

## 7 Übergreifende Diskussion

Trotz beachtlicher Präventionserfolge (346, 355, 356, 391, 441) ist Karies immer noch eine der am weitesten verbreiteten Erkrankungen. Der Kariesbefall beträgt bei den Erwachsenen in Deutschland beispielsweise etwa 99 % (491). Zur Beseitigung kariöser Läsionen und zur Behandlung ihrer Folgeschäden wurden in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2002 mehr als 10 Milliarden Euro aufgewendet (BMG 2002). Es liegt daher auf der Hand, mit der Weiter- und Neuentwicklung von Präventionsstrategien den bereits eingeschlagenen Weg fortzusetzen und Karies weiter zurückzudrängen.

Die tatsächliche Effektivität neuer Präventionsmaßnahmen kann streng genommen nur mit Hilfe klinisch kontrollierter Experimente am Menschen in seinem jeweiligen sozialen Umfeld ermittelt werden. Da streng kontrollierte Kariesexperimente, wie z. B. die klassischen Versuche zur Kariesbeeinflussung durch Ernährungsverhalten (185, 200, 486), aus ethischer Sicht heute nicht mehr durchführbar sind, zudem sehr lange dauern und die Teilnahme mehrerer hundert Teilnehmer erfordern, müssen verschiedene Kariesmodelle als Ersatz oder Screeningverfahren zur Identifizierung viel versprechender Präventivmaßnahmen angewendet werden.

In-situ-Experimente nutzen die Mundhöhle als natürliches Habitat zur Erzeugung initialer kariöser Läsionen, indem durch Schaffung von Retentionsstellen eine Plaqueanlagerung auf im Mund befindlichen Proben hervorgerufen und durch entsprechende Behandlung die Ausbildung initialer kariöser Läsionen forciert wird (71). In-situ-Modelle nehmen eine Zwischenstellung zwischen Labormodellen und klinischen Experimenten ein, lassen sich mit deutlich weniger Probanden durchführen als klinische Studien und sind daher weniger aufwändig und teuer (125, 421, 422, 548). Dies führt dazu, dass sich durch die Übersichtlichkeit des Versuches eine bessere Kontrolle der Probanden ergibt. Die Zahnproben stehen – anders als bei klinischen Versuchen – für eine histologische Aufbereitung zur Verfügung. Dadurch lassen sich auch kleinste Auswirkungen von Präventionsmaßnahmen auf die Zahnhartsubstanz (Grad der Demineralisation, Läsionstiefe usw.) herausarbeiten. Allerdings wird dies mit dem Nachteil erkauft, dass meist keine aussagekräftigen Zwischenuntersuchungen möglich sind. Unterschiede im Verhalten (Ernährung, Mundhygiene usw.) und die

unterschiedliche Ausprägung von Wirtsfaktoren (Speichel usw.) lassen sich bei In-situ-Experimenten nicht kontrollieren. Dies stellt jedoch ein generelles Problem aller In-vivo-Modelle dar. In-situ-Modelle werden häufig zum Screening der Wirksamkeit von Fluoridierungsmaßnahmen eingesetzt (71). Aus ethischer Sicht stößt jedoch auch das In-situ-Experiment an seine Grenzen, wenn es beispielsweise um die Evaluation von Substanzen geht, deren biologische Schädlichkeit noch nicht ausreichend geprüft ist.

Aufgrund des erheblichen Aufwandes und der ethischen Bedenken gegenüber Versuchen am Menschen müssen also neue Maßnahmen und Strategien an anderen Modellen erprobt werden. Das den Gegebenheiten des Menschen am nächsten kommende Modell wäre ein Tierversuch an Primaten. Neben der Tatsache, dass Experimente an Affen sehr aufwändig, langwierig und damit ebenfalls teuer sind, gibt es auch hierbei erhebliche ethische Bedenken, zur Erprobung von Maßnahmen gegen eine nicht lebensbedrohliche Erkrankung wie der Karies Affen als Versuchstiere heranzuziehen (305, 372, 620). Als etabliertes aussagekräftiges In-vivo-Kariesmodell gilt das Rattenexperiment (285). Die experimentelle Untersuchung erfolgt unter den Bedingungen der Mundhöhle, d. h., es sind z. B. die natürliche Bakterienflora, Speichel mit seiner natürlichen Zusammensetzung und den Benetzungseigenschaften sowie eine feucht-warme Umgebung vorhanden. Es lassen sich mit gewissen Einschränkungen alle vier ätiologischen Faktoren der Karies (Wirt, Substrat, Mikroorganismen, Zeit) abbilden. Die kariösen Läsionen der Rattenmolaren zeigen histologisch eine ausreichende Vergleichbarkeit zum Erscheinungsbild der menschlichen Karies und weisen die gleichen Prädilektionsstellen (Fissuren, Grübchen, approximale Flächen) auf (285). Die Kariesentwicklung vollzieht sich vergleichsweise schnell. Nach etwa zwei Monaten treten bei entsprechender saccharosereicher Diät und Besiedelung mit Plaquebakterien ausreichend viele Läsionen auf. Potenziell kariesinhibitorisch wirksame Substanzen können z. B. dem Trinkwasser bzw. der Nahrung zugesetzt werden. Auch individuelle Behandlungen, wie z. B. die Immunisierung einzelner Tiere, sind durchführbar. Aufgrund der geringen Größe der Rattenmolaren sind jedoch Versuche mit Füllungswerkstoffen kaum möglich und wenig aussagekräftig. Maßnahmen, die mit Mundhygienemaßnahmen zusammenhängen, lassen sich wegen des fehlenden Mundhygieneverhaltens bei Tieren ebenfalls nur eingeschränkt simulieren (616). Wie bei den In-situ-Experimenten ist wegen der

histologischen Aufbereitung der Kiefer ein Abbruch des Experimentes zur Kariesdiagnostik erforderlich.

Insgesamt sind die Ergebnisse aus Rattenexperimenten nicht direkt auf den Menschen übertragbar, da sich z. B. das Immunsystem von dem des Menschen unterscheidet. Das Ausmaß der Wechselwirkung zwischen den oralen Keimen wird durch die Tatsache beeinflusst, dass Ratten Coprophagen sind und ca. 35 % ihrer Faeces recyceln (285). Der Grad an Kontrollierbarkeit ist im Rattenexperiment jedoch höher als bei Versuchen am Menschen. Durch die Verwendung von Tieren eines Wurfs lassen sich genetische Einflüsse weitestgehend kontrollieren, und es ist möglich, spezifisch pathogenfreie Tiere (SPF) zu verwenden. Ein weitergehendes Maß der Kontrolle bieten – wie im Rahmen dieser Arbeit angewendet – die gnotobiotischen Modelle, bei denen keimfrei aufgezogene Tiere mit bekannten Keimen infiziert werden. Diese Experimente erlauben zwar ein hohes Maß an Standardisierung, sind aber sehr aufwändig und kostenintensiv (136, 431).

Damit ist das Rattenexperiment trotz aller Einschränkungen ein etabliertes, aussagekräftiges Verfahren der Kariesforschung. So werden fortlaufend Untersuchungen z. B. zur Immunisierung und Antiadhäsion, zur Kariogenität von Nahrungsmitteln und Nahrungszusätzen, zu potenziell plaquehemmenden und remineralisierend wirkenden Substanzen in Oralprophylaktika durchgeführt (89, 124, 172, 174, 193, 252, 384, 399, 430, 437, 439, 446, 544, 567, 579, 602, 654). Die hohen ethischen Anforderungen, insbesondere für die Testung von Kosmetikprodukten wie z. B. Zahnpasten, machen es unumgänglich, in vorausgeschalteten In-vitro-Experimenten aussichtsreiche Strategien zu identifizieren und zu optimieren, um den Einsatz von Tierversuchen und Studien an Menschen auf das absolut notwendige Mindestmaß zu beschränken.

Im Bereich der In-vitro-Kariesforschung verfügt man prinzipiell über zwei Möglichkeiten zur Erzeugung kariesähnlicher Läsionen: 1. rein chemische Modelle, in denen direkt Säuren eingesetzt werden, um die Zahnhartsubstanzen zu demineralisieren, und 2. bakterielle Systeme, in denen die zur Demineralisation führenden Säuren durch bakterielle Stoffwechselforgänge erzeugt werden. Erstere sind einfach und günstig, beschränken sich jedoch auf die Erforschung rein physikochemischer Faktoren, also Faktoren, die die De- und Remineralisationsvorgänge beeinflussen (21,

263, 264, 269, 286, 337, 526, 590). Die bakteriellen Modelle sind komplexer und erlauben neben der Erforschung der physikochemischen Parameter eine Erweiterung um die biologischen Faktoren. So genannte künstliche Mundhöhlen zielen darauf ab, die ätiologischen Faktoren „Wirt“, „Mikroorganismen“, „Substrat“ und „Zeit“ experimentell abzubilden [Übersicht bei (578) und (335)]. Der wichtigste Vorteil dieser Modelle gegenüber den In-vivo-Modellen ist das hohe Maß an Kontrollierbarkeit, da – je nach Konstruktionsprinzip – der Zutritt sämtlicher Medien und Umgebungsparameter, wie z. B. der Temperatur, streng kontrolliert werden kann. Je nach Fragestellung lassen sich biochemische Vorgänge, wie Säureproduktion und Mineralstoffkonzentration, zerstörungsfrei messen (536, 538). Anders als bei In-vitro-Modellen, die das Verhalten von Mikroorganismen in Suspensionen beurteilen (112), zielen künstliche Mundhöhlen darauf ab, einen Biofilm (künstliche Plaque) zu produzieren. Ein bakterieller Biofilm unterscheidet sich maßgeblich von in Flüssigkultur befindlichen Mikroorganismen und wird hinsichtlich seiner komplexen Organisationsstruktur mit einem mehrzelligen Organismus verglichen (75, 76). Biofilme zeigen eine gewisse Form der Kommunikation mit Hilfe von Signalmolekülen (84, 87, 435) und besitzen eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen als die gleichen Bakterien im planktonischen Zustand (163). Zur Untersuchung bakterieller Adhäsionsvorgänge und der Mechanismen, die zur Bildung eines komplexen, aus mehreren Arten bestehenden Biofilms führen, werden flow cells (41, 67, 301) oder modifizierte Chemostaten (43, 46, 206) eingesetzt. Diese Versuchsanordnungen erlauben in der Regel jedoch keine längere Versuchsdauer und eignen sich daher nicht zur Erzeugung kariesähnlicher Läsionen.

Von *Fontana et al.* (139) wurden verschiedene Anforderungen an In-vitro-Kariesmodelle diskutiert. Alle Komponenten sollten leicht sterilisierbar und unter sterilen Bedingungen manipulierbar sein. Die Probenkörper sollten leicht zugänglich sein, die Experimente sollten reproduzierbare Ergebnisse liefern und die oralen Begebenheiten dabei optimal simulieren (139).

Aktuelle Modelle künstlicher Mundhöhlen, die in Abhängigkeit von ihrer Konstruktion zur Untersuchung bakterieller Anhaftung oder Wechselwirkung bakterieller Stoffwechselforgänge verwendet werden, eignen sich prinzipiell auch zur Erzeugung kariesähnlicher Läsionen (96, 138, 139, 180, 488, 501, 503, 517, 535, 537). Im Detail

weisen sie erhebliche Unterschiede auf, lassen sich aber nach der Versorgung des Biofilms über Tropfspitzen (dripping technique) oder in Form einer Kulturbadtechnik (culture bath technique) unterteilen. Die Versorgung der künstlichen Plaque durch Betropfung (96, 335, 488, 501, 537) anstelle der Verwendung einer Kulturbadtechnik (139, 180) bietet einige Vorteile. So kann die Gasatmosphäre sehr gut kontrolliert und den Gegebenheiten in der Mundhöhle nachempfunden werden. Das Verhältnis der Mediummenge zur Probe entspricht eher den realen Bedingungen. Zudem können die Proben bei Bedarf individuell ohne großen Aufwand versorgt oder behandelt werden. Da es sich bei der Mundhöhle nicht um ein streng anaerobes Habitat handelt und es in anderen Systemen möglich war, *S.-mutans*-Biofilme unter aeroben (98, 411) wie anaeroben (489) Verhältnissen zu erzeugen, wurde von uns kommerziell erwerbliche synthetische Luft mit einem CO<sub>2</sub>-Anteil von 5 % verwendet.

Alle modernen Apparaturen erfüllen die Forderung nach der Sterilisierbarkeit und der Aufrechterhaltung dieses Zustandes bzw. eines kontrolliert kontaminierten Zustandes. Gerade die Erfüllung dieser Forderung, die für das Gelingen eines Versuches eine *conditio sine qua non* darstellt, ist jedoch besonders schwierig und nur unter hohem Aufwand und besonderer Sorgfalt zu bewerkstelligen. In der Literatur wird daher immer wieder von der Gefahr einer Fremdkontamination durch z. B. *Staphylococcus spp.* berichtet (335, 578). Zur Reduzierung dieser Gefahr bietet das von uns entwickelte System einen besonderen Ansatz, da durch die Integration des Reaktionsgefäßes in den Isolator erstmals ein robuster Kontaminationsschutz implementiert wurde. Zudem bot die Konstruktion die einmalige Möglichkeit, die Zahnproben während des laufenden Versuches zu manipulieren und mehrere Versuchsreihen ohne Unterbrechung durchzuführen. Auf diese Weise war es möglich, sehr lange Beobachtungszeiten unter kontrollierten Bedingungen mit vergleichsweise geringem Aufwand zu realisieren. Die Wartungsarbeiten während des laufenden Betriebes bestanden lediglich aus dem Wechsel von Mediumflaschen und der gelegentlichen Entleerung des Abfallgefäßes. Für die meisten in der Literatur beschriebenen künstlichen Mundhöhlen wird eine sehr begrenzte Anzahl an Probenkörpern pro Versuchsdurchlauf angegeben (139, 411, 488). Durch die Verwendung eines Probenrades war es möglich, bis zu 60 Proben gleichzeitig zu inkubieren. Obwohl der constant depth film fermentor (CDFF) erlaubt, eine ähnlich große Anzahl an Proben zu beherbergen, und ebenfalls über ein Probenrad verfügt,

ermöglicht seine Konstruktion nicht, mit ganzen Zahnproben zu arbeiten, was die Verwendbarkeit für bestimmte Fragestellungen, bei denen es z. B. um die Testung von Füllungswerkstoffen geht, einschränkt (96). In unserem Modell ist die Verwendung ganzer Zahnproben problemlos möglich. Aktuell in Durchführung befindliche Versuche arbeiten sogar mit 120 Proben. Zwar bietet die Verwendung ganzer Zähne die Möglichkeit, auch Füllungswerkstoffe, wie in vivo appliziert, zu untersuchen, birgt jedoch einen Nachteil. Durch interindividuelle strukturelle Unterschiede der Zahnhartsubstanzen können größere Variabilitäten der Läsionsausprägung zustande kommen, als dies zu erwarten wäre, wenn aus einem Zahn mehrere Proben zur Verteilung auf die Versuchsgruppen gewonnen werden. Trotz dieses Nachteils lieferte unser System in aufeinander folgenden Experimenten an verschiedenen ganzen Zahnproben reproduzierbare Läsionstiefen, die keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Durchläufen oder der Platzierung auf dem Probenrad erkennen ließen. Die von *Fontana et al.* (139) beschriebene Forderung nach Reproduzierbarkeit ließ sich daher ebenfalls voll erfüllen.

Prinzipiell eröffnet das von uns entwickelte Modell die Bearbeitung eines weiten Spektrums möglicher Fragestellungen, die bei der Ausbildung kariöser Läsionen eine Rolle spielen. Neben Fragestellungen, die denen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ähneln, wäre es möglich, die Kariogenität verschiedener Nahrungsbestandteile zu untersuchen. Außerdem bietet sich durch die besondere Konstruktion erstmals die Gelegenheit, Präventionsmaßnahmen, die eine direkte chemische oder mechanische Probenmanipulation während des laufenden Versuches erfordern, in einer realitätsnahen Weise zu untersuchen. Untersuchungen an komplexen Biofilmen, die aus mehr als einem Keim bestehen (180, 535), wären prinzipiell ebenfalls möglich, erschienen zur Bearbeitung der bisherigen Fragestellungen jedoch nicht nötig. In allen bislang von uns durchgeführten Versuchen wurde zur Simulation des Speichels künstlicher Speichel verwendet. Falls es aufgrund der Fragestellung nötig sein sollte, komplexer aufgebaute Lösungen, wie pasteurisierten natürlichen Speichel, zu verwenden, wäre dies aus konstruktionstechnischer Sicht problemlos umsetzbar (489).

Ein Nachteil unseres Systems ist, dass eine ausführliche Einweisung des Personals (Operatoren) erfolgen muss, um einen störungsfreien Versuchsablauf ohne Fremd-

kontamination zu gewährleisten. Auch das Hantieren innerhalb des Isolators mit Hilfe der Gummihandschuhe erfordert ein gewisses Training.

## 7.1 Schlussfolgerungen

Mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten In-vitro-Kariesmodells war es möglich, einen plaqueähnlichen Biofilm zu kultivieren, der bei entsprechender Substratversorgung die Erzeugung kariesähnlicher Läsionen im Zahnschmelz von ganzen Zahnproben sowie die Erzeugung sekundärkariesähnlicher Läsionen an Füllungsrandspalten erlaubte. Der Vergleich verschieden vorbehandelter Zahnproben und die Testung unterschiedlicher Behandlungen während des laufenden Betriebes waren möglich.

Die karieshemmenden Eigenschaften etablierter Verfahren, wie der Fluoridierung und der Versiegelung von Zahnoberflächen mit Kompositmaterialien, konnten innerhalb des In-vitro-Modells reproduzierbar nachgestellt werden.

Die Untersuchung ausgewählter experimenteller kariespräventiver Maßnahmen ergab, 1., dass bislang verfügbare selbstätzende Adhäsivsysteme zur Fissurenversiegelung bei alleiniger Anwendung nicht geeignet erscheinen,

2., dass ein selbstätzendes Adhäsivsystem als Fissurenversiegler gegenüber konventionellen Fissurenversiegler auch auf speichelkontaminiertem Zahnschmelz zu keiner besseren Karieshemmung führt,

3., dass eine adhäsiv applizierte Kompositfolie zu einer vollständigen Karieshemmung der versiegelten Flächen führt und

4., dass eine experimentelle Glykanlösung mit antiadhäsiven Eigenschaften gegenüber *S. mutans* eine kariesprotektive Wirkung besitzt, die sich in einem Experiment an gnotobiotischen mit *S. mutans* infizierten Ratten verifizieren ließ.

Aufgrund der Reproduzierbarkeit, der Sicherung des Langzeitbetriebs ohne Fremdkontamination und der Möglichkeit der Manipulierbarkeit der Proben während des laufenden Betriebs erscheint das In-vitro-Modell geeignet, ein breites Spektrum an Fragestellungen zur Weiter- und Neuentwicklung kariespräventiver Strategien zu bearbeiten. Somit kann es einen Beitrag leisten, im Rahmen der Kariesforschung notwendige Tierversuche und klinische Experimente auf ein absolut notwendiges Mindestmaß zu reduzieren.

