

## 6 Diskussion der Anwendung des In-vitro-Kariesmodells

### 6.1 Erzeugung kariöser Läsionen

Die Zahnhartsubstanzen sind in ihrer natürlichen Umgebung einem kontinuierlichen Wechsel von De- und Remineralisationsvorgängen ausgesetzt. Gesundheit bedeutet in diesem Zusammenhang, dass zwischen beiden ein Gleichgewicht herrscht. Ist dieses Gleichgewicht gestört und überwiegt die Demineralisation, kommt es zu einem lokalen Nettoverlust an Mineralien der Zahnhartsubstanz und damit zur Ausbildung einer kariösen Läsion (594).

Die Verfahren zur Beschreibung und Bewertung initialer Schmelz- und Dentinläsionen basieren auf der Darstellung der Unterschiede zwischen intakten und demineralisierten Zahnhartsubstanzbereichen und schaffen so ein Abbild von der Stärke des kariösen Angriffs. Als Verfahren sind in der Literatur Mikrohärtemessungen auf der Schmelzoberfläche (15, 17, 449, 488) und an Schnitten (86, 127), verschiedene mikroradiographische Techniken (10, 169, 205), Jod-Absorptionsspektrometrie (9), Lichtstreuung (588), Polarisationsmikroskopie (488, 525, 526), quantitative light-induced fluorescence (QLF) (6, 7, 180) und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) mit und ohne Färbeverfahren (138-141, 169, 170, 501) beschrieben worden. Während die Mikroradiographie lange als praktikabelste Lösung angesehen wurde, ergeben sich aus einer Vergleichsstudie zwischen Mikroradiographie und CLSM-Technik von *González-Canezas et al.* (169) einige Vorteile für den Einsatz der CLSM-Technik. Die Probenherstellung und Probenvorbereitung ist einfacher und der Untersucher läuft nicht Gefahr, einer potenziell gesundheitsschädigenden Röntgenstrahlung ausgesetzt zu sein. Das CLSM erlaubt, Schichten unter der Probenoberfläche darzustellen, und ist daher weniger empfindlich gegenüber oberflächlichen Rauigkeiten. Es kann aufgrund der direkten digitalen Verarbeitung der Bilder eine maßstabsgetreue Vermessung von Strecken, Flächen und Volumina vorgenommen werden (169).

Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene CLSM-Verfahren erlaubte die Darstellung auch sonst in der Literatur beschriebener struktureller Merkmale initialer kariöser Schmelzläsionen. So fanden sich deutlich laminäre Zonen innerhalb der Läsionen, die in der Literatur für natürliche initiale Schmelzläsionen beschrieben worden sind (147, 266, 434). Diese Zonen entstehen nach *Sato und Yamamoto* (479) aufgrund der

Demineralisationsphasen im natürlich ablaufenden Prozess der Ausbildung kariöser Demineralisationen und sind daher nicht bei kariesähnlichen Läsionen zu finden, die in reinen Demineralisationsmodellen erzeugt wurden. Durch die im CLSM gewählten Einstellungsparameter konnte eine klare Begrenzung der Läsionen durch Nutzung der Autofluoreszenz der Zahnhartsubstanz dargestellt werden und auf die vorherige Anfärbung mit Rhodamin verzichtet werden (139, 501). Im Hinblick auf zukünftige Experimente, die eine gleichzeitige Darstellung der bakteriellen Besiedelung und der Demineralisation erfordern, ist dies von Bedeutung.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten sekundärkariesähnlichen Läsionen zeigten die gleichen wie von anderen Autoren beschriebenen typischen Merkmale. So fanden sich die Ausbildung einer äußeren Läsion, die durch den primären Säureangriff auf den unbehandelten Schmelzoberflächen entstand, und die Bildung einer Wandläsion (innere Läsion) entlang des Spaltes zwischen Restaurationsmaterial und Zahnhartsubstanz (139, 166, 176, 263, 264, 268). Zur Beschreibung und Quantifizierung der Ausprägung einer Sekundärkaries werden prinzipiell die gleichen Verfahren wie oben beschrieben eingesetzt. Zur Quantifizierung der Wandläsion wird in der Regel deren Länge bzw. deren Tiefe an bestimmten Messpunkten angegeben (102, 489). In der vorliegenden Arbeit konnte aufgrund der Nutzung der CLSM-Technik die Tiefe der Primärläsion (Primärkaries) und die Tiefe bzw. die Fläche der Wandläsion (Sekundärkaries) bestimmt werden. Dies ist vergleichbar mit dem von *Sá et al.* angewendeten und von *Fontana et al.* entwickelten Verfahren (139, 476). Unseres Wissens nach beschreiben wir erstmals die Histologie bakteriell erzeugter sekundärkariesartiger Läsionen im Bereich von Fissurenversiegelungen und ein Verfahren zur quantitativen Beurteilung dieser Läsionsform (501, 503) (siehe auch Diskussion im Kapitel 6.2).

## 6.2 Fissurenversiegelungen

Fissurenversiegelungen werden seit mehr als 30 Jahren zum Schutz vor Karies in Fissuren und Grübchen okklusaler Zahnflächen eingesetzt und werden trotz methodischer Unzulänglichkeiten vieler klinischer Studien als empfehlenswerte Methode eingestuft (4). Zur Beurteilung ihrer Effektivität *in vitro* werden in der Regel mikroskopische Untersuchungen der Randmorphologie (554) oder Randsdichtheitsprüfungen vorgenommen (164, 440). Daraus resultierend wird der Analogieschluss

abgeleitet, dass morphologisch erkennbare Randspalten oder durch Farbstoffe penetrierbare Randspalten zu einem klinischen Versagen durch Versieglerverlust oder Randkaries führen. Die Beschreibung der Entstehung von Sekundärkaries an Fissurenversiegelungen findet sich jedoch bislang nur bei *Hicks et al.* (207-212), die mit Hilfe eines einfachen Demineralisationsmodells kariesähnliche Läsionen an Fissurenversiegelungen erzeugten. Sämtliche bislang eingesetzten In-vitro-Modelle lassen somit den möglichen Einfluss mikrobieller Plaque außer Acht. Der Einsatz eines biofilmbasierten In-vitro-Modells erscheint daher in diesem Zusammenhang sinnvoll. Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals die erfolgreiche mikrobiologische Erzeugung sekundärkariesähnlicher Läsionen an Fissurenversiegelungen und deren quantitative Beurteilung.

Die Durchführung einer Fissurenversiegelung kann als ein techniksensitives Behandlungsverfahren betrachtet werden, da ein unbeabsichtigter Speichelzutritt die Oberflächenenergie des geätzten Schmelzes stark herabsetzen und damit den innigen Verbund zwischen Zahnoberfläche und Versieglermaterial zerstören kann (246, 650). Somit ist bei unvollständig durchgebrochenen Zähnen oder unkooperativen Patienten ein erhöhtes Risiko vorhanden, eine qualitativ minderwertige Versiegelung zu applizieren, die ihrer eigentlichen Bestimmung, die Fissuren vor Karies zu schützen, nicht nachkommt. Ein unbeabsichtigter Speichelzutritt wurde in der vorliegenden Arbeit durch eine Kontamination des distalen Anteils der Fissur mit einer dünnen Schicht menschlichen Speichels simuliert. In der Pilotstudie (Kapitel 5.2.1) ergab sich wie erwartet an Fissurenversiegelungen mit einem konventionellen Versieglermaterial ein größerer Sekundärkariesbefall, wenn der Schmelz vor der Applikation mit Speichel kontaminiert wurde. Auch das zweite von uns durchgeführte Experiment erbrachte ein ähnliches Ergebnis. Bei den mit dem konventionellen Versiegler Delton versiegelten Fissuren fanden sich auf der kontaminierten Seite der Fissur im Vergleich zu der nicht kontaminierten Seite statistisch signifikant mehr Versiegelungen, die aufgrund des Sekundärkariesbefalls als „Totalversager“ bewertet wurden. Diese Ergebnisse unterstützen eindeutig die Forderung nach einer absoluten Isolation des Arbeitsfeldes zur Applikation eines konventionellen Fissurenversieglers (246).

Da sich eine sichere Isolierung des Arbeitsfeldes vor Speichelzutritt unter klinisch realistischen Bedingungen nicht immer für den gesamten Zeitraum der Behandlung

bewerkstelligen lässt, sollte eine Weiterentwicklung dieses Behandlungsverfahrens darauf abzielen, die Behandlungszeit zu verkürzen und/oder Materialien einzusetzen, die einen Speichelzutritt ohne relevante Qualitätseinbuße tolerieren. Obwohl von den Herstellern nicht dafür vorgesehen, bieten sich selbstätzende Ein-Schritt-Adhäsivsysteme zu diesem Zweck an. Ihr Gehalt an hydrophilen Monomeren erklärt, warum sich Hinweise eines weniger feuchtigkeitsempfindlichen Bindungsverhaltens zu Zahnschmelz ergeben (117, 146, 203, 224). Außerdem wird durch das Wegfallen des Ätzworgangs mit Phosphorsäure Zeit eingespart. In einer klinischen Studie, in der anstelle der Anwendung der Säureätztechnik das selbstätzende Adhäsivsystem Prompt-L-Pop als Zwischenschicht zwischen Zahn und konventionellen Fissurenversiegler appliziert wurde, konnte ein Zeitersparnis von mehr als einem Drittel (3,1 gegenüber 1,8 Minuten) errechnet werden (132). Um ein maximales Zeitersparnis zu erreichen, wäre es jedoch wünschenswert, ein selbstätzendes System als alleiniges Material ohne zusätzliche Applikation eines Versieglers zu verwenden. Diesbezüglich sind nur vereinzelte Berichte, die sich auf morphologische In-vitro-Versuche beschränken, in der Literatur zu finden (164, 199). Umfangreiche In-vitro-Experimente und klinische Experimente fehlen bislang.

In der vorliegenden Studie wurde das Ein-Schritt-Adhäsiv Xeno III als experimenteller Fissurenversiegler eingesetzt. Aufgrund seiner Inhaltsstoffe und Materialeigenschaften könnte es für diese Anwendung geeignet sein. Trotz seiner hydrophilen Eigenschaften fanden wir im Vergleich mit dem hydrophoben konventionellen Versiegler Delton eine gleich große Anzahl an Versiegelungen, die aufgrund des Sekundärkariesbefalls als „Totalversager“ klassifiziert worden waren. Wurden die Versiegelungen beider Materialien auf nicht kontaminiertem Schmelz durchgeführt, schnitt der konventionelle Versiegler signifikant besser ab als die experimentellen Versiegelungen aus Xeno III. Auf Basis dieser In-vitro-Daten lässt sich schließen, dass das selbstätzende Ein-Schritt-Adhäsiv Xeno III in der hier gewählten Applikationsform nicht als alleiniger Fissurenversiegler geeignet ist. Möglicherweise könnte das Material aber als Zwischenschicht zwischen Zahn und zusätzlichem Versieglermaterial eingesetzt werden. So konnten *Hebling* und *Feigal* (203) bei Verwendung eines selbstätzenden Adhäsivs als Intermediärschicht eine Reduktion von Randundichtigkeiten zwischen Versiegler und speichelkontaminiertem Schmelz demonstrieren. In einer Zweijahresstudie mit 18 Probanden im Split-mouth-Design fanden sich keine Unterschiede

bezüglich der klinischen Erfolgsrate zwischen Versiegelungen aus dem konventionellen Versieglermaterial Delton nach Säurekonditionierung und Versiegelungen aus Delton nach Vorbehandlung mit dem selbstätzenden Adhäsivsystem Prompt-L-Pop. Die dabei erzielte Zeitersparnis wurde bereits oben erwähnt (132).

Die Gründe für den in dieser Arbeit erzielten unzureichenden Erfolg des Materials Xeno III als Fissurenversiegler können vielschichtig sein. Eine mögliche Ursache, die im Prinzip auch von *Hannig et al.* (199) diskutiert wird, ist, dass die methacrylierte Phosphorsäure in selbstätzenden Adhäsivsystemen gerade im Bereich des nicht mechanisch bearbeiteten prismenarmen Zahnschmelzes des Fissurensystems ein deutlich schwächer ausgeprägtes Ätzmuster erzeugt, als dies Phosphorsäure vermag (436, 587). Weiterhin ergibt sich die Problematik, dass die aus dem Schmelz durch den Ätzzvorgang herausgelösten Kalzium- und Phosphationen nicht durch Wegspülen beseitigt werden und in der Kunststoffmatrix negative Einflüsse auf die thermo-mechanische Stabilität und damit die Verbindung zwischen Kunststoff und Schmelz ausüben können. Gegen diese Erklärung spricht die Beobachtung von *Pashley et al.*, die zeigen konnten, dass die Effektivität eines selbstätzenden Systems auf unbearbeitetem Schmelz nicht von seiner Aggressivität hinsichtlich der Erzeugung eines Ätzmusters abhängt (436, 587), sondern möglicherweise über ein so genanntes nanoretentive interlocking zu erklären ist (198). Darunter versteht man die Ausbildung einer inter- und intrakristallinen Hybridschicht, basierend auf der Fähigkeit des Versieglerharzes, zwischen die Schmelzkristallite in den Schmelz hineinzupenetrieren, was wesentlich für die Haftung zwischen beiden Substanzen verantwortlich zu sein scheint (198, 514).

Eine weitere Erklärung für das schlechte Abschneiden von Xeno III mag darin begründet sein, dass aufgrund seiner für selbstätzende Adhäsivsysteme typischen chemischen Zusammensetzung der Gehalt an hydrophilen Monomeren dazu führt, dass Wasser auch nach der Polymerisation in das Material aufgenommen wird, wenn es nicht von einem hydrophoben Material abgedeckt wird. Von *Tay et al.* (586) wurde dieses Phänomen des „osmotic blisterings“ erst kürzlich beschrieben. Es liegt auf der Hand, dass eine Wasseraufnahme zu einer Schwächung und zu einem Versagen des Materials führen kann.

Teilweise könnten die Ergebnisse dieser Studie aber auch allein durch die Kavitätengeometrie, die durch die Form des Fissurensystems bedingt ist, begründet sein. Die Kavitätengeometrie lässt sich durch den C-Faktor charakterisieren, der das Verhältnis von gebundener zu ungebundener Füllungsoberfläche angibt (133). In Kavitäten mit hohem C-Faktor entwickelt sich durch die hohe Abbindekontraktion ungefüllter Versiegler ein hohes Maß an Stress auf die Schmelz-Versiegler-Verbindung, die zur Bildung von Randspalten führt, wenn sie nicht durch die elastischen Eigenschaften des Materials ausgeglichen werden kann (585). Bedingt durch die unterschiedliche Zusammensetzung besitzen die Materialien Delton und Xeno III verschiedene Elastizitätsmodule und reagieren daher unterschiedlich auf diesen Umstand (297). Von *Tay et al.* (585) wurde der C-Faktor von Fissurenversiegelungen bestimmt und liegt mit Werten zwischen 3,2 und 4,1 sehr hoch.

Letztlich spielt auch die Art und Weise der Applikation des Materials eine Rolle. Wichtig erscheint in diesem Zusammenhang die Frage nach der Dauer der Einwirkzeit, die in gewissem Umfang das Ausmaß der Ätzwirkung bestimmt, und ob das zum Ätzen nötige Lösungsmittel (Wasser) vor der Durchführung der Polymerisation in ausreichendem Maße evaporieren kann. Unklar ist ebenfalls, ob sich durch Verarbeitungsmodifikationen, wie z. B. durch das Bewegen des Versieglers mit Hilfe eines Applikators während der Einwirkzeit, die Effektivität beeinflussen lässt. In weiterführenden Experimenten sollte diesen Detailfragen nachgegangen werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass unser In-vitro-Kariesmodell geeignet erscheint, die Effektivität experimenteller Fissurenversiegelungen hinsichtlich ihrer kariesprotektiven Wirkung zu untersuchen. Unter dem Gesichtspunkt der Kariesprävention war der experimentelle Einsatz des selbstätzenden Adhäsivsystems Xeno III als Fissurenversiegler weniger effektiv auf unkontaminiertem Schmelz und ebenso ineffektiv auf mit Speichel kontaminiertem Schmelz wie der konventionelle Versiegler Delton.

### **6.3 Approximale Versiegelung**

Prinzipiell werden zur Prävention von Karies hauptsächlich Strategien verfolgt, die eine Bildung und Reifung des Biofilms „dentale Plaque“ stören und/oder die Dissolutionskinetik der Zahnhartsubstanzen modifizieren (265). Die Basis für den Erfolg solcher Maßnahmen, wie z. B. dem Einsatz von Substanzen zur chemischen

Plauekontrolle (25, 484, 605) oder der Gabe von Fluoriden (606, 607), ist eine hohe Compliance der Patienten. Möglicherweise ist darin auch ein Grund für unterschiedliche Erfolgsraten verschiedener Maßnahmen zu suchen. Eine Strategie zur Kariesprävention, die nicht von einer kontinuierlichen Compliance der Patienten abhängt, besteht darin, den Zahn vor den schädigenden Einflüssen des Biofilms durch Einbringen einer physikochemischen Barriere zu schützen. Diese Strategie wird erfolgreich im Bereich okklusaler Zahnflächen eingesetzt, indem Fissuren mit Hilfe adhäsiv befestigten Kunstharzes versiegelt werden (4, 106, 572). Auch im Bereich approximaler Glattflächen gibt es Anstrengungen, diese durch eine Versiegelung vor plaquebedingten Säureangriffen zu schützen, allerdings mit teilweise kontroversen Ergebnissen. So ergaben einige Studien, dass chemisch härtende ungefüllte Versiegler nicht in der Lage waren, eine ausreichende Versiegelung zu gewährleisten, während bei der Verwendung lighthärtender Versiegler eine besser vorhersagbare Schichtstärke und ein besserer Säureschutz zu erzielen waren (106, 145). Für die insgesamt wenig zufrieden stellenden Ergebnisse wurde hauptsächlich die polymerisationsinhibitorische Wirkung des Luftsauerstoffs verantwortlich gemacht. Dieser bewirkt, dass die oberflächliche Schicht nicht polymerisiert und bei sehr dünnen Schichten, die beim Verblasen auftreten können (168), die gesamte Schicht verloren gehen kann. Zurück bleibt dann eine nicht versiegelte Schmelzschicht. Um die Auswirkungen dieser Sauerstoffinhibitionsschicht zu verringern, nahmen *Schmidlin* et al. (495) in ihren Experimenten einen doppelten Versiegleranstrich vor. Allerdings führte diese Maßnahme auch zu keinem vollständigen Schutz der Zahnoberfläche (495), was durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt wird. Auf der mit einem doppelten Versiegleranstrich versiegelten Fläche war ein teilweiser Versieglerverlust zu verzeichnen, was zur Entstehung einer deutlich sichtbaren gesprenkelten Oberfläche in Form von white spot lesions nach Inkubation im künstlichen Mund führte. Zu erklären ist dieses Phänomen wahrscheinlich durch den Polymerisationsstress, der bewirkt, dass es zur lokalisierten Ablösung von der Zahnoberfläche kommt und damit zu Undichtigkeiten bis hin zum partiellen Verlust des Versieglers (242). Allerdings zeigte in anderen Untersuchungen trotz eines Versieglerverlustes der darunter befindliche Schmelz eine geringere Löslichkeit als unversiegelter Schmelz, was wahrscheinlich an den in den oberflächlichen Schichten verbliebenen resin tags liegt, die den Schmelz imprägnieren (168, 212). Es ist daher davon auszugehen, dass eine intakte

Versiegelung notwendig ist, um den langfristigen Schutz einer Zahnfläche vor der Ausbildung einer Demineralisation zu gewährleisten.

Im Gegensatz zum ungefüllten Versiegler führte das Überdecken mit einem gefüllten, aber fließfähigen Komposit (Tetric flow) zu einem vollständigen Schutz der Zahnoberfläche vor Demineralisation. Aus rein praktischen Beweggründen erscheint die Verwendung dieses Materials im Bereich approximaler Glattflächen wegen der schlechten Kontrollierbarkeit der Materialapplikation und der Schichtstärke nicht geeignet zu sein. Um eine gleichmäßige, aber dünne Schichtstärke ohne oberflächliche Sauerstoffinhibitionsschicht sowie eine kontrollierte Adaptation zu erreichen, wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Ivoclar Vivadent eine vorpolymerisierte Folie entwickelt, die mit Hilfe der Säureätztechnik wie eine Art Pflaster appliziert werden kann. In-vitro-Vorversuche zeigten, dass durch die Applikation des Pflasters die darunter befindliche Zahnoberfläche vor einem Säureangriff geschützt werden kann (498). Vor der Durchführung klinischer Studien war zu klären, ob die Folie auch nach mechanischer Belastung im Approximalraum einen zuverlässigen Schutz vor einem durch bakterielle Plaque induzierten Säureangriff bietet. Daher erfolgte die Simulation des approximalen Kontaktes äquivalent zu einer Tragezeit von fünf Jahren in vivo. Diese Simulation konnte mit Hilfe eines Kausimulators unter gleichzeitiger thermischer Wechselbelastung erreicht werden (496), obwohl sich die Situation in dieser Simulationsumgebung von der In-vivo-Situation unterschied. Die möglicherweise schützende Funktion des Pellikels konnte nicht berücksichtigt werden, und es fand keine parallele bakterielle Inkubation zur Erzeugung eines kariösen Säureangriffs statt (656). Diese erfolgte jedoch konsekutiv mit Hilfe unseres In-vitro-Kariesmodells im Anschluss an die künstliche Alterung im Kausimulator (501).

In der hier verwendeten experimentellen Anordnung führte die Applikation der adhäsiv befestigten Folie trotz umfangreicher thermischer und mechanischer Belastung zu einem vollständigen Schutz der Zahnoberfläche vor einem bakteriell induzierten Säureangriff. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen eines vorangegangenen Experiments, bei dem die mit der Folie versiegelten Schmelzareale vor einer 21-tägigen Lagerung in Milchsäure vergleichbar gut geschützt wurden wie bei einer Versiegelung mit dem Komposit Tetric flow (498).

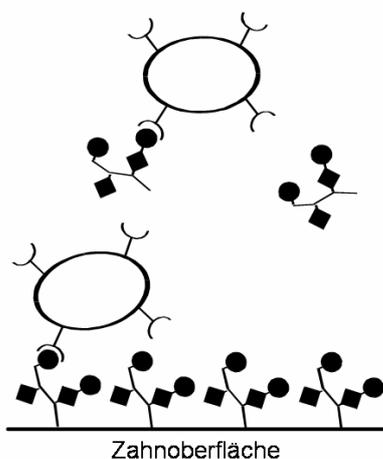
Bei gleichzeitiger Berücksichtigung der vorangegangenen In-vitro-Experimente erscheint es nach der hier durchgeführten realitätsnahen Simulation von Abnutzung und Belastung in Kombination mit einem bakteriell induzierten Säureangriff gerechtfertigt, klinische Studien durchzuführen, in denen die kariesprotektive Wirkung der Folie nach leichter Separation der Zähne (494) untersucht werden kann. Weitere potenzielle Anwendungen könnten folgen. In Frage kämen die Versiegelung überempfindlicher Zahnhälse oder Erosionen (24).

#### **6.4 Karieshemmung durch Glykane**

Tierexperimente und Untersuchungen an eineiigen und zweieiigen Zwillingspaaren offenbaren die Präsenz einer genetischen Komponente bei der Kariesentstehung (72, 231, 233, 285, 345, 461, 499, 518). Die in den Industriestaaten zu beobachtende ungleichmäßige Verteilung der Karies (114, 490) kann daher zum Teil auf genetischen prädisponierenden Faktoren beruhen (345). Als Effektoren der genetischen Prädisposition kommen Host-defence-Faktoren in Betracht, die die Zusammensetzung und damit die Kariogenität des oralen Biofilms „Plaque“ modifizieren können (504).

Insbesondere der Keim *S. mutans* ist in der Lage, durch glykolytischen Abbau niedermolekularer Kohlenhydrate einen pH-Wert-Abfall zu induzieren, der zur Demineralisation der Zahnhartsubstanz und damit zu Karies führt (331). Der erste Schritt für die Entstehung von Karies ist die Anheftung und Etablierung dieses Keimes auf der Zahnoberfläche (155, 162). Sekretorische Antikörper gegen Oberflächenstrukturen von *S. mutans* sind in der Lage, seine Adhäsion an in vitro erzeugte Pellikeloberflächen zu verhindern (187, 639). In aktiven Immunisierungsexperimenten an Nagetieren und Primaten konnte gezeigt werden, dass sich die Etablierung von *S. mutans* verhindern und die Ausbildung kariöser Läsionen reduzieren lässt (253, 254, 306-309, 363-365, 373-378, 543, 545, 620). Auch am Menschen konnte die Bildung sekretorischer Antikörper gegen *S. mutans* durch die Verabreichung von Antigenen angeregt werden (85, 371). Aus ethischen Gesichtspunkten und aufgrund der Gefahr unerwünschter Kreuzreaktionen ist jedoch die Durchführung einer Immunisierung gegen die als primär nicht lebensbedrohlich einzustufende Erkrankung „Karies“ nicht unproblematisch und damit nach Risikoabwägung für den breiten Einsatz nicht empfehlenswert.

Eine als weitaus weniger kritisch zu betrachtende Möglichkeit der Beeinflussung des Kariesgeschehens resultiert aus der Wechselwirkung zwischen bakteriellen Oberflächenadhäsinen vom Lektintyp und den an diese bindenden Oligosaccharidstrukturen. Die spezifische Adhäsion oraler Keime an die Zahnhartsubstanzen erfolgt teilweise über die Bindung von bakteriellen Oberflächenlektinen (Adhäsinen) an Glykanstrukturen des Pellikels oder der Plaque und ist durch spezifische Glykanstrukturen hemmbar (68, 155, 160, 280-283). Diese Glykane sind meist Bestandteil eines Glykokonjugates (Glykoprotein, Glykolipid) und weisen eine hohe strukturelle Variabilität auf, die aus der Anzahl der involvierten Kohlenhydratmoleküle (Galaktose, N-Acetyl-Galaktosamin, Mannose, N-Acetyl-Glukosamin, Fukose, Sialinsäure) und der Variabilität der glykosidischen Bindungen resultiert (288). Lektine sind in der Lage, spezifisch an ganz bestimmte der dabei entstehenden unterschiedlichen Strukturmuster zu binden, ohne gegenüber diesen eine enzymatische Aktivität aufzuweisen (277). Lektine mit bekannter Bindungsspezifität können daher generell zur Strukturcharakterisierung von Glykanen als „Sonden“ eingesetzt werden (151, 250). Während auf der Zahnoberfläche die Strukturmuster immobilisierter Glykane die Adhäsion vermitteln, vorausgesetzt, die passende Glykanstruktur zu dem jeweiligen Adhäsion ist vorhanden, können die gleichen Glykanstrukturen eine Adhäsion unterbinden, wenn sie in ausreichender Konzentration gelöst im Speichel vorkommen und kompetitiv mit dem immobilisierten Glykan um die Bindung an das bakterielle Adhäsion konkurrieren (Abbildung 6-1) (68, 249, 250, 418, 419, 504, 561, 569-571, 573).



**Abbildung 6-1**

In vivo wird die Adhäsion oraler Pathogene an die Zahnoberfläche durch Lektin-Glykan-Wechselwirkung zwischen bakteriellen Adhäsinen und auf der Zahnoberfläche immobilisierten Glykanstrukturen vermittelt. Die gleichen Glykanstrukturen können eine bakterielle Adhäsion verhindern, wenn sie gelöst im Speichel vorliegen.

() orales Pathogen

() Glykanstruktur

[Titelblatt *Caries Research* 2001; 35/2 (504)]

Bindet ein Bakterium an ein gelöstes Glykan, sollte die Adhäsion und damit eine Infektion verhindert werden können (247, 250, 418, 419, 561). Kennt man die genaue Lektinspezifität pathogener Keime, sollte es möglich sein, durch Supplementierung der passenden Glykanstruktur die Adhäsion gezielt zu unterbinden, ohne die residente, „erwünschte“ apathogene Standortflora zu beeinflussen (570, 571). Am Urogenitaltrakt durchgeführte Experimente zeigten, dass durch die Gabe spezifischer Glykanstrukturen im Sinne von Glykomimetika eine Infektion mit *Escherichia coli* verhindert werden konnte (570). Übertragen auf die Situation in der Mundhöhle bedeutet dies, dass durch spezifisch wirksame Glykane die lektinvermittelte Adhäsion von *S. mutans* und damit auch Karies zu inhibieren sein müssten. Dabei ist es grundsätzlich unerheblich, ob das immobilisierte Glykan bakteriellen oder humanen Ursprungs ist. Je größer die Übereinstimmung der Glykanstruktur mit der Spezifität des Lektins, desto effektiver erfolgt die Inhibition der Adhäsion. Es sind Bindungsspezifitäten (Glykanmusterspezifitäten) der Adhäsine einiger Plaquebakterien beschrieben worden (94, 95, 161, 312, 319, 320, 466, 575). Für *S. mutans* ergeben sich bislang keine einheitlichen Ergebnisse (95, 123, 156, 161, 319). Möglicherweise ist die Ursache für die uneinheitlichen Ergebnisse darin zu suchen, dass die Bakterienoberfläche in ihrer Zusammensetzung nicht statisch ist. So besitzen die meisten Pathogene Gene für verschiedene Adhäsine, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Infektionsgeschehens exprimiert werden (418). Dies geschieht in Abhängigkeit von der Mikroumgebung (Temperatur, nutritive Faktoren etc.), also auch von den Kultivierungsbedingungen. Für *S. mutans* ist seine Saccharoseabhängigkeit der Adhärenz bekannt (359), was auf die Expression unterschiedlicher Glukosyltransferasen und saccharoseabhängiger Regulatorproteine zurückzuführen ist (235, 429). Für eine effektive antiadhäsive Therapie ist es daher notwendig, eine Substanz oder ein Substanzgemisch zu verwenden, das das Spektrum der Spezifitäten der Adhäsine eines Pathogens abdeckt (387, 418, 505, 506). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit bewusst keine einzelne strukturell charakterisierte Glykanstruktur eingesetzt, sondern ein heterogenes Glykangemisch verwendet, das durch Proteolyse eines Schweinemagenmuzins gewonnen wurde. Die Monosaccharidanalyse der Muzinglykane nach Proteolyse zeigte einen Anteil von etwa 60% Kohlenhydraten mit vorwiegend GalNAc und Gal in etwa gleichem Verhältnis, was die muzintypische Grundstruktur der O-Glykane bestätigt und die Grundlage für ein heterogenes

Glykangemisch nach weitreichendem enzymatischem Abbau des Proteingerüsts bildet. Das Gemisch zeigte gegenüber einem Oberflächenadhäsion des in dieser Studie verwendeten *S.-mutans*-Stammes eine antiadhäsive Wirkung (249), so dass es als potenziell karieshemmend eingestuft werden konnte. Tatsächlich zeigte sich in unserem In-vitro-Versuch in der künstlichen Mundhöhle, dass das heterogene Glykangemisch eine antikariogene Wirkung besaß, die sich in einer geringeren Läsionstiefenentwicklung gegenüber der Kontrollgruppe, die Wasser verabreicht bekam, ausdrückte. Zur Einordnung der Größe des Effektes in der gewählten Versuchsanordnung wurde als positive Kontrolle die karieshemmende Wirkung einer Fluoridlösung getestet, deren prinzipielle Wirkung durch Rattenexperimente belegt ist (181). Die Testung dieser Substanz diente damit gleichzeitig zur Validierung unseres Modells und zeigte, dass es zur Testung potenziell karieshemmender Substanzen geeignet ist. Wie bei einer Konzentration von 10 ppm Fluorid erwartet, war eine deutliche, fast vollständige Hemmung der Kariesentwicklung zu verzeichnen (592). Im Vergleich dazu scheint der Effekt des Glykangemisches in der gewählten Konzentration geringer ausgeprägt zu sein.

Obwohl die Vorversuche eine antiadhäsive Wirkung des Glykangemisches gegenüber *S. mutans* ergeben haben, liefern die Versuche in der künstlichen Mundhöhle streng genommen keinen direkten Beweis dafür, dass die karieshemmende Wirkung allein von einem antiadhäsiven Mechanismus ausgeht. Weitergehende Versuche, z. B. mit saliva coated hydroxyapatite (556, 557, 626), und Untersuchungen in einem reinen Demineralisations-Remineralisations-Modell (591) könnten zur Klärung dieser Frage beitragen.

## 6.5 Tierversuche

In der Kontrollgruppe 2 (Fluorid) war es mit der dem Trinkwasser zugesetzten Menge von 10 ppm Fluorid möglich, die Ausbildung von Karies sowohl im Bereich der Fissuren als auch im Bereich der approximalen Glattflächen gegenüber der Kontrollgruppe 1 (kein Zusatz) zu reduzieren, jedoch nicht vollständig zu inhibieren. Dies deckt sich mit den Ergebnissen des Experimentes in der künstlichen Mundhöhle und den Berichten aus der Literatur (181).

Der Glykanzusatz der Testgruppe 1 war bei Betrachtung aller kariösen Läsionen ebenfalls in der Lage, eine signifikante Kariesreduktion hervorzurufen. Allerdings lag

diese niedriger als bei der Kontrollgruppe 2 (Fluorid) und der Testgruppe 2 (Fluorid + Glykan). Bei alleiniger Betrachtung des Kariesbefalls der Fissuren konnte keine statistisch gesicherte Reduzierung des Kariesbefalls durch den Glykanzusatz festgestellt werden. Bei isolierter Betrachtung der approximalen Glattflächen war hingegen eine signifikante Kariesreduktion zu beobachten, die zudem keinen statistisch signifikanten Unterschied zu den beiden Fluoridgruppen erkennen ließ. Auch diese Ergebnisse bestätigen die Daten der Experimente innerhalb der künstlichen Mundhöhle.

Als Erklärung für die karieshemmende Wirkung kann eine antiadhäsive Wirkung der Glykanverbindung angenommen werden (siehe Kapitel 6.4; Diskussion der Karieshemmung durch Glykane in der künstlichen Mundhöhle). Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass eine antiadhäsive Wirkung gegenüber *S. mutans* eher an Glattflächen zu beobachten sein sollte als in den Fissuren. Fissuren stellen unabhängig vom Adhäsionsmechanismus ein aufgrund ihrer morphologischen Beschaffenheit natürliches Retentionsgebiet für Mikroorganismen und das für die Kariesentstehung notwendige Substrat dar. Eine Adhäsionsinhibition sollte sich zudem in einer Reduzierung des Plaquebefalls äußern. Tatsächlich war in der Glykangruppe die Tendenz einer leichten Plaquereduktion ( $p = 0,055$ ) gegenüber der Kontrollgruppe ohne Zusatz zu verzeichnen. Die gewählte Untersuchungsmethode zur Plaquebestimmung erlaubt jedoch keine Aussage über die Bakteriendichte, die Dicke und den Vitalitätszustand der Keime und damit über deren kariöses Potenzial innerhalb der Plaque (400). Außerdem konnten nicht alle Zähne in die Auswertung einbezogen werden, weil einige beim Herauspräparieren der Kiefer mit Blut in Kontakt kamen. Da sowohl ein Belassen des Blutes als auch eine Reinigung Einfluss auf die visuelle Beurteilung der Plaquemenge gehabt hätten, wurden die entsprechenden Kiefer nicht beurteilt. Insgesamt sollten daher die Ergebnisse der Plaquebeurteilung mit Zurückhaltung interpretiert werden.

Ein ähnlicher wie der von uns gewählte Ansatz, Karies durch die Gabe eines heterogenen Glykangemisches zu inhibieren, ohne damit eine einzige Adhäsionspezifität anzusprechen, wird von einer weiteren Forschergruppe verfolgt. Diese Gruppe setzt ein aus Moosbeersaft (cranberry juice) gewonnenes, so genanntes non-dialysable material (NDM) ein (462), das eine In-vitro-Antiadhäsivität gegenüber einer

Reihe verschiedener Bakterien, u. a. auch gegenüber *S. mutans*, aufweist (59, 60, 417, 627, 629, 655). NDM war in einer klinischen Studie in der Lage, die Konzentration von *S. mutans* im Speichel zu reduzieren; eine klinisch messbare Plaquerreduktion trat dabei jedoch nicht ein (555). In-vitro- oder In-vivo-Karieshemmversuche liegen bislang noch nicht vor.

Eine Kombination aus Fluorid und Glykan zeigte in der gewählten Versuchsanordnung keinen deutlichen synergistischen karieshemmenden oder plaquerreduzierenden Effekt, obwohl dies aufgrund der unterschiedlichen Wirkmechanismen beider Substanzen zu erwarten gewesen wäre. Falls ein synergistischer Effekt existiert, könnte dieser möglicherweise durch eine längere Versuchsdauer aufgedeckt werden, denn in beiden Gruppen entwickelten sich innerhalb des Versuchszeitraumes von acht Wochen im Grunde noch keine ausgeprägten Dentinläsionen (C-Läsionen). Deren Entwicklung könnte in einer der beiden Gruppen jedoch möglicherweise verzögert einsetzen. Eine längere Versuchsdauer wäre beim hier bewusst gewählten Versuchsdesign aus ethischen Gründen nicht zu vertreten gewesen, da insbesondere Tiere der Kontrollgruppe 1 (kein Zusatz) bereits massive konfluierende Zahnhartsubstanzzerstörungen aufwiesen.

Da sich unser biofilmbasiertes In-vitro-Modell neben dem Screening von Stoffbibliotheken auch zur Dosisfindung eignet, könnte eine Bearbeitung des oben beschriebenen Problems in der künstlichen Mundhöhle entsprechende Antworten liefern.

Trotz der diskutierten Einschränkungen stellen die Ergebnisse dieser Arbeit im Zusammenhang mit den Arbeiten anderer Autoren einen Schritt auf dem Weg der Entwicklung von Glykomimetika zur Infektionsprophylaxe dar (249, 250, 417-420, 561-565, 569-571). Möglicherweise eröffnet die Verwendung von Proteoglykangemischen die Möglichkeit der kostengünstigen Produktion ausreichender Mengen antiadhäsiver Substanzen, die zur Bekämpfung bakterieller Infektionen auch an anderer Stelle eingesetzt werden können. Dieser Ausblick gewinnt insbesondere vor dem Hintergrund zunehmender Resistenzen gegenüber Antibiotika an Bedeutung, da aufgrund des Wirkmechanismus rein antiadhäsiv wirkender Substanzen keine Resistenzbildungen zu erwarten sind (247, 418, 664).