Zone der Demineralisation treffen (Vol.-%/ $\mu\text{m}$ ).

### 4.4.3.1 Vorbereitung

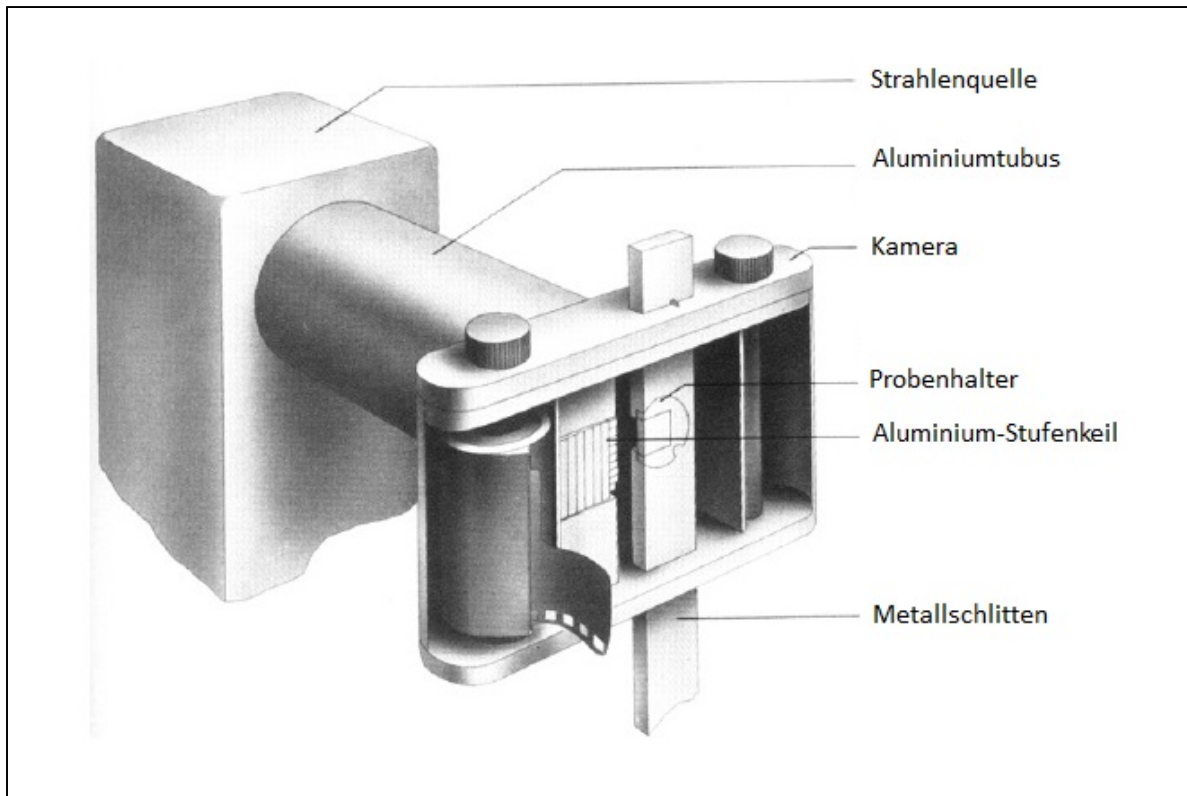
Nach Ablauf der Demineralisationszeiten wurden die Proben der Entnahmegruppen zusätzlich zur lichtmikroskopischen Analyse mikroradiographisch ausgewertet. Hierzu wurde die Trägerfolie mitsamt dem Probenkörper vom Objektträger abgezogen und der zu analysierende Ausschnitt mithilfe einer Schere und eines Skalpellens ausgeschnitten. Mithilfe eines zurechtgeschnittenen Klebefilmstreifens (Tesafilm, Tesa, Hamburg, Deutschland) erfolgte die Übertragung in einen TMR-Probenhalter (modifizierte Lego-Kacheln 2x2, manufactured, Berlin, Deutschland) (Abb. 4-4). Zu jeder Zeit dieses Prozesses wurde die Feuchthaltung der Proben mit demineralisiertem Wasser gewährleistet.



**Abb. 4-4:** Vorbereiteter TMR-Halter mit Probe

### 4.4.3.2 Aufnahme der Mikroradiogramme

Mithilfe eines Metallschlittens, in den mehrere Proben zugleich montiert werden konnten, wurden die Proben in den Strahlengang eines speziellen Röntgengeräts (PW3830 X-Ray generator, PANalytical, Almelo, Niederlande) eingebracht. Die mikroradiografische Aufnahme fand bei einer Röhrenspannung von 20 V und einem Röhrenstrom von 20 mA bei einer Belichtungszeit von 10 Sekunden statt. Die Abbildung der Mikroradiogramme erfolgte auf einen in einer Kamera befindlichen Spezialfilm (Fuji 35 positive, Fujifilm, Tokio, Japan), der parallel zu den Probenhaltern ausgerichtet war (Abb. 4-5). Die Entwicklung des Films verlief strikt nach Angaben des Herstellers.



**Abb. 4-5:** Aufbau des TMR-Röntgengerät (modifiziert nach [De Josselin de Jong, 1986])

### 4.4.3.3 Auswertung der Mikroradiogramme

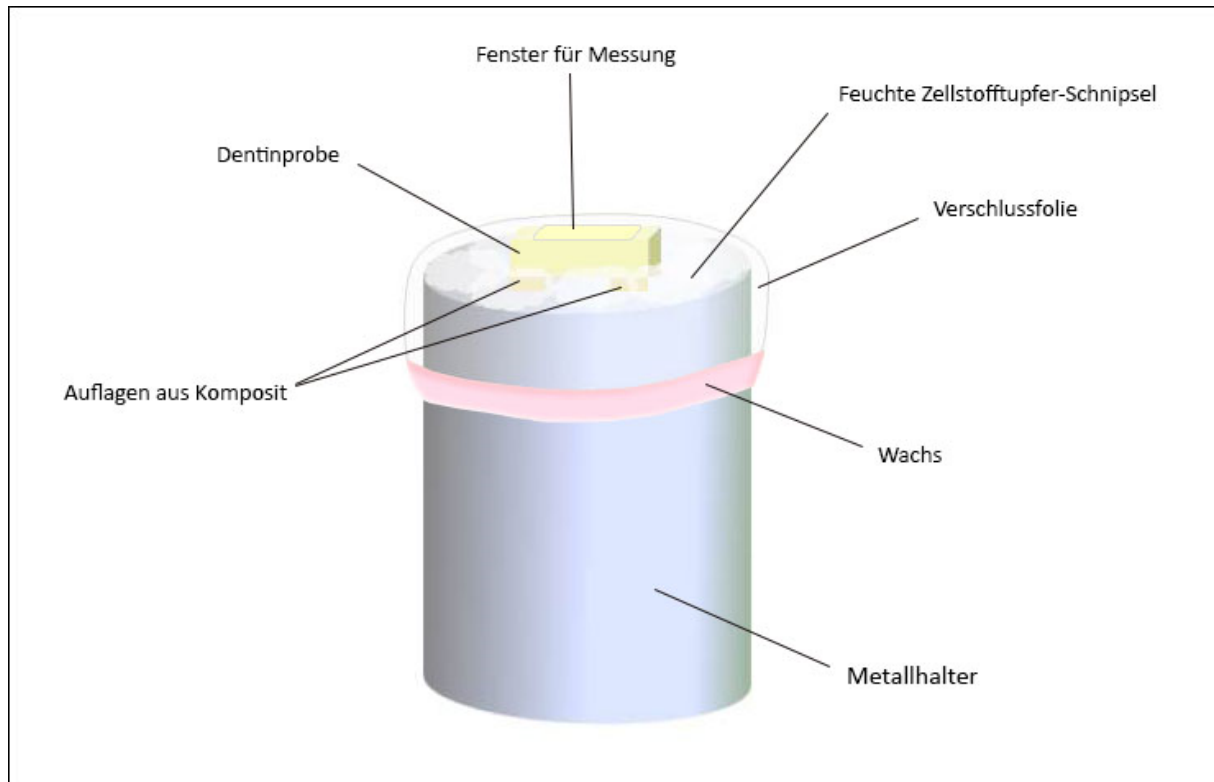
Nach erfolgreicher Entwicklung der Mikroradiogramme wurden zunächst erneut am Durchlichtmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 5-facher Vergrößerung Aufnahmen der Läsionen mit der angeschlossenen Schwarz-Weiß-Kamera (CFW-1312M, Scion Corporation, Frederick, USA) angefertigt. Die Auswertung der Bilder erfolgte dann mittels Software (TMR für Windows Version 5.25, UCMG, Groningen, Niederlande) am Computer.

### 4.4.4 Messung der Nanohärte

Neben der Ermittlung der Läsionstiefen und des Mineralgehalts wurden die natürliche und die durch azetatbasierte Lösung mit pH 5,3 induzierte künstliche Karies auf ihre Nanohärte analysiert.

#### 4.4.4.1 Vorbereitung der Proben

Für die Messung der Nanohärte wurden die jeweils komplementären Hälften der zuvor bereits geschnittenen und auf Läsionstiefe und Mineralgehalt überprüften Proben verwandt. Wieder erfolgte die Planparallelisierung und Politur. Da die Proben zur Vermessung im Nanoindenter (MTS Nanoindenter SA2, Agilent, Santa Clara, USA) auf speziell auf das Gerät genormte Metallzylinder aufgebracht wurden und eine bestimmte Entfernung von Indenterspitze und Messoberfläche nicht unterschritten werden durfte, wurden die Proben nach der Politur mittels Bandsäge auf einen Millimeter Dicke gebracht. Nach diesem Vorgang ließ sich die Probe leicht aus dem Kunstharz herauslösen. Mithilfe von punktuellen Auflagen aus Komposit (Tetric Ceram, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) und einem Dentinhaftvermittler (Optibond FL, Kerr, Bioggio, Schweiz) wurden die Proben auf den Haltern fixiert und mittels Wasserwaage parallel zur Tischebene ausgerichtet. Um ein Austrocknen der Proben während des langwierigen Messprozesses zu gewährleisten, wurden kleine Stücke von Zellstoff-Tupfern (Pur-Zellin, Hartmann, Heidenheim, Deutschland) mit demineralisiertem Wasser getränkt und um die Probe herum platziert. Ein Verdampfen der Flüssigkeit wurde durch die Bedeckung mit Verschlussfolie (Parafilm, Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA), aus der zuvor ein Loch für den Bereich der Messung ausgeschnitten worden war, verhindert. Fixiert wurde die Verschlussfolie zirkulär mit erhitztem Wachs und bildete so eine feuchte Kammer (Abb. 4-5).



**Abb. 4-5:** Schematische Darstellung des Probenkörpers auf dem zylindrischen Metallhalter für die Nanohärtemessung

### 4.4.4.2 Durchführung der Messung

Die Messung der Nanohärte erfolgte im Nanoindenter (Nanoindenter SA2, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Mit einer Andruckkraft von  $5.000 \mu\text{N}$  wurde eine Messreihe von 45 Punkten senkrecht zur Probenoberfläche in einem Abstand von je  $35 \mu\text{m}$  gewählt, beginnend in einem geringen Abstand zur Probenoberfläche. Dies stellte den minimal möglichen Abstand zwischen zwei Messpunkten dar, da es ansonsten bei elastischen Geweben wie Dentin zu Verfälschungen durch Aufwurf der Masse um den Eindruck herum kommen kann. Mittels einer Software (TestWorks 4 Software for Nanoindentation, MTS Systems Corporation, Eden Prairie, USA) wurde das Gerät kalibriert, die Messung initiiert und in Echtzeit ausgewertet. Bei dem Prüfkörper handelte es sich um eine Diamantpyramide mit dreieckiger Basis, sodass die Messergebnisse der Berkovich-Härte entsprachen.

### 4.4.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS 22 (IBM, Armonk, USA). Mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests wurden die Daten zunächst auf Normalverteilung überprüft. Der Mineralverlust zwischen den einzelnen Gruppen wurde unter Anwendung des zweiseitigen Zweistichproben-t-Tests mit Bonferroni-Korrektur verglichen. Mittels Varianzanalyse (ANOVA) wurde der statistische Vergleich der Härteprofile durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  angenommen. Zur graphischen Darstellung wurden Referenzbänder genutzt. [Bowman, 1996]. Die Breite des Referenzbandes wurde durch die zusammengefassten Standardfehler gegeben, das Zentrum bildeten die entsprechenden Mittelwerte.



## 5. Ergebnisse

### 5.1 Läsionstiefen (LT)

#### 5.1.1 Natürliche kariöse Läsionen

Ausgewertet wurden zwölf natürliche residuale Läsionen nach selektiver Exkavation. Die ermittelten Läsionstiefen variierten erwartungsgemäß stark. Die mittlere Läsionstiefe betrug  $626 \pm 212 \mu\text{m}$ .

#### 5.1.2 Künstlich erzeugte Läsionen

Die Demineralisierung mit EDTA erbrachte im Vergleich zu den anderen Methoden bei weitem die größten Läsionstiefen in der kürzesten Zeit. Bereits nach 96 Stunden betrug die mittlere Läsionstiefe  $655 \pm 68 \mu\text{m}$ . Deutlich langsamer entwickelten sich die Läsionen in azetatbasierter Lösung ( $\text{pH} = 4,95$ ) und Laktatgel. Nach Ablauf von fünf Wochen erzeugte Erstere mittlere Tiefen von  $357 \pm 41 \mu\text{m}$ , Letztere von  $572 \pm 117 \mu\text{m}$ . Das Bakterienmodell lief über drei Wochen und erzeugte Läsionen von  $407 \pm 165 \mu\text{m}$  im Mittel.

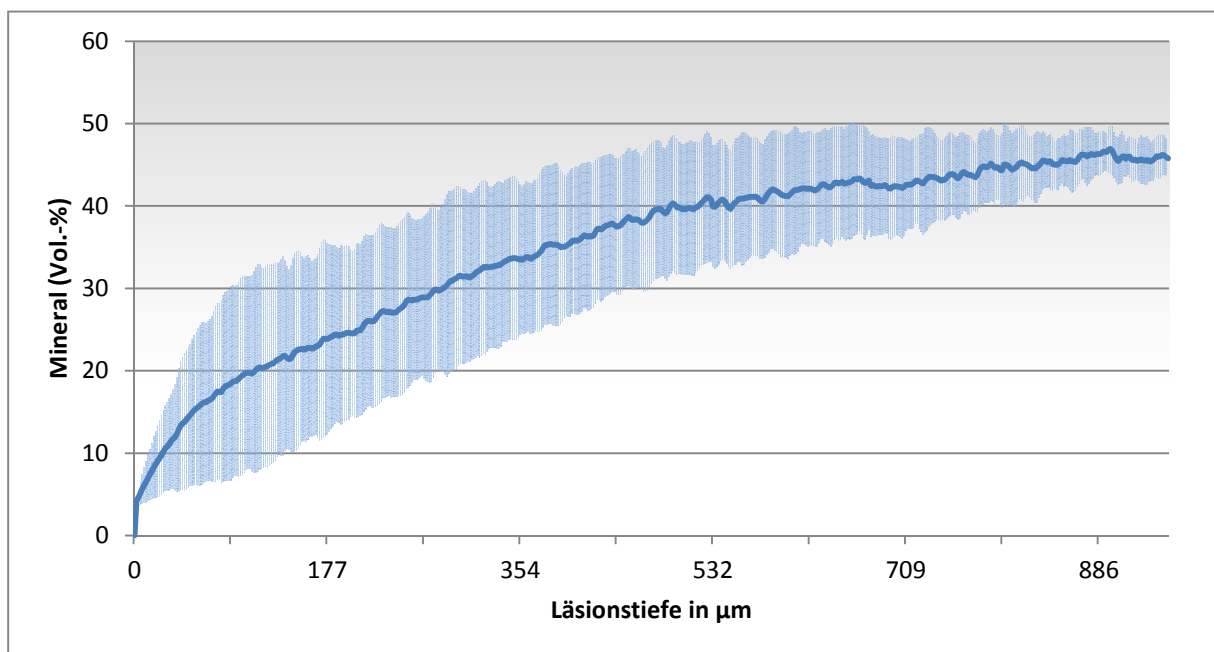
##### 5.1.2.1 Azetatbasierte Lösung mit $\text{pH} = 5,3$

Nachdem sich die azetatbasierte Lösung vor allem in der Analyse des Mineralverlustes, der hier später diskutiert wird, als vielversprechend darstellte, wurden weitere Versuche mit variiertem pH-Wert durchgeführt, wobei sich eine Lösung mit  $\text{pH} 5,3$  aufgrund der Ähnlichkeit der Parameter zur natürlichen Karies als besonders geeignet herausstellte. Sieben weitere Proben wurden über einen Zeitraum von zwölf Wochen demineralisiert, um höhere Läsionstiefen zu erreichen. Nach Ablauf der Zeit betrug die mittlere Läsionstiefe  $563 \pm 88 \mu\text{m}$ . Im Folgenden werden unter der Überschrift „Azetatbasierte Lösung“ nur noch solche Probenanalysen der soeben erwähnten  $\text{pH}-5,3$ -Variante aufgeführt und erläutert.

## 5.2 Mineralverlust ( $\Delta Z$ )

### 5.2.1 Natürliche Residualkaries

Äquivalent zu den Läsionstiefen gab es auch hinsichtlich des Mineralverlusts eine starke Varianz innerhalb der Proben der natürlichen Läsionen. Der mittlere Mineralverlust innerhalb der Läsionen lag bei 12437 Vol.-%\* $\mu\text{m}$ , allerdings einhergehend mit einer Standardabweichung von 5834 Vol.-%\* $\mu\text{m}$ , was die großen interindividuellen Unterschiede verdeutlicht. Allen Proben gemein war aber, dass sich der Mineralgehalt innerhalb der Läsionen mit zunehmender Distanz von der Oberfläche ins Innere flach und nahezu linear erhöhte und somit ein gleichmäßiger Mineralanstieg zu verzeichnen war (Abb. 5-1).



**Abb. 5-1:** Mittlerer Mineralgehalt in Vol.-% (dunkelblaue Linie) und Standardabweichung (hellblaues Band) natürlicher residualer Läsionen (n = 12)

### 5.2.2 Künstlich erzeugte Läsionen

#### 5.2.2.1 EDTA

Die Demineralisation mittels EDTA-Lösung zeigte erwartungsgemäß den größten Mineralverlust innerhalb der Läsionen. Unabhängig von der Einwirkdauer und der Läsionstiefe wurde das Mineral beinahe vollständig aus den Läsionen herausgelöst. So ergibt sich im Graphen ein langer Verlauf entlang der Nulllinie, bis schließlich ein sehr steiler Anstieg am Boden der Läsion auftritt. Der mittlere Mineralverlust lag nach 96 Stunden bei  $28615 \pm 3129 \text{ Vol.-%}\mu\text{m}$  und somit mehr als doppelt so hoch wie der der natürlichen Läsionen. Im TMR-Bild unterscheiden sich die „leeren Läsionen“, die durch EDTA induziert wurden, stark von denen der anderen Methoden, bei denen eine deutliche Demineralisationsfront zu erkennen ist. Als Demineralisationsfront ist der Bereich der Läsion definiert, in der der Mineralverlust zwischen 10 und 40 Vol.-% beträgt (Abb. 5-2).

#### 5.2.2.2 Carboxymethylcellulose-Gel

Im Gegensatz zum EDTA fanden sich in den durch Gel induzierten Läsionen deutlich geringere Mineralverluste und flacher ansteigende Verläufe. Nach fünf Wochen Lagerung im Demineralisationsgel betrug der mittlere Mineralverlust  $17147 \pm 5444 \text{ Vol.-%}\mu\text{m}$ . Im Gegensatz zur stark erodierten EDTA-Läsion ist eine Demineralisationsfront erkennbar, dennoch zeigt sich in der TMR-Auswertung eine harsche Grauabstufung ins Innere des Dentins.

#### 5.2.2.3 Bakterienmodell

Eine Probe zerbrach bei dem sensiblen Prozess der Vorbereitung für die TMR-Auswertung und war daher nicht auswertbar. Die anderen bakterieninduzierten Läsionen zeigten nach drei Wochen Lagerung einen mittleren Mineralverlust von  $8664 \pm 2014 \text{ Vol.-%}\mu\text{m}$  ( $n = 5$ ). Auffällig war hier ein initialer Anstieg des Mineralgehalts an der unmittelbaren Läsionsoberfläche, verglichen mit dem der Demineralisationsfront. Dieser weist auf die Ausbildung einer stärker mineralisierten Oberfläche hin, wie sie im Prozess der natürlichen Kariesentstehung durch Remineralisationsprozesse zwischen Läsion und Plaque an der

Oberfläche einer Läsion häufig entsteht [Kawasaki et al., 2000]. Die Darstellung im TMR-Bild zeigt sich mit weitgehend gleichmäßiger Graustufung.

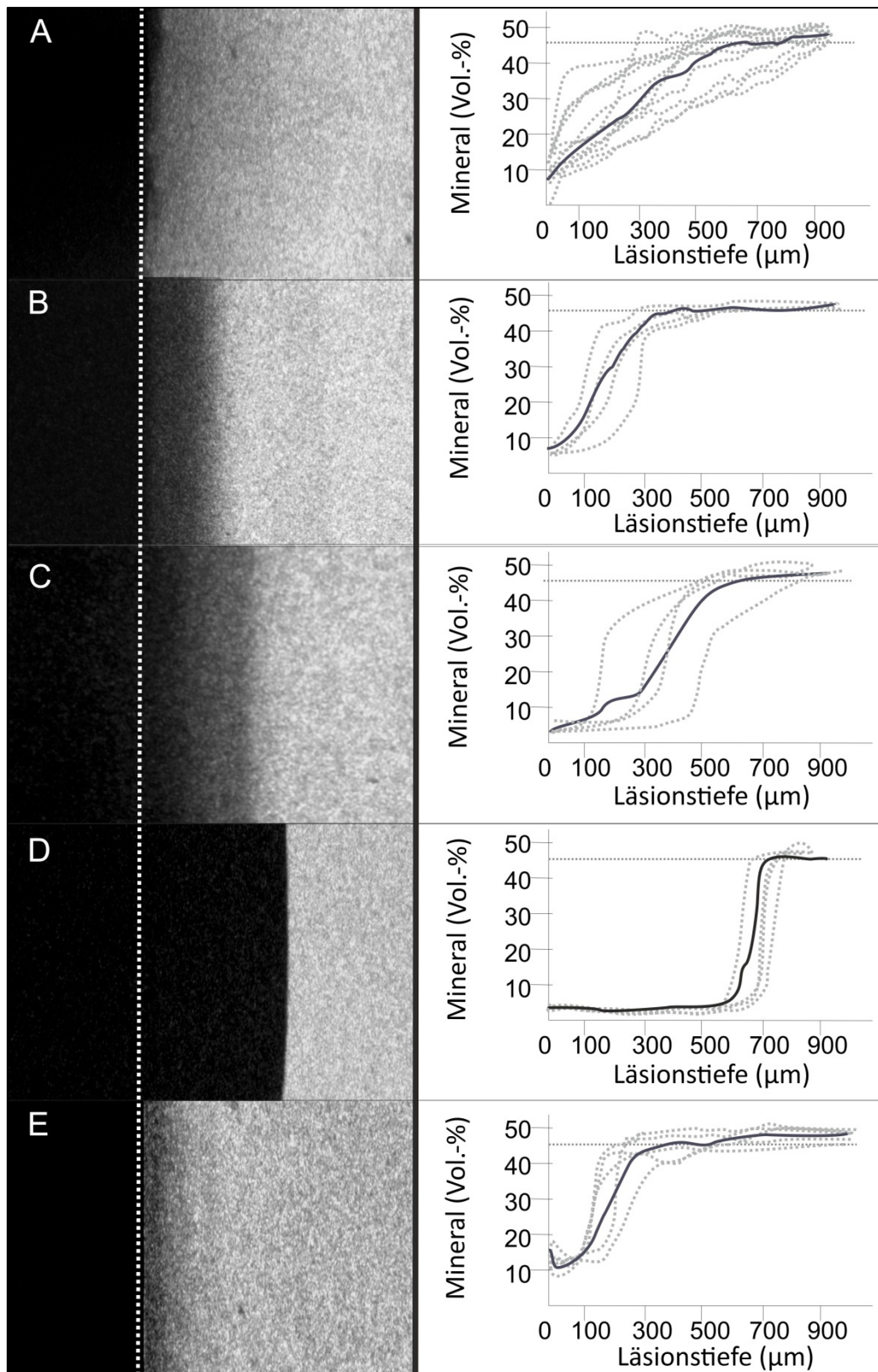
#### 5.2.2.4 Azetatbasierte Lösung pH = 5,3

Nach Ablauf von zwölf Wochen Lagerungszeit zeigten sich Läsionen mit einem mittleren Mineralverlust von  $16593 \pm 2270$  Vol.-%\* $\mu\text{m}$  ( $n = 7$ ). Die Proben unterschieden sich im Hinblick auf die untersuchten Parameter Läsionstiefe, Mineralverlust, -intensität und -anstieg innerhalb der Läsion nicht signifikant von den natürlichen Läsionen ( $p > 0,05$ , t-test/Bonferroni), während die Proben der anderen Demineralisationsmethoden in einem oder mehreren Parametern signifikante Unterschiede aufwiesen ( $p < 0,05$ ) (Tab. 5-1).

**Tab. 5-1:** Mittlere Läsionstiefen, mittlere Mineraleigenschaften und Standardabweichungen ( $\pm$ ) der verschiedenen Demineralisationsmethoden im Vergleich (mod. nach [Schwendicke et al., 2015])

	Natürliche Läsionen	Azetatbas. Lösung pH = 4,95	Azetatbas. Lösung pH = 5,3	Laktatgel	EDTA	Bakterien
Probenanzahl	12	4	7	4	4	6
Zeit	-	35 Tage	84 Tage	35 Tage	96 Stunden	21 Tage
Läsionstiefe ( $\mu\text{m}$ )	$626 \pm 212^a$	$357 \pm 41^a$	$563 \pm 88^a$	$572 \pm 117^a$	$655 \pm 68^a$	$407 \pm 165^a$
Mineralverlust ( $\Delta Z$ Vol.-%* $\mu\text{m}$ )	$12437 \pm 5834^a$	$9072 \pm 1536^a$	$16593 \pm 2270^a$	$17147 \pm 5444^a$	$28615 \pm 3129^b$	$8664 \pm 2014^a$
Mineralverlust-intensität R ( $\Delta Z/LT$ , Vol.-%)	$19,5 \pm 4,7^a$	$26,9 \pm 2,8^{a,b}$	$29,8 \pm 4,1^b$	$29,4 \pm 4,3^b$	$43,8 \pm 0,4^c$	$23,1 \pm 6,5^{a,b}$
Mineralanstieg (Vol.-%/ $\mu\text{m}$ )	$0,10 \pm 0,05^a$	$0,25 \pm 0,09^a$	$0,13 \pm 0,06^a$	$0,17 \pm 0,1^a$	$1,71 \pm 0,67^b$	$0,80 \pm 0,52^c$

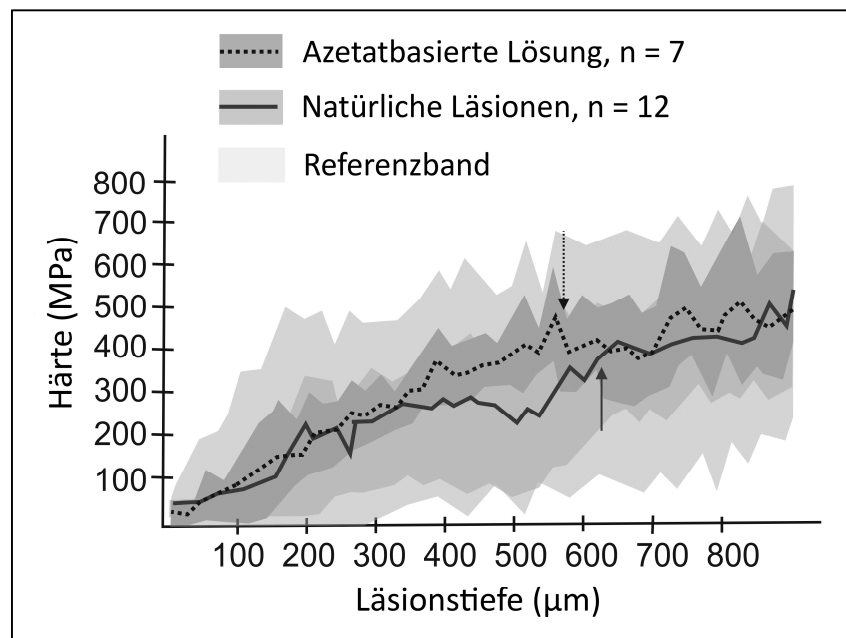
Unterschiedliche hochgestellte Buchstaben innerhalb der Reihen markieren signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (t-test/Bonferroni).



**Abb. 5-2:** Mineralverlauf innerhalb der natürlichen (a) und den künstlich erzeugten Läsionen (b-e). Azetatbasierte Lösung (pH = 4,95) (b), Laktatgel nach 35 Tagen (c), EDTA nach 96 Stunden (d), Bakterienmodell (e). Links: Mikroradiografien der Läsionen, gestrichelte Linie = Läsionsoberfläche; rechts: Mineralverläufe in Vol.-%\* $\mu\text{m}$ : hellgrau = einzelne ausgewertete Proben, dunkelgrau = mittlerer Mineralverlauf aller ausgewerteter Proben einer Gruppe [Schwendicke et al., 2015]

### 5.3 Nanohärte (nach Berkovich)

Nach Evaluation der Mineralverluste und der Erkenntnis der nächsten Vergleichbarkeit der mit azetatbasierter Lösung demineralisierten Proben gegenüber der natürlichen Residualkaries wurden beide auf ihre Nanohärten überprüft. Hierbei zeigten sich unmittelbar nahe der Läsionsoberfläche sehr niedrige Werte, im Mittel 0,04 GPa, die ins Innere der Läsionen weitgehend linear anstiegen und sich schließlich im gesunden Dentin auf einem Plateau bis um 0,45 GPa einpendelten. Gegenüber dem in der Literatur auffindbaren Wert für die Härte gesunden Dentins (ca. 0,7 – 0,8 GPa) ist dieses Plateau relativ niedrig angesiedelt, was damit zu begründen ist, dass man sich in pulpanahen Bereichen des Dentins bewegte und der Härtegrad von der Schmelz-Dentin-Grenze ins Innere des Zahns abnimmt [Zhang et al., 2014]. Die Härteprofile der beiden verschiedenen Läsionstypen unterschieden sich nicht signifikant ( $F = 0,168$ ,  $p = 0,752$ ,  $\omega^2 = 0,144$ , ANOVA) (Abb. 5-3).



**Abb. 5-3:** Nanohärte (MPa) der natürlichen (Mittelwert: durchgehende Linie, Standardabweichung: halbdunkle Schattierung) und der künstlich induzierten Läsionen (Mittelwert: gepunktete Linie, Standardabweichung: dunkle Schattierung). Die hellgraue Schattierung dient als Referenzband, dessen Breite durch die zusammengefassten Standardfehler gegeben wird, die entsprechenden Mittelwerte bilden das Zentrum. Die Schattierungen der Läsionen verlaufen nicht über das Referenzband hinaus, was auf keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Läsionsarten schließen lässt. Die Pfeile markieren die zuvor mittels Lichtmikroskopie evaluierten mittleren Läsionstiefen (durchgehend: natürliche Läsionen, gepunktet: künstliche Läsionen). Anzumerken ist, dass die Härte auch im Bereich des zuvor als „gesund“ identifizierten Dentins noch leicht ansteigt [Schwendicke et al., 2015].

## 6. Diskussion

### 6.1 Diskussion von Material und Methode

Die vorliegende Studie untersuchte die Herstellung künstlicher residualkariesähnlicher Läsionen *in vitro*, die der natürlichen Residualkaries in den Eigenschaften Mineralgehalt und Härte möglichst ähnlich sind. Zu diesem Zweck wurden zunächst natürliche residuale Kariesläsionen auf ihren Mineralgehalt und ihre Härte analysiert. Dann wurde ein Vergleich mit verschiedenen, in vorangegangenen Studien verwendeten Demineralisationsmethoden künstlich hergestellten Läsionen vorgenommen [Buskes et al., 1985; Kawasaki et al., 2000; Magalhaes et al., 2009; Marquezan et al., 2009; Moron et al., 2013; Schwendicke et al., 2014a]. Die aussichtsreichste Demineralisationsstrategie wurde in einem zweiten Schritt optimiert und die entstandenen Läsionen neben ihrem Mineralgehalt auch auf ihre Härte analysiert und der natürlichen Karies gegenübergestellt.

#### 6.1.1 Durchführung *in vitro*

Die Versuchsdurchführung *in vitro* ermöglichte den Ablauf unabhängig von der Compliance eines Patienten und dessen individuellen Einflüssen, wie Essgewohnheiten, Mundhygieneverhalten, Speichelzusammensetzungen usw. So werden standardisierte Bedingungen und Läsionen geschaffen, die eine Arbeit in großem Umfang ermöglichen und die für verschiedenste Studien und Untersuchungen Anwendung finden könnten. Hier stoßen *In-vivo*-Studien aus praktischen und ethischen Gründen schnell an ihre Grenzen, zum einen durch die begrenzte Verfügbarkeit geeigneter Zähne, zum anderen durch das Risiko einer potenziellen Schädigung des Individuums. *In vitro* können verschiedene Parameter beliebig verändert werden, so können die Effekte von beispielsweise variiertem pH-Wert, unterschiedlicher Mineralsättigung der Lösungen oder Zugabe verschiedener Fluoride getestet und unterschiedliche Läsionen kreiert werden.

Die Forschung an extrahierten Zähnen erlaubt die Anwendung destruktiver Analyseverfahren, wie z.B. die Auswertung mittels TMR, für die die Zähne zuvor longitudinal

zerteilt werden müssen. Dies ist für eine umfangreiche Analyse von essenzieller Bedeutung, da nur auf diese Weise Zugang zum Inneren einer Läsion gewährt ist und Aussagen über Eigenschaften und Veränderungen innerhalb einer Läsion getroffen werden können.

Trotz aller Vorteile sind *In-vitro*-Studien nur begrenzt in der Lage, eine natürliche Residualkaries zu imitieren. Zwar werden ähnliche kariogene Umstände beispielsweise in Bezug auf die Konfrontation mit niedrigem pH-Wert oder die Umgebungstemperatur erzeugt, die realen Bedingungen in der Mundhöhle eines lebenden Individuums sind allerdings durch wesentlich mehr Faktoren charakterisiert und durchaus variabel [Menaker, 1980; Stephan and Miller, 1943]. Pulpale Reaktionen auf selektives Exkavieren können *in vitro* nicht nachgestellt werden. Aus dem gleichen Grund entfällt die Schichtung der Dentinkaries, da hierfür neben einem bakteriellen Angriff ebenfalls eine pulpale Abwehrreaktion vonnöten ist. Da im Falle der Residualkaries mit dem Exkavationsvorgang aber bereits der Großteil der ursprünglich vorhandenen Schichten entfernt wird, ist dies von eher untergeordneter Bedeutung.

### 6.1.2 Auswahl der Zähne

Die Studie wurde ausschließlich an Molaren der zweiten Dentition durchgeführt. Zum Zweck der künstlichen Kariesinduktion wurden klinisch als kariesfrei, zur Analyse der natürlichen Residualkaries als tief kariös eingestufte Zähne ausgewählt [Ismail et al., 2007]. Die Inspektion der Zähne erfolgte visuell-taktil [Moller and Poulsen, 1973]. Das Alter der Spender war nicht bekannt, es können daher strukturelle Unterschiede zwischen den Zähnen vorgelegen haben [Baume, 1980]. In Vorversuchen wurden die Demineralisationsvorgänge allerdings an vermeintlich alten (Verfärbungen) und jungen (dritte Molaren ohne Auffälligkeiten) Probezähnen durchgeführt, ohne dass ein signifikanter Unterschied in der Läsionstiefe und ihrem Mineralgehalt nach Demineralisation festzustellen gewesen wäre.



### 6.1.3 Selektive Exkavation

Da eine genaue Einschätzung der tatsächlichen Läsionstiefe einer Karies sowie der Restdicke des Dentinmantels bei der Exkavation klinisch derzeit nicht möglich ist, muss im Exkavationsprozess vom Behandler individuell entschieden werden, wann dieser abgebrochen wird. Die dann verbleibende Kariestiefe variiert also stark von Fall zu Fall und von Behandler zu Behandler. Das Belassen einer definierten, möglicherweise standardisierten Restdicke kariösen Dentins ist derzeit durch fehlende klinische Analysemethoden nicht durchführbar.

### 6.1.4 Erzeugung künstlicher Karies

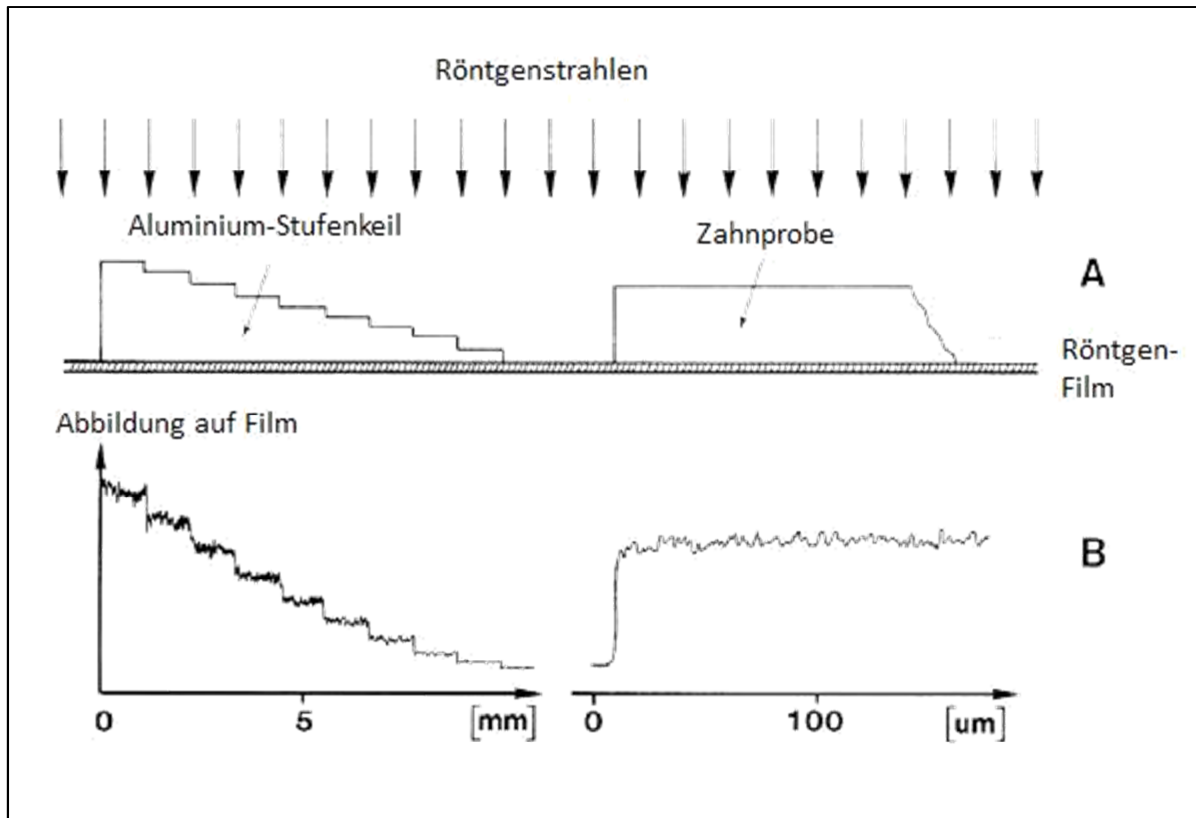
Der Anschnitt der Proben erfolgte senkrecht zur Oberfläche, sodass sich die Läsion entlang der Tubuli ins Innere des Dentins ausbreiten konnte, wie es auch im Mund der Fall wäre [Meyer-Lueckel et al., 2012]. Die Lagerung der Proben in den verschiedenen Demineralisationslösungen geschah bei 37,4 °C in einem Rotationsbrutkasten. Dies diente zum einen der Imitation der Temperaturbedingungen in der menschlichen Mundhöhle und zum anderen der Vermeidung einer stärker mineralisierten Oberflächenschicht. Diese ist in einer stehenden Lösung zurückzuführen auf die Akkumulation der aus dem Zahn gelösten Mineralionen in unmittelbarer Nähe zur Zahnprobe und auf ständig stattfindende Remineralisationsprozesse [Buskes et al., 1985; Kawasaki et al., 2000]. Sie ist eher charakteristisch für Primärläsionen und hier Ausdruck von Remineralisationsvorgängen, die an der Läsionsoberfläche durch Repräzipitation von Mineralien aus dem Speichel und der Plaque ablaufen [Arends and Christoffersen, 1986; Silverstone et al., 1988]. Bei einer Residualkaries ist eine solche Schicht nicht zu erwarten, da sie spätestens nach der Exkavation und Abtragung der oberflächlichen Schichten der Karies entfernt wäre.

Es wurden vier verschiedene Demineralisationsmethoden untersucht, wovon eine ein Biofilm-Modell war. Um die Karies in möglichst kurzer Zeit zu kreieren, waren die Proben dauerhaft dem kariogenen Milieu ausgesetzt, eine zwischenzeitliche Pufferung des pH-Werts, wie sie zwischen den Mahlzeiten im Mund geschieht, erfolgte nicht [Stephan and Miller, 1943].

### 6.1.5 Transversale Mikroradiographie

Die Transversale Mikroradiographie (TMR) ist ein Verfahren zur Ermittlung des Mineralgehalts von Zahnhartsubstanzen unter Zuhilfenahme von Röntgenstrahlung. Gemessen wird die Absorption der Strahlung durch die Zahnhartsubstanz im Vergleich zu einem Standard. Eichgegenstand ist hierbei ein Stufenkeil aus Aluminium, der den gleichen Strahlungsschwächungskoeffizienten wie Hydroxylapatit besitzt. Nach Entwicklung des Spezialfilms kann so mittels Software jeder Graustufung ein spezifischer Mineralgehalt zugeordnet und eine präzise quantitative Aussage darüber getroffen werden (Abb. 6-1). Des Weiteren wird die Läsionstiefe ermittelt als der Abstand zwischen der Läsionsoberfläche bis zu dem Punkt, an dem der Mineralgehalt wieder bei 95 % des gesunden Dentins liegt.

Die TMR ist ein techniksensitives Verfahren, bei dem penibel darauf geachtet werden muss, die Proben während der Vorbereitung auf den Röntgenvorgang zu jeder Zeit feucht zu halten. Andernfalls trocknet die künstliche Läsion binnen kürzester Zeit aus und wird spröde, sodass ein Zerspringen der dünnen Probe nur schwer verhindert werden kann. Vor allem aber birgt die Austrocknung das Risiko der Entstehung von Schrumpfungartefakten. Rissbildung oder Überlagerungen innerhalb der Probe können die einwandfreie Auswertung behindern. Bei der Entwicklung des Films ist das Vorgehensprotokoll einzuhalten, da es sonst zu Fleckenbildung oder Kontrastarmut auf dem Film kommen kann.



**Abb. 6-1:** Schematische Darstellung der Funktionsweise und Auswertung der TMR-Methode. Röntgenstrahlung durchdringt die Körper (Aluminium-Stufenkeil und Zahnprobe), wird je nach Schichtstärke (Alu-Keil) oder Mineralgehalt (Zahn) absorbiert und entsprechend auf dem Film abgebildet (A). Grafische Darstellung nach Film-Auswertung mittels Software (B). Das Absorptionsverhalten des Alu-Keils dient als Referenz für den Mineralverlust der Zahnhartsubstanz.

(mod. nach [De Josselin de Jong, 1986])

### 6.1.6 Nanohärtemessung

Für die Nanohärtemessung wurden die demineralisierten Proben in einer feuchten Kammer auf einem für das Messgerät passenden Metallhalter montiert (Abb. 4-4). Aufgrund des langwierigen Messprozesses über mehrere Stunden war dies unumgänglich, um die Proben vor der vorzeitigen Austrocknung zu schützen. Diese hätte zum einen die sensible Messmethode durch das Einfallen der zuvor durch Kalibrierung ermittelten Probenoberfläche stören können, zum anderen nicht den realen Bedingungen in der Mundhöhle entsprechen, da sich kariöses Dentin hier zu jeder Zeit im feuchten Milieu befindet. Da das Gerät bis zu vier Proben fassen konnte, musste die zuletzt zu messende

Probe bis zu ihrer Messung insgesamt teilweise einen Tag feucht gehalten werden, was erfolgreich gelang.

Trotz der Aufrechterhaltung des Feuchtigkeitsniveaus stellte das Absinken der erweichten Oberfläche während des langwierigen Messprozesses ein Problem dar. Dadurch kam es des Öfteren zu Fehlmessungen, da sich die reelle Lage der Oberfläche im Gegensatz zu jener, auf die das Gerät zuvor kalibriert wurde, im Prozess veränderte und so vom Prüfkörper nicht immer einwandfrei detektiert werden konnte. Entstanden aufgrund dessen zahlreiche Fehlmessungen innerhalb einer Probe, sodass eine repräsentative Auswertung nicht möglich war, wurde eine erneute Kalibrierung an anderer Stelle der Oberfläche durchgeführt und die Messung wiederholt. Dennoch bietet die Nanohärtemessung aufgrund geringerer Messabstände die höhere Auflösung der Messergebnisse gegenüber der Mikrohärtemessung und ist dieser vorzuziehen.

## **6.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **6.2.1 Natürliche Karies**

Der mittlere Mineralanstieg innerhalb der Läsionen verlief nahezu linear, was grundsätzlich auf eine niedrige Demineralisationsgeschwindigkeit schließen lässt, die vermutlich durch Diffusionsprozesse begrenzt wird [Gao et al., 1993]. Die großen interindividuellen Unterschiede lassen allerdings vermuten, dass die vorliegenden Läsionen unterschiedlich aktiv waren bzw. die Demineralisation unterschiedlich schnell voranschritt [Zheng et al., 2003]. Dieser lineare Mineralanstieg verdeutlicht, dass eine standardisierte Exkavation auf Basis einer taktilen Begutachtung kaum möglich ist. Selbst im Bereich des schon als „gesund“ identifizierten Dentins stieg die Nanohärte noch an, sodass kein klarer Schwellenwert zu definieren ist, ab dem der Vorgang abubrechen wäre (Abb. 5-3).

### **6.2.2 Ethylendiamintetraacetat (EDTA)**

EDTA gehört chemisch zur Gruppe der Chelatoren [Nikiforuk and Sreebny, 1953]. Chelatoren sind in der Lage, Komplexe mit Kationen, wie beispielsweise Calcium, zu bilden und diese sehr fest zu binden [Chenoweth, 1956]. Calcium bildet den Großteil des Minerals der Zahnhartsubstanz, sodass diese in EDTA-Lösung demineralisiert wird [Seidberg and Schilder, 1974; Zeeck et al., 2005].

Da es sich um einen sehr potenten Chelator handelt, entstanden innerhalb weniger Tage sehr tiefe Läsionen. Diese waren allerdings nahezu frei von Mineral, sodass sich erst am Boden der Läsion ein sehr steiler Mineralanstieg zeigt. Trotz der einfachen, wenig techniksensitiven Durchführung und des schnellen Ablaufs der Prozesse eignet sich diese Form der Demineralisation daher nur wenig zur Imitation einer Karies und gleicht eher einer Erosion.

### **6.2.3 Azetatbasierte Lösung und Carboxymethylcellulose-Gel**

Die Demineralisation in azetatbasierter Lösung und in Carboxymethylcellulose-Gel beruht auf der Konfrontation mit einem für das Hydroxylapatit kritischen pH-Wert [Dawes, 2003]. Ersterer Lösung ist zusätzlich Methylhydroxydiphosphonat als Puffer zugesetzt, der die Ionenkonzentration innerhalb der Lösung konstant hält [Buskes et al., 1985].

#### **6.2.3.1 Carboxymethylcellulose-Gel**

Die im Gel demineralisierten Proben zeigten einen höheren Mineralverlust und eine höhere Mineralverlustintensität als natürliche Karies, was zunächst einmal vergangenen Studien widerspricht [Moron et al., 2013], jedoch durch eine längere Lagerungsdauer und die Schwenkung der Proben in der vorliegenden Studie herbeigeführt worden sein könnte. Eine Oberflächenschicht, wie in anderen Studien beschrieben, trat ebenfalls nicht auf, was vermutlich auch durch die Schwenkung bedingt war. Die Methode ist gut praktikabel, einfach in ihrer Anwendung und erzeugt weniger stark demineralisierte Läsionen als EDTA, dennoch sind die Abweichungen zur natürlichen Residualkaries groß. Daher eignet sie sich nur bedingt

zur Induktion künstlicher Residualkaries, könnte aber eventuell zur Imitation einer stark demineralisierten Primärläsion Anwendung finden.

### **6.2.3.2 Azetatbasierte Lösung pH = 5,3**

Die Demineralisation mittels azetatbasierter Lösung zeigte sich als geeignete Methode, um Läsionen zu generieren, die ähnliche Eigenschaften wie natürliche Residualkaries aufweisen. Es gelang, Läsionen zu kreieren, die in Bezug auf Läsionstiefe, Mineralanstieg innerhalb der Läsion und Nanohärte mit der natürlichen Residualkaries weitestgehend übereinstimmen. Der Mineralverlust bzw. die Mineralverlustintensität fielen etwas höher aus. Eine weitere Annäherung über beispielsweise Variation des pH-Werts ist denkbar, wobei dann auch eine geringere Demineralisationsgeschwindigkeit zu erwarten wäre und sich die Frage der Praktikabilität stellt. Wie auch bei den anderen Methoden entfällt die subjektiv durchgeführte Exkavation, was zur Standardisierung der Läsionen beiträgt. Es sei dennoch darauf hingewiesen, dass sich der Vergleich mit der natürlichen Karies ausschließlich auf die mechanischen Eigenschaften begrenzt. Biologische und biochemische Parameter wie beispielsweise die Bakterienlast, die bei der restaurativen Versorgung einer Residualkaries durchaus eine Rolle spielen könnten, sind außer Acht gelassen und in diesem Modell nicht nachstellbar. Hierzu ist eine Kombination mit einem Bakterienmodell denkbar.

### **6.2.3.3 Bakterien-Modell**

Das Bakterien-Modell stellt wohl diejenige Demineralisationsmethode dar, die den realen kariogenen Mechanismen im Mund am nächsten steht. Es wurde ein Biofilm mit Bakterien der Gattung *Streptococcus mutans* erzeugt, der in regelmäßigen Zeitabständen mit einer Zuckerlösung beträufelt wurde, um eine wiederholte Nahrungszufuhr zu imitieren. *S. mutans* gilt als einer der Leitkeime der Karies [Tanzer et al., 2001]. Ein monokultureller Biofilm entspricht jedoch nicht der Realität, *in vivo* existieren mehrere hundert verschiedene Bakterienarten nebeneinander in einem komplex organisierten Biofilm und viele dieser Arten sind an der Bildung der Karies beteiligt [Beighton, 2005]. Es wäre denkbar, das Bakterienspektrum um weitere kariogene Bakterien zu ergänzen, um realistischere Bedingungen zu schaffen [Shu et al., 2000]. Arretierende Faktoren wie

Mundhygienemaßnahmen oder Fluoridzufuhr wurden nicht simuliert, um die Karies möglichst schnell voranschreiten zu lassen und die Bildung einer Oberflächenschicht gering zu halten. Es zeigten sich Läsionstiefen und Mineralverlustverhältnisse wie bei der natürlichen Karies, jedoch ein deutlich steilerer Mineralanstieg und eine ausgeprägte Oberflächenschicht. Es ist anzunehmen, dass die Bakterien eine Diffusionsbarriere bilden und sich Mineral in der Plaque anreichert, das wiederum Remineralisationsprozesse an der Oberfläche begünstigt [Hellwig et al., 2010].

Die Durchführung dieses Modells erwies sich im Vergleich zu den anderen Methoden als verhältnismäßig aufwendig. Nach Sterilisation der Arbeitsmaterialien wurde zu jeder Zeit unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Um das Risiko für eine Kontamination zusätzlich gering zu halten, wurde ein kurzer Versuchsverlauf von wenigen Wochen gewählt. Um es weiter zu minimieren und gegebenenfalls eine längere Versuchsdurchführung zu ermöglichen, ist die Versuchsdurchführung in einem gänzlich geschlossenen Kreislauf denkbar, in dem lediglich das Nährmedium bei Bedarf ausgetauscht wird. Hierfür bedarf es weiterer Modellaufbauten. Die Kariesinduktion durch ein Bakterienmodell birgt im Gegensatz zu den anderen o.g. Methoden als einzige den Vorteil, wie unter Bedingungen *in vivo*, infizierte Läsionen hervorzubringen. Diese erlauben beispielsweise nachfolgende Untersuchungen im Hinblick auf den Einfluss der mikrobiologischen Aktivität der verbliebenen Bakterien in der Kavität auf die Arretierung der Läsionen. Dies bleibt in den anderen Modellen unberücksichtigt.

### **6.2.4 Ausblick**

Die vorliegende Arbeit ist die erste, die die Nanohärteprofile von natürlichen und künstlichen Läsionen miteinander vergleicht. Der Vergleich zwischen Härte und Mineralgehalt ist wichtig, da beides nicht immer vollständig miteinander korreliert, was auch in dieser Studie durch einen Mineralanstieg im lichtmikroskopisch als „gesund“ identifizierten Dentin bestätigt wird (Abb. 5.3) [Balooch et al., 1998; Kinney et al., 2003]. Die Arbeit kann als Basis für weitere Versuche dienen, beispielsweise für die Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher belassener Kariestiefen auf die mechanischen Eigenschaften oder auf die Lebensdauer einer

hierauf platzierten adhäsiven Restauration. Ebenso sind Remineralisationsversuche möglich, bei denen die Läsionen für eine gewisse Zeit versiegelt und remineralisationsfördernden Substanzen wie Fluoriden ausgesetzt werden können. Da neben den rein mechanischen Eigenschaften die mikrobiologische Besiedelung und Aktivität ebenfalls von großer Bedeutung sind, sollten weitere Modifikationen des Versuchsaufbaus stattfinden. Denkbar wäre beispielsweise eine Demineralisation mittels azetatbasierter Lösung, gefolgt von der Lagerung im Bakterienmodell. So könnten die Lagerungsdauer und damit die Kontaminationswahrscheinlichkeit mit unerwünschten Mikroorganismen im Bakterienmodell reduziert werden, da die eigentliche Läsion bereits in der Demineralisationslösung entsteht, und später separat eine Infektion der Läsionen erfolgt. Auf diese Art kombiniert entstandene Läsionen mit enzymatischer Aktivität könnten die Grundlage für weitere Versuche bilden, die sich beispielsweise mit deren Einfluss auf den Adhäsivverbund einer Restauration auseinandersetzen. Diese ist für die Lebensdauer einer adhäsiven Restauration von nicht untergeordneter Bedeutung [Bourbia et al., 2013; Frassetto et al., 2016]. Grundsätzlich lässt sich der Versuchsaufbau auch für die Bildung einer Primär- oder Sekundärkaries nutzen; hierbei sollte auf die Schwenkung der Proben verzichtet werden, damit die natürlichen Diffusionsprozesse an der Oberfläche ablaufen können.



### 7. Schlussfolgerung

Die Demineralisation mittels azetatbasierter Lösung mit angepasstem pH-Wert (5,3) führte ähnliche Läsionen herbei wie die natürliche, selektiv exkavierte Residualkaries. Die Läsionen waren ähnlich tief und hatten ein vergleichbares Mineral- und Nanohärteprofil. Die außerdem getesteten Methoden EDTA und Carboxymethylcellulosegel eignen sich nicht oder nur bedingt zur Herstellung künstlicher Residualkaries, da vor allem der Mineralverlust deutlich höher ausfiel als bei der natürlichen Residualkaries. Das Bakterienmodell lieferte grundsätzlich vielversprechende Ergebnisse, war aber schwierig in der Durchführung und wenig standardisierbar. Hier wären weitere Modifikationen und Versuche wünschenswert.

Vor allem im Hinblick auf die mechanischen Eigenschaften einer Residualkaries oder einer dort platzierten Restauration lassen sich mit einer geeigneten Methode bereits viele Fragen unabhängig von etwaigen ethischen Konflikten oder der Patientencompliance *in vitro* klären. So können mechanische Parameter wie die Belastbarkeit oder die Randschlussqualität einer Restauration untersucht werden, ohne dass potenziell ein Individuum zu Schaden kommt. Weitere Modifikationen des Modellaufbaus und -ablaufs, vor allem die angesprochene Ergänzung um einen kürzeren Durchlauf im Bakterienmodell, könnten die entstehenden Läsionen noch realitätsnäher gestalten und den Einsatzbereich erweitern. Einige Fragestellungen, wie beispielsweise die pulpale Reaktion oder deren Einfluss auf die Remineralisation, sind mit solchen Modellen allerdings nicht zu untersuchen.

## 8. Literaturverzeichnis

- Almqvist H, Wefel JS, Lagerlof F: Root hard-tissue demineralization rate measured by <sup>125</sup>I absorptiometry: Comparison with lesion-depth measurements. *J Dent Res* 1990;69:1519-1521.
- Arends J, Christoffersen J: The nature of early caries lesions in enamel. *J Dent Res* 1986;65:2-11.
- Balooch M, Wu-Magidi IC, Balazs A, Lundkvist AS, Marshall SJ, Marshall GW, Siekhaus WJ, Kinney JH: Viscoelastic properties of demineralized human dentin measured in water with atomic force microscope (afm)-based indentation. *Journal of biomedical materials research* 1998;40:539-544.
- Barthel CR, Rosenkranz B, Leuenberg A, Roulet JF: Pulp capping of carious exposures: Treatment outcome after 5 and 10 years: A retrospective study. *Journal of endodontics* 2000;26:525-528.
- Baume LJ: *The biology of pulp and dentine*. Basel, S. Karger AG 1980.
- Baume LJ, Treccani A: [the biology of dental pulp and dentin: Recent findings in the biology of the pulp-dentinal organ (ii)]. *Rivista italiana di stomatologia* 1983;52:877-887.
- Beighton D: The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community dentistry and oral epidemiology* 2005;33:248-255.
- Bjorndal L, Mjor IA: Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 4: Dental caries--characteristics of lesions and pulpal reactions. *Quintessence international* 2001;32:717-736.
- Bjorndal L, Reit C, Bruun G, Markvart M, Kjaeldgaard M, Nasman P, Thordrup M, Dige I, Nyvad B, Fransson H, Lager A, Ericson D, Petersson K, Olsson J, Santimano EM, Wennstrom A, Winkel P, Gluud C: Treatment of deep caries lesions in adults: Randomized clinical trials comparing stepwise vs. Direct complete excavation, and direct pulp capping vs. Partial pulpotomy. *European journal of oral sciences* 2010;118:290-297.
- Bjorndal L, Thylstrup A: A structural analysis of approximal enamel caries lesions and subjacent dentin reactions. *European journal of oral sciences* 1995;103:25-31.
- Bjorndal L, Thylstrup A: A practice-based study on stepwise excavation of deep carious lesions in permanent teeth: A 1-year follow-up study. *Community dentistry and oral epidemiology* 1998;26:122-128.
- Bourbia M, Ma D, Cvitkovitch DG, Santerre JP, Finer Y: Cariogenic bacteria degrade dental resin composites and adhesives. *J Dent Res* 2013;92:989-994.

## 8. Literaturverzeichnis

---

- Bowman A, Young, S.: Graphical comparison of nonparametric curves. *J R StatSocSerC Appl Stat* 1996.
- Burt BA, Eklund SA: *Dentistry, dental practice and the community*, ed 6. St. Louis, Elsevier Saunders, 2005.
- Buskes JA, Christoffersen J, Arends J: Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions. A new technique with applications. *Caries research* 1985;19:490-496.
- Chenoweth MB: Chelation as a mechanism of pharmacological action. *Pharmacological reviews* 1956;8:57-87.
- Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ: Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *Journal of dentistry* 2010;38:687-697.
- Dawes C: What is the critical ph and why does a tooth dissolve in acid? *Journal* 2003;69:722-724.
- De Josselin de Jong E: *Comparison of methods in caries research*. Naturwiss Diss Gronningen 1986.
- Frassetto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH, Cadenaro M: Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability--a literature review. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2016;32:e41-53.
- Gao XJ, Elliott JC, Anderson P: Scanning microradiographic study of the kinetics of subsurface demineralization in tooth sections under constant-composition and small constant-volume conditions. *J Dent Res* 1993;72:923-930.
- Gustafsson BE, Quensel CE, Lanke LS, Lundqvist C, Grahnen H, Bonow BE, Krasse B: The vipeholm dental caries study; the effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta odontologica Scandinavica* 1954;11:232-264.
- Hellwig E, Klimek J, Attin T: *Einführung in die zahnerhaltung*, ed 5. Köln, Deutscher Zahnärzte Verlag, 2010.
- Hintze H, Wenzel A, Danielsen B, Nyvad B: Reliability of visual examination, fibre-optic transillumination, and bite-wing radiography, and reproducibility of direct visual examination following tooth separation for the identification of cavitated carious lesions in contacting approximal surfaces. *Caries research* 1998;32:204-209.
- Ismail AI, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sen A, Hasson H, Pitts NB: The international caries detection and assessment system (icdas): An integrated system for measuring dental caries. *Community dentistry and oral epidemiology* 2007;35:170-178.

## 8. Literaturverzeichnis

---

- James PM: Epidemiology of dental caries: The british scene. *British medical bulletin* 1975;31:146-148.
- Kawasaki K, Featherstone JD: Effects of collagenase on root demineralization. *J Dent Res* 1997;76:588-595.
- Kawasaki K, Ruben J, Tsuda H, Huysmans MC, Takagi O: Relationship between mineral distributions in dentine lesions and subsequent remineralization in vitro. *Caries research* 2000;34:395-403.
- Kinney JH, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW: The importance of intrafibrillar mineralization of collagen on the mechanical properties of dentin. *J Dent Res* 2003;82:957-961.
- König K, G.: *Karies und parodontopathien*. Stuttgart, Thieme Verlag, 1987.
- Kuttler Y: Classification of dentine into primary, secondary, and tertiary. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* 1959;12:996-999.
- Lager A, Thornqvist E, Ericson D: Cultivable bacteria in dentine after caries excavation using rose-bur or carisolv. *Caries research* 2003;37:206-211.
- Lee YL, Liu J, Clarkson BH, Lin CP, Godovikova V, Ritchie HH: Dentin-pulp complex responses to carious lesions. *Caries research* 2006;40:256-264.
- Leksell E, Ridell K, Cvek M, Mejare I: Pulp exposure after stepwise versus direct complete excavation of deep carious lesions in young posterior permanent teeth. *Endodontics & dental traumatology* 1996;12:192-196.
- Magalhaes AC, Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Buzalaf MA: Comparison of cross-sectional hardness and transverse microradiography of artificial carious enamel lesions induced by different demineralising solutions and gels. *Caries research* 2009;43:474-483.
- Maltz M, Alves LS, Jardim JJ, Moura Mdos S, de Oliveira EF: Incomplete caries removal in deep lesions: A 10-year prospective study. *American journal of dentistry* 2011;24:211-214.
- Maltz M, de Oliveira EF, Fontanella V, Bianchi R: A clinical, microbiologic, and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal. *Quintessence international* 2002;33:151-159.
- Maltz M, Henz SL, de Oliveira EF, Jardim JJ: Conventional caries removal and sealed caries in permanent teeth: A microbiological evaluation. *Journal of dentistry* 2012;40:776-782.
- Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabe E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, Murray CJ: Global burden of oral conditions in 1990-2010: A systematic analysis. *J Dent Res* 2013;92:592-597.

## 8. Literaturverzeichnis

---

- Margolis HC, Moreno EC: Kinetics of hydroxyapatite dissolution in acetic, lactic, and phosphoric acid solutions. *Calcified tissue international* 1992;50:137-143.
- Marquezan M, Correa FN, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling J, Guedes-Pinto AC, Mendes FM: Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. *Archives of oral biology* 2009;54:1111-1117.
- Marthaler TM: Changes in dental caries 1953-2003. *Caries research* 2004;38:173-181.
- Mejare I, Stenlund H, Zelezny-Holmlund C: Caries incidence and lesion progression from adolescence to young adulthood: A prospective 15-year cohort study in Sweden. *Caries research* 2004;38:130-141.
- Menaker L: *The biologic basis of dental caries*. Hagerstown, Harper & Row, 1980.
- Meyer-Lueckel H, Paris S, Ekstrand KR: *Karies*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG, 2012.
- Mjör IA, Fejerskov O: *Human oral embryology and histology*. Copenhagen, Munksgaard, 1986.
- Møller IJ, Poulsen S: A standardized system for diagnosing, recording and analyzing dental caries data. *Scandinavian journal of dental research* 1973;81:1-11.
- Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Yu H, Buzalaf MA, Magalhaes AC: Different protocols to produce artificial dentine carious lesions in vitro and in situ: Hardness and mineral content correlation. *Caries research* 2013;47:162-170.
- Nikiforuk G, Sreebny L: Demineralization of hard tissues by organic chelating agents at neutral pH. *J Dent Res* 1953;32:859-867.
- Ogaard B, Rolla G, Arends J: In vivo progress of enamel and root surface lesions under plaque as a function of time. *Caries research* 1988;22:302-305.
- Pashley DH: Clinical correlations of dentin structure and function. *The Journal of prosthetic dentistry* 1991;66:777-781.
- Pitts NB, Rimmer PA: An in vivo comparison of radiographic and directly assessed clinical caries status of posterior approximal surfaces in primary and permanent teeth. *Caries research* 1992;26:146-152.
- Reich E: Trends in caries and periodontal health epidemiology in Europe. *International dental journal* 2001;51:392-398.
- Ricketts D, Lamont T, Innes NP, Kidd E, Clarkson JE: Operative caries management in adults and children. *The Cochrane database of systematic reviews* 2013;3:CD003808.
- Schiffner U, Hoffmann T, Kerschbaum T, Micheelis W: Oral health in German children, adolescents, adults and senior citizens in 2005. *Community dental health* 2009;26:18-22.

## 8. Literaturverzeichnis

---

- Schroeder HE: Pathobiologie oraler Strukturen: Zähne, Pulpa, Parodont. Freiburg, Karger Verlag, 1991.
- Schwendicke F, Dorfer C, Kneist S, Meyer-Lueckel H, Paris S: Cariogenic effects of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in a dental biofilm model. *Caries Research* 2014a;48:186-192.
- Schwendicke F, Dorfer CE, Paris S: Incomplete caries removal: A systematic review and meta-analysis. *J Dent Res* 2013;92:306-314.
- 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 Research* 2015;49:259-265.
- Schwendicke F, Meyer-Lueckel H, Schulz M, Dorfer CE, Paris S: Radiopaque tagging masks caries lesions following incomplete excavation in vitro. *J Dent Res* 2014b;93:565-570.
- Seidberg BH, Schilder H: An evaluation of EDTA in endodontics. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology* 1974;37:609-620.
- Sheiham A: Changing trends in dental caries. *International Journal of Epidemiology* 1984;13:142-147.
- Shu M, Wong L, Miller JH, Sissons CH: Development of multi-species consortia biofilms of oral bacteria as an enamel and root caries model system. *Archives of Oral Biology* 2000;45:27-40.
- Silverstone LM, Hicks MJ: The structure and ultrastructure of the carious lesion in human dentin. *Gerodontology* 1985;1:185-193.
- Silverstone LM, Hicks MJ, Featherstone MJ: Dynamic factors affecting lesion initiation and progression in human dental enamel. Part I. The dynamic nature of enamel caries. *Quintessence International* 1988;19:683-711.
- Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H: Reactionary dentinogenesis. *The International Journal of Developmental Biology* 1995;39:273-280.
- Smith AJ, Tobias RS, Cassidy N, Plant CG, Browne RM, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H: Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components. *Archives of Oral Biology* 1994;39:13-22.
- Sognaes RF: Analysis of wartime reduction of dental caries in European children; with special regard to observations in Norway. *American Journal of Diseases of Children* 1948;75:792-821.
- Stephan RM, Miller BF: A quantitative method for evaluating physical and chemical agents which modify production of acids in bacterial plaques on human teeth. *Journal of Dental Research* 1943.

## 8. Literaturverzeichnis

---

- Takada K, Hirasawa M: A novel selective medium for isolation of streptococcus mutans. *Journal of microbiological methods* 2005;60:189-193.
- Takahashi N, Nyvad B: Ecological hypothesis of dentin and root caries. *Caries research* 2016;50:422-431.
- Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM: The microbiology of primary dental caries in humans. *Journal of dental education* 2001;65:1028-1037.
- Ten Cate A: *Oral histology: Development, structure and function*. Saint Louis, USA, Mosby, 1994.
- Uribe S: Partial caries removal in symptomless teeth reduces the risk of pulp exposure. *Evidence-based dentistry* 2006;7:94.
- WHO WHO: Who oral health country/area profile project (capp), country oral health profiles; in. Internet: <http://www.mah.se/CAPP/Country-Oral-Health-Profiles/EURO/>, World Health Organization (WHO) Collaborating Centre for Education, 2011.
- Zavgorodniy AV, Rohanizadeh R, Bulcock S, Swain MV: Ultrastructural observations and growth of occluding crystals in carious dentine. *Acta biomaterialia* 2008;4:1427-1439.
- Zeeck A, Grond S, Papastavrou I, Zeeck SC: *Chemie für mediziner*, Elsevier, Urban & Fischer, 2005.
- Zhang YR, Du W, Zhou XD, Yu HY: Review of research on the mechanical properties of the human tooth. *International journal of oral science* 2014;6:61-69.
- Zheng L, Hilton JF, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW: Dentin caries activity status related to hardness and elasticity. *European journal of oral sciences* 2003;111:243-252.

## 9. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Kerrin Nupnau geb. Eggers, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „In-vitro-Modell zur Herstellung künstlicher Residualkaries im Dentin“ 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/innen 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 Erstbetreuer/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](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

---

Datum

---

Unterschrift



## **Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Kerrin Nupnau geb. Eggers hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Schwendicke F, Eggers K, Meyer-Lueckel H, Dörfer 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.

Beitrag im Einzelnen:

- Mitentwicklung, Vorbereitung und Durchführung der Versuche
- Analyse der Proben und Erhebung der Daten mittels Lichtmikroskopie, transversaler Mikroradiographie und Nanohärtemessung
- Auswertung und Interpretation der Ergebnisse
- Mitwirkung an der Erstellung des Manuskripts
- Aus meiner Auswertung ist die Tab. 1 und die Fig. 1 entstanden

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **10. Lebenslauf**

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

### **11. Danksagung**

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Falk Schwendicke und Prof. Dr. Sebastian Paris für die Überlassung des interessanten Themas. Prof. Schwendicke danke ich insbesondere für die kompetente und freundliche Betreuung während der gesamten Bearbeitungszeit, die auch auf die Ferne einwandfrei und jederzeit prompt funktionierte.

Herrn Prof. Dr. Christof Dörfer als Leiter der Abteilung für Zahnerhaltung und Parodontologie des UKSH Kiel danke ich für die Bereitstellung der Gerätschaften und des Arbeitsumfelds für die Versuche. Bei Frau Regina Marquardt bedanke ich mich herzlich für die überaus freundliche Unterstützung bei der Vorbereitung der Versuche. Die nette Arbeitsatmosphäre im Labor wird mir in sonniger Erinnerung bleiben.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Stanislav Gorb als Leiter der Abteilung für funktionelle Morphologie und Biomechanik für die Zurverfügungstellung des Nanoindenters am Zoologischen Institut der Universität Kiel und Dr. Alexander Kovalev für die ausführliche und geduldige Einführung und Erklärung.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie; meinen Eltern Monika und Bernd Eggers, die mir meinen bisherigen Lebensweg bis hierhin ermöglicht und diese Arbeit mit Akribie gegengelesen haben, und meiner Schwester Ellen Eggers, die in jeder Lebenslage an mich glaubt. Meinem Ehemann Jan Nupnau danke ich für das Rückenfreihalten, die Unterstützung und die stetige Motivation auf den letzten Metern.