

4 Material und Methode

4.1 Aufbau des In-vitro-Kariesmodells

Das In-vitro-Kariesmodell bestand aus einem Reaktionsgefäß, in dem Zahnproben zur Züchtung eines bakteriellen Biofilms und zur Ausbildung kariesähnlicher Läsionen inkubiert wurden (Abbildung 4-1). Das Reaktionsgefäß wurde von einem Isolator (Modell 90; Metall und Plastik, Randolphzell, Deutschland) bakteriendicht von der Außenwelt isoliert. Während des Betriebes herrschten innerhalb des Isolators sterile bzw. kontrolliert kontaminierte Verhältnisse. Alle zur Versorgung des Biofilms auf den Zahnproben nötigen Flüssigkeiten und Gase passierten den Isolator durch ein speziell gefertigtes Interface, das in die Außenhaut des Isolators eingelassen war. Über zwei Schleusensysteme (Hauptschleuse Ø 43,5 cm; Nebenschleuse Ø 9 cm) war es möglich, Materialien während des laufenden Versuches kontrolliert ein- bzw. auszuschleusen.

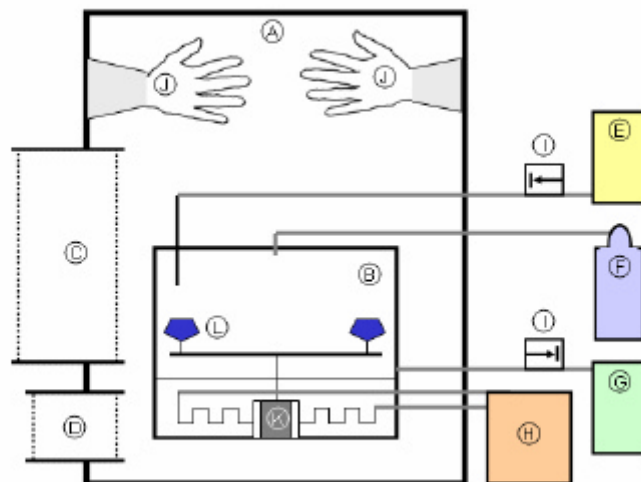


Abbildung 4-1

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: A = steriler Bereich innerhalb des Isolators; B = Reaktionsgefäß; C = Hauptschleuse für den initialen Transfer aller Materialien; D = Nebenschleuse für den Transfer kleinerer Gegenstände während des laufenden Versuches; E = flüssige Medien; F = synthetische Luft; G = Abfallcontainer; H = Wasserthermostat und Heizröhrensystem zur Temperierung des Reaktionsgefäßes; I = Schlauchpumpen; J = Handschuheingriffe für Arbeiten innerhalb des Isolators; K = Schrittmotor; L = auf Probenrad montierte Zahnproben passierende Tropfspitzen, die alle erforderlichen flüssigen Medien fördern (501).

Die initiale Bestückung und der grobe Aufbau erfolgten über die Hauptschleuse. Dazu wurden sämtliche im Innenraum benötigten Materialien in Sterilisationsfolien eingeschweißt und entsprechend der jeweiligen Materialbelastbarkeit sterilisiert. So vorbereitet wurden die Materialien im Isolator platziert, der Isolator wurde bakteriendicht verschlossen und der Innenraum durch ein 20-minütiges Einwirken einer 5%igen Peroxyessigsäure sterilisiert. Der endgültige Aufbau der Apparatur im Inneren des Isolators erfolgte mit Hilfe der Handschuheingriffe.

4.1.1 Reaktionsgefäß

Eine aus transparentem Polymethylmethacrylat (Plexiglas) gefertigte Box (L x H x B = 25 cm x 25 cm x 15 cm) bildete die Basis des Reaktionsgefäßes. Der Boden der Box wurde mit einem Epoxidharz (Wessex Resin and Adhesives Ltd, Romsey, UK) ausgegossen, um das wasserführende Heizsystem einzukleiden. Das Heizsystem bestand aus einem spiralförmig angeordneten Kupferrohr (\varnothing 1,0 cm), das über ein Umlaufsystem von einem temperierten Wasserbad (Haake B3, Karlsruhe, Deutschland) außerhalb des Isolators gespeist wurde. Die Zahnproben wurden am äußeren Rand eines Probenrades (Polyoxymethylen, \varnothing 20 cm) innerhalb des Reaktionsgefäßes platziert. Das Probenrad wurde von einem Schrittmotor angetrieben (RS 440-436; RS components, Mörfelden Walldorf, Deutschland). Der Motor befand sich in einem von unten zugänglichen Schacht am Boden der Box. Lediglich die Achse des Motors ragte in den Innenraum des Reaktionsgefäßes und war mit Hilfe eines Simmerings abgedichtet. Auf dem Probenrad fanden maximal 60 Proben Platz. Die Umdrehungsgeschwindigkeit konnte von einer Steuereinheit außerhalb des Isolators eingestellt werden. Auf dem Deckel der Box befanden sich zehn Halterungen aus Messing, in die Injektionskanülen mit *Luer*-Verschluss eingespannt werden konnten. Über diese Kanülen wurden die Zahnproben mit allen nötigen Flüssigkeiten versorgt. Mit Hilfe eines Thermometers, das durch eine Bohrung im Deckel der Box in das Reaktionsgefäß hineinragte und dessen Messspitze sich in unmittelbarer Nähe der rotierenden Zahnproben befand, konnte die Temperatur kontrolliert werden. Die Inkubations-temperatur betrug bei allen Experimenten 37°C. Zusätzlich befand sich zentral im Deckel ein Anschluss für die Zuleitung einer kontrollierten Gaszufuhr. An der tiefsten Stelle des Bodens des Reaktionsgefäßes war ein Abfluss installiert. Das gesamte Reaktionsgefäß inklusive des Motors wurde in eine Sterilisationstüte verpackt und mittels Formaldehyd sterilisiert.

4.1.2 Medien

Um ein bakterielles Wachstum und die Bildung eines Biofilms zu ermöglichen, wurden die Zahnproben über die Tropfspitzen mit Tryptikase-Soja-Bouillon (TSB; Becton Dickinson, Sparks, USA) versorgt, die nach Herstellerangaben zubereitet wurde. Eine Minerallösung wurde zugeführt, um den remineralisierenden Effekt von Speichel zu simulieren. Eine Saccharoselösung (10%ig) diente als Substrat für die Bakterien zur Produktion extrazellulärer Polysaccharide und Laktat.

Zur Herstellung der Minerallösung wurden einem Liter destillierten Wassers 0,33 g KH_2PO_4 , 0,34 g Na_2HPO_4 , 1,27 g KCl, 0,16 g NaSCN, 0,58 g NaCl, 0,17 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,16 g NH_4Cl , 0,2 g Harnstoff, 0,03 g Glukose, 0,002 g Vitamin C und 2,7 g Muzin (M-1778 Schweinemuzin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) zugesetzt und auf einen pH-Wert von 6,8 (512) eingestellt.

Alle Medien wurden durch Autoklavieren sterilisiert und in sterile Infusionsflaschen (1 l) abgefüllt. Jedes Medium wurde mit Hilfe einer eigenen Schlauchpumpe (Alitea, Modell XV, Watson Marlow Alitea, Stockholm, Schweden) in sterilen Infusionsschläuchen transportiert (Heidelberger Verlängerung 04097408, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Die Koordination der Pumpen erfolgte über eine Relaischaltung, die durch ein eigens entwickeltes Computer-Steuerprogramm geregelt wurde.

Die Abfallflüssigkeit wurde in einer 15 Liter fassenden Ballonflasche gesammelt und vor der Entsorgung sterilisiert. Zur Schaffung einer kontrollierten Gasatmosphäre wurde das Reaktionsgefäß mit einem Strom synthetischer Luft (19 Vol-% O_2 , 80 Vol-% N_2 , 5 Vol-% CO_2 ; Linde AG, Höllriegelskreuth, Deutschland) aus einer Druckgasflasche versorgt. Die Regulierung des Gasvolumens von 4 cm^3/min erfolgte über einen Durchflussmesser. Zur Sterilisierung wurde ein Filter mit *Luer*-Verbindern verwendet (Midisart, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland; Porengröße 0,3 μm).

4.2 Keime

Zur Bildung eines Biofilms wurde ein kariogener Stamm von *S. mutans* (DSM 20523; ATCC 25175) eingesetzt. Der Keim wurde in lyophilisierter Form von der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland) bezogen. Zur Vorbereitung des Inokulums wurde *S. mutans* zunächst auf Blut-Agar-

Platten vorkultiviert. Einzelne Kolonien wurden in 30 ml Tryptikase-Soja-Bouillon überführt und unter anaeroben Bedingungen bei 37°C inkubiert. Die so gewonnene Suspension wurde ohne weitere Aufbereitung zur Kontamination der Apparatur verwendet.

4.3 Testung karieshemmender Substanzen

Neben der Untersuchung verschiedenartig vorbehandelter Proben wurde das Modell auch zur Untersuchung potenziell karieshemmender Stoffe eingesetzt. Dazu wurden zusätzliche Tropfspitzen installiert und die Proben in zwei Reihen auf dem Probenteller angeordnet (Abbildung 4-2).

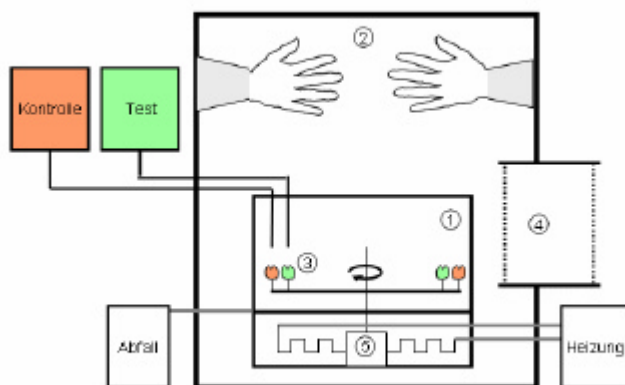


Abbildung 4-2

Zuleitung der Medien bei Testung potenziell karieshemmender Substanzen: 1 = Reaktionsgefäß; 2 = sterile Umgebung innerhalb des Isolators; 3 = zwei Reihen Zahnproben auf dem rotierenden Probenrad, die über Tropfspitzen mit allen nötigen Medien versorgt werden; 4 = Schleuse für den Transfer aller nötigen Materialien; 5 = Schrittmotor zum Antrieb des Probenrades.

4.4 Vorversuche

Die Grundlagen der beschriebenen Apparatur wurden im Rahmen umfangreicher Vorversuche erarbeitet (335). Diese umfassten die Evaluation sämtlicher physikalischer Parameter, der Sterilisationsverfahren, der Versuchsdauer, der Handhabung der verwendeten Materialien, der Entwicklung einzelner Komponenten wie Schleusen und Steuerungen, der Erhöhung der Probenzahl sowie die Grundlagen der Kariesauswertung.

4.5 Erzeugung kariöser Läsionen

Zur Erzeugung kariesähnlicher Schmelzläsionen wurden die Proben mit den im Kapitel 4.1.2 spezifizierten Medien in der in Abbildung 4-3 dargestellten zeitlichen Abfolge versorgt. Wenn nötig, wurden leere Medienbehälter gegen volle und mit ihnen die zuführenden Schläuche ersetzt. Die Rotationsgeschwindigkeit des Probenrades wurde auf ca. 24°/s eingestellt und die Fördermenge der Schlauchpumpen auf 0,4 ml/min justiert. Die Inkubationstemperatur betrug 37°C. Die Infektion mit *S. mutans* erfolgte durch die Applikation von 30 ml einer Keimsuspension (siehe Kapitel 4.2) durch eine zusätzliche Tropfspitze. Die Fördermenge betrug wie bei den anderen Medien 0,4 ml/min, so dass jede Probe mit ca. 1 ml Keimsuspension kontaminiert wurde. Die Kontamination erfolgte zweimal im Abstand von einer Woche.

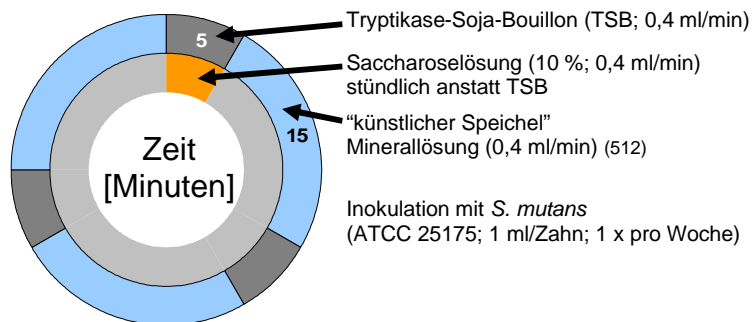


Abbildung 4-3

Zeitlicher Ablauf der Versorgung der Zahnproben zur Ausbildung eines Biofilms und kariesähnlicher Läsionen über einen Zeitraum von 14 Tagen.

Zur Durchführung vergleichender morphologischer Untersuchungen wurden an verschiedenen Probenkörpern durch Inkubation in der künstlichen Mundhöhle experimentelle kariesähnliche Schmelzläsionen erzeugt. Dazu wurden die Labialflächen humaner Inzisivi und die Bukkalflächen humaner Prämolaren mit Hilfe eines säureresistenten Lackes (Dyract-Lack, Dentsply DeTrey, Konstanz, Deutschland) so versiegelt, dass ein unversiegeltes Fenster mit ca. 3 mm Durchmesser entstand. Zur morphologischen Beschreibung artifizierlicher Sekundärkariesläsionen wurden auf den Labialflächen von Prämolaren mit Hilfe eines Präparierdiamanten (Gebr. Brasseler GmbH, Lemgo, Deutschland) und eines Schnellläufers etwa 2 mm breite und 1,5 mm tiefe, leicht ovale Kavitäten präpariert. Diese wurden mit Glasionomermzement gefüllt und mit Hilfe von SoFlex-Scheiben grober, mittlerer und feiner Körnung (3M Espe, Seefeld, Deutschland) geglättet. Eine Kavitätenseite wurde vor dem Legen der Füllung zur Produktion eines definierten Randspaltes mit einer 0,1 mm starken Zinnfolie versehen, die später vorsichtig entfernt wurde.

4.6 Darstellung des Biofilms mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie

Um Zahnproben inklusive des auf ihnen haftenden Biofilms elektronenmikroskopisch untersuchen zu können, mussten Schnitte mit Schichtstärken von 60 bis 90 nm angefertigt werden. Diese extrem dünnen Schnitte wurden durch das Einbetten der Zahnprobe in das Epoxidharz Epon (Serva, Heidelberg, Deutschland) möglich. Die einzelnen Schritte von der Vorbereitung bis zur Einbettung mit Epon werden im Folgenden beschrieben:

4.6.1 Fixierung

Zur Fixierung wurden die Zahnproben unmittelbar nach dem Ausschleusen über Nacht im Kühlschrank in *Karnosky*-Lösung aufbewahrt.

Die nach *Morris J. Karnovsky* benannte Lösung wurde wie folgt hergestellt: 2 g Paraformaldehydpulver wurden in 25 ml H₂O unter Rühren und Erwärmen gelöst. Anschließend wurden ein bis drei Tropfen 1 n NaOH zugefügt, bis die Lösung klar wurde. Nach dem Abkühlen wurden 5 ml 50%iges Glutaraldehyd hinzugefügt und das Volumen auf 50,0 ml mit Flagellatennährlösung (pH 7,4 bis 7,6) aufgefüllt.

4.6.2 Osmiumbehandlung

Osmium (OsO₄) dient zur Fixierung von Zellmembranen und hebt deren osmotische Wirkung auf. Zur Herstellung der Lösung wurde eine Glasampulle mit 0,1 g OsO₄ zusammen mit 6,6 ml Cacodylatpuffer + 1,65 % K₂Cr₂O₇ (pH 7,2) in einem Glaskolben vermischt. Das Osmium löste sich sehr schwer auf, daher erfolgte das Lösen über Nacht im Kühlraum auf einem Magnetrührer. Der Kolben wurde mit Parafilm gut verschlossen.

Durch die Fixierung der Probe in *Karnowsky*-Lösung reicherte sich diese mit Glutaraldehyd an. Um überschüssiges Glutaraldehyd zu entfernen, wurde die fixierte Probe auf Schalen zweimal mit je 2 ml Cacodylatpuffer gewaschen. Bei Raumtemperatur wurde die Probe nun eine Stunde mit 2 ml einer 1,5%igen Osmiumlösung in 1,65 % K₂Cr₂O₇ (pH 7,2) behandelt. Der Überstand wurde abgesaugt und gesammelt. Anschließend wurde die Probe erneut zweimal mit je 2 ml Cacodylatpuffer gewaschen.

4.6.3 Uranylazetatbehandlung

Uranylazetat kontrastiert die Nukleinsäuren, besonders die Phosphatgruppen. Zur Herstellung der Lösung wurden 100 mg Uranylazetat in 10 ml Wasser gelöst. In 2 ml

dieser Lösung blieb die Probe eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen. Danach wurde der Überstand abgesaugt.

4.6.4 Entwässerungsreihe

Weil die Einbettmasse Epon nicht wasserlöslich ist, musste der einzubettenden Probe das Wasser entzogen werden. Die folgende Behandlung (Entwässerungsreihe) überführte die Probe vom hydrophilen in den hydrophoben Zustand:

70 % Ethanol (20 min), 90 % Ethanol (20 min), 96 % Ethanol (20 min), 100 % Ethanol (20 min), 100 % Ethanol + Azeton 1:1 gemischt (20 min), 100 % Azeton (20 min)

4.6.5 Epon einbettung

Das für die Einbettung notwendige Epongemisch musste vor der Einbettung erst hergestellt werden. Zunächst wurden 23 ml Epon 812 und 37 ml Dodecylbernsteinsäureanhydrid (DDSA) sowie 74 ml Epon 812 mit 66 ml Methylnadicanhydrid (MNA) jeweils in einem Kolben mit einem Magnetrührer gemischt, bis die Lösungen eine hellgelbe Färbung zeigten. Daraufhin wurden beide Flüssigkeiten miteinander vermischt. Von dieser Ausgangslösung wurden mit Azeton die verschiedenen Eponverdünnungen angesetzt.

| | | |
|---------------------------------|---------|--------------------------|
| 75 Teile Azeton + 25 Teile Epon | mischen | 2 h ruhen lassen, daraus |
| 50 Teile Azeton + 50 Teile Epon | mischen | 2 h ruhen lassen, daraus |
| 25 Teile Azeton + 75 Teile Epon | mischen | über Nacht ruhen lassen |
| 100 % Epon | | 24 h ruhen lassen. |

Nach der angegebenen Zeit wurde das Epongemisch mit Härter versetzt. Je 98,3 ml Eponmischung wurden mit je 1,7 ml Härter DPM 30 gut vermischt. Vor der Anwendung musste das Epon-Härter-Gemisch im Exsikkator entgast werden, bis keine Gasblasenbildung mehr zu erkennen war. Daraufhin wurde die zu fixierende Probe in das Epon-Härter-Gemisch eingegossen. Zum Aushärten kamen die Schalen zunächst bei 45°C für 24 Stunden in den Wärmeschrank. Danach wurde die Temperatur auf 60°C erhöht und das Epon weitere 24 Stunden ausgehärtet.

4.6.6 Transmissionselektronenmikroskopie

Die in Epon eingebetteten Proben wurden im *Reichert-Ultra*-Mikrotom mit Diamantmesser auf eine Dicke von 60 bis 90 nm geschnitten und anschließend zur Nachkontrastierung zehn Minuten mit Bleizitrat behandelt.

Im Elektronenmikroskop Philips 400 (Fa. Philips, Eindhoven, Niederlande) wurde die Transmissionsmikroskopie bei einer Spannung von 80 kV durchgeführt. Die mikroskopischen Aufnahmen des Biofilms erfolgten bei 10.000- bis 100.000facher Vergrößerung.

4.7 Messung der Demineralisationstiefe

Die Quantifizierung der Ausdehnung der kariesähnlichen Läsionen erfolgte mit Hilfe der Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) (139, 501). Dazu wurden die Zahnproben in Polymethylmethacrylat (PMMA; PalaXpress, clear; Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland) eingebettet. Nach vollständiger Aushärtung bei Raumtemperatur wurden mit Hilfe einer Innenlochsäge (Zeitz 1600; Ernst Zeitz, Wetzlar, Deutschland) transversale Serienschnitte von 500 µm Stärke angefertigt und mit Hilfe von Sandpapier (Körnung 4000) poliert. Basierend auf der von *Fontana et al.* (139) beschriebenen Methode wurden die Schnitte in einem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert (Zeiss LSM 510; Carl Zeiss, Jena, Deutschland), allerdings ohne die Schnitte anzufärben (501, 503). Die Anregung erfolgte mit Hilfe eines Argonlasers (Wellenlänge 488 nm) bei einer relativen Intensität von 45 %. Es wurde ein 2,5x Fluar-Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0,12 verwendet. Der Strahlengang wurde wie folgt konfiguriert: Kanal 1, Langpass (LP 650), 386 µm pinhole; Kanal 2, Bandpass (BP 505 bis 530), 386 µm pinhole; Kanal 3, Bandpass (BP 560 bis 615), 374 µm pinhole. HFT 488 wurde als main dichroic beam splitter (HFT) und NFT 545 als secondary dichroic beam splitter (NFT) konfiguriert.

Mit Hilfe der Software "Zeiss LSM 510 image browser" (Carl Zeiss, Jena, Deutschland), wurden pro Probe bis zu drei Parameter bestimmt: 1. die Tiefe der Läsion von der Oberfläche der Zahnprobe (Primärkaries); zur Berechnung der mittleren Läsionstiefe erfolgten zehn Einzelmessungen im Abstand von 200 µm; 2. die maximale Tiefe der Wandläsion (Sekundärkaries), beginnend am Rand der Füllung oder Versiegelung, und 3. die Fläche der Demineralisation unterhalb der Restauration. In der Abbildung 4-4

sind die drei Parameter am Beispiel einer kariesähnlichen Läsion am Rand einer Fissurenversiegelung dargestellt (Abbildung 4-4). Um während der Messung keinen Rückschluss auf die Gruppenzugehörigkeit zu ermöglichen, wurden sämtliche Zahnproben fortlaufend nummeriert und zufällig auf die Gruppen verteilt (Untersucherblind).

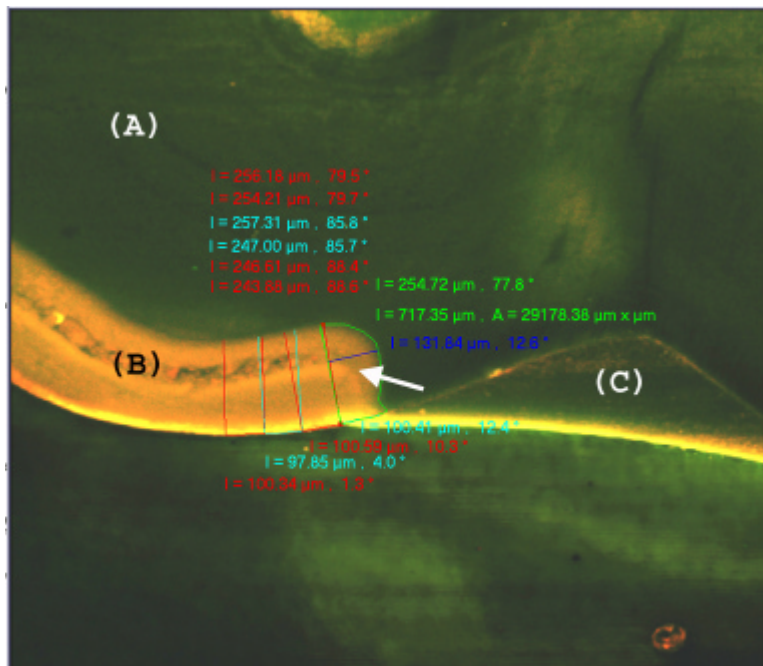


Abbildung 4-4

CLSM-Aufnahme: Schnitt eines Prämolaren mit Fissurenversiegelung (C). A = Zahnschmelz, B = kariesähnliche Läsion (charakterisiert durch Messung der mittleren Tiefenausdehnung, Primärläsion). Anteil der Läsion unterhalb der Versiegelung (Pfeil; charakterisiert durch maximale Tiefe und Fläche unterhalb der Restauration; Sekundärkaries) (503).

4.8 Mikrobiologische Untersuchungen

Zur Überprüfung der kontrollierten Kontamination wurden mikrobiologische Untersuchungen an Proben aus dem Inneren des Reaktionsgefäßes und aus dem Abfallbehälter vorgenommen. Dazu wurden die Proben auf Columbia-Blut-Agar (Sifin GmbH, Berlin, Germany) und Mitis-Salivarius-Bacitracin-Agar (20 % Saccharose and 200 IU/l Bacitracin, BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) ausplattiert. Nach Inkubation für drei Tage bei 37°C unter anaeroben Verhältnissen wurde visuell beurteilt, ob ein homogenes Erscheinungsbild der Kolonien vorlag.

4.9 Anwendungen

4.9.1 Fissurenversiegelungen (Pilotstudie)

4.9.1.1 Probenvorbereitung

Die Untersuchung erfolgte an 25 kariesfreien oberen Prämolaren, die aus kieferorthopädischen Gründen extrahiert worden waren. Die Lagerung der Zähne erfolgte in 20%igem Ethanol. Die Zahnwurzeln und die Pulpa wurden mit Hilfe eines Diamantschleifers entfernt. Als Probenhalterung diente ein Stift aus rostfreiem Stahl, der in die Pulpakammer eingebracht und mit Hilfe von Komposit fixiert wurde. Der Durchmesser des Stiftes (1,5 mm) entsprach dem Durchmesser der Bohrungen auf dem Probenrad. Mit Hilfe einer Positionierungshilfe war es möglich, die Stifte so zu fixieren, dass sich die Proben innerhalb des Reaktionsgefäßes des In-vitro-Kariesmodells später zentral unter den Tropfspitzen hindurchbewegen und alle den gleichen Abstand zu den Spitzen besaßen (Abbildung 4-5).

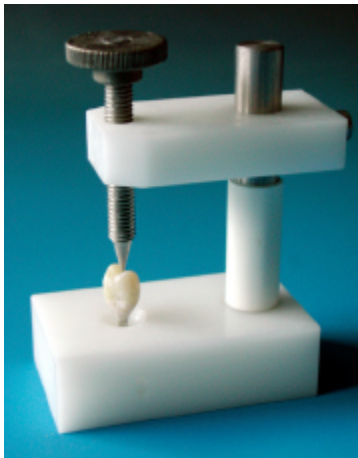


Abbildung 4-5

Positionierungshilfe (Herstellung: Medizinisch-Technische Labore der Charité) zur Fixierung der Probenhalterungsstifte.

Der mesiale Anteil der Fissur wurde mit Hilfe eines konventionellen Fissurenversieglers entsprechend den Herstellerangaben versiegelt (Testgruppe 1, Delton, Dentsply DeTrey, Konstanz, Deutschland). Eine Ätzung des Fissurensystems erfolgte mit 37%iger Phosphorsäure für 60 Sekunden. Nach Reinigung mit Wasserspray und Trocknung im Luftstrom wurde das Versieglermaterial mit Hilfe des vom Hersteller mitgelieferten Applikators in die Fissur appliziert und anschließend für 60 Sekunden polymerisiert. Um die Entstehung von Undichtigkeiten der Versiegelung realitätsnah zu simulieren,

wurde der distale Anteil der Fissur nach der Säurevorbehandlung (vor der Versieglerapplikation) leicht mit menschlichem Speichel benetzt (Testgruppe 2) (Abbildung 4-6). Nach Thermocycling (2000 Zyklen, 5 bis 55°C, 30 s Tauchzeit) wurden die Proben in Leitungswasser (0,1 mg/l Fluorid) gelagert.

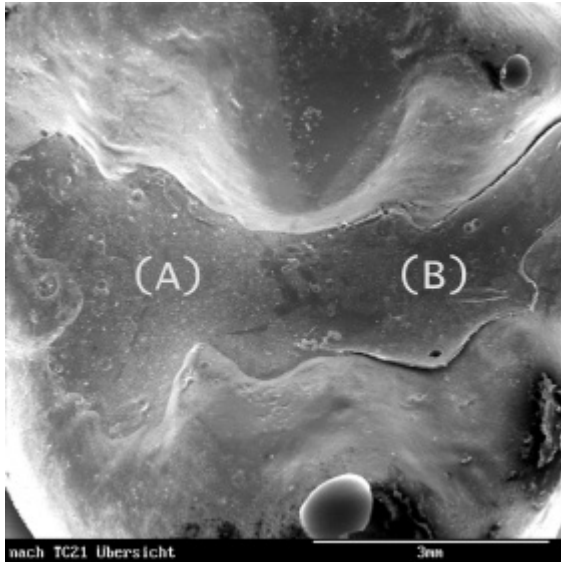


Abbildung 4-6

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines oberen Prämolaren nach Thermocycling: Der mesiale Anteil der Fissur wurde regulär versiegelt (A, Testgruppe 1), der distale Anteil wurde nach dem Ätzen leicht mit Speichel befeuchtet (B, Testgruppe 2). Im Bereich (B) ist eine deutliche Randspaltbildung zu erkennen.

Vor der Inkubation in der künstlichen Mundhöhle wurden die Proben mit Hilfe von Ethylendioxid sterilisiert. Um ein Austrocknen der Zähne zu vermeiden, wurden sie in einer mit feuchtem Schaumstoff beschickten Tupperware-Dose gelagert. Die Dose wiederum wurde mit geöffnetem Deckel in Sterilisationsfolie eingeschweißt. Nach erfolgter Sterilisation konnte der Deckel innerhalb der Folie geschlossen werden und so vorbereitet in den Isolator eingeschleust werden.

4.9.1.2 Versuchsverlauf

Zur Karieserzeugung kam der im Kapitel 4.1 beschriebene Aufbau des In-vitro-Modells zur Anwendung.

Fünf Zähne dienten als Kontrolle und wurden nach Aufbau der gesamten Apparatur ohne Infektion mit *S. mutans* für eine Woche allen im Kapitel 4.4 beschriebenen Medien ausgesetzt. Die Zähne wurden aus dem Reaktionsgefäß entfernt, in ein steriles Falcon-Röhrchen verbracht und durch die kleine Schleuse des Isolators ausgeschleust. Die verbleibenden 20 Zähne wurden dem im Kapitel 4.4 beschriebenen Protokoll ausgesetzt und für 14 Tage inkubiert. Nach Beendigung des Versuches wurden der

Biofilm mit Hilfe einer weichen Zahnbürste und Mullgaze vorsichtig entfernt und die Zähne in physiologischer Kochsalzlösung bis zur Anfertigung der Serienschnitte (siehe Kapitel 4.7) gelagert. Die gesamte Apparatur wurde daraufhin sterilisiert.

Zur Kontrolle der Gnotobiose wurden einmal pro Woche Proben aus dem Inneren des Reaktionsgefäßes und aus der Abfallflüssigkeit entnommen und mikrobiologisch, wie in Kapitel 4.8 beschrieben, untersucht.

4.9.2 Fissurenversiegelung mit selbstätzendem Adhäsivsystem

4.9.2.1 Probenvorbereitung

Als Probenkörper dienten 40 kariesfreie Prämolaren des Oberkiefers, die aus kieferorthopädischen Gründen extrahiert worden waren. Die Zähne wurden mit Hilfe einer fluoridfreien Prophylaxepaste und einem rotierenden Bürstchen gereinigt. Daraufhin wurden die Zahnwurzeln entfernt und ein rostfreier Stahlstift als Probenhalterung analog dem im Kapitel 4.9.1 beschriebenen Vorgehen in das Pulpakavum eingebracht. Die Zahnproben wurden zufällig auf zwei Gruppen verteilt. Die Zähne der Gruppe A wurden mit einem konventionellen Fissurenversiegler (Delton, Dentsply DeTrey, Konstanz, Deutschland) unter Anwendung der Säureätztechnik versiegelt. Bei den Zähnen der Gruppe B erfolgte eine experimentelle Versiegelung des Fissurensystems mit Hilfe eines selbstätzenden Adhäsivsystems (Xeno III, Dentsply DeTrey, Konstanz, Deutschland). Die Details der Inhaltsstoffe und der Verfahrensweise sind in der Tabelle 4-1 dargestellt.

Tabelle 4-1

Zusammensetzung und Verarbeitung der verwendeten Materialien

| | Zusammensetzung | Verarbeitung |
|-----------------|--|---|
| Delton | Konventioneller Fissurenversiegler - aromatische und aliphatische Di-Methacrylate - Ethyl-p-Dimethyl-Aminobenzoat - Fotokatalysatoren - SiO ₂ - TiO ₂ | - Ätzung mit 37%iger Phosphorsäure für 60 s - Spülung mit Wasser für 30 s - Trocknung im Luftstrom - Applikation mit Hilfe des mitgelieferten Applikators - Polymerisation für 40 s |
| Xeno III | Selbstätzendes Ein-Schritt-Adhäsiv Flüssigkeit A - 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) - Aqua dest. - Ethanol - Butyl-Hydroxyltoluen (BHT) - SiO ₂ Flüssigkeit B - phosphorsäuremodifiziertes Methacrylat (Pyro-EMA) - Monofluor-Phosphazene-modifiziertes Methacrylat (PEM-F) - Urethan-Dimethacrylat - Butyl-Hydroxyltoluen (BHT) - Camphorquinon - Ethyl-4-Dimethylaminobenzoat | - Mischung gleicher Mengen von Flüssigkeit A und B mit Hilfe eines mitgelieferten Applikators für 5 s - Applikation mit Hilfe des mitgelieferten Applikators - Trocknung mit Hilfe eines sanften Luftstromes, um eine Evaporation des Lösungsmittels zu erreichen (40 s) - Polymerisation für 40 s |

Um die versehentliche Kontamination mit Speichel während der Fissurenversiegelung realitätsnah zu simulieren, wurde der distale Anteil der Fissur in beiden Gruppen unmittelbar vor der Applikation des Versiegelungsmaterials leicht mit Speichel befeuchtet. Nach Thermocycling (2000 Zyklen, 5 bis 55°C, 30 s Tauchzeit) wurden die Proben in Leitungswasser gelagert, entsprechend dem Vorgehen in Kapitel 4.9.1 sterilisiert und zur Aufnahme in die künstliche Mundhöhle vorbereitet.

4.9.2.2 Versuchsverlauf

Zur Karieserzeugung kam der im Kapitel 4.1 beschriebene Aufbau des In-vitro-Modells zur Anwendung. Die Zahnproben wurden dem im Kapitel 4.5 beschriebenen Protokoll ausgesetzt und für 14 Tage inkubiert. Nach Beendigung des Versuches wurde der Biofilm mit Hilfe einer weichen Zahnbürste und Mullgaze vorsichtig entfernt und die Zähne in physiologischer Kochsalzlösung bis zur Anfertigung der Serienschnitte (siehe Kapitel 4.7) gelagert. Die gesamte Apparatur wurde daraufhin sterilisiert.

Zur Kontrolle der Gnotobiose wurden einmal pro Woche Proben aus dem Inneren des Reaktionsgefäßes und aus der Abfallflüssigkeit entnommen und – wie in Kapitel 4.8 beschrieben – mikrobiologisch untersucht.

4.9.3 Approximale Versiegelungen

4.9.3.1 Probenvorbereitung für thermomechanische Belastung

Als Probenkörper dienten 30 bezüglich ihrer Größe vergleichbare humane erste Molaren ohne visuell erkennbare Schmelzunregelmäßigkeiten und Entwicklungsdefekte. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 5°C in einer 0,1%igen Thymollösung. Die Zahnwurzeln wurden etwa einen Millimeter unterhalb der Schmelz-Zement-Grenze entfernt und mit Hilfe eines Cyanacrylatklebers (Superglue, Renford Sekundenkleber Nr. 1733, Dentex AG, Zürich, Schweiz) auf Probenhalterungen für das Rasterelektronenmikroskop (Baltec AG, Balzers, Liechtenstein) fixiert und zur Simulation des Gingivaverlaufes in chemisch härtendes Polymethylmethacrylat (PMMA) eingebettet (PalaDur, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland).

Nach dem Einbetten wurden die Zähne mit Hilfe einer Zahnbürste (ParoM39, ESRO, Thalwil, Schweiz) und einer Zahnpastaaufschwemmung (6 g Depurdent, Wild SA, Basel, Schweiz; 10 g künstlicher Speichel; 8 Tropfen silicone antifoam, Fluka, Art. Nr. 85390, Schweiz) mit einer standardisierten Kraft von 2,5 N für 25 Minuten gereinigt. Wie in der Abbildung 4-7 dargestellt, wurde eine Approximalfläche der Zahnproben in drei Felder unterteilt und entsprechend der in Tabelle 4-2 angegebenen Beschreibung behandelt.

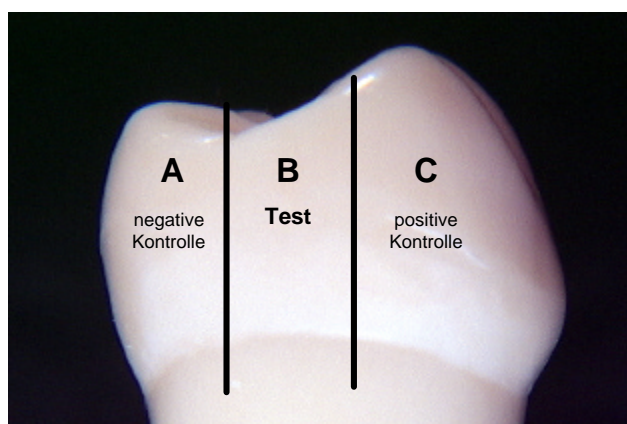


Abbildung 4-7

Einteilung und Behandlung der Approximalfläche der Proben.

Tabelle 4-2

Einteilung und Behandlung der Approximalfläche der Proben

| | |
|----------------|--|
| Feld A: | negative Kontrolle; blieb unbehandelt |
| Feld B: | Testfeld; wurde mit einer der folgenden Maßnahmen behandelt: <ul style="list-style-type: none"> I. zwei Schichten eines ungefüllten Adhäsivs (Heliobond, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein) II. Adhäsive Folie, befestigt mit einem ungefüllten Adhäsiv (Heliobond, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein) III. Adhäsive Folie, befestigt mit einem fließfähigen Komposit (Tetric flow, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein) |
| Feld C: | positive Kontrolle; Versiegelung mit einem fließfähigen Komposit (Tetric flow, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein) |

Während der Behandlung wurden die übrigen Bereiche der Approximalfläche mit Hilfe eines Rubber-Zementes geschützt (Sanford Corp. Bellwood, ILL, USA). Die Proben wurden mit Hilfe einer 37%igen Phosphorsäure (Ultraetch, Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, USA) geätzt, mit Wasser abgespült, im Luftstrom getrocknet, mit Azeton behandelt und erneut im Luftstrom getrocknet. Anschließend wurde der Versiegler appliziert, eine Penetrationszeit von 20 s eingehalten, und danach für 60 Sekunden polymerisiert (Optilux 500, 700 mW/cm², Demetron Inc., Danbury, CT, USA). Die Probenfelder der Gruppe B-I erhielten einen zweiten Versiegleranstrich mit anschließender Polymerisation. Auf die Felder der Gruppe B-II wurde die adhäsive Folie mit Hilfe eines Versieglers adaptiert und ebenfalls für 60 Sekunden polymerisiert. Auf die Felder der Gruppe B-III wurde die Folie mit Hilfe des fließfähigen Komposits Tetric flow adaptiert und für 60 Sekunden polymerisiert. Die Felder der Gruppe C dienten als positive Kontrollen; sie wurden mit einer dünnen Schicht des fließfähigen Komposits Tetric flow versiegelt und für 60 Sekunden polymerisiert. Alle Arbeiten erfolgten unter Zuhilfenahme einer Lupenbrille mit 2,5facher Vergrößerung. Nach Abschluss der Versiegelungen wurde der Rubber-Zement entfernt, und die Proben wurden in einen computergesteuerten Kausimulator überführt (Abbildung 4-8; CoCoM 2, PPK, Zürich, Schweiz), um eine Gebrauchsperiode im approximalen Kontakt

zu einem Nachbarzahn zu simulieren. Als approximaler Antagonist diente ein weiterer Molar, der wie die Testzähne auf einem Probenhalter fixiert wurde. Dazu erfolgte eine okklusale Belastung mit Hilfe einer Kalotte, die die im approximalen Kontakt befindlichen Zähne gegeneinander bewegte. Diese Belastung erfolgte mit einer Kraft von 49 N und einer Frequenz von 1,7 Hz. Zusammen mit einer Temperaturwechselbelastung zwischen 5°C und 50°C (120.000 Zyklen) entspricht dies einem Zeitäquivalent unter natürlichen Bedingungen von ca. fünf Jahren. Eine detaillierte Beschreibung der Apparatur findet sich bei *Schmidlin et al.* (496).

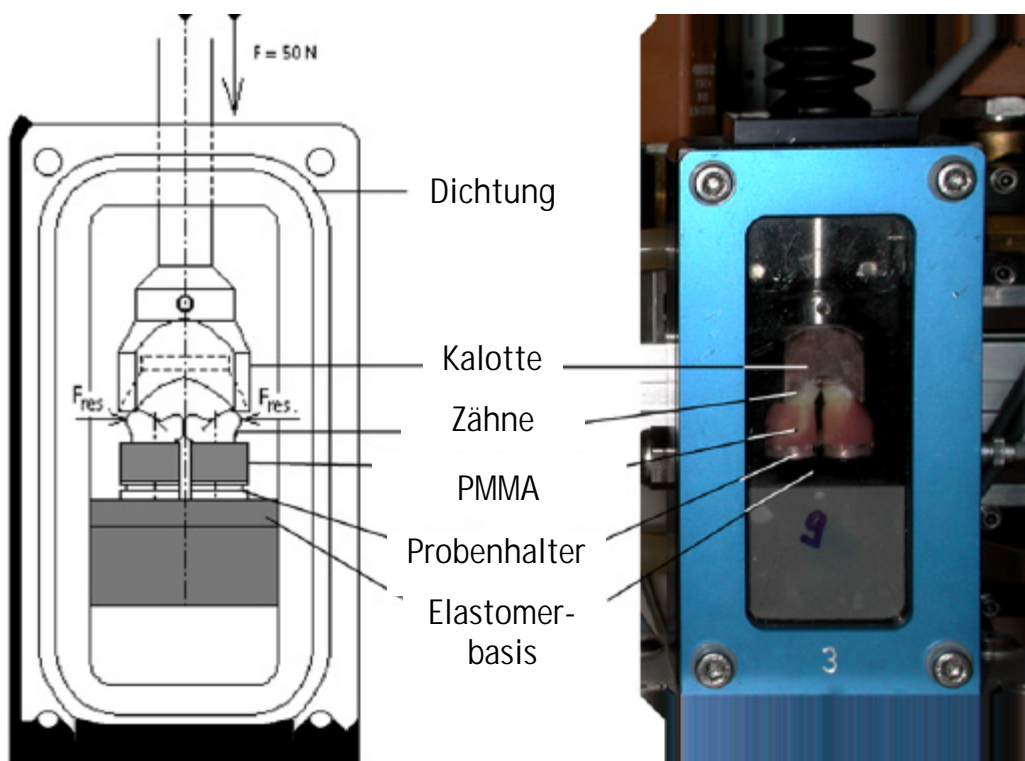


Abbildung 4-8

Kammer des Kausimulators.

Nach Abschluss der thermomechanischen Belastung wurden die Proben zur Aufnahme in die künstliche Mundhöhle vorbereitet. Die Probenhalter für das Rastermikroskop wurden entfernt und an der unbehandelten Approximalfläche ein Stift aus rostfreiem Stahl mit Komposit befestigt, so dass die behandelte Approximalfläche im künstlichen Mund nach oben wies. Dazu wurde die bereits in Abbildung 4-5 dargestellte Positionierhilfe verwendet. Die Sterilisation und Lagerung der Proben erfolgte wie im Kapitel 4.9.1 beschrieben.

4.9.3.2 Karieserzeugung

Die Erzeugung des kariogenen Milieus erfolgte mit Hilfe des Aufbaus des In-vitro-Kariesmodells, wie im Kapitel 4.1 beschrieben. Die Bestimmung der mittleren Demineralisationstiefe erfolgte an Serienschritten von 500 µm Dicke parallel zur Okklusalfäche. Die Zähne wurden dazu in PMMA (Technovit, Heraeus Kulzer, Hanau) eingebettet (Abbildung 4-9).



Abbildung 4-9

Serienschnitte parallel zur Okklusalfäche eines in Kunststoff eingebetteten Zahnes.

An den einzelnen Schnitten konnte so – entsprechend der Beschreibung aus Kapitel 4.7 für die Primärkaries – an zehn Messpunkten im Abstand von 200 µm in allen drei Testfeldern eine Bestimmung der Demineralisationstiefe vorgenommen werden (Abbildung 4-10).

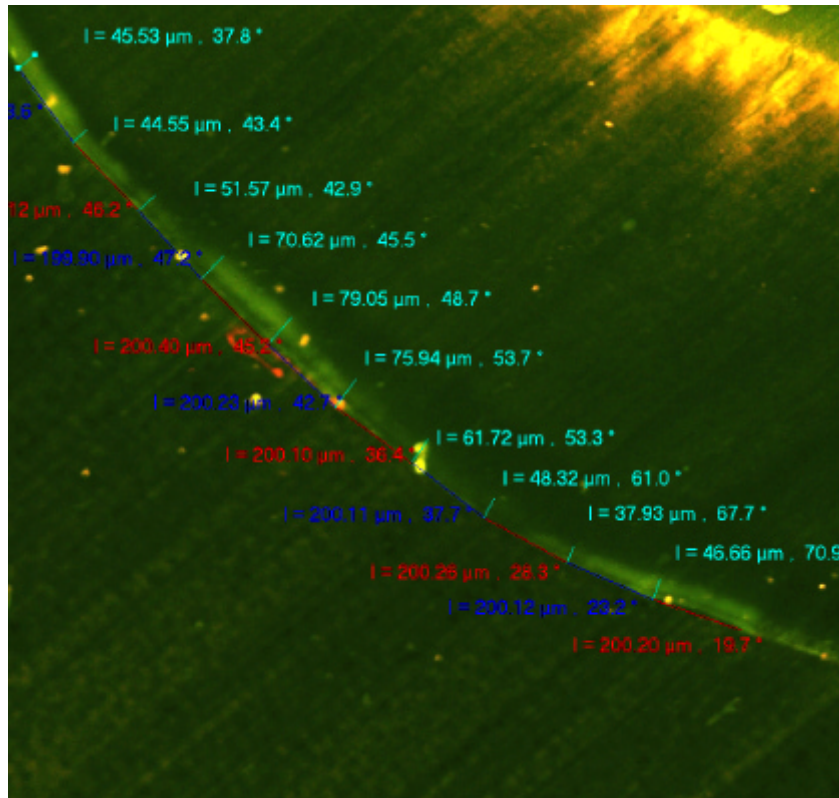


Abbildung 4-10

CLSM-Auswertung der Demineralisationstiefen eines Schnittes aus der Gruppe B-I.

4.9.4 Karieshemmung durch Fluorid und Glykane

In vier aufeinanderfolgenden Experimenten wurde die karieshemmende Wirkung einer Fluoridlösung (10 ppm NaF) (592) und einer experimentellen Glykanlösung gegenüber Wasser als Kontrolle getestet (Tabelle 4-3). Die experimentelle Glykanlösung wurde durch enzymatische Proteolyse eines kommerziellen Schweinemagen-Muzins (saliva medac, Hamburg, Deutschland) gewonnen. Die Glykanlösung zeigte in eigenen, bislang nicht veröffentlichten In-vitro-Untersuchungen eine bindungshemmende Wirkung gegenüber einem von *S. mutans* isolierten Oberflächenadhäsion und besitzt daher eine potenziell karieshemmende Wirkung.

Zur Durchführung dieser Studie wurden 64 humane untere Inzisivi verwendet. Die Zähne wurden mit Hilfe einer fluoridfreien Polierpaste und einem rotierenden Bürstchen gereinigt, und bei 2,5facher Vergrößerung wurden Schmelzdefekte ausgeschlossen. Nach der Entfernung der Zahnwurzeln wurde ein Stift aus rostfreiem Stahl in die Pulpakammer eingebracht und mit Komposit fixiert. Mit Hilfe einer Positionierungshilfe (Abbildung 4-5) wurden die Labialflächen der Zähne in einem Winkel von ca. 25° zur Horizontalebene positioniert. Die Lagerung und die

Sterilisation der Zähne zur Vorbereitung der Einschleusung in die künstliche Mundhöhle erfolgten analog der Beschreibung im Kapitel 4.9.1. Die Inkubation erfolgte in dem im Kapitel 4.3 beschriebenen Aufbau des In-vitro-Kariesmodells. Test- und Kontrollzähne waren dabei auf zwei unterschiedlichen Radien des Probenrades angeordnet und wurden von getrennten Tropfspitzen versorgt (siehe Abbildung 4-2). Es wurden vier aufeinanderfolgende Experimente durchgeführt (Tabelle 4-3). Die zur Karieserzeugung nötigen Parameter sind im Kapitel 4.4 beschrieben worden und wurden für jedes der 16 Tage dauernden Experimente wiederholt. Die Infektion mit *S. mutans* erfolgte an den Tagen 3 und 10 (siehe Kapitel 4.4). Die jeweilige Testsubstanz wurde mit einem Fördervolumen von 0,4 ml/min parallel zur Tryptikase-Soja-Bouillon verabreicht. Als Kontrolle diente autoklaviertes Leitungswasser. Eine bakteriologische Untersuchung entsprechend der Beschreibung im Kapitel 4.8 erfolgte zweimal pro Experiment.

Am Ende jedes der vier Experimente wurden die Zahnproben aus dem Reaktionsgefäß entfernt, mit Hilfe einer weichen Zahnbürste gereinigt und bis zur Kariesevaluation in physiologischer Kochsalzlösung gelagert.

Die Kariesevaluation erfolgte an sagittalen Serienschliffen entsprechend der Beschreibung im Kapitel 4.7.

Tabelle 4-3

Probenverteilung während der Experimente I – IV; NaF = Natriumfluorid

| | Experiment I | Experiment II | Experiment III | Experiment IV |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Tag | 1 - 16 | 17 - 32 | 33 - 48 | 49 - 64 |
| Innerer Kranz des Probenrades | NaF (n = 8) | Kontrolle (n = 8) | Glykan (n = 8) | Kontrolle (n = 8) |
| Äußerer Kranz des Probenrades | Kontrolle (n = 8) | NaF (n = 8) | Kontrolle (n = 8) | Glykan (n = 8) |

4.10 Tierversuche

4.10.1 Tiere und Untersuchungsgruppen

Die Untersuchung der potenziell karieshemmenden Wirkung einer Fluoridlösung und der experimentellen Glykanlösung aus den In-vitro-Experimenten wurde weiterführend in einem In-vivo-Experiment an gnotobiotischen mit *S. mutans* infizierten Ratten vorgenommen. Eine Genehmigung zur Durchführung der Versuche lag vor. Die Versuchsdurchführung erfolgte am Institut für Tierschutz und Tierverhalten der Freien Universität Berlin¹. Als Versuchstiere dienten 30 keimfrei aufgezogene Sprague-Dawley-Ratten aus drei Würfen eigener Zucht des Institutes. Die keimfreien Tiere lebten in Isolatoren und wurden über ein Schleusensystem mit sterilisierten Nahrungsmitteln versorgt. Die Jungtiere wurden paarweise in Drahtbodenkäfigen gehalten, im Alter von 21 Tagen entwöhnt und am 21. sowie am 29. Lebenstag mit *S. mutans* (DSM 20523) infiziert. Jedem Tier wurde mit Hilfe einer Insulinspritze oral 1 ml einer *S.-mutans*-Suspension verabreicht. Als Nahrung erhielten sie eine feinkörnige Diät mit einem Saccharoseanteil von 56 Gew.-% (modifizierte Diät C 1065, Altromin, Lage, Deutschland, 56 % Saccharose und 2 % Geval Instant Protein, Lederle, Gosport, UK) ad libitum. Die Versuchsdauer betrug 56 Tage. Die zur Infektion verwendete Keimsuspension wurde analog zur Beschreibung im Kapitel 4.2 hergestellt.

Folgende Untersuchungsgruppen wurden gebildet:

| | | |
|------------------------------------|--------|--|
| Kontrollgruppe 1 | n = 10 | kariogene Diät ad libitum Trinkwasser ad libitum |
| Kontrollgruppe 2 (Fluorid) | n = 10 | kariogene Diät ad libitum Trinkwasser mit Fluorid (10 ppm) ad libitum |
| Testgruppe 1 (Glykan) | n = 10 | kariogene Diät ad libitum Trinkwasser mit Glykanformulation ad libitum |
| Testgruppe 2 (Glykan + Fluorid) | n = 10 | kariogene Diät ad libitum Trinkwasser mit Glykanformulation und Fluorid (10 ppm) ad libitum |

Die Sterilisation des Futters erfolgte durch Gamma-Bestrahlung mit Hilfe einer Cäsium-Strahlenquelle am Hahn-Meitner-Institut Berlin². Die Sterilisation des Trinkwassers erfolgte durch Autoklavieren. Die Modifikationen des Trinkwassers der Testgruppen

¹ Prof. Dr. N. C. Jühr, Institut für Tierschutz und Tierverhalten, Freie Universität Berlin, Kraemerstr. 6, D-12207 Berlin

² Dr. Janata, Hahn-Meitner-Institut, Glienicke Str. 100, D-14109 Berlin

wurden innerhalb des Isolators jeweils kurz vor der Verabreichung an die Tiere vorgenommen. Dazu wurden in Falcon-Röhrchen (50 ml, BD, Heidelberg) vorportionierte Konzentrate eingeschleust. Die Sterilisation der Fluorid- und Glykanlösung erfolgte durch Sterilfiltration, die Sterilisation des Schleusungsgutes durch 20-minütige Einwirkzeit einer frisch angesetzten 5%igen Peroxyessigsäure.

Zur Überwachung der Gnotobiose wurden regelmäßig Proben der Faeces entnommen und entsprechend der Beschreibung im Kapitel 4.8 mikrobiologisch untersucht.

Vorversuche an einzeln untergebrachten Tieren hatten ergeben, dass das mit Fluorid bzw. mit Glykan versetzte Trinkwasser in gleicher Menge wie das reine Trinkwasser getrunken wurde.

4.10.2 Kariesbestimmung

Die Tiere wurden nach Abbruch des Versuches von einem Tierarzt untersucht, im CO₂-Rausch geopfert und anschließend gewogen. Die Kariesbestimmung erfolgte an den Molaren des Unterkiefers. Die Zähne des Oberkiefers dienten zur Bestimmung des Plaquebefalls. Dazu wurden die Kiefer mit einer Schere grob präpariert und für mindestens 48 Stunden in zehnpromzentigem Formalin verwahrt. Durch die Fixierung ließen sich die Weichteile leicht vom Hartgewebe lösen. Nach der vollständigen Entfernung der Weichgewebe erfolgte die histologische Aufbereitung der Kiefer. Dazu wurden die Kiefer mit Hilfe von Kerr-Compound-Masse (Kerr, Orange, CA, USA) auf einem Probenhalter fixiert und so in die Halterung einer Innenlochsäge eingespannt, dass sich die sagittale Achse der Molarenreihe genau parallel zur Schnittebene befand. Unter Wasserkühlung wurde so tief geschliffen, dass der Kiefer zwar nicht in die einzelnen Schnitte zerfiel, aber später mit Hilfe eines Skalpells leicht getrennt werden konnte. Die geschnittenen Kiefer wurden anschließend in einem ventilierten Wärmeschrank bei 50°C für 90 Minuten vollständig getrocknet. Die so vorbereiteten Präparate wurden mit einem Tropfen Schiffreagenz für zehn Sekunden gefärbt und unmittelbar danach mit reichlich Aqua dest. abgespült (Abbildung 4-11). Danach wurden die Schnitte voneinander getrennt und mit Hilfe von Klebewachs an einer für die Auswertung irrelevanten Stelle auf einem gläsernen Objektträger fixiert (259, 285). Jeder Objektträger wurde mit einer fortlaufenden Nummer kodiert, um während der Auswertung keine Rückschlüsse auf die Gruppenzugehörigkeit zu ermöglichen.

Das zur Anfärbung verwendete Schiffreagenz nach der Spezifikation von *Graumann* (1953) wird folgendermaßen hergestellt: a) 0,5 g Pararosanilin acidinfrei in 15 ml normaler Salzsäure ohne Erwärmen unter Schütteln vollständig auflösen; b) 0,5 g Kaliummetabisulfit ($K_2S_2O_5$) in 85 ml destilliertem Wasser lösen und zusetzen; c) die klare, kräftig rote Lösung hellt sich allmählich auf und wird dabei gelblich; sie wird nach 24 Stunden mit 0,3 g pulverisierter Aktivkohle zwei Minuten lang geschüttelt und dann filtriert. Das Reagenz ist sofort gebrauchsfertig (285).

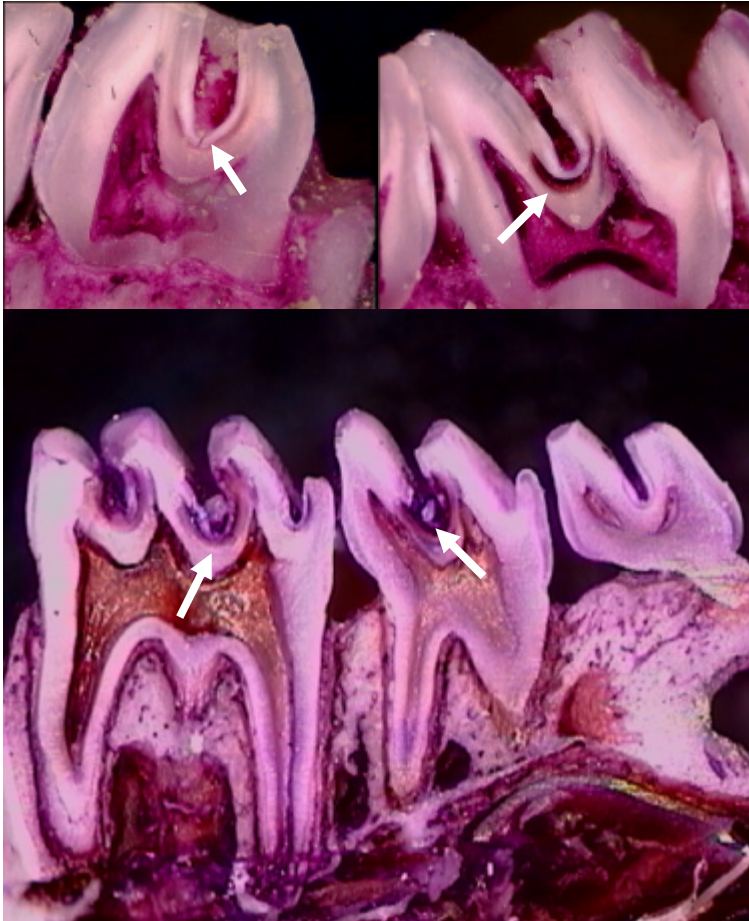
Gesunder Schmelz und gesundes Dentin bleiben ungefärbt, während sich kariös entkalkte Zahnhartsubstanzen intensiv rot färben. Als Ursache für diese Reaktion wird die unterschiedlich starke Penetration des Formalins in die verschieden stark entkalkten Gewebe angenommen.

Die Bewertung des Kariesbefalls erfolgte mit Hilfe eines Auflichtmikroskops (Zeiss Stemi 2000-C, Zeiss, Jena, Deutschland) bei sechsfacher Vergrößerung im Bereich der Fissuren und der approximalen Glattflächen. Folgende Schweregrade wurden entsprechend der von *König* (285) vorgeschlagenen Klassifikation unterschieden (Tabelle 4-4).

Tabelle 4-4

Klassifikation der Schweregrade der kariösen Läsionen nach Anfärbung mit Schiffreagenz (285)

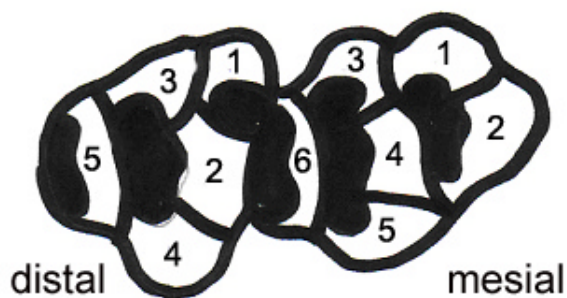
| | | |
|---|----------------------------|---|
| A | Schmelzläsion | Farbreaktion auf Schmelz begrenzt keine Beteiligung der Schmelz-Dentin-Grenze |
| t | initiale Dentinläsion | Farbreaktion der Schmelz-Dentin-Grenze bei beginnender halbmondförmiger Ausbreitung, jedoch ohne spaltförmige Schrumpfung |
| B | mittelschwere Dentinläsion | Vordringung der Entkalkung Richtung Pulpa unter Bildung einer spaltförmigen Schrumpfung zwischen Schmelz und Dentin |
| C | ausgedehnte Dentinläsion | Stark fortgeschrittene Zerstörung mit Kavitation |

**Abbildung 4-11**

Mit Schiffreagenz angefärbte Schnitte unterer Molaren der Ratte:
 t-Läsion (oben links);
 B-Läsion (oben rechts);
 C-Läsionen in den Zentralfissuren des ersten und zweiten Molaren (unten) (285).

4.10.3 Plaquebestimmung

Die Auswertung des Plaquebefalls erfolgte an den ersten und zweiten Molaren des mit Hilfe von 10%igem Formalin fixierten Oberkiefers nach Anfärben mit Erythrosin (493). An den ersten Molaren wurde die Bewertung von sechs Flächen, die sich aus der Anatomie des Zahnes ergaben, vorgenommen. Am zweiten Molaren wurden entsprechend fünf Flächen beurteilt (Abbildung 4-12).

**Abbildung 4-12**

Schematische Aufsicht des ersten (rechts) und zweiten (links) linken Molaren des Oberkiefers der Ratte: Am ersten Molaren wurden sechs Flächen bewertet, am zweiten Molaren fünf. Die Höckerspitzen sind schwarz gekennzeichnet (285).

Es wurden fünf Schweregrade des Plaquebefalls unterschieden (Tabelle 4-5). Der Plaqueindex zur Beschreibung des Plaquebefalls ergab sich als Quotient aus der Summe des Plaquebefalls der einzelnen Flächen durch die Anzahl der bewerteten Flächen. Zähne, bei denen es durch das Herauspräparieren der Kiefer zu Blutablagerungen kam, wurden nicht in die Bewertung einbezogen.

Tabelle 4-5

Schweregrade des Plaquebefalls an den entsprechenden Zahnflächen der ersten und zweiten oberen Molaren (285)

| | |
|---|---|
| 0 | keine Plaque |
| 1 | dünnes Band oder vereinzelte Plaqueinseln |
| 2 | ca. ein Drittel der Fläche mit Plaque besiedelt |
| 3 | ca. zwei Drittel Fläche mit Plaque besiedelt |
| 4 | fast die gesamte Fläche mit Plaque besiedelt |

4.11 Finanzielle Förderung der Arbeiten

Der Bau der künstlichen Mundhöhle wurde teilweise mit Unterstützung durch die Universitäre Forschungsförderung der Charité realisiert. Die Rattenexperimente waren das Ergebnis eines Kooperationsprojektes mit den Firmen AptaRes AG (Luckenwalde, Deutschland) und Gaba International AG (Basel, Schweiz). Die Experimente zur approximalen Versiegelung erfolgten in Kooperation mit der Universität Zürich und wurden gefördert durch öffentliche Drittmittel des Swiss Federal Office for Professional Education and Technology, Grant 5523.2 MTS (KTI/CTI Innovation Promotion Agency) sowie teilweise durch die Firma Ivoclar Vivadent (Schaan, Liechtenstein).

4.12 Statistische Aufbereitung der Daten

Zur Testung auf Normalverteilung der Daten wurde der *Kolmogorov-Smirnov*-Test angewandt ($p < 0,05$). Alle Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS. Die verwendeten Streumaße, statistischen Tests und Irrtumswahrscheinlichkeiten sind nachfolgend in der jeweiligen Darstellung angegeben.