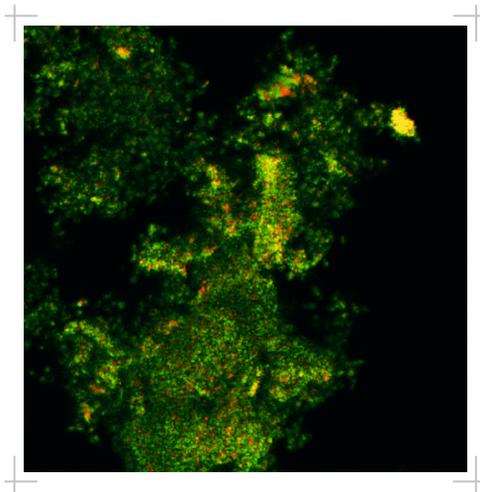


STEFANIE AMEND

Ein zwei-Spezies-biofilmbasiertes
Kariesmodell zur Erzeugung artifiziereller
Sekundärkaries *in vitro*



INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Ein zwei-Spezies-biofilmbasiertes Kariesmodell zur Erzeugung artifizierlicher Sekundärkaries *in vitro*

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Stefanie Amend

aus Gießen

Gießen 2016

Aus dem Medizinischen Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

Poliklinik für Kinderzahnheilkunde

Direktor: Prof. Dr. Dr. Norbert Krämer

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Norbert Krämer

Gutachter: PD Dr. Peter Rehmann

Tag der Disputation: 02.02.2017

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	Mikrobiologie der Mundhöhle.....	2
2.1.1	Orale Residentmikrobiota.....	2
2.1.2	Dentale Plaque	4
2.1.3	Plaqueshypthesen	7
2.1.4	Mikrobiologische Aspekte der Karies.....	8
2.2	Sekundärkaries	12
2.2.1	Definition und Ätiologie der Sekundärkaries.....	12
2.2.2	Klinische Diagnostik sekundärkariöser Läsionen.....	13
2.2.3	Lokalisation der Sekundärkaries	15
2.2.4	Histopathologie der Sekundärkaries.....	16
2.2.5	Mikrobiologische Aspekte der Sekundärkaries	18
2.3	Mikrobiologische Modelle in der Kariesforschung.....	19
2.3.1	Labormodelle – Artifizielle Mundhöhlen.....	20
2.3.2	Sekundärkariesforschung in artifiziiellen Mundhöhlen.....	22
2.3.3	Tierversuche, humane <i>In-situ</i> - und <i>In-vivo</i> -Studien	25
3	ZIEL DER ARBEIT UND NULLHYPOTHESEN	28
4	MATERIAL UND METHODE	29
4.1	Zahnproben.....	29
4.1.1	Probenauswahl und -lagerung	29
4.1.2	Kavitätendesign	29
4.1.3	Verwendete Restaurationsmaterialien und deren Verarbeitung.....	30
4.1.4	Inkubation	33

4.1.5	Thermozyklische Belastung	33
4.1.6	Weitere vorbereitende Maßnahmen	33
4.1.7	Abformung und Modellherstellung	34
4.2	Artifizielle Mundhöhle: Das biofilmbasierte Kariesmodell	35
4.2.1	Bestandteile des Kariesmodells	35
4.3	Verwendete Flüssigmedien	40
4.3.1	Nährmedium	40
4.3.2	Artifizieller Speichel	41
4.4	Bakterien	42
4.4.1	Erstellung einer Wachstumskurve von <i>L. casei</i> (DSM Nr.: 20021)	42
4.4.2	Anzüchtung von <i>L. casei</i> zur Beimpfung des Kariesmodells	42
4.4.3	Anzüchtung von <i>S. mutans</i> zur Beimpfung des Kariesmodells	43
4.4.4	Vorversuch mit <i>L. casei</i> im Kariesmodell	45
4.4.5	Vorversuch mit <i>L. casei</i> und <i>S. mutans</i> im Kariesmodell	45
4.4.6	Visuelle Darstellung des Biofilms	46
4.5	Funktionsweise des Kariesmodells	47
4.5.1	Funktionsweise	47
4.5.2	pH-Wertmessung	48
4.6	Durchführung der Versuche	49
4.6.1	Vorbereitung des Kariesmodells	49
4.6.2	Versuchsdurchführung	49
4.6.3	Desinfektion und Sägen der Zahnproben	49
4.6.4	Nachbereitung des Kariesmodells	49
4.6.5	Keimzahlbestimmung und Reinheitskontrolle	50
4.7	Versuchsanalyse	51
4.7.1	Fluoreszenzmikroskopische Analyse	51
4.7.2	Rasterelektronenmikroskopische Analyse	52

4.7.3	Quantitative Randspaltanalyse	53
4.8	Statistische Analyse	54
5	ERGEBNISSE	55
5.1	Vorversuche	55
5.2	Hauptversuche	56
5.3	Fluoreszenzmikroskopische Ergebnisse.....	58
5.3.1	Vergleich der Restaurationsmaterialien hinsichtlich der Demineralisationstiefen	58
5.3.2	Vergleich der Restaurationsmaterialien hinsichtlich des Substanzverlustes durch Demineralisation	59
5.3.3	Vergleich der Restaurationsmaterialien hinsichtlich der Gesamtdemineralisation.....	60
5.3.4	Vergleich der Restaurationsmaterialien hinsichtlich der Randspaltbreite...	62
5.3.5	Vergleich der Gesamtdemineralisationstiefen in Abhängigkeit von der Lage des Messpunktes	62
5.4	Quantitative Randspaltanalyse	66
6	DISKUSSION	70
6.1	Diskussion von Material und Methode	70
6.1.1	Zahnproben.....	70
6.1.2	Restaurationsmaterialien und deren Verarbeitung	72
6.1.3	Inkubation und thermozyklische Belastung	73
6.1.4	Biofilmbasiertes Kariesmodell	74
6.1.5	Replikaherstellung.....	79
6.2	Diskussion der Ergebnisse	79
6.2.1	Diskussion der mikrobiologischen Ergebnisse.....	79
6.2.2	Diskussion der fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse	81

6.2.3	Diskussion der quantitativen Randspaltanalyse	85
6.2.4	Vergleich mit artifiziellen Mundhöhlen zur Sekundärkariesforschung	86
6.3	Diskussion der Nullhypothesen	90
6.3.1	Nullhypothese 1	90
6.3.2	Nullhypothese 2	91
6.3.3	Nullhypothese 3	91
6.4	Schlussfolgerung.....	95
7	ZUSAMMENFASSUNG	97
7.1	Zusammenfassung.....	97
7.2	Summary.....	99
8	LITERATURVERZEICHNIS	101
9	ANHANG	114
9.1	Abkürzungsverzeichnis.....	114
9.2	Abbildungsverzeichnis.....	117
9.3	Tabellenverzeichnis.....	122
9.4	Publikationsverzeichnis	125
10	ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	126
11	DANKSAGUNG	127

1 Einleitung

Die menschliche Mundhöhle bildet ein mikrobiologisches Habitat [90], in der aufgrund der gegebenen ökologischen Bedingungen eine Vielzahl an Mikroorganismen, welche als orale Residentmikrobiota bezeichnet wird, überlebt [1,90,91]. Auf den Zahnoberflächen bildet sich eine mikrobielle Gemeinschaft, die in eine Matrix aus Polymeren eingebettet ist – die dentale Plaque [88,89,91]. In der mikrobiellen Homöostase bleibt die Stabilität des Biofilms trotz ständig wechselnder Umgebungsbedingungen erhalten [85,87,90]. Bei anhaltender Änderung der Umgebungseinflüsse, beispielsweise durch häufige Zufuhr niedermolekularer Kohlenhydrate, kommt es zur Störung des dynamischen Gleichgewichtes mit zunehmender Selektion der säurebildenden und säuretoleranten Bakterien [11,17,40,44,87,88,135,141]. Als bedeutende Pathogene in der Kariesätiologie gelten hierbei *S. mutans* und *Lactobacillus* spp. aufgrund ihrer Fähigkeit zur Säurebildung und Säuretoleranz [17,90,135]. Durch die Zunahme potenziell pathogener Mikroorganismen innerhalb der dentalen Plaque können Erkrankungen, wie Karies und Parodontalerkrankungen, hervorgerufen werden [17,85,91].

Allgemein wird das Auftreten von Karies im Restaurationsrandbereich als „Sekundärkaries“ bezeichnet [53]. Auch hier scheinen *S. mutans* und *Lactobacillus* spp. ätiologisch bedeutsam, da eine erhöhte Anzahl koloniebildender Einheiten dieser beiden Bakterienpezies aus sekundärkariösen Läsionen isolierbar ist [63,65,66]. In zahnärztlichen Praxen nimmt die Diagnose „Sekundärkaries“ mit anschließender Therapie eine wichtige Rolle ein [98], wodurch aus wirtschaftlicher Sicht jährlich hohe Kosten entstehen [98]. Aus diesem Grund sind weitere Untersuchungen über die Sekundärkaries und die Etablierung alternativer Therapieansätze von Bedeutung [98].

Artifizielle Mundhöhlen als *In-vitro*-Modelle eignen sich je nach Design sowohl zur Primärkariesforschung [32,112,113,118,137] als auch zur Sekundärkariesforschung [7,30,41,42,72,117,122,123]. In der Sekundärkariesforschung bieten sie die Möglichkeit, reproduzierbar artifizielle sekundärkariöse Läsionen unter kontrollierten Bedingungen zu erzeugen [117] und Materialien beispielsweise bezüglich ihrer kariesprotektiven Eigenschaften zu erforschen [72]. Des Weiteren gibt es eine Vielzahl neuer Materialien, die, unter anderem aus ethischen Gründen [137], zunächst im Rahmen von *In-vitro*-Studien hinsichtlich ihrer Qualität zu beurteilen sind [123]. Vielversprechende Materialien oder potenziell kariespräventiv wirksame Agenzien können dann in folgenden *In-situ*- und *In-vivo*-Studien genauer untersucht werden [86]. Somit eignen sich artifizielle Mundhöhlen vor allem im Rahmen von Voruntersuchungen *in vitro* [86].

2 Literaturübersicht

2.1 Mikrobiologie der Mundhöhle

2.1.1 Orale Residentmikrobiota

Der menschliche Körper besteht aus mehr als $\sim 10^{14}$ Zellen, davon sind $\sim 10\%$ von Säugetierherkunft [87,90]. Den Hauptteil bilden die Mikroorganismen der residenten Mikrobiota, die sämtliche der Umgebung exponierten Körperoberflächen besiedeln und deren metabolische Kapazität der einer menschlichen Leber entspricht [90,91]. Die Mundhöhle als Teil des Oropharynx gilt aus ökologischer Sicht als „open growth system“, in welchem sie unentwegt sowohl der Zufuhr als auch dem Abtransport von Nährstoffen und Mikroorganismen ausgesetzt ist. Aus diesem Grund müssen Bakterien an Hart- oder Weichgeweben anhaften, um im oropharyngealen Bereich zu überleben [139]. Im Allgemeinen handelt es sich bei den Vorgängen der Bioadhäsion und der Biofilmentstehung um ubiquitär vorkommende Phänomene an verschiedenen festen Oberflächen, wie beispielsweise an Zähnen oder Kontaktlinsen [50,78,100].

Die Mundhöhle bildet ein mikrobiologisches Habitat, in dem die Zähne, die Zunge, der Gaumen, die Lippen und die Wangen als mikrobielle Lebensräume dienen und entsprechend ihrer biologischen Charakteristika von bestimmten Mikroorganismen besiedelt werden [90]. Die residente orale Mikrobiota ist durch einen Reichtum und eine Vielfalt von Mikroorganismen gekennzeichnet, von denen bisher etwa 700 Spezies oder Phänotypen identifiziert werden konnten [1,91]. Eine Pyrosequenzierung der oralen Mikrobiota gesunder Erwachsener lieferte Hinweise auf ein Vorhandensein von Tausenden unterschiedlichen Phänotypen im Speichel und in der Plaque [58,91]. Die orale Residentmikrobiota setzt sich aus einer Vielfalt grampositiver und gramnegativer Bakterien, inklusive fakultativer und obligater Anaerobier, zusammen (s. Tabelle 1, S. 3) [89]. Des Weiteren finden sich dort Pilze, Mykoplasmen, Viren und mitunter auch Protozoen [90]. Die Zusammensetzung des oralen Biofilms variiert interindividuell und auch intraindividuell lassen sich Unterschiede an verschiedenen Entnahmestellen (Zunge, Gaumen, supragingivale oder subgingivale Plaque *etc.*) feststellen [1,91].

Wirtseigene Proteine, Glykoproteine, Aminosäuren, Vitamine und Gase aus dem Speichel und dem Sulkusfluid dienen in erster Linie als Nährstoffe der residenten Mikrobiota, während die Ernährung des Wirtes als Nährstoffquelle eine geringe Rolle spielt [89–91]. Zur Verstoffwechslung der komplexen Wirtsmoleküle ist das Zusammenarbeiten mehrerer Bakterien nötig [90,91]. Neben der Verfügbarkeit von Nährstoffen beeinflusst

sen die Temperatur, der pH-Wert und der Sauerstoffgehalt das Wachstum der Bakterien. Auch wenn in der Mundhöhle aerobe Bedingungen herrschen, handelt es sich bei der Mehrheit der Mikroorganismen um fakultative und obligate Anaerobier [90,91]. Durch die frühen Kolonisierer, die vornehmlich aerob oder fakultativ anaerob sind, wird der Sauerstoff verbraucht und durch Freisetzung von Gasen (z. B. CO₂) sowie Abbauprodukten wird das Redoxpotential in der dentalen Plaque gesenkt, sodass ein Wachstum obligater Anaerobier ermöglicht wird [87,90,91]. Ein neutraler pH-Wert ist wichtig für das Wachstum vieler Bakterien. Dieser wird durch den Gesamtspeichel der großen und kleinen Speicheldrüsen mit einem mittleren pH-Wert von 6,75 – 7,25 im nicht stimulierten Zustand aufrechterhalten [87,90,91].

Tabelle 1: Bakterien der Mundhöhle nach Marsh und Martin (2003) [90].

	Grampositiv	Gramnegativ
Kokken	<i>Abiotrophia</i> <i>Enterococcus</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Staphylococcus</i>	<i>Moraxella</i> <i>Neisseria</i> <i>Veillonella</i>
Stäbchen	<i>Actinomyces</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Eubacterium</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Pseudoramibacter</i> <i>Rothia</i>	<i>Actinobacillus</i> (<i>Bacteroides</i> ; Neudefinierung dieser Gattung) <i>Campylobacter</i> <i>Capnocytophaga</i> <i>Catonella</i> <i>Centipeda</i> <i>Desulfovibrio</i> <i>Desulfobacter</i> <i>Eikenella</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Haemophilus</i> <i>Johnsonella</i> <i>Leptotrichia</i> <i>Porphyromonas</i> <i>Prevotella</i> <i>Selemonas</i> <i>Simonsiella</i> <i>Treponema</i> <i>Wolinella</i>

2.1.2 Dentale Plaque

Die dentale Plaque, ein multi-Spezies-Biofilm [22,87], entwickelt sich definitionsgemäß auf den Zahnoberflächen. Es handelt sich um eine mikrobielle Gemeinschaft, die in eine Matrix aus Polymeren eingebettet ist, welche bakterieller Herkunft sind oder aus dem Speichel stammen [88,89,91]. Die Matrix eines Biofilms bildet einen dynamischen Lebensraum, in dem die Mikroorganismen, optimal organisiert, sämtliche verfügbare Nährstoffe nutzen und eine Homöostase erreichen [131]. Zu den wichtigsten Bestandteilen der Matrix mit mikrobieller Herkunft zählen extrazelluläre Polysaccharide und Proteine [14]. Insbesondere die extrazellulären Polysaccharide stellen Pathogenitätsfaktoren der Plaque dar [89]. Die Matrix als wichtiger Bestandteil des Biofilms trägt zur strukturellen Integrität und zur Toleranz gegenüber Umweltfaktoren bei [14,91]. Aufnahmen mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop zur Untersuchung der Biofilmarchitektur zeigen eine heterogene Struktur mit Kanälen und Poren [88]. Nach Anfärbung des Biofilms mit Fluorescein und Anfertigung von Fluoreszenzaufnahmen mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm erscheinen die Poren flüssigkeitsgefüllt [153]. Die Kanäle und Poren vereinfachen den Transport von Molekülen in die Tiefen des Biofilms [24]. So ist bei Exposition des Biofilms mit NaF (1000 ppm) eine Penetration von Fluoridionen in die Plaque feststellbar, wobei die Penetrationstiefe von der Einwirkdauer des fluoridhaltigen Präparates abhängt [149].

Anders als bei den von Mukosa ausgekleideten Oberflächen der Mundhöhle, bei denen die physiologische Desquamation die Bakterienakkumulation limitiert, haben die Zähne nicht abschilfernde Oberflächen, auf denen sich große Mengen von Bakterien ansammeln können [34,80,87,89,90,139]. Die Plaque kann sich sowohl supra- als auch subgingival bilden [89,90]. Supragingival entsteht sie vor allem an habituell unsauberen Zahnoberflächen, wie den Grübchen und Fissuren der Okklusalfächen, in Approximalebereichen, in gingivalen Regionen der Zähne sowie auf exponierten Wurzeloberflächen [53]. Der Entstehungsprozess der Plaque läuft dabei in Phasen ab [53,88,89,91]:

Pellikelbildung: Die Speichelproteine haften an einer gesäuberten Zahnoberfläche aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen an den Kalzium- und Phosphatgruppen der Apatitkristalle [53]. Diese 0,1 – 1 µm dicke, proteinhaltige Deckschicht auf den Zahnoberflächen, auch „acquired pellicle“, erworbenes Pellikel oder sekundäres Zahnoberhäutchen genannt, vermittelt die Interaktionen zwischen den Festkörpern, den oralen Flüssigkeiten und den Mikroorganismen [50,53,90]. Neben den Speichelproteinen und -glykoproteinen finden sich auch Lipide und Glykolipide aus dem Speichel, weitere Wirtsmoleküle und Moleküle bakterieller Herkunft in dem erworbenen Pellikel [70,87,89,90]. Die dadurch veränderten Oberflächeneigenschaften ermöglichen

die Interaktion der Bakterien mit den anhaftenden Molekülen [91,100] und somit bildet das erworbene Pellicel die Voraussetzung für die Entstehung des Biofilms [89,90].

Reversible Adhäsion: Durch den Speichel und die Sulkusflüssigkeit werden die Mikroorganismen passiv zur Zahnoberfläche transportiert und haften durch schwache, weitreichende physikalisch-chemische Wechselwirkungen zwischen den Ladungen der Moleküle des erworbenen Pellicels und der Bakterienoberfläche [18,87–89,91].

Irreversible Adhäsion: Es entstehen starke, über geringe Distanzen wirksame Bindungen zwischen den Adhäsinen (z. B. Antigen-I / II-Familie der Polypeptide, Glukosyltransferasen und Lipoteichonsäure) auf der Zelloberfläche der Mikroorganismen und den Rezeptoren (z. B. saure prolinreiche Proteine und Statherin) in dem erworbenen Pellicel [87–91,150].

Koadhäsion: Die mikrobielle Vielfalt steigt durch Koadhäsion von sekundären und späten Kolonisierern, die ebenfalls über Adhäsine an bereits anhaftende Mikroorganismen binden [22,87,89,91,100].

Vermehrung der Mikroorganismen: In der Folge vermehren sich die Mikroorganismen des Biofilms durch Teilung und Akkumulation weiterer Bakterien [18,33,34,53,88,89,91]. Sie synthetisieren extrazelluläre Polymere, welche die Matrix des Biofilms bilden. Durch die Produktion der extrazellulären Matrix reift der Biofilm und erhält die finale Architektur [14,91]. Die Mikroorganismen sind zusätzlich in der Lage sich von dem Biofilm zu lösen [24,88,91,100].

Nach etwa zwei bis vier Stunden kann man auf der pellicelbedeckten Zahnoberfläche mikroskopisch einzelne Zellen grampositiver Kokken und wenige stäbchenförmige Bakterien sehen, die durch schnelle Zellteilung Mikrokolonien bilden und zu einem konfluierenden Film variabler Dicke verschmelzen [79,89]. Zu den frühen Kolonisierern, welche die gereinigte Zahnoberfläche besiedeln, gehören Nicht-Mutans-Streptokokken, wie *S. sanguinis*, *S. mitis* 1 und *S. oralis* [29,53,70,105,106,134,135,158], sowie Aktinomyzeten [34,53,70,76,105,135,158]. Unabhängig von der Kariesaktivität des Individuums beträgt der Anteil von Mutans-Streptokokken (*S. mutans* Serotyp c) an der Gesamtzahl der Streptokokken in der initialen Mikrobiota maximal 2 % [106,134,135]. Die intragenerische Koaggregation der Streptokokken über lektinähnliche Adhäsine einer Zelloberfläche und den dazu passenden Rezeptorpolysacchariden auf einer anderen Zelloberfläche sowie die intergenerische Koaggregation mit weiteren Bakterienspezies wie Veillonellen treten in den frühesten Stadien der Plaqueentstehung auf und binden die Bakterien zur Bildung einer funktionellen Einheit aneinander [22]. Nach einigen Tagen der Plaquebildung erhöht sich die kulturelle und morphologische Vielfalt der

Bakterien [79]. Die Anzahl der Aktinomyzeten in der vormals von Streptokokken dominierten Flora steigt [89,133–135,144,158]. Die Plaque einer Zahnglattfläche besteht hauptsächlich aus Streptokokken [135] und Aktinomyzeten [154,155], wobei der Anteil an Mutans-Streptokokken gering ist [135]. Mit zunehmender Reifung des Biofilms ändert sich dessen Zusammensetzung; während zu Beginn grampositive Kokken (*Streptococcus* spp.) und Stäbchen (*Actinomyces* spp.) dominieren, steigt mit zunehmendem Alter der Plaque die Anzahl gramnegativer Spezies (*Veillonella* spp., *Fusobacterium* spp., *Capnocytophaga* spp., *Bacteroides* spp.) [133,144,158].

Die Plaque besteht zu 80 - 90 Gew.-% aus Wasser, die Trockenmasse zu 70 Gew.-% aus Bakterien. Die verbleibenden 30 Gew.-% bildet die extrazelluläre Matrix aus Glykoproteinen, anderen Speichelproteinen und Polysacchariden [89].

Das Leben der Mikroorganismen innerhalb eines Biofilms hat zum einen verschiedene Auswirkungen auf die Mikroorganismen, zum anderen auf den Wirt. Der Phänotyp der Bakterien unterscheidet sich je nachdem, ob sie in Biofilmen vergesellschaftet sind oder planktonisch wachsen. Somit beeinflusst die Vergesellschaftung im Biofilm die mikrobielle Genexpression einerseits direkt durch die initiale Anheftung, andererseits indirekt durch die veränderten Umgebungsbedingungen in einem Biofilm [17,24,88,91]. Aufgrund der engen räumlichen Lagebeziehung der Mikroorganismen interagieren diese synergistisch und antagonistisch [17,85,88,91,100]. Die effiziente Verstoffwechslung der komplexen Wirtsmakromoleküle, wie beispielsweise Muzine oder andere Glykoproteine, gelingt durch Kooperation der oralen Bakterien [10,85,87,91,100]. Eine Art von Synergismus stellt die Bildung von Nahrungsketten und –netzen dar, in denen ein Stoffwechselprodukt eines Mikroorganismus einen primären Nährstoff für einen weiteren Mikroorganismus bildet [85,88,90,91,100]. So dient das von den Streptokokken gebildete Laktat als Kohlenstoffquelle für die nichtsaccharolytischen Veillonellen [22,85,90,100]. Das Leben im Biofilm unter aeroben Bedingungen in der Mundhöhle bedeutet für obligat anaerobe Mikroorganismen eine Erweiterung des Habitats. Durch den Verbrauch des Sauerstoffs durch die frühen Kolonisierer werden geeignete Lebensbedingungen für die obligaten Anaerobier geschaffen [88,91]. Auch können die Bakterien im Sinne des „quorum sensing“ über die Diffusion kleiner Moleküle miteinander kommunizieren und die Genexpression koordinieren [77,88,91,100]. Eine weitere Möglichkeit der Interaktion stellt der horizontale Gentransfer dar [88,91]. In Biofilmen vergesellschaftete Mikroorganismen weisen eine erhöhte Toleranz gegenüber antimikrobiellen Agenzien auf [24,86,88,90,91]. Die Bakterien in den Tiefen des Biofilms zeigen diese Eigenschaft aufgrund der geringeren Zellteilungsrate, während die Produkti-

on neutralisierender Faktoren als Schutzmechanismus für die an der Oberfläche befindlichen Mikroorganismen dient [91].

Dem Wirt kann der komplexe Biofilm sowohl nutzen wie auch schaden. Durch Bindung der Mikroorganismen an spezifische Wirtsrezeptoren können Änderungen der Genexpression in den Wirtszellen und in den bakteriellen Zellen hervorgerufen werden. Auf diese Weise findet eine Kommunikation zwischen dem Wirt und den Mikroorganismen statt [91]. Die residente orale Mikrobiota bildet eine Barriere gegen die Bevölkerung mit exogenen Mikroorganismen und ist somit ein wichtiger Bestandteil der Wirtsabwehr [17,24,85,88,90,91]. Allgemein profitieren beide Parteien voneinander und leben in Harmonie miteinander [90,91]. Trotz ständig wechselnder Umgebungsbedingungen wird die Stabilität in der Zusammensetzung des Biofilms aufrechterhalten; dieser Zustand wird als mikrobielle Homöostase bezeichnet [85,87,90]. Es herrscht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen dem Biofilm und den Abwehrkräften des Wirtes [17,90]. In diesem Zustand gilt der Biofilm als kompatibel mit der Aufrechterhaltung der Integrität der Zielgewebe. Eine Erkrankung tritt auf, wenn es zur Störung der Zusammensetzung und der Stoffwechsellistung der komplexen Gemeinschaft im Biofilm kommt. Dies resultiert in einer Zunahme potenziell pathogener Mikroorganismen, die virulenter sind als solche, die mit oraler Gesundheit assoziiert werden [17,85,91]. Dadurch kann die dentale Plaque krankheitsauslösend werden. Das Resultat bilden Karies und Parodontalerkrankungen, die zwei häufigsten und mit hohen Behandlungskosten verbundenen Erkrankungen der industrialisierten Gesellschaften [87,89].

2.1.3 Plaquehypothesen

Die Plaquehypothesen beschreiben die ätiologische Bedeutung der oralen Mikroorganismen in der Kariesentstehung. Die spezifische Plaquehypothese sagt aus, dass nur einige bestimmte Arten der oralen Mikrobiota aufgrund ihrer Eigenschaften krankheitsauslösend sind [80,85,87,90]. Eine weitere Betrachtungsweise liefert die unspezifische Plaquehypothese, nach der sämtliche Mikroorganismen der Plaque ätiologisch am Krankheitsgeschehen beteiligt sind [85,87,90,140]. Eine Vereinigung der beiden Hypothesen bildet die ökologische Plaquehypothese [90]. Diese beschreibt, dass potenziell pathogene Mikroorganismen auch bei Gesunden innerhalb des Biofilms in geringer Anzahl vorhanden sind. Kommt es durch Änderung der Umgebungsbedingungen zu Verschiebungen innerhalb des Gleichgewichtes der mikrobiellen Zusammensetzung, so kann dies zu einem Selektionsvorteil für die krankheitsauslösenden Mikroorganismen führen und in dem Auftreten einer Erkrankung resultieren [85,87,90]. Nach einer Erweiterung des Begriffs der ökologischen Plaquehypothese verläuft die Kariesentste-

hung in drei reversiblen Stadien. Die Säureanreicherung innerhalb des Biofilms auf einer gesunden Zahnoberfläche, welcher vor allem aus Nicht-Mutans-Streptokokken und Aktinomyzeten besteht, ist mild und unregelmäßig. In diesem Zustand kann das dynamische Gleichgewicht zwischen Demineralisation und Remineralisation der Zahnoberfläche aufrechterhalten werden (Stadium der dynamischen Stabilität). Eine regelmäßige Zuckerezufuhr oder ein reduzierter Speichelfluss führen zur gehäuften Absenkung des pH-Wertes in der Plaque [134,135]. Durch Adaptationsvorgänge können Nicht-Mutans-Streptokokken ihre Säuretoleranz und Fähigkeit zur Säurebildung erhöhen [134–136]. Die säureinduzierte Adaptation unterliegt dabei nach *Quivey et al.* (2000) vier Mechanismen: (1) Erhöhung der Protonenundurchlässigkeit der Zellmembran, (2) Induktion der H⁺-ATPase-Aktivität zur H⁺-Auscheidung aus der Zelle, (3) Induktion des Arginin-Deaminase-Systems, (4) Induktion von Stressproteinen zum Schutz der Nucleinsäuren und Enzyme vor Denaturierung [115]. Darüber hinaus kommt es zur Selektion weiterer säuretoleranter Nicht-Mutans-Streptokokken, die bei niedrigen pH-Werten überleben können. Diese Veränderungen innerhalb des Biofilms können dazu führen, dass das Gleichgewicht zwischen Demineralisation und Remineralisation gestört wird, mit nachfolgendem Mineralverlust und Entstehung einer kariösen Läsion (Stadium der Säurebildung). Bei anhaltenden und stark azidogenen Bedingungen kommt es zur Eliminierung von Nicht-Mutans-Streptokokken und Aktinomyzeten aus dem Biofilm mit Ausnahme der säuretoleranten Stämme dieser Spezies. Des Weiteren erfolgt eine Selektion säuretoleranter Mikroorganismen wie *S. mutans*, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. und Hefen (Stadium der Säuretoleranz). Laut dieser Hypothese ist somit die Absenkung des pH-Wertes der Umgebung Initiator der während der Kariesentstehung auftretenden phänotypischen und genotypischen Veränderungen der Bakterien [134,135].

2.1.4 Mikrobiologische Aspekte der Karies

Die Karies gilt als eine chronische Erkrankung, die voranschreitend und selbstlimitierend ist. Das klinische Symptom der Erkrankung ist die lokalisierte Zerstörung der Zahnhartsubstanz (kariöse Läsion). Ohne Behandlung führt sie zur Zerstörung des Zahnes [134]. Der Prozess der Kariesentstehung ist dynamisch, es lassen sich Phasen der Progression (Demineralisation) und Regression (Remineralisation) der Erkrankung unterscheiden [134].

Zu den wichtigsten metabolischen Eigenschaften oraler Mikroorganismen im Rahmen der Kariesentstehung zählt ihre Fähigkeit zur Verstoffwechslung niedermolekularer Kohlenhydrate zu Säuren im Rahmen der Glykolyse. Die Säuren führen zu einer Ab-

senkung des pH-Wertes im Bereich der Zahnoberfläche. Dies resultiert einerseits in einer Demineralisation der Zahnhartsubstanz, andererseits kommt es zu einer Verschiebung innerhalb der mikrobiellen Zusammensetzung der Plaque mit zunehmender Selektion der säuretoleranten und säurebildenden Bakterienspezies [11,17,40,44,87,88,135,141]. Im Rahmen einer *In-vitro*-Studie im Chemostat konnten *Bradshaw* und *Martin* (1989) zeigen, dass die Verschiebungen in der mikrobiellen Zusammensetzung der Plaque nicht durch die Verfügbarkeit von Kohlenhydraten an sich ausgelöst werden. Vielmehr trägt der pH-Wertabfall infolge der Verstoffwechslung der Kohlenhydrate zum Anstieg von *S. mutans* und Laktobazillen bei [13]. Während bei einem pH-Wert von 7 die prädominierenden metabolischen Endprodukte der Glukoseverstoffwechslung Acetat und Propionat waren, bildete Laktat den Hauptteil der Stoffwechselendprodukte der Glykolyse bei zugelassenem pH-Wertabfall [12,13]. Bei einer weiteren Studie von *Bradshaw et al.* (1998) im Chemostat stand die Zunahme der Anzahl und Proportion von *S. mutans* und *L. rhamnosus* (vormals als *L. casei* klassifiziert) in direktem Zusammenhang mit der Größe des pH-Wertabfalls. Bei pH-Werten von 4,5 – 5,5 kam es zur Anreicherung von potenziell kariogenen Mikroorganismen. Die mit oraler Gesundheit assoziierten Spezies konnten bei diesen pH-Werten weiterhin persistieren. Erst bei pH-Werten kleiner 4,5 kam es zur Selektion der potenziell pathogenen Mikroorganismen *S. mutans*, *L. rhamnosus* und *V. dispar* auf Kosten der nicht-kariogenen Spezies [12]. Diese *In-vitro*-Studien lassen darauf schließen, dass nicht die alleinige Verfügbarkeit fermentierbarer Kohlenhydrate, sondern vielmehr der durch die Metabolisierung der Kohlenhydrate verursachte pH-Wertabfall zu Verschiebungen innerhalb der Plaquezusammensetzung führt [90]. Die Zusammensetzung der Plaque verändert sich durch einen Anstieg der säuretoleranten und säurebildenden Mikroorganismen (*i.e.* *S. mutans* und *Lactobacillus* spp.) sowie einer Reduktion der säureempfindlichen Bakterien (*S. gordonii*, *S. sanguis* etc.). Des Weiteren kommt es zur Änderung der metabolischen Aktivität innerhalb der Zahnplaque [17,85,87,89–91].

Es ist jedoch nicht alleinig der Abfall des pH-Wertes unter einen kritischen Wert (für Schmelz 5,0 – 5,5 [11,80]) für die Demineralisation des Zahnschmelzes verantwortlich. Auch der Grad der Sättigung der Umgebungsflüssigkeit, bei Karies des Plaquefluids, mit Kalzium- sowie Phosphationen beeinflusst die dynamischen Vorgänge von Demineralisation und Remineralisation [11]. Wenn bei säurebedingtem Abfall des pH-Wertes die vorhandenen Konzentrationen dieser Ionen in der Umgebungsflüssigkeit ungenügend sind, kommt es zu einem Netto-Mineralverlust [11].

Die zentrale Bedeutung von *S. mutans* als Hauptpathogen im Rahmen der Kariesentstehung wird in vielen Studien beschrieben [11,17,49,80,134,138,141], da *S. mutans*

regelmäßig in kavitierten kariösen Läsionen vorzufinden ist [11,49,80,134,138,141]. Innerhalb der Gruppe der Mutans-Streptokokken wurden vier Serotypen zu eigenständigen Spezies (*S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. ferus*) erhoben, wobei sich *S. mutans sensu stricto* auf die Serotypen c, e und f bezieht. Von diesen Spezies werden allerdings nur *S. mutans* und *S. sobrinus* regelmäßig beim Menschen isoliert [11,80]. *S. mutans* gilt als stark säurebildend und säuretolerant [11,17,85,87,90,134,138,141]. Im Rahmen der Glykolyse verstoffwechselt *S. mutans* Glukose abhängig von deren Verfügbarkeit zu Laktat (bei Glukoseüberschuss) [49,80] oder Laktat, Formiat, Acetat und Ethanol (bei begrenzter Glukoseverfügbarkeit) [49]. Durch Metabolisierung von Saccharose bildet *S. mutans* sowohl intrazelluläre als auch lösliche sowie unlösliche extrazelluläre Polysaccharide [17,49,80,90]. Die extrazellulären Polysaccharide (Glukane und Fruktane) stellen wichtige Pathogenitätsfaktoren dar [11,49,90,135,141], weil sie die Bakterienadhärenz an festen Oberflächen während der Plaqueformation unterstützen [49,80]. Bei den intrazellulären Polysacchariden handelt es sich um Glykogen ähnliche Glukane [49]. Diese dienen als Speicherstoffe, die in Zeiten des Kohlenhydratmangels zu organischen Säuren abgebaut werden [49,80,90,135]. Des Weiteren verursacht *S. mutans* in Tierversuchen bei saccharosereicher Diät kariöse Läsionen [11,49,80,134,138,141].

Laktobazillen werden ebenfalls aufgrund ihrer Fähigkeit zur Säurebildung und Säuretoleranz mit der Kariesätiologie in Verbindung gebracht [85,87,138,141]. Laktobazillen gelten als starke Säurebildner [90,138]. Während die homofermentativen Arten der Laktobazillen Glukose zu Laktat verstoffwechseln, metabolisieren heterofermentative Arten jene zu Laktat und Acetat. Der Anteil der Laktobazillen an der Gesamtzahl der kultivierbaren oralen Mikroorganismen beträgt weniger als 1 % [90]. Allerdings steigt die Anzahl bei fortgeschrittenen kariösen Erkrankungen der Zahnhartsubstanzen [80,90,138,141]. *L. acidophilus*, *L. casei* (Isolate der *L. casei*-Gruppe aus der Mundhöhle sind in der Mehrzahl *L. rhamnosus* und *L. paracasei* subsp. *paracasei* zugehörig) und *L. fermentum* werden am häufigsten gefunden, jedoch sind auch die Arten *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. cellobiosus*, *L. plantarum* und *L. salivarius* aus der Mundhöhle isolierbar [90]. In Tierversuchen zeigen einige Laktobazillen kariogene Eigenschaften, wobei der Kohlenhydratreichtum der Ernährung der Tiere die Kariogenität bestimmt [138]. Die Anzahl der Laktobazillen im Speichel korreliert mit dem Kohlenhydratkonsum des Individuums [90,138].

Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Säurebildung und der ausgesprochen hohen Säuretoleranz gelten *S. mutans* und *Lactobacillus* spp. als bedeutende Pathogene im Rahmen der Kariesentstehung [17,90,135].

Allerdings zeigte sich auch, dass kariöse Läsionen durch weitere säuretolerante und säurebildende Mikroorganismen erzeugt werden können [12,141–143], wie beispielsweise Nicht-Mutans-Streptokokken und Aktinomyzeten [120,134,135,141,143]. Auch diese Mikroorganismen sind in der Lage, durch Bildung organischer Säuren im Rahmen der Glykolyse den pH-Wert unter den kritischen Bereich abzusenken. Daraus resultiert die Demineralisation der Zahnhartsubstanz [12,134]. Zusätzlich sind Nicht-Mutans-Streptokokken und Aktinomyzeten dazu fähig, Saccharide und Aminosaccharide aus Glykoproteinen des Speichels durch extrazelluläre Glykosidasen freizusetzen und zu metabolisieren [107,134,135].

Wenngleich Nicht-Mutans-Streptokokken säuretolerant sind, so führt ein anhaltend niedriger pH-Wert der Umgebung zur Selektion der säuretoleranteren *S. mutans* und *Lactobacillus* spp. [134]. *In vitro* zeigte sich das Wachstum der Nicht-Mutans-Streptokokken von einem pH-Wert zwischen 4,5 und 5,5 unbeeinflusst, während pH-Werte von 4,5 oder geringer das Wachstum und den Stoffwechsel dieser Mikroorganismen störten. Im Gegensatz dazu stiegen die koloniebildenden Einheiten von *S. mutans* und *L. rhamnosus* bei diesen Umgebungsbedingungen ($\text{pH} \leq 4,5$) [12]. Da in kavitierten kariösen Läsionen aufgrund der unzureichenden Clearance der Säuren anhaltend saure Bedingungen herrschen, kann es deshalb möglicherweise zur Selektion von *S. mutans* und *Lactobacillus* spp. in diesen Bereichen kommen [134].

Bei Betrachtung der mikrobiologischen Zusammensetzung des Biofilms von White-Spot-Läsionen zeigt sich eine Dominanz von Nicht-Mutans-Streptokokken, wenngleich die *S. mutans*-Anzahl im Vergleich zu gesunden Zahnoberflächen erhöht sein kann [120,135,143]. Eine Zunahme der Mutans-Streptokokken, insbesondere von *S. mutans* und *S. sobrinus*, sowie der Laktobazillen ist in der Plaque kariöser Schmelzläsionen feststellbar [89]. Die Anzahl an Mutans-Streptokokken steigt bei kavitierten kariösen Läsionen [81,102,135]. Des Weiteren lassen sich *Lactobacillus* spp., *Prevotella* spp., *Propionibacterium* spp. und *Bifidobacterium* spp. aus diesen Läsionen isolieren [23,84,92,102]. Zu den Bakterien, die aus tiefen kariösen Dentinläsionen isoliert wurden, zählen *S. mutans*, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. und *Atopobium* spp. [1]. Die Mikrobiota oberhalb kariöser Läsionen auf freiliegenden Wurzeloberflächen wird von Mutans-Streptokokken, Laktobazillen und Aktinomyzeten dominiert [89], zusätzlich sind *Bifidobacterium* spp. isolierbar [142]. Auch aus Läsionen frühkindlicher Karies lässt sich eine erhöhte Anzahl an *S. mutans* isolieren. *Bifidobacterium* spp. finden sich in tiefen Läsionsbereichen [3]. Somit ändert sich die Zusammensetzung der Plaque während der Entstehung einer Karies. In dem vormals von Nicht-Streptokokken und Aktinomyzeten dominierten Biofilm gewinnen *S. mutans* und weitere Bakterien wie

Lactobacillus spp., *Prevotella* spp. und *Bifidobacterium* spp. an Bedeutung [23,81,84,92,135].

2.2 Sekundärkaries

2.2.1 Definition und Ätiologie der Sekundärkaries

Das Auftreten von kariösen Läsionen im Füllungsrandbereich ist seit vielen Jahren bekannt und veranlasste *Black* bereits 1914 zur Etablierung des Prinzips der „extension for prevention“ im Rahmen der Kavitätenpräparation [5]. Das Verlegen der Kavitätenränder in Bereiche, die Mundhygienemaßnahmen zugänglich sind, sollte die Plaqueansammlung im Restaurationsrandbereich reduzieren [98].

Auch wenn dieses Phänomen seit Jahrzehnten beobachtet wird, ist der Begriff „Sekundärkaries“ weder klinisch noch histopathologisch eindeutig definiert und die wissenschaftliche Basis für die Diagnostik gilt als dürftig [62,99]. Hinsichtlich der Terminologie gibt es lokale Unterschiede; während man im europäischen Raum häufig die Bezeichnung „secondary caries“ oder im Deutschen den Begriff der „Sekundärkaries“ verwendet, ist in Nordamerika der Terminus „recurrent caries“ gebräuchlich [98].

Eine Sekundärkaries bezeichnet allgemein das Auftreten einer kariösen Läsion angrenzend an eine zahnärztliche Versorgung [53]. Die Sekundärkaries unterscheidet sich von einer Primärkaries dadurch, dass sie im Randbereich einer Restauration lokalisiert ist. In dieser Region kann sie klinisch und radiologisch festgestellt werden [62]. Somit entspricht die Sekundärkaries einer Primärkaries im Restaurationsrandbereich [61,99]. Schwierigkeiten treten allerdings in der Abgrenzung der Sekundärkaries von marginalen Defekten, Spaltbildungen und Residualkaries auf [97,99]. Nach *Mjör* und *Toffenetti* (2000) resultieren aus der fehlenden Genauigkeit der Definition Unsicherheiten und Verwirrungen sowohl bei klinisch Tätigen als auch in der wissenschaftlichen Gemeinschaft [99].

Als Residualkaries hingegen bezeichnet man die Progression einer kariösen Läsion durch belassene, kariös erkrankte Zahnhartsubstanz im Rahmen der Kavitätenpräparation und Kariesexkavation mit anschließender Restauration der Kavität [61,62].

Kidd et al. beschreiben in einer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 1992 mehrere mögliche Gründe für das Versagen von Restaurationen [67]. Einerseits kann eine neue Erkrankung des Zahnes ursächlich dafür verantwortlich sein. Es kann sich beispielsweise um das Auftreten einer Karies im Randbereich der vorhandenen Restauration oder an einer anderen Stelle des Zahnes handeln. Des Weiteren können pulpale oder parodontale Erkrankungen auftreten. Auch ein Trauma kann zum Versagen der Restauration

führen. Andererseits gibt es technische Ursachen, wie unter anderem die Fraktur der Restauration, marginale Einbrüche oder Höckerfrakturen angrenzend an die Restauration, die nachfolgend eine Rerestauration erfordern. Darüber hinaus können sowohl eine mangelnde anatomische Gestaltung als auch ästhetische Beeinträchtigungen zur Füllungserneuerung führen.

Nach *Jokstad* (2016) sind die Mundhygienegewohnheiten des Patienten der primäre Faktor in der Sekundärkariesätiologie, da das Vorhandensein eines kariogenen Biofilms die Voraussetzung zur Sekundärkariesentstehung darstellt [56].

Die Sekundärkaries gilt laut *Kidd et al.* (1992) als die häufigste Ursache für den Füllungsaustausch in zahnärztlichen Praxen [67]. Das Auftreten einer sekundärkariösen Läsion kann zur weiteren Schwächung des Zahnes infolge der Zerstörung von Zahnhartsubstanz führen [103]. Aus diesen Gründen sind, auch aus wirtschaftlicher Sicht, weitere Untersuchungen zu diesem Krankheitsbild von Nutzen, da Erneuerungen von Restaurationen mit anfallenden Behandlungskosten verbunden sind [98,103].

2.2.2 Klinische Diagnostik sekundärkariöser Läsionen

Die klinische Diagnose „Sekundärkaries“ gilt als die häufigste Ursache für den Austausch von Restaurationen [61,62,67,97–99]. Nach *Mjör* (2005) werden 45 – 55 % der Restaurationen erwachsener Patienten von Zahnärzten aufgrund dieser Diagnose ausgetauscht [98]. Diese hohen Prozentzahlen stehen allerdings im Widerspruch zu den Ergebnissen kontrollierter klinischer Studien, in denen 1 – 4 % der Restaurationen wegen einer diagnostizierten Sekundärkaries ausgetauscht werden [62,99]. Mögliche Gründe für die schwankenden Werte der Inzidenz sowie der Prävalenz von Sekundärkaries in verschiedenen Studien können aus Unterschieden in der Datenerhebung, der Studienmethodik und den patientenbezogenen Faktoren resultieren [56]. Da viele Restaurationen von Zahnärzten in der Annahme des Vorliegens einer neuen kariösen Zerstörung der Zahnhartsubstanz im Restaurationsrandbereich ausgetauscht werden, wird die klinische Diagnostik der Sekundärkaries anhand von validen und verlässlichen Kriterien als bedeutsam erachtet [62]. Allerdings gilt es als schwierig, Sekundärkaries klinisch zu diagnostizieren [61,66,67,97,99]. *Brouwer et al.* (2016) zeigten in einer systematischen Übersichtsarbeit und Metaanalyse zur Detektion von Sekundärkaries, dass es zum aktuellen Zeitpunkt nur eine begrenzte Anzahl an Studien gibt, die sich mit diesem Thema beschäftigen und dass die Validität sowie die Anwendbarkeit der einzelnen Diagnostikmethoden begrenzt erscheint [15]. Während visuelle sowie radiologische Methoden und der Einsatz von Laserfluoreszenzgeräten hilfreich bei der De-

tektion der Sekundärkaries sein können, erweist sich die Validität der quantitativen lichtinduzierten Fluoreszenz und der taktilen Bestimmung als unklar [15].

Nach der Reinigung und der Trocknung des Zahnes kann sich die Außenläsion (s. Kapitel 2.2.4, S. 16) der Sekundärkaries als „white spot lesion“, „brown spot lesion“, mit oder ohne Vorliegen erweichter Zahnhartsubstanz klinisch darstellen [67]. Des Weiteren kann auch eine Kavitation vorliegen [67]. Die Kavitätenwandläsion (s. Kapitel 2.2.4, S. 16) wird erst klinisch sichtbar, wenn die demineralisierte Zahnhartsubstanz durch den Zahnschmelz durchschimmert, oder wenn bereits ein Einbruch der Zahnschmelzoberfläche vorliegt [67]. Diagnostische Schwierigkeiten rufen Restaurationen mit defekten Füllungsrandern hervor, da an diesen Stellen vermehrte Plaqueansammlungen vorzufinden sind [61]. Allerdings entstehen nicht an sämtlichen dieser Stellen voranschreitende kariöse Läsionen [61]. Wie bereits von *König* 1971 beschrieben wurde, setzen sich die Grundvoraussetzungen zur Kariesentstehung aus dem Zusammenspiel der Wirtsfaktoren, der oralen Mikroorganismen und deren Substrat sowie einem Zeitfaktor zusammen [71].

Die Interpretation von Farbveränderungen im Füllungsrandbereich ist abhängig vom verwendeten Füllungsmaterial. Bei Amalgamfüllungen können gräuliche oder bläuliche Verfärbungen aufgrund von kariösen Läsionen auftreten, jedoch lassen auch Lichtreflexionen oder Korrosionsprodukte den Füllungsrandbereich mitunter verfärbt erscheinen [67]. Marginale Verfärbungen angrenzend an zahnfarbene Restaurationsmaterialien stehen in Zusammenhang mit einer signifikant höheren Anzahl an Bakterien im Dentin [63]. Eine Verfärbung des Dentins gilt jedoch nicht als reliabler Vorhersageparameter für den Infektionsgrad der Zahnhartsubstanz [63].

Nach *Kidd* (1990) wird das Sondieren der Sekundärkaries mit einer spitzen Sonde nicht empfohlen, da mit dieser eine Kavitation der Außenläsion erzeugt werden kann [61]. Des Weiteren kann der Restaurationsrand verletzt werden oder marginale Ungenauigkeiten können als Sekundärkaries fehlinterpretiert werden. Lediglich zervikal in den Bereichen, in denen Bissflügelröntgenaufnahmen nicht eindeutig zu interpretieren sind, kann vorsichtig mit einer gebogenen Sonde sondiert werden [61].

Radiologisch kann eine Sekundärkaries sowohl approximal als auch gingival dargestellt werden, sofern der Röntgenstrahl in optimalem Winkel zur Läsion eingestellt wird [98]. Allerdings ist es auch möglich, dass die Sekundärkaries aufgrund der Radioopazität des Restaurationsmaterials von dessen Röntgenshatten überdeckt wird [98].

Die Beurteilung der Konsistenz, der Härte und das mögliche Vorliegen von Verfärbungen der Zahnhartsubstanzen gelten als beste Parameter in der Diagnostik der Sekun-

därkaries [99]. Lediglich das Vorliegen offener kariöser Läsionen im Füllungsrandbereich zahnfarbener Restaurationen eignet sich laut *Kidd et al.* (1996) als verlässliches klinisches Kriterium zur Vorhersage des Vorhandenseins von erweichtem Dentin [63].

Im Rahmen der Kariesdiagnostik nimmt die Beurteilung der Aktivität der kariösen Läsion eine wichtige Rolle ein. Je nachdem, ob die Läsion aktiv und schnell voranschreitend oder langsam progredient beziehungsweise arretiert ist, wird sich dies auf die Behandlungsentscheidung auswirken [62,98]. Im Zusammenhang mit Sekundärkaries lässt sich lediglich der Aktivitätsgrad der Außenläsion klinisch beurteilen, Aussagen über eine aktive / inaktive Kavitätenwandläsion können anhand klinischer Parameter nicht vorgenommen werden [67].

Des Weiteren ist die Abgrenzung der Sekundärkaries von einer Primär- und einer Residualkaries wichtig. Das Auftreten einer kariösen Läsion an einer vormals intakten und füllungsfreien Zahnoberfläche kennzeichnet eine Primärkaries [98]. Im Rahmen der Kavitätenpräparation absichtlich oder unabsichtlich belassene Karies unter einer Restauration bezeichnet man als Residualkaries [98]. Die Unterscheidung einer Sekundärkaries von einer Residualkaries gestaltet sich mitunter problematisch [62]. Betrachtet man beispielsweise einen extrahierten Zahn histologisch ohne das Wissen des klinischen Hintergrundes, kann es zu Verwechslungen von einer Sekundärkaries mit einer Residualkaries kommen [62]. In Anbetracht des Paradigmenwechsels in der Kariestherapie hin zu zahnhartsubstanzschonender Kariesexkavation bedeutet heute ein Vorfinden demineralisierter Zahnhartsubstanz unter einer Restauration allerdings nicht immer das Versagen der Restauration, sondern die demineralisierte Zahnhartsubstanz kann mitunter absichtlich unvollständig exkaviert worden sein [103]. Bei einem Behandlerwechsel kann dies ohne Kenntnis der Vorgeschichte fälschlicherweise als „Sekundärkaries“ diagnostiziert werden. Die in Bezug auf die Diagnosestellung auftretenden Unsicherheiten resultieren bisweilen in unnötigen Erneuerungen von Restaurationen [66].

2.2.3 Lokalisation der Sekundärkaries

Sekundärkaries tritt vor allem in Zonen der Plaquestagnation auf [62]. Häufig findet man Läsionen im zervikalen Randbereich von Restaurationen [62,67,98,99]. Des Weiteren treten sekundärkariöse Läsionen auch am approximalen Füllungsrand auf [67]. An Klasse-I-Restaurationen und den okklusalen Anteilen von Klasse-II-Restaurationen wird Sekundärkaries hingegen selten diagnostiziert [98].

Im Rahmen einer klinischen Studie von *Mjör* (1998) diagnostizierten niedergelassene Zahnärzte 80 – 90 % der Sekundärkaries am gingivalen Kavitätenrand. Eine Abhän-

gigkeit von der Art der Restauration und dem verwendeten Restaurationsmaterial ließ sich nicht feststellen [97].

Einige prädisponierende Faktoren, wie die klinische Verarbeitung, die Materialeigenschaften und die Mundhygiene, beeinflussen das Entstehen von Sekundärkaries [99]. Nach *Mjör* (1998 und 2005) gibt es mehrere Gründe für die vor allem gingivale respektive zervikale Lokalisation sekundärkariöser Läsionen [97,98]. Im Zuge der Füllungstherapie erschweren das Sulkusfluid und der Speichel eine adäquate Trockenlegung, vor allem wenn auf die Verwendung eines Kofferdams verzichtet wird. Auch sind diese Bereiche für den Zahnarzt beim Legen der Füllung mitunter erschwert einsehbar, was zu marginalen Ungenauigkeiten der Restauration führen kann. Wenn der gingivale Anteil der Kavität nicht mehr von Schmelz begrenzt ist, sind die Bedingungen zur adhäsiven Befestigung bei Verwendung von Kompositen nicht optimal. Aufgrund der geringeren Bindungsstärke an das Wurzelzement in Verbindung mit der Polymerisationschumpfung der Komposite können Randspalten entstehen. Da die gingivalen Restaurationsränder oft äqui- oder subgingival gelegen sind, können diese mit Mundhygienemaßnahmen oft nur erschwert sauber gehalten werden und gelten aus diesem Grund als Prädispositionsstellen für Plaqueansammlungen. Nicht zuletzt sind diese Bereiche für den Zahnarzt bei Kontrolluntersuchungen lediglich eingeschränkt einsehbar, sodass die Beurteilung der Integrität des Restaurationsrandes nicht ausreichend möglich ist [97,98]. Deshalb wird vor dem Hintergrund des möglichen Entstehens einer Sekundärkaries empfohlen, den gingivalen Bereichen von Klasse-II- bis Klasse-V-Restaurationen bei der Inspektion besondere Beachtung zu schenken [99].

2.2.4 Histopathologie der Sekundärkaries

Die Entstehung der Sekundärkaries auf histopathologischer Ebene ist nicht eindeutig definiert [99]. Im Allgemeinen kann der an die Restauration angrenzende Zahnschmelz in zwei Zonen unterteilt werden. Man unterscheidet den Schmelz an der Zahnoberfläche von dem an der Kavitätenwand [61,67]. Aufgrund dessen wird in der Literatur beschrieben, dass sich sekundärkariöse Läsionen aus zwei Anteilen zusammensetzen: einer Außenläsion und einer Kavitätenwandläsion [46–48,61,67,99]. Die Existenz dieser beiden Anteile der Läsion konnte in *In-vitro*-Studien histologisch nachgewiesen werden [60,99]. *Jokstad* (2016) stellt in einer Übersichtsarbeit zu Sekundärkaries und Microleakage allerdings heraus, dass der Terminus „Kavitätenwandläsion“ nicht eindeutig definiert ist und die Bezeichnung in den vorhandenen Studien variierend eingesetzt wird [56].

Die Außenläsion entsteht aufgrund von einer Plaqueansammlung an der Zahnoberfläche im Restaurationsrandbereich und entspricht einer Primärkaries [98,99]. Belassene Überschüsse des Restaurationsmaterials prädisponieren dabei die Sekundärkariesentstehung durch die vermehrte Plaqueakkumulation [98]. Die Außenläsion ist an der Zahnoberfläche lokalisiert und zeigt im klinischen Erscheinungsbild eine weiß-opake Schmelzoberfläche. Auch histologisch durchläuft das Voranschreiten der Läsion die charakteristischen Stadien [99]. Mit zunehmender Läsionstiefe kommt es zum Einbruch der Schmelzoberfläche und einer Kavitation [67,99].

Auf der einen Seite wird das Auftreten einer Kavitätenwandläsion als Resultat einer „Microleakage“ betrachtet [60–62,66,67,99]. Die Kavitätenwandläsion kann tief im Füllungsrandbereich auftreten und sich, den Schmelz unterminierend, im Dentin ausbreiten [67]. Als Microleakage wird allgemein das Eindringen von Bakterien, Flüssigkeiten, Molekülen oder Ionen zwischen die Kavitätenwand und das Restaurationsmaterial bezeichnet [60,61,67,99]. Durch das Eindringen von oralen Mikroorganismen in den Zwischenraum von Zahn und Restauration können Pulpitiden oder Sekundärkaries hervorgerufen werden [99]. Eine Reihe von *In-vitro*-Studien beschäftigt sich mit dem Auftreten von Microleakage im Restaurationsrandbereich [99]. Es werden *in vitro* beispielsweise artifizielle kariöse Läsionen erzeugt und zur Untersuchung Farbstoffe, radioaktive Isotope, Bakterien, Luftdruck oder rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eingesetzt [60,61,67,99]. Anhand dieser Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass bei Restaurationsmaterialien wie Amalgamen, Kompositen, Glasionomerzementen und zementierten Inlays potenziell Microleakage auftreten kann. In Abhängigkeit vom verwendeten Restaurationsmaterial unterscheidet sich jedoch die Zeitspanne bis ein Versagen der Restauration aufgrund von Sekundärkaries feststellbar ist [67]. Die Übertragung der Ergebnisse der *In-vitro*-Studien auf die Situation *in vivo* gestaltet sich allerdings oft als schwierig, weil sich die Versuchsbedingungen *in vitro* von den Gegebenheiten *in vivo* unterscheiden [56,60,99].

Andererseits hat sich die Sichtweise darüber, dass Microleakage für die Entstehung der Kavitätenwandläsion verantwortlich ist, in den letzten Jahren geändert [98,99]. Es bestehen Zweifel daran, ob sich eine Kavitätenwandläsion unabhängig von einer äußeren Schmelzläsion als alleiniges Resultat von Microleakage bilden kann [56]. Die Sekundärkaries breitet sich im Schmelz entlang der Schmelzprismen aus und es erscheint möglich, dass der Verlauf der Schmelzprismen in Relation zur Kavitätenwand entscheidend für das Auftreten und das Ausmaß der Kavitätenwandläsion ist [46–48]. Falls die Schmelzprismen von der Zahnoberfläche zur Grenzfläche zwischen Restauration und Zahnhartgewebe verlaufen, kann eine Kavitätenwandläsion entstehen [99].

Nach dieser Ansicht ist somit die Zahnoberfläche Ausgangspunkt für die Entstehung der Kavitätenwandläsion und nicht das Auftreten von Microleakage [99]. Dafür spricht auch, dass in Studien bisweilen kein Zusammenhang zwischen der Randspaltbreite und der Entstehung von Sekundärkaries festgestellt werden konnte, solange Randspaltbreiten von 400 µm nicht überschritten werden [66,98]. Schmelzrisse sind nach *Mjör* (2005) ein klinisches Beispiel dafür, dass Microleakage nicht zwangsläufig zur Kariesentstehung führt [98]. Die Schmelzrisse können sich mit der Zeit verfärben, Karies tritt in diesen Bereichen allerdings nahezu nie auf [98].

2.2.5 Mikrobiologische Aspekte der Sekundärkaries

Obwohl die Diagnose „Sekundärkaries“ im zahnärztlichen Alltag häufig gestellt wird, gibt es nur wenige Studien, die sich den mikrobiologischen Zusammenhängen der Erkrankung beschäftigen [98,99].

Anhand von Probenentnahmen während der Kavitätenpräparation aus dem Bereich der Schmelz-Dentin-Grenze sekundärkariöser Läsionen konnte ermittelt werden, dass bei Vorliegen von weichem und feuchtem Dentin eine signifikant höhere Anzahl von Mutans-Streptokokken und Laktobazillen feststellbar war. Einen Unterschied in der mikrobiologischen Zusammensetzung von Primär- und Sekundärkaries lag jedoch nicht vor [65,98].

In einer Studie von *Kidd et al.* (1995) wurde untersucht, ob sich kariöse Läsionen, Randspaltbildungen oder Verfärbungen im Füllungsrandbereich von Amalgamrestorationen als Prädiktor für ein Vorhandensein von infiziertem Dentin an der Schmelz-Dentin-Grenze eignen. Bei Restaurationen mit Randspalten breiter als 0,4 mm enthielten die von den Restaurationsrändern entnommenen Plaqueproben eine signifikant höhere Anzahl an Bakterien (Mutans-Streptokokken und Laktobazillen) als bei Vorliegen von intakten Restaurationsrändern oder schmalen Randspalten. Auch konnte festgestellt werden, dass im Dentin bei Randspaltbildungen von mehr als 0,4 mm oder beim Auftreten von kariösen Läsionen deutlich mehr Bakterien (Mutans-Streptokokken und Laktobazillen) vorhanden waren. Die Farbe des an die Restauration angrenzenden Zahnschmelzes erwies sich als unerheblich für die Vorhersagekraft des Infektionsgrades des darunterliegenden Dentins. Die Voraussetzung dafür war, dass keine offenen kariösen Läsionen feststellbar waren. Daraus wurde geschlossen, dass Amalgamrestorationen mit breiten Randspalten oder kariösen Läsionen im Füllungsrandbereich erneuert werden sollten, im Gegensatz zu solchen mit geringen Randspalten oder alleinigen Verfärbungen [66,99].

Im Rahmen einer weiteren klinischen und mikrobiologischen Untersuchung wurde die Relevanz marginaler Verfärbungen und Spaltbildungen im Randbereich zahnfarbener Restaurationen hinsichtlich des Infektionsgrades des darunterliegenden Dentins untersucht. Dazu wurden zum einen Plaqueproben von der Grenzfläche zwischen Zahn und Restauration entnommen. Danach wurden die Restaurationen entfernt, die Schmelz-Dentin-Grenze mittels Sondierung als hart beziehungsweise weich beurteilt und Proben des Dentins entnommen. Es konnte festgestellt werden, dass eine größere Anzahl an Mutans-Streptokokken und Laktobazillen in der Plaque offener kariöser Läsionen vorhanden war; das Dentin in diesen Regionen war weich und stark infiziert. Bei Vorhandensein von erweichtem Dentin im Bereich der Schmelz-Dentin-Grenze ohne gleichzeitig vorliegende offene kariöse Läsion enthielten sowohl die Plaque- als auch die Dentinproben eine höhere Anzahl an Mutans-Streptokokken und Laktobazillen [63].

Auch die Auswahl des Restaurationsmaterials kann die Plaquemenge und -zusammensetzung im Füllungsrandbereich beeinflussen [98]. Die von *Svanberg et al.* (1990) bestimmten koloniebildenden Einheiten an *S. mutans* waren in den Plaqueproben am höchsten, die aus dem Füllungsrandbereich von Kompositrestaurationen entnommen wurden, gefolgt von Amalgamrestaurationen. Die geringsten *S. mutans*-Zahlen wurden im Füllungsrandbereich von Glasionomerzementrestaurationen festgestellt [99,132].

Des Weiteren kann der Gehalt an *S. mutans* im Speichel die Kolonisation der Zahnflächen, welche die Restauration angrenzen, beeinflussen. Bei einer erhöhten Anzahl von *S. mutans* im Speichel steigt auch die Zahl dieser Bakterien in der Plaque. Andererseits verhindern geringe Mengen von *S. mutans* im Speichel nicht das Auftreten einer hohen Anzahl dieser Mikroorganismen im Randbereich von Restaurationen [99,147].

Die Isolation erhöhter Mengen koloniebildender Einheiten von Mutans-Streptokokken und Laktobazillen aus Bereichen mit Sekundärkaries im Füllungsrandbereich lässt einen Einfluss dieser Spezies im Entstehungsprozess der Läsionen vermuten.

2.3 Mikrobiologische Modelle in der Kariesforschung

Zur Untersuchung der mikrobiologischen Zusammenhänge im Rahmen der Kariesforschung eignen sich Labormodelle, Tierversuche und humane *In-situ*-Studien und *In-vivo*-Studien, die sich in ihrer mikrobiellen Komplexität voneinander unterscheiden. Die Möglichkeiten der Kontrolle und Manipulation der Versuchsbedingungen sinken mit zunehmender Realitätsnähe des Versuchsdesigns. Je nach Fragestellung, Forschungsstadium und verfügbaren Ressourcen unterscheidet sich die Wahl des geeigneten Versuchsmodells [86].

2.3.1 Labormodelle – Artifizielle Mundhöhlen

Demineralisationen der Zahnhartsubstanzen lassen sich chemisch durch Einsatz von sauren Lösungen [20,21,27,93,146], sauren Gelen [20,27,55,75] oder mikrobiologisch durch saure Stoffwechselprodukte (z. B. Laktat) verschiedener Bakterienspezies erzeugen [7,30,35,36,42,52,57,104,110,113,117,121,123,125,130].

Die Entwicklung von Labormodellen zur Simulation der Mundhöhlenbedingungen seit Ende des 19. Jahrhunderts resultierte aus der Vielschichtigkeit der oralen Mikrobiota [83,95]. Des Weiteren führten ethische Konflikte in Zusammenhang mit der Untersuchung von Karies und Parodontalerkrankungen *in vivo* zur Etablierung dieser auch als „artifizielle Mundhöhlen“ bezeichneten Modelle [137]. Der Begriff der „artifiziellen Mundhöhle“ umfasst eine Vielzahl von *In-vitro*-Modellen, die sich unter anderem hinsichtlich des Aufbaus, der Versuchsdurchführung und der zu untersuchenden Fragestellung unterscheiden. Während es sich bei den ersten Entwicklungen um einfache Basismodelle zur Untersuchung der Kariesätiologie und -pathogenese handelte [32,112,113,118,137], ermöglichen die aktuellen automatisierten und hochanspruchsvollen Versionen die Gewährleistung kontrollierter Bedingungen zur Auswertung des Stoffwechsels, des Wachstums, der Mineralisation sowie der Pathogenität des dentalen Biofilms [125,130,137,152]. Eine begrenzte Anzahl an Studien befasst sich auch mit der Untersuchung der Einflussfaktoren der Sekundärkariesentstehung [7,30,41,42,52,123].

Das gemeinsame Prinzip der artifiziellen Mundhöhlen, nachfolgend auch als „Kariesmodelle“ bezeichnet [117], besteht in der Simulation der physikalischen Gegebenheiten der Mundhöhle *in vitro* [86]. Merkmale der Versuchsdurchführung in artifiziellen Mundhöhlen sind die Kontrolle und die Einstellung der Umgebungsbedingungen. Zu Beginn wurden die Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt [112,137], was allerdings nicht den Gegebenheiten in der menschlichen Mundhöhle entspricht. Durch den Einsatz von temperierbaren Wasserbädern [35,36,52,110] und Brutschränken [41,117] konnten die Versuche schließlich bei 35 °C [35,36,110,113,125,128–130,152] bis 37 °C [30,41,42,52,74,117,123,126] durchgeführt werden. Je nach Gestaltung der artifiziellen Mundhöhle kann durch gezielte Zuleitung von Gasgemischen (*i. e.* 5 Vol.-% CO₂ und 95 Vol.-% N₂) die Zusammensetzung der gasförmigen Phase innerhalb der Reaktionskammer reguliert werden [36,104,110,121,125,128,152]. Alternativ werden die Versuche unter aeroben Umgebungsbedingungen ohne Gaszufuhr durchgeführt [41,42,117]. Einige Versuchsaufbauten ermöglichen auch die Überwachung des pH-Wertes mittels pH-Messelektroden [41,52,73,74,117,125,128,130].

Die Versuche werden in Reaktionskammern durchgeführt, in denen sich Deckglasplatten [125,128,130,152] oder Zähne [4,7,30,32,35,36,41,42,52,57,104,110,112–114,121,123,125] zur Etablierung einer Plaque befinden. Die Zähne können sowohl boviner [30,52,125,129] als auch humaner Herkunft [4,7,35,36,41,42,57,104,110,112–114,121,123,125] sein und entweder im Ganzen [57,112,123] oder als Probenschnittkörper [4,30,32,35,36,41,52,104,110,113,121,125] montiert werden.

Es werden verschiedene Methoden zur Etablierung einer bakteriellen Plaque auf den Untersuchungsoberflächen beschrieben. Seit Mitte des 20. Jahrhunderts wird humaner Speichel [32,112,114,118,128] oder mit natürlicher Plaque angereicherter humaner Speichel [4,130,152] zur Inokulation eingesetzt. *Sissons et al.* (1991) verwendeten in Thioglycolat gelöste supragingivale Plaque zur Etablierung eines Biofilms in ihrer artifizialen Mundhöhle [128]. Des Weiteren kann die bakterielle Plaque durch Mono- [35,36,57,73,74,110,113,121,123,125] oder Mischkulturen [7,35,36,41,52,110,125] oraler Mikroorganismen erzeugt werden (s. Tabelle 2, S. 27).

Das Funktionsprinzip der artifizialen Mundhöhle besteht darin, durch intermittierende oder kontinuierliche Zuleitung von unterschiedlichen Flüssigkeiten Phasen der Nahrungsaufnahme und den natürlichen Speichelfluss *in vitro* zu simulieren. Dieser wird zum Beispiel den durch Einsatz von artifiziellem Speichel imitiert [7,30,35,36,57,73,74,110,121,123]. Es handelt sich dabei um eine mineralienhaltige Lösung (z. B. NaCl, KCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, CaCl₂, CaSO₄, MgCl₂) [7,41,57,73,123], wobei die mengenmäßige Zusammensetzung zwischen den einzelnen Studien variiert und weitere Zusätze wie Glykoproteine tierischer Herkunft [35,36,110,125], Muzin, Harnstoff oder Vitamin C [123] zugefügt werden können. Der pH-Wert der Lösung liegt bei 6,8 [123], 6,9 [121] oder 7 [7,73,74]. Die intermittierende oder kontinuierliche Zufuhr von Nährstoffen ermöglicht das Wachstum des bakteriellen Biofilms innerhalb dieser Umgebung [137]. Dafür wird ein Nährmedium für Bakterien verwendet [7,30,35,36,41,42,52,110,112–114,123], das zur Simulation einer zuckerhaltigen Ernährungsweise zusätzlich niedermolekulare Kohlenhydrate wie beispielsweise Glukose [35,36,110,112–114,125] oder mitunter auch Saccharose [7,30,41,42,52,57,121,123,125,128,130,152] enthält [7,35,36,41,42,52,110,112–114]. Alternativ können diese niedermolekularen Kohlenhydrate unabhängig vom Nährmedium supplementiert werden [30,104,121,123,125,128,130,152]. Auch der pH-Wert des Nährmediums liegt im neutralen Bereich [7,35,36,110]. Aufgrund der bakteriellen Stoffwechselung der niedermolekularen Kohlenhydrate entstehen organische Säuren. Der damit verbundene pH-Wertabfall führt zur Demineralisation der Zahnhartsubstanz und Erzeugung artifizialer kariöser Läsionen auf den Zahnoberflächen. Durch die indi-

viduelle Einstellung der Fließraten der Flüssigkeiten werden Phasen der Demineralisation durch die bakterielle Metabolisierung der niedermolekularen Kohlenhydrate und Phasen der Remineralisation durch den artifiziellen Speichel simuliert [7,30,35,36,41,42,104,110,117,121,123,125].

Im Laufe der Jahre wurden die artifiziellen Mundhöhlen automatisiert. In den aktuellen Modellen sorgen Pumpen für konstante Fließraten, die mithilfe von Computerprogrammen automatisch gesteuert werden [30,52,117,123,125].

Somit handelt es sich bei einer artifiziellen Mundhöhle um ein Modell zur Etablierung eines Biofilms auf einer relevanten Oberfläche [86]. Ein Vorteil dieser Labormodelle ist, dass komplexe Ökosysteme in Einzelteile zerlegt werden können, welche unter kontrollierten Bedingungen unabhängig voneinander untersucht werden können [86]. Dadurch können definierte Gesichtspunkte einer Fragestellung unter vollständiger experimenteller Kontrolle untersucht werden. Die kontrollierbaren Versuchsbedingungen garantieren die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse [86]. Labormodelle eignen sich vor allem im Rahmen von Voruntersuchungen. Damit können vielversprechende Materialien / Agenzien ausfindig gemacht werden, welche dann im Rahmen weiterer Studien untersucht werden können [86]. Des Weiteren sind *In-vitro*-Studien im Vergleich zu *In-vivo*-Studien kostengünstiger [86]. Allerdings sind die Ergebnisse solcher vereinfachten Ökosysteme mit Vorbehalt auf die komplexen *In-vivo*-Situationen übertragbar [86]. Unter Einhaltung ethischer Grundsätze bedarf es weiterer Studien in Tierversuchen oder humanen *In-situ*- und letztendlich *In-vivo*-Studien zur Überprüfung der Ergebnisse.

2.3.2 Sekundärkariesforschung in artifiziellen Mundhöhlen

Eine artifizielle Mundhöhle zur Untersuchung der Sekundärkariesbildung stellten *Fontana et al.* im Jahr 1996 vor. Sie verwendeten humane Unterkieferinzisivi, deren Wurzeln abgetrennt wurden sowie deren Labial- und Lingualflächen plan geschliffen wurden. Jeder Zahn wurde mit einer rechteckigen Kavität versehen, die mit einem Komposit versorgt wurde. Mit Ausnahme der Restauration und eines 0,5 mm breiten Streifens um die Restauration herum wurden die Zahnoberflächen mit einem säureresistenten Lack versehen. Für jede Gruppe von acht Zähnen stand ein eigenes Versuchsgefäß zur Verfügung, an dessen Boden die Zahnproben fixiert wurden. Die Versuchsgefäße befanden sich auf einem elektrischen Rührer innerhalb eines Inkubators (37 °C, aerobe Umgebungsbedingungen). Als Nährmedium diente dextrosefreies Trypticase Soja Bouillon, dem 5 % Saccharose zugefügt wurde (TSBS). Eine Mineralwaschlösung (MWL) wurde als artifizieller Speichel verwendet. Peristaltische Pumpen sorgten für die Flüssigkeitsbewegungen. Die verbrauchten Flüssigkeiten wurden aus

den Versuchsgefäßen in Abfallbehältnisse gepumpt. Das Versuchsprotokoll bestand aus wechselnden Zyklen von TSBS (3 x täglich für je 30 min, 0,7 ml / min, 63 ml / d) und MWL (insgesamt 22,5 h, 0,7 ml / min, 945 ml / d) für eine Versuchsdauer von 7 d oder 12 d. Während die Sterilisation der Zähne mit Ethylenoxid erfolgte, wurden die Modellbestandteile und Flüssigkeiten autoklaviert (121 °C, 20 min). Zur Inokulation der experimentellen Gruppen wurde eine Mischung einer *S. mutans*-Kultur und einer *L. casei*-Kultur in TSBS verwendet. Dazu wurden je 20 ml der Mischung pro Zahn auf den 0,5 mm breiten Streifen Zahnhartsubstanz angrenzend an die Restauration pipettiert. Nach einer zweistündigen Inkubation (37 °C) wurden die Zahnproben in den Versuchsgefäßen platziert und die artifizielle Mundhöhle zusammengebaut. Nach einer weiteren Inkubation für 2 h in TSBS starteten die Versuchszyklen. Die Kontrollgruppen durchliefen die Versuchszyklen ohne vorherige Inokulation mit *S. mutans* und *L. casei*. Zur Kontrolle des Modells erfolgten pH-Wertmessungen, Keimzahlbestimmungen und Reinheitskontrollen. Während der Testphasen fiel der pH-Wert bei den experimentellen Gruppen auf 4,1 – 4,5, bei den Kontrollgruppen lag er im Bereich von 6,8 – 7,0. Unerwünschte Kontaminationen waren nicht feststellbar. Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie ließen sich nach 7 d Versuchsdauer sekundärkariöse Läsionen feststellen, weshalb die Autoren schlussfolgerten, dass sich die artifizielle Mundhöhle zur Sekundärkariesforschung eigne [41].

Die artifizielle Mundhöhle nach *Fontana et al.* (1996) [41] wurde in einer weiteren Studie von *Fontana et al.* (1999) eingesetzt. Ziel war es, die antikariogenen Eigenschaften eines Kalzium-, Fluorid- und Hydroxylionen freisetzenden Restaurationsmaterials (Ariston pHc) gegenüber einem fluoridfreien Restaurationsmaterial (Silux) zu testen. Es gab vier Versuchsgruppen; humane Zähne wurden mit beiden Restaurationsmaterialien sowohl mit als auch ohne Randspalt versorgt. Nach einer Versuchsdauer von 7 d zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den an der Zahnoberfläche adhärenen Keimzahlen von *S. mutans* und *L. casei* pro Versuchsgruppe. Aufnahmen der Sekundärkaries wurden mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop gemacht und zeigten entsprechende Läsionen in allen Versuchsgruppen [42].

Eine modifizierte Version der artifiziellen Mundhöhle nach *Fontana et al.* (1996) [41] diente 2006 zur Untersuchung der Frage, ob ein Zusammenhang zwischen einer Residualkaries (affektiertes Dentin) und dem zukünftigen Entstehen einer Sekundärkaries besteht. Die Wurzeln von 18 einwurzeligen, extrahierten humanen Zähnen wurden je mit vier standardisierten Kavitäten (jeweils auf der Labial- und Lingualseite, apikal und zervikal) versehen. In den apikalen Kavitäten wurden chemisch artifizielle Läsionen erzeugt. Nach Anfärben mit einem Kariesdetektor und unvollständiger Kariesexkavati-

on mit einem Handinstrument wurden alle Kavitäten mit Komposit gefüllt. Die gesamten Lingualflächen der Zähne wurden vollständig mit einem säureresistenten Lack abgedeckt, um weitere Demineralisationen zu vermeiden. Auf den Labialflächen wurden die Restaurationen und ein 0,5 mm breiter Streifen um die Restaurationen herum ausgespart. Die Versuchsdauer in der artifiziellen Mundhöhle betrug drei Tage. Eine energie-dispersive Röntgenanalyse der Kalziumkonzentration angrenzend an die Grenzfläche zwischen Dentin und Restauration zeigte, dass das Belassen von affektiertem inneren Dentin die Anfälligkeit für die Entstehung einer Sekundärkaries nicht erhöht [7].

Im Jahre 2005 beschrieben *Seemann et al.* die Entwicklung einer artifiziellen Mundhöhle, welche innerhalb eines sterilisierbaren Handschuhkastens aufgebaut war, um Manipulationen und die Entnahme von Zahnproben durch zwei Luftschleusen während des Versuchs zu ermöglichen. Es wurden 25 kariesfreie Oberkieferprämolaren mit Fissurenversiegelungen versehen, wobei die mesialen Anteile der Fissur *lege artis* versorgt wurden. Bei den distalen Anteilen wurde die Entstehung eines Randspaltes durch Kontamination der Zahnoberfläche mit Speichel vor dem Einbringen des Fissurenversiegels provoziert. Die Zähne wurden auf einer rotierenden Oberfläche mit Platz für bis zu 60 Zahnproben in der Reaktionskammer befestigt. Es herrschten Umgebungsbedingungen von 37 °C und eine kontinuierliche Gaszufuhr von 19 Vol.-% O₂, 80 Vol.-% N₂ und 5 Vol.-% CO₂. Als Kontrollgruppe dienten fünf Zähne, die nach siebentägiger Versuchsdauer entnommen wurden. Danach erfolgte die Inokulation der verbliebenen Zähne mit 30 ml einer *S. mutans*-Übernachtskultur (ATCC 25175) und eine weitere Versuchsdauer von 14 Tagen. Der Vorgang der Inokulation wurde nach sieben Tagen wiederholt. Bei den tropfenweise zugeführten Flüssigkeiten handelte es sich um eine 10 %-ige Saccharoselösung, Trypticase Soja Bouillon (TSB) und artifiziellen Speichel. Es wurde jeweils für 5 min TSB, gefolgt von artifiziellem Speichel für 15 min im Wechsel während des gesamten Versuchs zugeführt. Einmal stündlich wurde eine 10 %-ige Saccharoselösung anstelle von TSB supplementiert. Die Flüssigkeitsbewegungen erfolgten über peristaltische Pumpen, die computergesteuert funktionierten. Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie konnten primärkariöse Läsionen und Kavitätenwandläsionen an allen Zähnen der Testgruppe festgestellt werden. Reinheitskontrollen der aus der Reaktionskammer ausgeleiteten Flüssigkeiten zeigten keine ungewollten Kontaminationen des Systems [123].

Diercke et al. (2009) untersuchten die Fragestellung, ob die Kavitätenwandläsionen der Sekundärkaries bei Restaurationen mit definierten Randspaltbreiten (50 µm, 100 µm, 250 µm) und bei Inhibition der Entstehung der Außenläsionen durch Auftragen eines säureresistenten Lackes entstehen. Es wurden Zahnblöcke boviner Zähne und eine

schlittenähnliche Konstruktion zur Erzeugung von Restaurationen definierter Randspaltbreiten verwendet. Der Zahnblock bildete den statischen Teil in der Konstruktion, ein Kompositblock war beweglich, sodass zwischen beiden Blöcken mithilfe des Einlegens von Metallstreifen definierter Dicke eine Randspaltbildung simuliert wurde. Die mikrobiologische Belastung erfolgte für 21 Tage in der artifizierten Mundhöhle nach *Seemann et al.* [123]. Es zeigte sich, dass die Kavitätenwandläsionen ohne Existenz der Außenläsionen entstehen können und das Ausmaß der Läsionen mit zunehmender Randspaltbreite steigt [30].

Ein oraler Biofilmreaktor wurde von *Hayati et al.* (2011) präsentiert. Probenschnittkörper boviner Inzisivi wurden mit Klasse-I-Kavitäten versehen und anschließend mit Komposit (Clearfil AP-X) gefüllt (mit / ohne Auftragen von Clearfil SE Bond). Die Kavitäten wurden mit einem definierten Unterschuss gefüllt; es wurden 0,8 mm der Kavitäten zur Zahnoberfläche hin unversorgt belassen, um die Akkumulation des Biofilms zu ermöglichen. Zur Inokulation diente eine Suspension von *S. mutans* MT8148, *S. sobrinus* 6715 und *S. gordonii* ATCC 10558 in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Der Versuchsaufbau bestand aus zwei Reaktionskammern, in denen die Zähne an einem Teflonhalter fixiert wurden. Eine Temperatur von 37 °C wurde durch Wasserummantelung der Reaktionskammer aufrechterhalten, ein Gasgemisch von 80 % N₂, 10 % H₂ und 10 % CO₂ wurde zugeführt und pH-Wertmessungen wurden über eine in der Reaktionskammer befindliche pH-Messelektrode durchgeführt. Peristaltische Pumpen, die von einem Computerprogramm gesteuert wurden, sorgten für die Flüssigkeitsbewegungen (Fließrate 6 ml / h). Die Bakterien suspension, das Nährmedium (saccharosehaltige Heartinfusion) und die phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) wurden kontinuierlich während der Versuchsdauer von 20 h zugeleitet. Die weitere Inkubation bei 37 °C für 7 d oder 30 d erfolgte außerhalb des Biofilmreaktors. Anhand von fluoreszenzmikroskopischen und rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ließen sich artifizielle sekundärkariöse Läsionen feststellen [52].

2.3.3 Tierversuche, humane *In-situ*- und *In-vivo*-Studien

Der Nachweis darüber, dass es sich bei Karies um eine übertragbare Infektionskrankheit handelt, gelang in Tierversuchen [59]. Des Weiteren konnten mit diesen Studien der Einfluss der Ernährung auf die Kariesentstehung, die Effektivität antikariogener Agenzien und die kariogenen Eigenschaften unterschiedlicher Bakterien spe zies untersucht werden [9,86]. Ein Vorteil von Tierversuchen gegenüber Labormodellen ist, dass die Untersuchungen in einer natürlichen Mundhöhle in Anwesenheit von natürlichem Speichel durchgeführt werden, welcher die Bestandteile der Wirtsabwehr enthält [86].

Auch können in Tierversuchen Fragestellungen untersucht werden, die *in vivo* ethisch nicht vertretbar wären [86]. Als nachteilig anzusehen ist, dass sich einerseits die tierische Mundhöhle von der des Menschen unterscheidet (Dentition, orale Mikrobiota, Speichelzusammensetzung *etc.*) [86] und andererseits durch Tierversuche ethische Konflikte resultieren können.

Humane *In-situ*-Modelle eignen sich zur Bildung von Biofilmen auf standardisierten Zahnhartsubstanzoberflächen bei Exposition gegenüber Mundhöhlenbedingungen. Die Zusammensetzung des Biofilms auf den Untersuchungsoberflächen ähnelt dem der natürlichen Zähne [86]. Eine Methode ist die Bildung von Retentionsstellen der Biofilmbildung mittels kieferorthopädischen Bändern an später zu extrahierenden Zähnen [86,159]. Eine weitere Möglichkeit stellt der Einsatz herausnehmbarer [86,159] oder festsitzender [159] Apparaturen dar, die humane oder bovine Zahnhartsubstanzoberflächen enthalten [86,159]. Die Demineralisation kann durch Beimpfen mit kariogenen Mikroorganismen oder durch zusätzliche intra- / extraoralen Zuckerspülungen forciert werden [86]. Die Studien sind durch eine hohe klinische Relevanz gekennzeichnet. Ein Problem dieser Studien ist, dass unter anderem der Speichelfluss, die orale Clearance sowie die Zusammensetzung des Biofilms intra- und interindividuell variieren. Dies erschwert die Standardisierung der Untersuchungen [86]. Des Weiteren ist die Anzahl der Studienteilnehmer zumeist begrenzt, wodurch die Repräsentativität der Ergebnisse für die Gesamtbevölkerung in Frage gestellt werden kann [159]. Im Vergleich zu *In-vitro*-Studien ist die Kontrolle der experimentellen Bedingungen geringer [86]. Auch stellt die mikrobielle Untersuchung der *in situ* gewonnenen Plaqueproben sich mitunter als zeitaufwendig, arbeits- sowie kostenintensiv dar [86]. Sowohl *In-situ*- wie auch *In-vivo*-Studien sind kostenintensiv und die Ergebnisse abhängig von der Compliance der Probanden [86]. Nichtsdestotrotz sind *In-vivo*-Studien unerlässlich zur Bestimmung der klinischen Effektivität [86] und von hoher klinischer Relevanz [159].

Tabelle 2: In artifizialen Mundhöhlen verwendete Bakterienstämme.

Autoren	Verwendete Bakterienstämme	Kulturart
Pigman et al. (1957) [113]	<i>L. casei</i> ATCC 4646, <i>S. faecalis</i> ATCC 4083, <i>S. salivarius</i> ATCC 9756, <i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i> , <i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>albus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> ATCC 846, <i>Neisseria catarrhalis</i>	Monokulturen
Donoghue, Perrons, Hudson (1985) [35]	<i>S. rattus (mutans)</i> BHT und <i>S. mitior</i> LPA-1	Mono- und Mischkulturen
Katz et al. (1986) [57]	<i>S. mutans</i>	Monokultur
Donoghue, Perrons (1988) [36]	<i>S. mitior</i> LPA-1, <i>A. viscosus</i> WVU627, <i>V. alcalescens</i> OMZ193, (<i>S. mutans</i> C67-1)	Mono- und Mischkulturen
Noorda et al. (1988) [104]	<i>S. mutans</i> C67-1 und <i>V. alcalescens</i> V-1	Monokulturen
Perrons, Donoghue (1990) [110]	<i>A. viscosus</i> WVU627, <i>S. mitior</i> LPA-1, <i>V. dispar</i> OMZ193, <i>S. mutans</i> C67-1	Mono- und Mischkulturen
Schiffner, Schmeiser (1995) [121]	<i>S. mutans</i> , Serotyp c	Monokultur
Fontana et al. (1996) [41]	<i>S. mutans</i> TH 16, Serotyp c und <i>L. casei</i> ATCC 7669	Mischkultur
Sissons, Wong, Shu (1998) [130]	<i>S. mutans</i> ATCC 10449	Monokultur
Fontana, González-Cabezas, Wilson (1999) [42]	<i>S. mutans</i> und <i>L. casei</i>	Mischkultur
Shu, Wong, Miller, Sissons (2000) [125]	<i>S. mutans</i> ATCC 25175, <i>S. sobrinus</i> O1H1, <i>A. naeslundii</i> WVU 626 und <i>L. rhamnosus / casei</i> ATCC 7469	Mono- und Mischkulturen
Seemann et al. (2005) [123]	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	Monokultur
Borczyk, Piątowska, Krzemiński (2006) [7]	<i>S. mutans</i> ATCC 25175 und <i>L. casei</i> ATCC 7469	Mischkultur
Ritzmann (2008) [117]	<i>S. mutans</i> ATCC 10449	Monokultur
Diercke et al. (2009) [30]	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	Monokultur
Hayati et al. (2011) [52]	<i>S. mutans</i> MT8148, <i>S. sobrinus</i> 6715 und <i>S. gordonii</i> ATCC 10558	Mischkultur
Schmidt (2013) [122]	<i>S. mutans</i> DSM Nr. 20523	Monokultur
Krämer et al. (2015) [72]	<i>S. mutans</i> DSM Nr. 20523	Monokultur

3 Ziel der Arbeit und Nullhypothesen

Ziel der Arbeit war die Weiterentwicklung des vorhandenen *S. mutans*-basierten Kariesmodells durch Etablierung von *L. casei* (DSM Nr.: 20021). Des Weiteren sollten Restaurationsmaterialien (ein konventioneller Glasionomerzement, ein kunststoffmodifizierter Glasionomerzement, ein adhäsiv befestigtes Komposit mit und ohne Anwendung der Etch-and-rinse-Technik) bezüglich möglicher kariesinhibitorischer Effekte im Füllungsrandbereich untersucht werden.

Folgende Fragen stellten sich:

- 1) Gelingt eine Weiterentwicklung des *S. mutans*-basierten, automatisierten Kariesmodells durch Etablierung einer weiteren Bakterienspezies (*L. casei*)?
- 2) Lassen sich auch nach der Weiterentwicklung des *S. mutans*-basierten Kariesmodells durch Etablierung von *L. casei* artifizielle sekundärkariöse Läsionen im Füllungsrandbereich erzeugen?
- 3) Sind kariesinhibitorische Effekte der verwendeten Restaurationsmaterialien hinsichtlich der Sekundärkariesentstehung feststellbar?

Nullhypothesen:

- 1) Eine Weiterentwicklung des vorhandenen *S. mutans*-basierten Kariesmodells durch Etablierung von *L. casei* ist nicht möglich.
- 2) Es ist nicht möglich, nach Weiterentwicklung des Kariesmodells durch Etablierung von *L. casei* artifizielle sekundärkariöse Läsionen im Füllungsrandbereich zu erzeugen.
- 3) Es lassen sich keine Unterschiede in den kariesinhibitorischen Eigenschaften bezüglich der Demineralisationstiefen, der Substanzverluste infolge der Demineralisation, der Gesamtdemineralisationen und der Randspaltbreiten zwischen den einzelnen Restaurationsmaterialien (konventioneller Glasionomerzement, kunststoffmodifizierter Glasionomerzement sowie Komposit, Dentinbondingagant (DBA) mit und ohne Anwendung der Etch-and-rinse-Technik) feststellen.

4 Material und Methode

4.1 Zahnproben

4.1.1 Probenauswahl und -lagerung

Zur Durchführung der Versuche wurden kariesfreie humane dritte Molaren verwendet. Nach deren Extraktion oder operativen Entfernung wurden die Zähne maximal vier Wochen in 0,5 %-iger Chloramin-T-Lösung (Chloramin T Trihydrat, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) gelagert. Für die Studie lag ein positives Votum der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen vor (Aktenzeichen 143 / 09). Es erfolgte die manuelle Reinigung der Zähne mit einem Scaler (Hu Friedy everedge SH 6 / 79, Hu Friedy Mfg. B.V., Rotterdam, Niederlande) und das Einfrieren bei -18 °C in *Aqua dest.* bis zur weiteren Verwendung. Nach dem Auftauen der Zähne auf Raumtemperatur wurden diese mittels eines Pulverstrahlgerätes (PROPHYflex 3, KaVo Dental GmbH, Biberach / Riß) gesäubert, mit Wasserspray gereinigt und mit öl- sowie wasserfreier Luft getrocknet. Noch vorhandene Reste von organischem Gewebe wurden mit einem Scaler (Hu Friedy everedge SH 6 / 79, Hu Friedy Mfg. B.V.) entfernt. Die Zähne wurden randomisiert vier Gruppen zugeordnet. Der Probenumfang eines Versuchsdurchlaufes umfasste zwölf Zähne, sodass je drei Zähne einer Gruppe zugeordnet werden konnten. Insgesamt wurden fünf Versuchsdurchläufe durchgeführt. Die Summe der Zahnproben pro Gruppe umfasste somit 15 Zähne. Zur Identifikation der einzelnen Zähne wurde auf der Füllung gegenüberliegenden Zahnseite eine Ziffer mit einem Finierdiamanten (Nr.: 8801.314.012, Komet Dental, Gebr. Brasseler GmbH & Co. KG, Lemgo) präpariert.

4.1.2 Kavitätendesign

Bei jeder Zahnprobe wurde eine Klasse-V-Kavität nach *Black* (1914) [5] auf der bukkalen oder oralen Glatfläche des Zahnes präpariert (s. Abbildung 1, S. 30). Die Schmelz-Zement-Grenze verlief dabei auf Höhe der halben Breite der Kavität, sodass die eine Hälfte der Präparation von Schmelz begrenzt und die andere Hälfte von Zement begrenzt war. Die Größe der Kavitäten war standardisiert, eine Ausdehnung von 4 - 5 mm in mesio-distaler Richtung, von 2 - 3 mm in okklusal-apikaler Richtung und eine Tiefe von 1,8 mm durften nicht überschritten werden. Zur Erzielung einer einheitlichen Tiefe der Kavitäten wurde der Substanzabtrag unter Verwendung eines diamantierten Bohrers des Occlusal Reduction Kit (Nr. 828O 017, Hager & Meisinger GmbH, Neuss) durchgeführt. Das Finieren der Kavitäten erfolgte danach mit einem diamantier-

ten Zylinder (Nr.: 8835KR.314.010, Komet Dental, Gebr. Brasseler GmbH & Co. KG) hohtourig unter Wasserkühlung. Zur Erzielung einer parallelwandigen Kavität wurde der Bohrer senkrecht zur Zahnoberfläche geführt. Sowohl eine Überschreitung der oben genannten Maße als auch eine Pulpaexposition im Rahmen der Präparation wurden als Ausschlusskriterien gewertet.

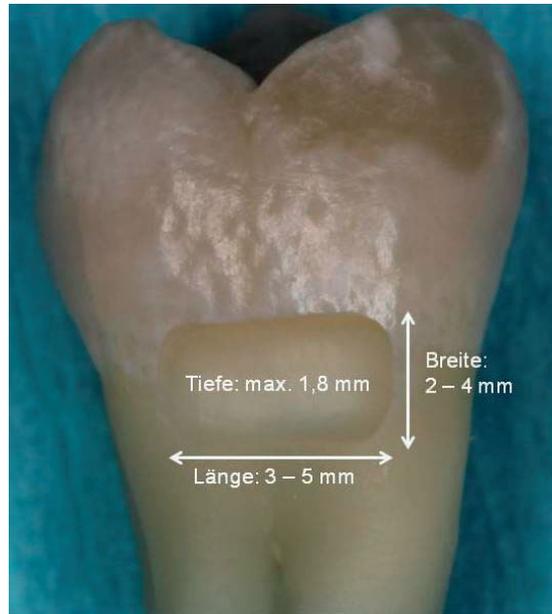


Abbildung 1: Kavitätdesign.

4.1.3 Verwendete Restaurationmaterialien und deren Verarbeitung

Im Anschluss an die Präparationen wurden die Zähne mit Füllungen versorgt, wobei die verwendeten Füllungsmaterialien nach Herstellerangaben verarbeitet wurden (s. Tabelle 3, S. 31). Bei den Restaurationmaterialien handelte es sich um einen konventionellen Glasionomerzement namens Ketac™ Molar Aplicap™ (3M Deutschland GmbH, 3M ESPE, Seefeld) und einen kunststoffmodifizierten Glasionomerzement (Photac™ Fil Quick Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE). Des Weiteren wurde das Komposit Ceram•X® mono (DENTSPLY DeTrey GmbH, Konstanz) in Kombination mit dem Haftvermittler Prime&Bond® NT (DENTSPLY DeTrey GmbH) verwendet. Zwei Gruppen wurden mit letzterem Restaurationmaterial versorgt, wobei sie sich darin unterschieden, dass bei einer Gruppe zusätzlich eine Konditionierung mit 35 %-iger Orthophosphorsäure (Vocoid, Voco GmbH, Cuxhaven) nach der Etch-and-rinse-Technik (nachfolgend mit SÄT abgekürzt) durchgeführt wurde, während bei der anderen Gruppe darauf verzichtet wurde, um die Entstehung eines Randspaltes zu provozieren.

Tabelle 3: Verwendete Restaurationsmaterialien.

Materialname	Materialklassifikation	Hersteller	LOT- Nummer
Photac™ Fil Quick Aplicap™ (A3)	Kunststoffmodifizierter Glasionomerzement	3M Deutschland GmbH, 3M ESPE, Seefeld	505647
Ketac™ Molar Apli- cap™ (A3)	Konventioneller Glasionomerzement	3M Deutschland GmbH, 3M ESPE, Seefeld	505470
Ceram•X® mono (M5)	Komposit	DENTSPLY DeTrey GmbH, Konstanz	1302000799
Prime&Bond® NT	Dentinbondingagent (DBA, Selbstprimen- der Haftvermittler)	DENTSPLY DeTrey GmbH, Konstanz	1110001496
Vocoid	35 %-ige Orthophos- phorsäure	Voco GmbH, Cuxhaven	1209623
Ketac Conditioner		3M Deutschland GmbH, 3M ESPE, Seefeld	508215
Ketac Glaze		3M Deutschland GmbH, 3M ESPE, Seefeld	499261

Gruppe 1: Kunststoffmodifizierter Glasionomerzement

Nach der Präparation wurde die Kavität mit Wasserspray gereinigt und mit wasser- sowie ölfreier Luft getrocknet, wobei darauf geachtet wurde, den Zahn nicht zu über-trocknen. Mit einem Aktivator (3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) wurde die Photac™ Fil Quick Aplicap™ Kapsel (3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) aktiviert, wobei der Applikatorhebel für 2 - 4 s heruntergedrückt gehalten wurde, um eine vollständige Ent-leerung der Flüssigkeit in das Pulver zu gewährleisten. Das daran anschließende Mi-schen erfolgte im RotoMix™-Rotationsmischgerät (3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) für 8 s. Das Restaurationsmaterial wurde in 1 - 2 Inkrementen mit einem Heidemann-spatel (PluLine Nr. 41357, Pluradent AG & Co. KG, Offenbach) und einem Kugelstop-fer (PluLine Nr. 41083, Pluradent AG & Co. KG) in einer Schichtstärke von maximal 2 mm eingebracht. Jede Schicht wurde mit der Bluephase-Polymerisationslampe (Ivo-clar Vivadent GmbH, Shaan, Liechtenstein) für 40 s lichtgehärtet.

Gruppe 2: Konventioneller Glasionomerzement

Zur Entfernung der im Rahmen der Präparation entstandenen Schmierschicht wurde Ketac Conditioner (3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) mit einem Microbrush® (Microbrush® International, Grafton, WI, USA) in der Kavität aufgetragen. Nach einer Einwirkdauer von 10 s wurde dieser mit Wasserspray entfernt. Die Trocknung erfolgte in 2 - 3 Intervallen mit wasser- und ölfreier Luft ohne dabei eine Übertrocknung herbeizuführen. Zur Aktivierung der Ketac™ Molar Aplicap™ Kapsel (3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) wurde diese in den Aktivator (3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) gelegt und der Hebel für 2 - 4 s vollständig heruntergedrückt gehalten. Nach dem Mischen von Pulver und Flüssigkeit im RotoMix™-Rotationsmischgerät (3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) für 8 s wurde das Füllungsmaterial unter Verwendung eines Kugelstopfers (PluLine Nr. 41083, Pluradent AG & Co. KG) und eines Heidemannspatels (PluLine Nr. 41357, Pluradent AG & Co. KG) in die Kavität eingebracht. Da Ketac™ Molar Aplicap™ (3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) während der Abbindephase sowohl wasser- als auch austrocknungsempfindlich ist, wurde Ketac Glaze (3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) mit einem Microbrush® (Microbrush® International) als Füllungsschutz aufgetragen und für 10 s mit der Bluephase-Polymerisationslampe (Ivoclar Vivadent GmbH) lichtgehärtet.

Gruppe 3: Komposit, DBA mit Säurekonditionierung von Schmelz und Dentin (Etch-and-rinse-Technik)

Die Säurekonditionierung erfolgte mit 35 %-iger Orthophosphorsäure (Vocoid, Voco GmbH), wobei die Einwirkzeit auf dem Schmelz 30 s und auf dem Dentin maximal 15 s betrug. Nach Ablauf der Zeit wurde die Säure sorgfältig mit Wasserspray abgesprüht und der Zahn anschließend vorsichtig getrocknet. Bei dem verwendeten Adhäsivsystem handelte es sich um Prime&Bond® NT (DENTSPLY DeTrey GmbH), welches mit einem Microbrush® (Microbrush® International) auf die Kavitätenwände aufgetragen und für 20 s einmassiert wurde. Es wurde dabei darauf geachtet, dass die präparierten Flächen während der gesamten Einwirkzeit mit dem Material gut benetzt waren. Das überschüssige Lösungsmittel wurde dann mit wasser- und ölfreier Luft für mindestens 5 s verblasen und der Haftvermittler für 20 s lichtgehärtet (Bluephase-Polymerisationslampe, Ivoclar Vivadent GmbH). Das Komposit Ceram•X® mono (DENTSPLY DeTrey GmbH) wurde nach der Inkrementtechnik mit einer Schichtstärke von maximal 2 mm in die Kavität eingebracht und jede einzelne Schicht mit der Bluephase-Polymerisationslampe (Ivoclar Vivadent GmbH) für 40 s ausgehärtet.

Gruppe 4: Komposit, DBA ohne Säurekonditionierung von Schmelz und Dentin (Etch-and-rinse-Technik)

Bei Gruppe 4 wurde keine Säurekonditionierung der präparierten Zahnflächen mit 35 %-iger Orthophosphorsäure durchgeführt, ansonsten wurde analog zur Behandlung der Zähne der Gruppe 3 vorgegangen.

Nach dem Legen der Füllungen wurden bei sämtlichen Zähnen die groben Überschüsse mit einem Scaler (Hu Friedy everedge SH 6/79, Hu Friedy Mfg. B.V.) entfernt. Danach erfolgten die Ausarbeitung und die Politur mit rotierenden Al₂O₃-beschichteten Scheiben (Sof-Lex™-Scheiben, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) im niedrigen Drehzahlbereich unter Wasserkühlung. Es wurden dabei Scheiben der Körnungen grob, mittel, fein und sehr fein nacheinander verwendet. Auf die vollständige Entfernung der Überschüsse wurde besonders geachtet.

4.1.4 Inkubation

Nach der Ausarbeitung und der Politur der Füllungen wurden die Zähne in *Aqua dest.* für insgesamt vier Wochen bei 37 °C in einem Brutschrank (Typ B20, Heraeus Holding GmbH, Hanau) gelagert. Dies diente der Simulation des Tragens einer zahnärztlichen Restauration in der Mundhöhle des Patienten. Nach einer anfänglichen Inkubation von 72 h wurden die Oberflächen der Füllungen nochmals mit Sof-Lex™-Scheiben (3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) nachbearbeitet, um letzte Füllungsmaterialüberschüsse vollständig zu beseitigen.

4.1.5 Thermozyklische Belastung

Im Anschluss an die Lagerung erfolgte eine thermozyklische Belastung der restaurierten Zähne im Thermocycler (TCS 30, Syndicad, München). Zur Simulation eines Alterungsprozesses der Restaurationen durchliefen sämtliche Zahnproben eine Summe von 10 000 Zyklen. Ein Zyklus umfasste eine Kaltwasserphase von 15 s bei + 5 °C, eine Warmwasserphase von 15 s bei + 55 °C und im Anschluss jeweils eine Abtropfphase von 15 s.

4.1.6 Weitere vorbereitende Maßnahmen

Nach der thermozyklischen Belastung und vor der Befestigung der Zähne an Kausimulatorplatten (Sonderanfertigung, Festo AG & Co. KG Systemtechnik, Denkendorf) wurde das apikale Wurzeldrittel aller Zähne mithilfe einer diamantierten Trennscheibe (H333C300, Horico, Hopf, Ringleb & Co. GmbH & Cie., Berlin) rotierend abgetrennt. Dadurch wurde ein Zugang zur Pulpakammer geschaffen und vorhandenes Pulpage-

webe konnte mit einem Scaler (Hu Friedy everedge SH 6/79, Hu Friedy Mfg. B.V.) entfernt werden. Danach wurden die Zähne mit Supradent-Wachs (Chemisches Dental Labor Oppermann-Schwedler, Bonn) an Kausimulatorplatten (Festo AG & Co. KG Systemtechnik) fixiert und sämtliche Öffnungen zur Pulpakammer mit Supradent-Wachs (Chemisches Dental Labor Oppermann-Schwedler) verschlossen. Die Zähne wurden für eine Dauer von 2 h in 70 %-igem Ethanol desinfiziert, wobei die Lösung in regelmäßigen Abständen vorsichtig geschwenkt wurde. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden die Kausimulatorplatten (Festo AG & Co. KG Systemtechnik) samt den daran befestigten Zähnen mittels einer Pinzette (PluLine St Nr. 43083, Pluradent AG & Co. KG) unter einer Clean Bench (Thermo Fisher Scientific™ Inc., Waltham, MA, USA) in die dafür vorgesehenen Bohrungen des Tefloneinsatzes (Bretthauer GmbH, Dillenburg) der Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware, Rochester, NY, USA) gesteckt.

4.1.7 Abformung und Modellherstellung

Die Zahnproben wurden nach der Doppelmischabformtechnik unter Verwendung eines additionsvernetzenden Silikons (Panasil® Putty und Panasil® initial contact Light, Kettenbach GmbH & Co. KG, Eschenburg) und Einzelzahnabformlöffeln (Miratray®-Mini, Hager Werken, Duisburg) abgeformt. Von jeder Zahnprobe wurden insgesamt zwei Abformungen genommen; jeweils eine Abformung nach der thermozyklischen Belastung der Zahnproben sowie eine Abformung nach der mikrobiologischen Belastung im Kariesmodell. Mithilfe der Abformungen wurden Replikas der Zähne auf Polyurethanbasis (AlphaDie MF, Schütz Dental GmbH, Rosbach) hergestellt, wobei die Materialverarbeitung nach Herstellerangaben erfolgte. Dazu wurden die vorgeschriebenen Mengen von Basismaterial (10 g) und Füllstoff (ca. 14 g) miteinander vermischt. Im Anschluss wurde der Härter (5 g) hinzugefügt, womit das Mischungsverhältnis von Basis zu Härter 2:1 betrug. Nach einer Anmischzeit von 30 s wurden die Abformungen mit AlphaDie (Schütz Dental GmbH) ausgegossen und für 15 min im Drucktopf (Polyclav®, Dentaforum GmbH & Co. KG, Ispringen) bei 2 bar gelagert. Die Entnahme der Replikas aus den Abformungen erfolgte 1 h nach dem Ausgießen.

4.2 Artificielle Mundhöhle: Das biofilmbasierte Kariesmodell

4.2.1 Bestandteile des Kariesmodells

Das verwendete Kariesmodell basierte auf dem von *Ritzmann* (2008) entwickelten Aufbau und Funktionsprinzip [117]. Eine schematische Darstellung des Kariesmodells zeigt Abbildung 2 (S. 39). Es setzte sich zusammen aus einer Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware, Rochester, NY, USA) zur Fixierung der Zahnproben, einem Bakterienreservoirkolben (Schott AG, Mainz) zur Aufnahme der Bakterien, zwei 20 l fassenden Reservoirgefäßen (Schott AG) zur Bevorratung von Nährmedium und artifiziellem Speichel sowie einem 10 l fassenden Abfallgefäß (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) zum Auffangen der verbrauchten Flüssigkeiten. Eine weitere angeschlossene, 500 ml fassende Laborflasche (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) wurde für die Reinheitskontrolle benötigt und diente zur Entnahme der Bakterienlösung nach dem Aufenthalt in der Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware). Sämtliche Bestandteile waren durch Silikon-Pumpenschläuche (Carl Roth GmbH & Co. KG) und Steckverbindungen (Carl Roth GmbH & Co. KG) miteinander verbunden, um einen Abbau des Modells in Einzelbestandteile zu gewährleisten. Dadurch konnten sämtliche Bestandteile des Kariesmodells einzeln verpackt und autoklaviert werden. Die Schläuche (Carl Roth GmbH & Co. KG) wurden über Pumpen (Carl Roth GmbH & Co. KG) geleitet und waren für die Flüssigkeitsbewegungen im System verantwortlich. Die Pumpen (Carl Roth GmbH & Co. KG) wurden mittels einer Steuereinheit, die mit einem Personal Computer (Betriebssystem Windows XP) verbunden war, automatisch an- und ausgeschaltet. Zur kontinuierlichen Überwachung des pH-Wertverlaufes diente eine pH-Messelektrode (SI Analytics Electrode N1048 1M – DIN – ID, SI Analytics GmbH, Mainz) im Inneren der Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware), deren Messungen über ein Labor pH-Meter (Schott Instruments Lab 870, Schott AG) an den Personal Computer geleitet wurden. Mit Ausnahme der Reservoirgefäße (Schott AG) für den artifiziiellen Speichel und das Nährmedium befanden sich die Bestandteile des Kariesmodells in einem Temperierlager-schrank (IPS Memmert, Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach) bei 37 °C. Darin wurde das Kariesmodell in zweifacher Ausführung aufgebaut, sodass zwei unabhängig voneinander funktionierende Kariesmodelle gleichzeitig gestartet werden konnten (s. Abbildung 6, S. 50).

Reaktionskammer

In der Reaktionskammer (300 - 4100 Reusable Filter Holder with Receiver, Thermo Scientific™ Nalgene™ labware, Rochester, NY, USA) befanden sich die Zahnproben während der Durchführung der Versuche. Die Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) bestand aus einem Kunststoffgefäß mit verschraubbarem Deckel und mehreren Steckverbindungen (Carl Roth GmbH & Co. KG). Sämtliche Bestandteile waren autoklavierbar. In das Innere wurde ein mit zwölf Bohrungen versehener Einsatz aus Teflon (Bretthauer GmbH, Dillenburg) zur Aufnahme der an den Kausimulatorplatten (Festo AG & Co. KG Systemtechnik) befestigten Zahnproben eingebracht. Über den verschraubbaren Deckel konnte die Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) luftdicht verschlossen werden. Der Schraubverschluss enthielt insgesamt drei Steckverbindungen (Carl Roth GmbH & Co. KG); eine für den Luftfilter (Duran® Group, Schott AG), eine weitere zum Einleiten der Bakterienlösung zu Beginn der Demineralisationsphase und die dritte diente der Zufuhr von artifiziellem Speichel zu Beginn der Remineralisationsphase. Eine in der Mitte des Schraubverschlusses befindliche Halterung aus Teflon (Bretthauer GmbH) wurde zur Befestigung der pH-Messelektrode (SI Analytics GmbH) verwendet. Es handelte sich hierbei um einen Hohlzylinder, durch den die pH-Messelektrode (SI Analytics GmbH) ins Innere der Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) geschoben werden konnte, wo sie während der Versuchsdurchführung zur kontinuierlichen pH-Wertaufzeichnung verblieb. Eine Steckverbindung (Carl Roth GmbH & Co. KG) am Boden der Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) leitete die Flüssigkeiten in Richtung Abfallgefäß (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware). Die Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) wurde an den Innenwänden eines autoklavierbaren Metallkorbes befestigt, was der Stabilisierung diente und ein Umkippen verhinderte.

Bakterienreservoirkolben

Der Bakterienreservoirkolben (500 ml Erlenmeyerkolben, Weithals, Durchmesser 50 mm, Duran® Laborglas, Schott AG) wurde zur Anzucht und Bevorratung der Bakterien verwendet. Es handelte sich dabei um einen modifizierten Erlenmeyerkolben (Schott AG), der ein Volumen von 500 ml fassen konnte. Die Glasbläserei des Chemischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen hatte nach Vorlage von *Ritzmann* (2008) [117] ca. 1 cm oberhalb des Kolbenbodens eine sogenannte Olive aus feuerfestem Glas angebracht, auf die ein Schlauch (Carl Roth GmbH & Co. KG) aufgesteckt werden konnte und die zum Ausleiten der Bakterienlösung in Richtung Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) diente. Die Positionierung der Olive erfüllte den Zweck, dass beim Abpumpvorgang am Ende einer Wachstumsphase der

Bakterien von 6 h der Bakterienreservoirkolben (Schott AG) nahezu vollständig entleert werden konnte. Zusätzlich befanden sich am Boden des Kolbens zehn Klarwasser Bio Filter Röhrrchen (Dennerle GmbH, Vinningen), die auf einem Draht (remanium®, federhart, \varnothing 0,8 mm, Dentaurum GmbH & Co. KG) aufgereiht waren und aufgrund der rauhen Oberfläche der Bakterienadhäsion zuträglich waren. Die daran anhaftenden Bakterien konnten sich während der nächsten Wachstumsphase vermehren. Luftdicht verschlossen wurde der Reservoirkolben (Schott AG) durch einen Silikon-Schwammstopfen (Carl Roth GmbH & Co. KG). Durch diesen ragte ein Metallrohr in den Kolben, das über eine Steckverbindung (Carl Roth GmbH & Co. KG) mit dem Reservoirgefäß (Schott AG) des Nährmediums verbunden war. Auf diese Weise konnte das Nährmedium in den Bakterienreservoirkolben (Schott AG) gepumpt werden. Der Bakterienreservoirkolben (Schott AG) stand auf einem Magnetrührer (IKA® - Werke GmbH & Co. KG, Staufen). Dieser sorgte, auf niedrigster Stufe eingestellt, für eine konstante Flüssigkeitsbewegung.

Reservoirgefäße

Zur Aufnahme von Nährmedium und artifiziellem Speichel wurden Glasflaschen (Duran® Laborglas, Schott AG), die ein Volumen von 20 l fassen konnten, verwendet. Zur einfacheren Handhabung befanden sich die Flaschen in eigens dafür angefertigten Metallkörben (Systec GmbH, Linden), deren Maschen mit Kunststoffschläuchen durchzogen waren. Der Schraubverschluss (Systec GmbH) jeder Flasche enthielt einen Luftfilter (Duran® Group) zum Druckausgleich sowie eine Steckverbindung (Carl Roth GmbH & Co. KG) zum Anschluss an das Kariesmodell. Ein in die Flasche ragendes Metallrohr des Schraubverschlusses (Systec GmbH) diente zur Aufnahme des Temperaturfühlers während des Autoklaviervorganges, um so die Kerntemperatur innerhalb des Gefäßes zu ermitteln und eine ausreichende Sterilisierdauer zu ermöglichen.

Abfallgefäß

Ein Abfallgefäß (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) wurde zur Aufnahme der aus der Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) abgepumpten Flüssigkeiten eingesetzt. Es handelte sich um eine 10 l fassende Kunststoffflasche, in deren Deckel sich ein Luftfilter (Duran® Group) und eine Steckverbindung (Carl Roth GmbH & Co. KG) zum Anschluss an das Kariesmodell befanden. Das Abfallgefäß (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) wurde jeweils nach zwei Tagen unter Vermeidung unerwünschter Kontaminationen gewechselt. Auf diese Weise wurde zum einen verfahren, um einen sicheren Umgang mit den kontaminierten Flüssigkeiten zu gewähr-

leisten, da kleinere Volumina einfacher zu transportieren und autoklavieren waren. Zum anderen wurde eine unangenehme Geruchsbildung vermieden.

Tropfenfallen

Die verwendeten Tropfenfallen dienten der Verhinderung einer retrograden bakteriellen Kontamination der Flüssigmedien während der Versuchsdurchführung. Wie von *Ritzmann* (2008) beschrieben wurde [117], kam es bei Verzicht auf den Einsatz von Tropfenfallen während der Versuche zur bakteriellen Besiedelung der Medien. Bei den Tropfenfallen handelte es sich um Sonderanfertigungen der Glasbläserei des Chemischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen aus hitzebeständigem Glas, die nach Vorlage [117] gefertigt wurden. Es wurden insgesamt drei Tropfenfallen im Kariesmodell eingebaut: Die erste Tropfenfalle befand sich zwischen dem Reservoirgefäß (Schott AG) des Nährmediums und dem Bakterienreservoirkolben (Schott AG), die zweite zwischen dem Bakterienreservoirkolben (Schott AG) und der Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) und die dritte wurde zwischen dem Reservoirgefäß (Schott AG) des artifiziellen Speichels und der Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) eingebaut.

Pumpen

Insgesamt vier Pumpen (Pericyclische Pumpe Roth Cyclo II, Carl Roth GmbH & Co. KG) sorgten für die Flüssigkeitsbewegungen innerhalb des Kariesmodells. Pumpe 1 (Carl Roth GmbH & Co. KG) transportierte das Nährmedium aus dem Reservoirgefäß (Schott AG) in den Bakterienreservoirkolben (Schott AG). Von dort aus pumpte Pumpe 2 (Carl Roth GmbH & Co. KG) die Bakterienlösung nach einer Wachstumszeit der Bakterien von 6 h in die Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) zum Einleiten der Demineralisationsphase. Pumpe 3 (Carl Roth GmbH & Co. KG) leitete den artifiziellen Speichel aus dem Reservoirgefäß (Schott AG) zu Beginn der Remineralisationsphase in die Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware). Sämtliche sich in der Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) befindlichen Flüssigkeiten wurden durch Pumpe 4 (Carl Roth GmbH & Co. KG) in das Abfallgefäß (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) entleert.

Personal Computer, Steuereinheit und Steuersoftware

Mithilfe der von *Ritzmann* (2008) entwickelten Steuereinheit konnten sämtliche Pumpen (Carl Roth GmbH & Co. KG) automatisch angesteuert und koordiniert werden [117]. Die Steuereinheit enthielt acht Steckdosen zum Anschluss der Pumpen (Carl Roth GmbH & Co. KG) und wurde an einen Personal Computer (Betriebssystem Windows XP) mit installierter Steuersoftware LeC (LeC Steuersoftware für Relaisplati-

nen 8-fach seriell, Conrad Electronic SE, Hirschau) angeschlossen. Die Steuersoftware LeC ermöglichte nach Programmierung die Steuerung der Pumpen (Carl Roth GmbH & Co. KG). Es wurde ein 24-stündiges Versuchsprotokoll programmiert, das die Informationen über den genauen Zeitpunkt, die anzusteuende Pumpe und den Schaltvorgang (Ein- / Ausschalten) enthielt. Dieses Protokoll wurde dann automatisch für eine Dauer von insgesamt 10 d wiederholt. Dadurch konnten die einzelnen Pumpen (Carl Roth GmbH & Co. KG) durch Stromzufuhr beziehungsweise Unterbrechung des Stromflusses zum gegebenen Zeitpunkt entweder an- oder ausgeschaltet werden.

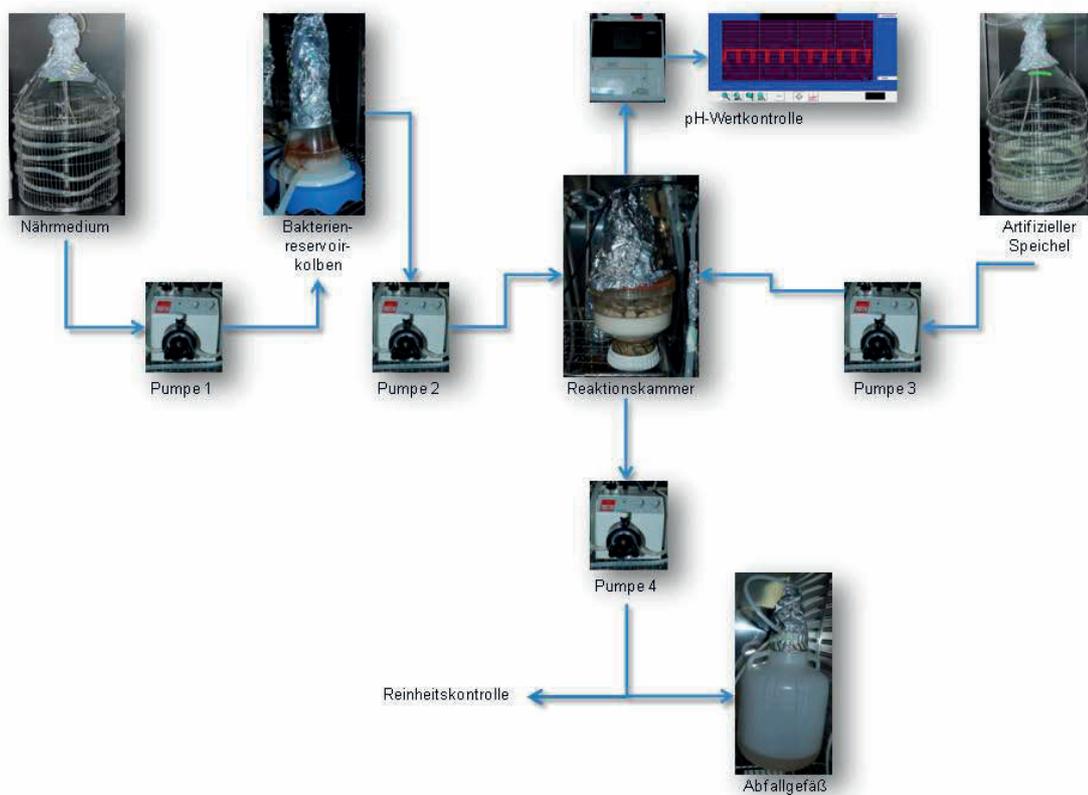


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Kariesmodells. Das Nährmedium wurde über Pumpe 1 in den Bakterienreservoirkolben gepumpt und von dort gelangte die Flüssigkeit über Pumpe 2 in die Reaktionskammer, in der sich die Zahnproben befanden. Pumpe 3 sorgte für den Transport des künstlichen Speichels in die Reaktionskammer. Das Abpumpen der Flüssigkeiten erfolgte über Pumpe 4 entweder in das Abfallgefäß oder zur Reinheitskontrolle in eine zusätzlich angeschlossene 500 ml Flasche. Der pH-Wert innerhalb der Reaktionskammer wurde kontinuierlich über eine pH-Messelektrode gemessen und aufgezeichnet.

4.3 Verwendete Flüssigmedien

4.3.1 Nährmedium

Schaedler Broth (BD, BBL™ Schaedler Broth, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) wurde als Nährmedium im Kariesmodell verwendet (s. Tabelle 4). Hierzu wurden nach Herstellerangaben jeweils 28,4 g des Pulvers in 1 l *Aqua dest.* vollständig durch Schwenken der Flüssigkeit gelöst. Das Ansetzen des Nährmediums erfolgte im Reservoirgefäß (Schott AG), wobei eine Gesamtmenge von 15 l Nährmedium für eine Versuchsdurchführung hergestellt wurde. Nach dem Ansetzen wurde das Nährmedium bei 121 °C und 2 bar für 15 min autoklaviert (Autoklav VX-75, Systec GmbH). Hierbei wurde der Schraubverschluss (Systec GmbH) des Reservoirgefäßes (Schott AG) nicht fest verschraubt, um ein Eindringen des gesättigten Wasserdampfes in das Reservoirgefäß (Schott AG) zu ermöglichen. Eine um den Schraubverschluss (Systec GmbH) herum adaptierte Aluminiumfolie (Carl Roth GmbH & Co. KG) diente zusätzlich als Schutz vor Kontaminationen. Unmittelbar nach dem Ende des Sterilisationsprozesses wurde der Schraubverschluss (Systec GmbH) des Reservoirgefäßes (Schott AG) fest verschlossen und das Gefäß bis zum Zusammenbau des Kariesmodells im Kühlraum des Instituts für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH bei 4 °C gelagert.

Tabelle 4: Zusammensetzung von 28,4 g Schaedler Broth (Herstellerangaben).

Inhaltsstoffe	Mengenangabe [g]
Pancreatic Digest of Casein	8,1
Peptic Digest of Animal Tissue	2,5
Papaic Digest of Soybean Meal	1,0
Dextrose	5,82
Yeast Extract	5,0
Sodium Chloride	1,7
Dipotassium Phosphate	0,82
Hemin	0,01
L-Cystine	0,4
TRIS(hydroxymethyl)aminomethane	3,0

4.3.2 Artifizierter Speichel

Bei dem artifizierten Speichel handelte es sich um eine mineralienhaltige Lösung, die einen Phosphatpuffer enthielt (2,20 mmol / l KH_2PO_4 , 4,59 mmol / l K_2HPO_4). Zur Herstellung wurden die in Tabelle 5 aufgelisteten Bestandteile in 20 l *Aqua dest.* vollständig aufgelöst. Der pH-Wert des artifizierten Speichels lag bei 7. Die Sterilisation erfolgte entsprechend dem bei der Herstellung des Nährmediums beschriebenen Ablauf. Aufgrund der vier Spülvorgänge nach jeder Demineralisationsphase (s. Kapitel 4.5, S. 47) war die Menge des benötigten artifizierten Speichels höher als die des Nährmediums, weshalb einmalig während der Versuchsdurchführung 20 l artifizierter Speichel in einem zusätzlichen Reservoirgefäß (Schott AG) nachproduziert wurden. Am fünften Tag der Versuchsdurchführung wurden dann die Reservoirgefäße (Schott AG) des artifizierten Speichels unter Vermeidung von Kontaminationen ausgetauscht, wobei die Steckverbindung (Carl Roth GmbH & Co. KG) des leeren Reservoirgefäßes (Schott AG) gelöst und an dem vollen Reservoirgefäß (Schott AG) befestigt wurde. Der Zeitpunkt des Wechsels wurde so gewählt, dass es währenddessen zu keinerlei Pumpvorgängen kam und die Zahnproben zu keinem Zeitpunkt im Trockenen standen.

Tabelle 5: Zusammensetzung des artifizierten Speichels nach *Zampatti et al. (1994) [157]*.

Inhaltsstoffe	Mengenangabe [g / 20 l]
NaCl	11,922
KCl	15,956
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	1,179
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	3,176
KH_2PO_4	5,988
K_2HPO_4	15,990
NaHCO_3	3,999
BioTrypcase	5,000
Hefeextrakt	5,000

4.4 Bakterien

4.4.1 Erstellung einer Wachstumskurve von *L. casei* (DSM Nr.: 20021)

Lactobacillus casei subsp. *rhamnosus* (DSM Nr.: 20021) wurde vom Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig) als Lyophilisat bezogen. Von diesem wurden Glycerinkulturen angelegt und zur Bevorratung bei $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Zum Erstellen der Wachstumskurve wurde ein Röhrchen der Glycerinkulturen bei Raumtemperatur aufgetaut und eine Übernachtskultur angelegt. Dazu wurde eine Öse der Glycerinkultur auf 20 ml Schaedler Broth (BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company) verdünnt und für 12 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei anaeroben Umgebungsbedingungen (Anaerobiertopf und Anaerocult®, Merck KGaA, Darmstadt) inkubiert. Danach wurden 2 ml der Übernachtskultur auf 38 ml Schaedler Broth (BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company) verdünnt (1:20) und mit dem Vortex-Mischer (Scientific Industries Inc., NY, USA) durchmischt. Von dieser Verdünnung wurde stündlich über einen Zeitraum von 24 h 1 ml entnommen, in eine Küvette (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) gegeben und die optische Dichte $\text{OD}_{600\text{nm}}$ (GENESYS™ 10S UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Scientific™) bestimmt. Zusätzlich wurde die Keimzahl bestimmt, indem eine Verdünnungsreihe angelegt und auf MRS-Platten (BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company) ausplattiert wurde. Hierzu wurden 100 μl der Verdünnung mit 900 μl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) in ein Eppendorf Tube (Eppendorf AG, Hamburg) gegeben und durchmischt (10^{-1}). Von der 10^{-1} -Verdünnung wurden 100 μl auf 900 μl PBS in ein weiteres Eppendorf Tube (Eppendorf AG) gegeben und durchmischt (10^{-2}). Dieser Vorgang wurde bis zum Erreichen der 10^{-6} -Verdünnungsstufe wiederholt. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden auf MRS-Platten (BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company) ausplattiert und für 48 h in anaerobem Milieu (s. Kapitel 4.4.2, S. 42 f.) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, bevor diese ausgezählt wurden.

4.4.2 Anzüchtung von *L. casei* zur Beimpfung des Kariesmodells

Zum Anzüchten von *L. casei* wurde eine Glycerinkultur bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend mit dem Vortex-Mischer (Scientific Industries, Inc.) durchmischt. Es wurden zwei Ansätze hergestellt, wobei jeweils eine Öse der Glycerinkultur in 10 ml Schaedler Broth (BD; BBL™, Becton, Dickinson and Company) gegeben wurde. Die Ansätze wurden durchmischt und für 24 h im Anaerobiertopf mit Anaerocult® (Merck KGaA) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit einer Blindprobe (10 ml Schaedler Broth, BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company) inkubiert. Anhand der Trübung im Vergleich zur Blindprobe

wurde beurteilt, ob die Bakterien angewachsen waren. Danach wurde von jedem Ansatz eine Öse der Bakterienkultur entnommen und auf MRS-Platten (BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company) fraktioniert ausgestrichen. Die Platten wurden mit Anaerobier-Portionstütchen (Anaero Gen™ COMPACT, OXOID AGS, Oxoid Limited, Basingstoke, Hampshire, England) und Indikatorpapier (Mikrobiologie Anaerotest®, Merck KGaA) in Anaerobierbeuteln (Mitsubishi Gas Company Inc.) eingeschweißt und für 48 h bei 37 °C inkubiert. Es wurde dann eine Übernachtkultur (12 h Inkubation bei 37 °C, anaerobes Umgebungsmilieu) im doppelten Ansatz hergestellt, indem jeweils eine Einzelkolonie der MRS-Platte (BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company) entnommen und in 10 ml Schaedler Broth (BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company) gelöst wurde. Die Inkubation erfolgte mit einer Blindprobe (10 ml Schaedler Broth, BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company) und anhand des Trübungsgrades der Flüssigkeit wurde das Anwachsen der Bakterien beurteilt. Am Folgetag wurde eine 1:10 Verdünnung der Übernachtkulturen erstellt, indem je 2 ml der Übernachtkulturen auf 18 ml Schaedler Broth (BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company) verdünnt wurden. Erneut erfolgte die Inkubation bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen für 8 h. Im Anschluss wurde die optische Dichte OD_{600nm} der Ansätze bestimmt und derjenige zur Inokulation des Kariesmodells verwendet, der eine OD_{600nm} von 1 erreicht hatte (s. Tabelle 6, S. 44).

4.4.3 Anzucht von *S. mutans* zur Beimpfung des Kariesmodells

Aus dem Lyophilisat von *S. mutans* (DSM Nr.: 20523; Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) wurden Glycerinkulturen hergestellt, die bei -80 °C gelagert wurden. Zum Anzüchten wurde ein Röhrchen dieser aufgetaut und eine Öse der Glycerinkultur fraktioniert auf Columbia-Blutagar (Schafsblood, OXOID AGS, Oxoid Limited) ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte unter aeroben Bedingungen für 48 h bei 37 °C. Dann wurde ein doppelter Ansatz einer Übernachtkultur (Inkubation für 12 h bei 37 °C) angelegt, indem jeweils eine Öse von der Platte entnommen, in 20 ml Schaedler Broth (BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company) gelöst und mit dem Vortex-Mischer (Scientific Industries) durchmischt wurde. Das Vorliegen einer Trübung im Vergleich zur Blindprobe (20 ml Schaedler Broth, BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company) wurde als Vorliegen einer Bakterienvermehrung gewertet. Die zwei Ansätze der Übernachtkultur wurden verdünnt (1:20), indem je 1 ml der Bakterienlösung in 19 ml Schaedler Broth (BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company) gelöst und durchmischt wurde. Nach einer Inkubation für 8 h bei 37 °C in aerober Umgebung wurde die optische Dichte bestimmt und das Kariesmodell mit dem Ansatz der $OD_{600nm} \sim 1$ beimpft (s. Tabelle 6, S. 44).

Tabelle 6: Anzucht von *L. casei* und *S. mutans* zur Beimpfung des Kariesmodells.

Tag	<i>L. casei</i> (DSM Nr.: 20021)	<i>S. mutans</i> (DSM Nr.: 20523)
1	<p>Auftauen der Glycerinkultur</p> <p>1 Öse in 10 ml Schaedler Broth lösen, durchmischen</p> <p><i>Inkubation: 37 °C, 24 h, anaerob</i></p>	
2	<p>1 Öse der Bakterienkultur auf MRS-Platte fraktioniert ausstreichen</p> <p><i>Inkubation: 37 °C, 48 h, anaerob</i></p>	<p>Auftauen der Glycerinkultur</p> <p>1 Öse auf Columbia-Blutagar fraktioniert ausstreichen</p> <p><i>Inkubation: 37 °C, 48 h, aerob</i></p>
3		
4	<p>Übernachtskultur: 1 Kolonie in 10 ml Schaedler Broth lösen, durchmischen</p> <p><i>Inkubation: 37 °C, 12 h, anaerob</i></p>	<p>Übernachtskultur: Eine Öse in 20 ml Schaedler Broth lösen, durchmischen</p> <p><i>Inkubation: 37 °C, 12 h, aerob</i></p>
5	<p>Verdünnung (1:10): 2 ml der Übernachtskultur in 18 ml Schaedler Broth lösen, durchmischen</p> <p><i>Inkubation: 37 °C, 8 h, anaerob</i></p> <p>Bestimmung der OD_{600nm}, Beimpfung des Kariesmodells mit 1 ml der Verdünnung</p>	<p>Verdünnung (1:20): 1 ml der Übernachtskultur in 19 ml Schaedler Broth lösen, durchmischen</p> <p><i>Inkubation: 37 °C, 8 h, aerob</i></p> <p>Bestimmung der OD_{600nm}, Beimpfung des Kariesmodells mit 1 ml der Verdünnung</p>

4.4.4 Vorversuch mit *L. casei* im Kariesmodell

Im Rahmen der Vorversuche wurde ermittelt, ob ein Überleben und Wachstum von *L. casei* unter den im Kariesmodell vorherrschenden Umgebungsbedingungen möglich war. Hierzu wurden die Laktobazillen, wie in Kapitel 4.4.2 (S. 42 f.) beschrieben, angezüchtet und das Kariesmodell mit *L. casei* beimpft. Es wurde 1 ml der Bakterienlösung auf 250 ml Schaedler Broth (BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company) in den Bakterienreservoirkolben (Schott AG) gegeben und für 8 h inokuliert, bevor der Versuchsdurchlauf nach dem Versuchsprotokoll startete. Die Keimzahl der Laktobazillen wurde bei der Beimpfung und an jedem Versuchstag zur gleichen Zeit bestimmt. Hierzu wurde die Bakterienlösung am Ende der Demineralisationsphase aus der Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) über Pumpe 4 (Carl Roth GmbH & Co. KG) abgeleitet. Ein zwischen der Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) und dem Abfallgefäß (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) angebrachter Drei-Wege-Hahn (Carl Roth GmbH & Co. KG) ermöglichte durch Umlegen des Hebels die Flüssigkeit in eine ebenfalls angeschlossene 500 ml-Glasflasche (Fisher Scientific GmbH) umzuleiten. Am Ende des Pumpvorgangs wurde der Hebel in die Ausgangsposition zurückgeschoben, sodass beim nächsten Abpumpen die Flüssigkeit wieder in das Abfallgefäß (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) gepumpt werden konnte. Die Steckverbindung (Carl Roth GmbH & Co. KG) zur Glasflasche (Fisher Scientific GmbH) wurde gelöst. Unter Vermeidung von Kontaminationen wurde eine neue 500 ml-Glasflasche (Fisher Scientific GmbH) für den nächsten Tag festgeschraubt. Von der aufgefangenen Flüssigkeit wurde eine Verdünnungsreihe (10^{-1} bis 10^{-6}) mit PBS, wie in Kapitel 4.4.1 (S. 42) beschrieben, angelegt und auf MRS-Platten (BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company) fraktioniert ausgestrichen. Diese wurden für 48 h bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen inkubiert und anschließend zur Keimzahlbestimmung ausgezählt. Des Weiteren wurde der pH-Wertverlauf während der De- und Remineralisationsphasen kontinuierlich aufgezeichnet.

4.4.5 Vorversuch mit *L. casei* und *S. mutans* im Kariesmodell

Während diesem Vorversuch wurde untersucht, wie sich die Kombination von *S. mutans* (s. Abbildung 4, S. 46) mit *L. casei* (s. Abbildung 3, S. 46) im Kariesmodell auswirkt. Beide Bakterienstämme wurden, wie in den Kapiteln 4.4.2 und 4.4.3 (S. 42 ff.) angegeben, angezüchtet und das Kariesmodell wurde mit jeweils 1 ml *S. mutans*- und 1 ml *L. casei*-Bakterienkultur inokuliert, indem diese Mengen den 250 ml Schaedler Broth (BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company) im Bakterienreservoirkolben (Schott AG) zugegeben wurden. Es wurde das genannte Versuchsproto-

koll (s. Kapitel 4.5.1, S. 47) gewählt. Bei diesem Vorversuch wurden die Keimzahlen jeweils zur Beimpfung, am 5. Versuchstag und nach Versuchsende durch Anlegen einer Verdünnungsreihe (10^{-1} - 10^{-6}) bestimmt. Im Gegensatz zu *L. casei* (Verwendung von MRS-Platten (BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company), anaerobe Inkubation für 48 h bei 37 °C) wurde die Verdünnungsreihe von *S. mutans* auf BHI-Platten (BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company) fraktioniert ausgestrichen und unter aeroben Bedingungen für 48 h bei 37 °C inkubiert.

4.4.6 Visuelle Darstellung des Biofilms

Exemplarisch wurde der Biofilm, welcher sich nach einer Versuchsdauer von 10 d auf den Zahnoberflächen bildete, auf einigen zusätzlichen Zahnproben visuell durch Anwendung einer Lebend-Tot-Färbung (LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit (L34856), Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande) dargestellt. Durch zwei Nukleinsäureinterkalatoren, SYTO 9 (grün fluoreszierend) und Propidiumiodid (rot fluoreszierend), fluoreszierten Bakterien mit intakten Zellmembranen grün, während solche mit beschädigten Zellmembranen entweder eine geringere Grünfluoreszenz aufwiesen oder rot fluoreszierten. Durch mikroskopische Untersuchung wurde der vorhandene Biofilm bewertet und anhand von digitalen Fotografien bildlich festgehalten.



Abbildung 3: *L. casei*, DSM Nr.: 20021.

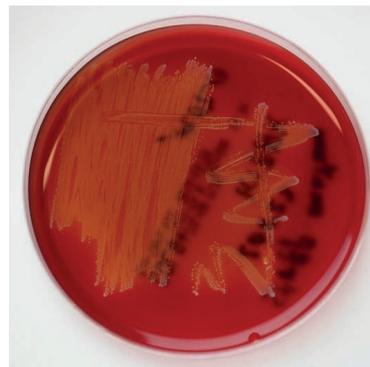


Abbildung 4: *S. mutans*, DSM Nr.: 20523.

4.5 Funktionsweise des Kariesmodells

4.5.1 Funktionsweise

Acht Stunden vor Versuchsstart erfolgte die Inokulation des Kariesmodells mit *S. mutans* (DSM Nr.: 20523) und *L. casei* (DSM Nr.: 20021). Hierzu wurden Verdünnungen der Übernachtskulturen beider Bakterienstämme bei einer OD_{600nm} im Bereich von 1 verwendet. Unter Vermeidung von unerwünschten Kontaminationen wurde jeweils 1 ml der *S. mutans*-Verdünnung und 1 ml der *L. casei*-Verdünnung zu im Bakterienreservoirkolben (Schott AG) befindlichen 250 ml Nährmedium (BD, BBL™ Schaedler Broth, Becton, Dickinson and Company) pipettiert. Das Nährmedium (BD, BBL™ Schaedler Broth, Becton, Dickinson and Company) wurde zuvor durch Anschalten der Pumpe 1 (Carl Roth GmbH & Co. KG) eingeleitet. Die Inokulation wurde 8 h vor Versuchsbeginn durchgeführt, um den Bakterien ausreichend Zeit zur Adaptation an die neuen Umgebungsbedingungen und zur Vermehrung zu gewähren. Zu Versuchsbeginn transportierte Pumpe 2 (Carl Roth GmbH & Co. KG) die Bakterienlösung in die Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware), womit die Demineralisationsphase eingeleitet wurde. Der pH-Wert lag währenddessen im Mittel bei 4,17. Pumpe 1 (Carl Roth GmbH & Co. KG) pumpte erneut Nährmedium (BD, BBL™ Schaedler Broth, Becton, Dickinson and Company) in den Bakterienreservoirkolben (Schott AG), um eine neue Wachstumsphase der Bakterien von 6 h einzuleiten. Nach einstündiger Demineralisation erfolgte die Ausleitung der Bakterienlösung aus der Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) in das Abfallgefäß (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) über Pumpe 4 (Carl Roth GmbH & Co. KG). Unmittelbar nach dem Abpumpen der Bakterienlösung wurde artifizieller Speichel durch Anschalten der Pumpe 3 (Carl Roth GmbH & Co. KG) in die Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) geleitet. Dies stellte den Beginn der Remineralisationsphase dar. Um einen konstanten pH-Wert von 7 innerhalb der Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) zu halten, mussten insgesamt vier Spülvorgänge mit artifiziellem Speichel vorgenommen werden. Hierbei wurde jeweils die in der Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) vorhandene Menge artifiziiellen Speichels von Pumpe 4 (Carl Roth GmbH & Co. KG) vollständig in das Abfallgefäß (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) entleert und danach die Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) mit artifiziellem Speichel mithilfe von Pumpe 3 (Carl Roth GmbH & Co. KG) wieder gefüllt. Die Remineralisationsphase dauerte insgesamt 5 h. Hiernach begann der Kreislauf wieder von neuem. Die Zeitdauer eines Versuchszyklus bestehend aus einer De- und einer Remineralisationsphase betrug somit 6 h. Innerhalb von 24 h war es möglich vier Zyklen durchzuführen, was bei einer Versuchsdauer von

10 d eine Summe von 40 Zyklen bedeutete. Falls sich der pH-Wert während der ersten Demineralisationsphase aufgrund von noch nicht ausreichender Stoffwechselaktivität der Bakterien oberhalb des kritischen pH-Wertbereiches (für Zahnschmelz 5,0 – 5,5 [11,80]) befand, wurde am Versuchsende eine zusätzliche Demineralisationsphase durchgeführt, um eine Gesamtzeit von 40 h Demineralisation zu erreichen.

4.5.2 pH-Wertmessung

Während der Versuchsdurchführung wurde der Verlauf des pH-Wertes innerhalb der Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet (s. Abbildung 5). Dies erfolgte durch eine in der Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) befindliche pH-Messelektrode (SI Analytics GmbH), die mit dem Multifunktionsgerät (Schott AG) verbunden wurde, welches an den Personal Computer angeschlossen war. Zur grafischen Darstellung und späteren Auswertung wurden die Daten unter Verwendung der Software MultiLab® pilot (MultiLab® pilot v4.7.2, WTW GmbH, Weilheim) aufgezeichnet und gespeichert. Zusätzlich konnte mit der pH-Messelektrode (SI Analytics GmbH) die Temperatur in der Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) ermittelt werden. Vor jedem Versuch wurde die pH-Messelektrode (SI Analytics GmbH) unter der Clean Bench (Thermo Fisher Scientific™ Inc.) mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert und anschließend mithilfe der dafür geeigneten Pufferlösungen (SI Analytics GmbH) kalibriert. Danach erfolgte das Einsetzen in die Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) unter Vermeidung von Kontaminationen.



Abbildung 5: Grafische Darstellung eines Ausschnittes des pH-Wertverlaufes innerhalb der Reaktionskammer durch Messung mit der pH-Messelektrode.

4.6 Durchführung der Versuche

4.6.1 Vorbereitung des Kariesmodells

Das Kariesmodell wurde vor der Versuchsdurchführung durch Lösen sämtlicher Steckverbindungen (Carl Roth GmbH & Co. KG) in die Einzelteile abgebaut. Jede Steckverbindung (Carl Roth GmbH & Co. KG) wurde mit Aluminiumfolie (Carl Roth GmbH & Co. KG) verschlossen und anschließend jedes Einzelteil zweifach in Aluminiumfolie (Carl Roth GmbH & Co. KG) verpackt. Danach wurden die Bestandteile bei 121 °C und 2 bar autoklaviert, bevor das Kariesmodell unter Vermeidung von unerwünschten Kontaminationen zusammengebaut wurde.

4.6.2 Versuchsdurchführung

Während der Versuchsdurchführung wurden der pH-Wert und die Temperatur innerhalb der Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) kontinuierlich aufgezeichnet. Durch mehrfach täglich durchgeführte Kontrollen wurde die störungsfreie Funktion des Kariesmodells überprüft. Nach jeweils 48 h wurde das Abfallgefäß (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) sowie an Tag 5 das Reservoirgefäß (Schott AG) des artifiziellen Speichels unter Vermeidung von Kontaminationen gewechselt.

4.6.3 Desinfektion und Sägen der Zahnproben

Nach dem Versuchsende wurden die Zahnproben mit einer Pinzette (PluLine St Nr. 43083, Pluradent AG & Co KG) aus der Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) entnommen und zur Desinfektion für 3 min in 70 %-igem Ethanol gelagert. Danach wurden sie mit *Aqua dest.* abgespült und von den Kausimulatorplatten (Festo AG & Co. KG Systemtechnik) gelöst. Reste des Klebewachses (Chemisches Dental Labor Oppermann-Schwedler) wurden vollständig von den Zahnoberflächen entfernt. Die Zahnproben wurde mit dem IsoMet™ 1000 Präzisionstrenner (Buehler, ITW Test & Measurement GmbH, Düsseldorf) unter Wasserkühlung entlang der Längsachse in zwei Hälften zersägt, wobei der Sägeschnitt in vestibulo-oraler Richtung durch die Mitte der Füllung verlief. Die Zahnhälften wurden in *Aqua dest.* gelagert.

4.6.4 Nachbereitung des Kariesmodells

Das Kariesmodell wurde nach Versuchsende bei 121 °C und 2 bar autoklaviert, um die Bakterien abzutöten. Dann wurden sämtliche Bestandteile mit *Aqua dest.* gespült. Nach Trocknung des Kariesmodells bei Raumtemperatur wurden die Einzelteile in Aluminiumfolie (Carl Roth GmbH & Co. KG) verpackt und für den nächsten Versuchsdurchlauf autoklaviert.

4.6.5 Keimzahlbestimmung und Reinheitskontrolle

Es wurden zum Zeitpunkt der Beimpfung und nach Versuchsende jeweils Verdünnungsreihen (10^{-1} - 10^{-6}) der Bakterienkulturen, wie in Kapitel 4.4.1 (S. 42) beschrieben, zur Bestimmung der Keimzahlen und Kontrolle der Reinheit hergestellt und ausplattiert. Bei Beimpfung des Kariesmodells mit den Bakterienkulturen wurde jeweils die zur Inokulation verwendete Bakterienkultur verdünnt, ausplattiert und inkubiert. Zu Versuchsende wurde die Bakterienlösung, die nach Beendigung der letzten Demineralisationsphase aus der Reaktionskammer (Thermo Scientific™ Nalgene™ labware) abgepumpt wurde, abgezapft und untersucht. Jede Verdünnungsstufe von *S. mutans* (10^{-1} - 10^{-6}) wurde auf einer BHI-Platte (BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company) fraktioniert ausgestrichen und aerob bei 37 °C für 48 h inkubiert. Die einzelnen Verdünnungsstufen von *L. casei* (10^{-1} - 10^{-6}) wurden jeweils auf MRS-Platten (BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company) fraktioniert ausgestrichen und unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C für 48 h inkubiert. Danach erfolgte das Auszählen der Platten zur Keimzahlbestimmung. Anhand der Kulturmorphologie der Einzelkolonien wurde überprüft, ob die Reinheit der Bakterienkultur gegeben war, oder ob es zu einer Kontamination mit Fremdkeimen gekommen war.



Abbildung 6: Aufbau der Kariesmodelle im Temperierlagerschrank.

4.7 Versuchsanalyse

4.7.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

Nach dem Sägen wurde zuerst eine Übersichtsaufnahme der Restauration mit angrenzender Zahnhartsubstanz jeder Zahnhälfte ($n = 120$) mit dem Auflichtmakroskop (AZ 100 M, Nikon, Tokio, Japan) aufgenommen (1er Objektiv, 3 x Zoom, Belichtung 200 – 400 ms). Im Anschluss wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zahnhälften mithilfe des Fluoreszenzmikroskops (AZ 100 M, Nikon) unter Verwendung von FITC-Filtern (Anregungsfilter 450 – 490 nm, Sperrfilter 515 - 565 nm) gemacht. Anhand von digitalen fluoreszenzmikroskopischen Fotografien der Zahnproben wurden Vermessungen mit der Software NIS-Elements AR 4.00.07 (64 bit) für Windows XP (Nikon) bei einer Pixelgröße von 0,9 μm durchgeführt. Es wurde dabei je eine Aufnahme von der Restauration und dem angrenzenden Schmelzbereich sowie eine weitere Aufnahme von der Restauration und dem angrenzenden Zement- / Dentinbereich gemacht. Spaltbildungen im Bereich zwischen der Restauration und der Zahnhartsubstanz wurden durch eine zusätzliche Aufnahme bildlich festgehalten. Danach wurden jeweils auf der Schmelzseite und der Zement- / Dentinseite im Restaurationsrandbereich die Demineralisation, der Substanzverlust durch Demineralisation sowie die Randspaltbreite und in 500 μm Entfernung vom ersten Messpunkt die Demineralisation sowie der Substanzverlust durch Demineralisation ausgemessen (s. Abbildung 7, S. 52).

Demineralisation

Anhand der stärkeren Grünfluoreszenz der demineralisierten Zahnhartsubstanz im Vergleich zum gesunden Zahnhartgewebe wurde die Demineralisationstiefe bestimmt.

Substanzverlust durch Demineralisation

Bei Vorliegen von Verlusten der Zahnhartsubstanz infolge der Demineralisationen wurde das vertikale Ausmaß des Substanzverlustes gemessen, wobei die Restaurationsoberfläche als Referenzpunkt für das ursprüngliche Vorhandensein von Zahnhartgewebe gewertet wurde.

Gesamtdemineralisation

Die Gesamtdemineralisation wurde definiert als Summe aus den gemessenen Werten für die Demineralisation und dem Substanzverlust an den jeweiligen Messpunkten.

Randspaltbreite

Bei Auftreten von Spalten zwischen der Restauration und der Zahnhartsubstanz wurde die Breite des Randspaltes im Bereich der Zahnoberfläche vermessen.

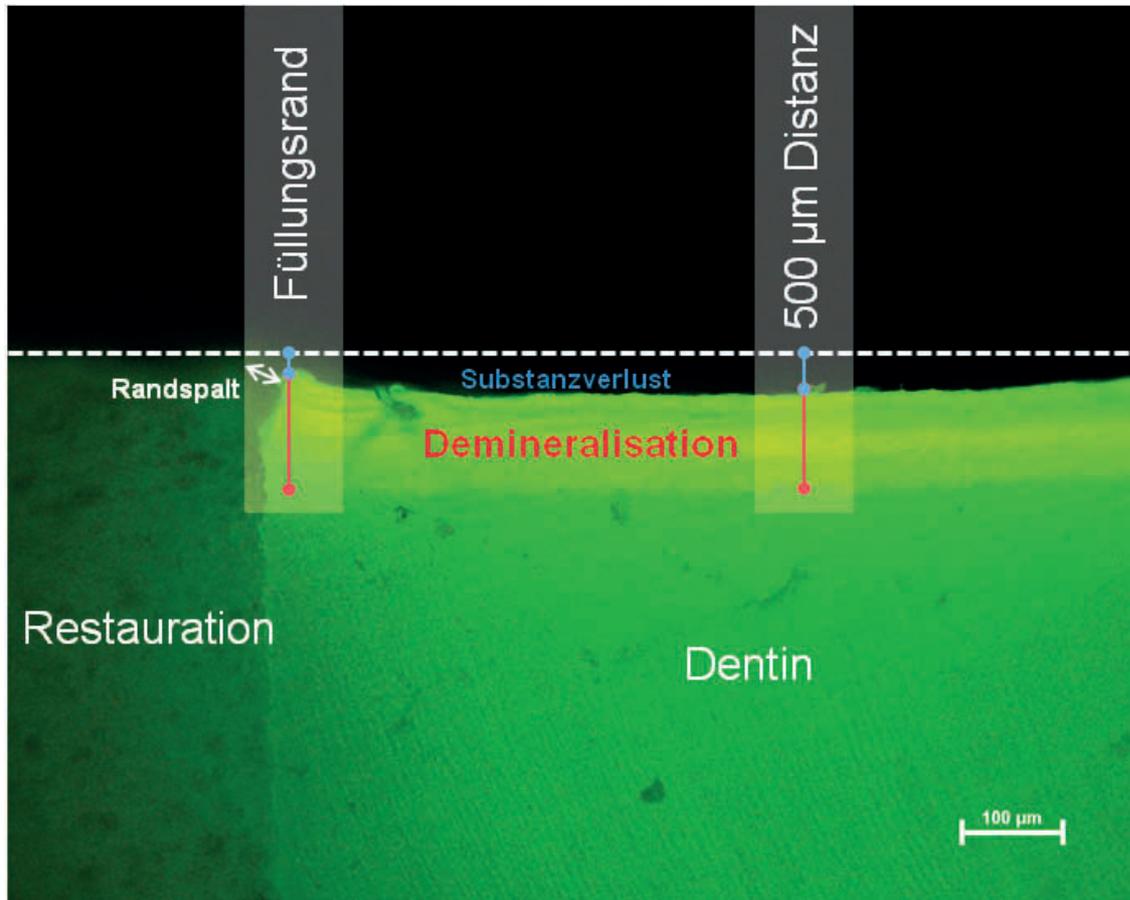


Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der oben dargestellten Parameter auf der Schmelzseite und der Zement- / Dentinseite. Jeweils am Füllungsrand und in 500 µm Entfernung davon wurden die Demineralisation und der Substanzverlust infolge der Demineralisation gemessen. Die Summe aus der Demineralisation und dem Substanzverlust durch Demineralisation ergab die Gesamtdemineralisation. Sofern eine Spaltbildung zwischen der Restauration und der Zahnhartsubstanz feststellbar war, wurde die Breite des Randspaltes ausgemessen.

4.7.2 Rasterelektronenmikroskopische Analyse

Für die rasterelektronenmikroskopische Analyse mit anschließender quantitativer Randspaltanalyse wurden von jedem der fünf Versuchsdurchläufe zwei Zahnproben pro Gruppe zur exemplarischen Darstellung der Veränderungen der Restaurationsrandqualitäten randomisiert ausgewählt. Es wurden somit zehn Zahnproben je Restaurationsmaterialgruppe und eine Gesamtsumme von 40 Zahnproben rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die Replikas der Zahnproben nach der thermozyklischen Belastung und nach der mikrobiologischen Belastung im Kariesmodell wurden mit einem leitfähigen Spezialkleber (Leit-C nach Göcke, Plano GmbH, Wetzlar) auf Alumini-

um-Stiftprobenteller (Nr. G301, Plano GmbH) geklebt. Nach einer Trocknungsphase des Klebers von 12 h wurden die Replikas in einem mittels Argongas erzeugten Vakuum in einer Sputter-Beschichtungsanlage (Sputter Coater, Polaron, SC502, Fisons Instruments, Ipswich, UK) mit Gold besputtert. Die Füllungsänder wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop (Amray Modell Turbo 1610, Amray Inc., Bedford, MA, USA) bei einer Beschleunigungsspannung von 10 kV und 200 x Vergrößerung untersucht. Dabei wurden digitale Aufnahmen der Füllungsänder unter Anwendung der Software Digital Image Scanning System 5 (DISS 5, point electronic GmbH, Halle (Saale)) angefertigt und mit dem Digital Image Processing System 2.9 (DIPS 2.9, point electronic GmbH) bearbeitet sowie gespeichert. Die Aufnahmen der Füllungsänder wurden sowohl auf der Schmelzseite als auch auf der Zement- / Dentinseite überlap-pend angefertigt, sodass mittels 7 - 10 Einzelaufnahmen je Seite (Schmelz bzw. Zement / Dentin) der gesamte Füllungsrand bildlich dargestellt werden konnte (s. Abbil-dung 8). Im Anschluss wurden die Einzelbilder der Füllungsänder mithilfe des Soft-wareprogramms Fiji is Just ImageJ (Freeware, http://pacific.mpi-cbg.de/wiki/index.php/Main_Page) zu einer einheitlichen Abbildung zusammengesetzt (s. Abbildung 9, S. 54).

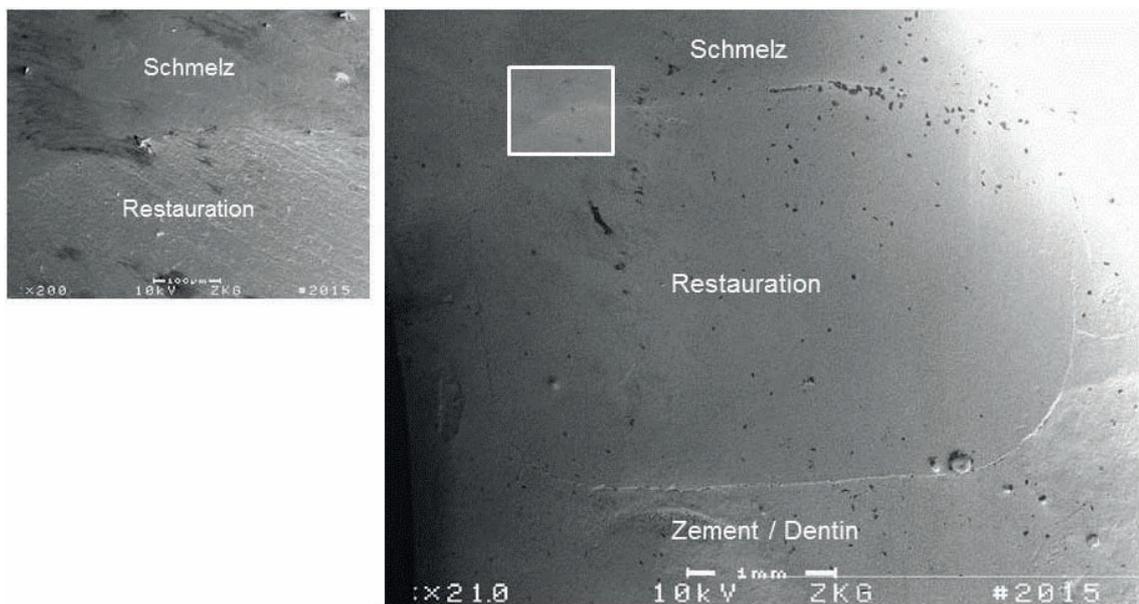


Abbildung 8: Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme einer Replika der Zahnprobenoberfläche (Gruppe 3: Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT) bei 21 x Vergrößerung (rechts) und exemplarische Darstellung einer Einzelaufnahme des Restaurationsrandes auf der Schmelzseite bei 200 x Vergrößerung (links).

4.7.3 Quantitative Randspaltanalyse

Anhand der zusammengeführten rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgte die quantitative Randspaltanalyse des Füllungsrandes nach den von Schmidt (2013)

beschriebenen Kriterien [122]. Unter Anwendung des Computerprogramms KHKs jQuaniGap (Prof. Dr. med. dent. Karl-Heinz Kunzelmann, Ludwig-Maximilians-Universität München; <http://www.dent.med.uni-muenchen.de/~kkunzelm/exponent-0.96.3/index.php?section=66>) wurde die Qualität des Füllungsrandes in sieben Kategorien eingeteilt: Perfekter Rand (f), positive Stufe (s), negative Stufe (a), Überschuss (d), Fraktur (e), Spalt (t) und nicht beurteilbar (r). Dies ermöglichte die prozentuale Bestimmung der Zusammensetzung der unterschiedlichen Restaurationsrandqualitäten auf der Schmelzseite und auf der Zement- / Dentinseite anhand der durch die Abformungen hergestellten Replikas der Zahnprobenoberflächen.

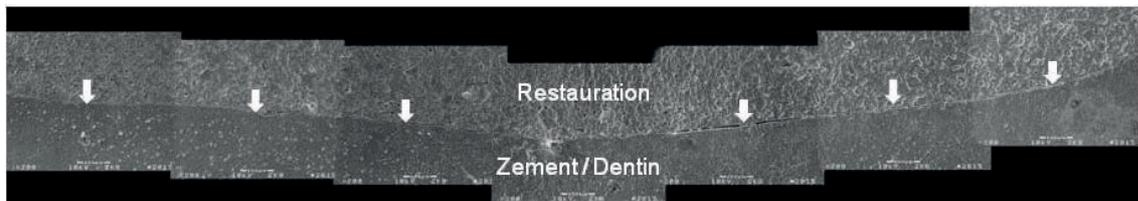


Abbildung 9: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung eines Füllungsrandes (Gruppe 1: Photac™ Fil Quick Aplicap™) zur quantitativen Randspaltanalyse nach Zusammenfügen der Einzelaufnahmen zu einem Gesamtbild. Die weißen Pfeile markieren den Verlauf des Füllungsrandes.

4.8 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der gemessenen Daten wurde mit der SPSS-Version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) für Windows vorgenommen. Die Anwendung des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstestes diente der Überprüfung der Normalverteilung der Messwerte. Bei Normalverteilung der fluoreszenzmikroskopischen Daten wurden Varianzanalysen (ANOVA, mod. LSD) durchgeführt, um den Einfluss der Restaurationsmaterialien (konventioneller und kunststoffmodifizierter Glasionomerzement sowie Komposit, DBA mit und ohne Anwendung der Etch-and-rinse-Technik) auf die Demineralisation, den Substanzverlust durch Demineralisation, die Gesamtdemineralisation und die Randspaltbreite im Füllungsrandbereich sowie die Demineralisation, den Substanzverlust durch Demineralisation und die Gesamtdemineralisation in 500 µm Entfernung vom Füllungsrand sowohl auf der Schmelz- als auch auf der Zement- / Dentinseite zu untersuchen. Bei Abweichungen der fluoreszenzmikroskopischen Daten von der Normalverteilung wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben angewendet. Des Weiteren wurden T-Tests durchgeführt. Die anhand der quantitativen Randspaltanalyse erhobenen Daten wurden mithilfe des nichtparametrischen Friedman-Tests für verbundene Stichproben statistisch ausgewertet. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgesetzt.

5 Ergebnisse

5.1 Vorversuche

Die Erstellung der Wachstumskurve von *L. casei* ergab, dass nach einer Wachstumsphase von 9 h eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,95 bei einer Anzahl von 6×10^8 CFU / ml erreicht wurde. Die Bakterien befanden sich zu diesem Zeitpunkt in der exponentiellen Wachstumsphase. Wie bereits vorangegangene *In-vitro*-Versuche in dem Kariesmodell zeigten, eignete sich eine $OD_{600\text{ nm}} = 1 (\pm 0,1)$ der verdünnten Übernachtskultur für die Anzucht von *S. mutans* im Bakterienreservoirkolben. Um die Inokulation von *S. mutans* und *L. casei* zu einem gemeinsamen Zeitpunkt durchführen zu können, wurde in einem Testlauf überprüft, ob eine achtstündige Wachstumsphase von *L. casei* in dem Bakterienreservoirkolben nach Inokulation ausreichte, um ein Überleben der Mikroorganismen während der Versuchsdauer von 10 d zu gewährleisten.

Bei dem Testlauf mit *L. casei* im Kariesmodell zeigte sich, dass nach Inokulation mit $1,56 \times 10^6$ CFU / ml und achtstündiger Wachstumsphase der Mikroorganismen im Bakterienreservoirkolben die Keimzahlen am Versuchstag 5 3×10^7 CFU / ml und zu Versuchsende nach 10 d 6×10^7 CFU / ml betragen. Der pH-Wert lag während der Demineralisationsphasen bei 4,07 (3,9 – 6,8) und während der Remineralisationsphasen bei 7,0 (6,9 – 7,1). Es ließ sich feststellen, dass sich die Verdünnung nach einer Wachstumsphase von 8 h zur Beimpfung des Kariesmodells mit *L. casei* eignete.

In einem weiteren Vorversuch mit *S. mutans* und *L. casei* wurde die Anzahl der koloniebildenden Einheiten beider Bakterienspezies bei gemeinsamem Wachstum im Kariesmodell bestimmt. Die zur Inokulation verwendeten Verdünnungen der Übernachtskulturen mit einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,975 (*S. mutans*) und 1,239 (*L. casei*) enthielten $1,12 \times 10^6$ CFU / ml *S. mutans* und $1,4 \times 10^6$ CFU / ml *L. casei*. Während der Demineralisationsphasen sank der pH-Wert in der Reaktionskammer auf 4,10 (4,0 – 5,1) und während der Remineralisationsphasen befand er sich bei 7,05 (7,0 – 7,1). Am Versuchstag 5 lag die Zahl koloniebildender Einheiten sowohl von *S. mutans* als auch von *L. casei* bei 4×10^7 CFU / ml. Das Ausplattieren der nach der letzten Demineralisationsphase aus der Reaktionskammer abgepumpten Flüssigkeit zeigte, dass nach zehntägiger Versuchsdauer $4,2 \times 10^7$ CFU / ml *S. mutans* und $4,1 \times 10^7$ CFU / ml *L. casei* in dem Kariesmodell vorhanden waren.

5.2 Hauptversuche

Tabelle 7 zeigt die Anzahl koloniebildender Einheiten von *S. mutans* und *L. casei* nach Ausplattieren der zur Inokulation verwendeten Kulturen und der nach der finalen Demineralisationsphase aus der Reaktionskammer abgepumpten Flüssigkeit. Das Auszählen der Einzelkolonien erfolgte für *S. mutans* auf BHI-Platten (BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company) und für *L. casei* auf MRS-Platten (BD, BBL™, Becton, Dickinson and Company). Das Ausplattieren diente zusätzlich als Reinheitskontrolle. Anhand der Kulturmorphologie der Einzelkolonien und bei Bedarf durch Analyse des Proteinprofils (MALDI-TOF MS) wurde beurteilt, ob eine unerwünschte Kontamination mit Fremdkeimen vorlag. Des Weiteren wurden das Nährmedium und der artifizielle Speichel kontrolliert (Verfärbung, Geruchsbildung, sichtbares Bakterienwachstum). Die Reinheit der Bakterienkulturen sämtlicher Versuchsdurchläufe war gegeben, unerwünschte Kontaminationen mit Fremdkeimen waren nicht feststellbar. Auch die Flüssigkeiten zeigten bei den Kontrollen keine unerwünschten Veränderungen wie Verfärbungen, unangenehme Geruchsbildungen oder die Bildung von Bakterien- / Pilzrasen.

Tabelle 7: Koloniebildende Einheiten von *S. mutans* und *L. casei* während der Hauptversuche.

Versuchsreihe	Inokulation [CFU / ml]		Versuchsende [CFU / ml]	
	<i>S. mutans</i>	<i>L. casei</i>	<i>S. mutans</i>	<i>L. casei</i>
1	1,08 x 10 ⁶	2,48 x 10 ⁶	9 x 10 ⁷	4 x 10 ⁷
2	1,08 x 10 ⁶	2,48 x 10 ⁶	2 x 10 ⁷	3 x 10 ⁷
3	2,24 x 10 ⁶	3,88 x 10 ⁶	9 x 10 ⁷	4 x 10 ⁷
4	2,64 x 10 ⁶	1,96 x 10 ⁶	4,8 x 10 ⁷	7 x 10 ⁷
5	2,64 x 10 ⁶	1,96 x 10 ⁶	14 x 10 ⁷	5,3 x 10 ⁷

Die Demineralisationszeit während der mikrobiologischen Belastung im Kariesmodell betrug 40 h bei einem mittleren pH-Wert von 4,17 (4,05 - 4,3). Während der Remineralisationsphasen mit einer Gesamtdauer von 215 ± 1 h lag der pH-Wert im Mittel bei 7,04 (6,9 - 7,15).

Sämtliche Zahnproben wiesen nach zehntägiger mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell auf der Oberfläche einen weißlichen bis gelblichen Plaquebelag auf. Exemplarisch wurde diese Plaque im Rahmen eines zusätzlich zu den Hauptversuchen durchgeführten Versuchsdurchlaufes färberisch dargestellt (s. Abbildung 10 und Abbildung 11, S. 57).

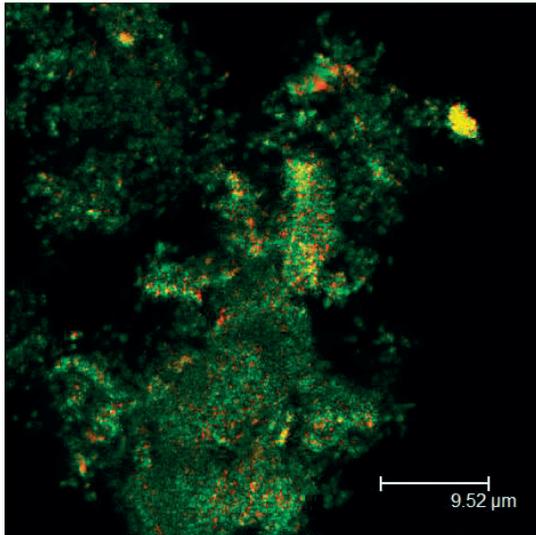


Abbildung 10: Exemplarische Anfärbung des Biofilms auf der Zahnprobenoberfläche nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell mit LIVE/DEAD® BacLight™.

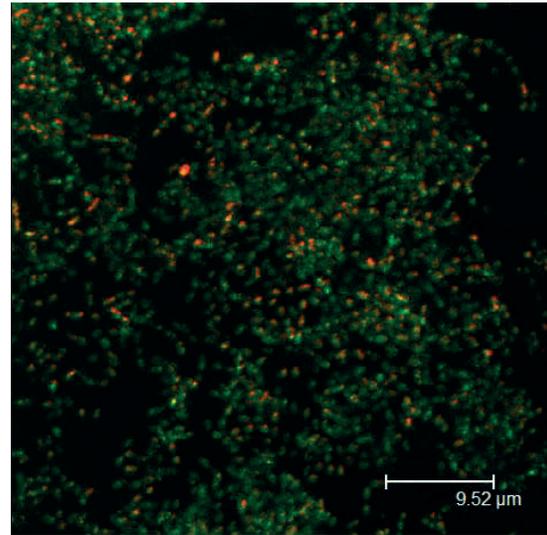


Abbildung 11: LIVE/DEAD® BacLight™ Färbung des Biofilms nach zehntägiger mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell (unbeschädigte Mikroorganismen grün, beschädigte rot dargestellt).

Nach vorsichtiger Entfernung des Biofilms zeigten sich die Schmelzoberflächen der Zahnproben einheitlich weiß-opak verfärbt (s. Abbildung 12).

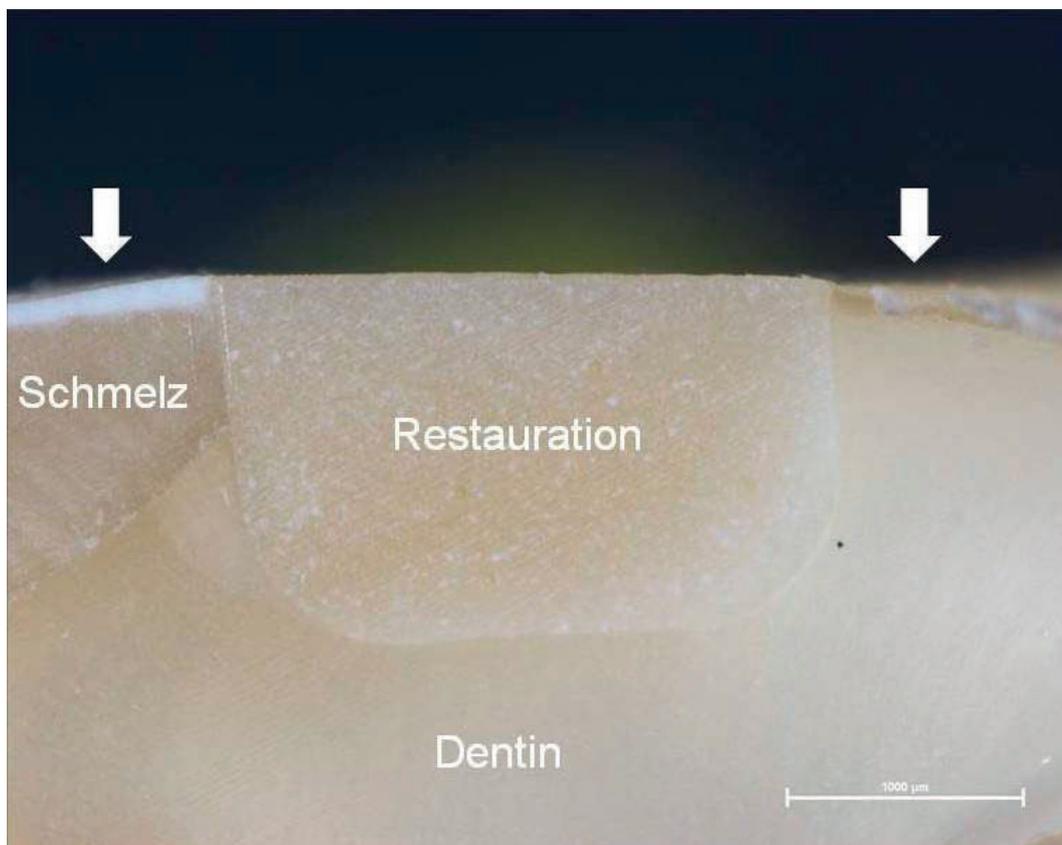


Abbildung 12: Übersichtsaufnahme eines Zahnschnittes nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell mit deutlich sichtbarer weiß-opaker Veränderung der Schmelzoberfläche sowie Demineralisation auf der Zement- / Dentinseite (weiße Pfeile).

5.3 Fluoreszenzmikroskopische Ergebnisse

Die deskriptive Statistik (Mittelwerte und Standardabweichungen) der Demineralisationstiefen, der Substanzverluste durch Demineralisation, der Gesamtdemineralisationen als Summe der beiden erstgenannten Messwerte und der Randspaltbreiten der einzelnen Restaurationsmaterialien auf der Schmelzseite und auf der Zement- / Dentinseite (am Füllungsrand und in 500 µm Entfernung vom Füllungsrand) sind in der Tabelle 8 und der Tabelle 9 (S. 59) dargestellt. Der Stichprobenumfang je Restaurationsmaterial lag bei $n = 15$. Lediglich bei Zahn 54 (Gruppe 2: Ketac™ Molar Aplicap™) ließen sich die Demineralisationstiefe sowie der Substanzverlust durch Demineralisation auf der Schmelzseite fluoreszenzmikroskopisch nicht eindeutig darstellen und ausmessen, weshalb der Stichprobenumfang der Gruppe 2 an diesen Messpunkten auf der Schmelzseite bei $n = 14$ lag.

Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichungen [SD] der Demineralisation und der Spaltbreite des Schmelzes [µm] an zwei Messpunkten (Füllungsrand und 500 µm Entfernung davon) für Photac™ Fil Quick Aplicap™, Ketac™ Molar Aplicap™, Ceram-X® mono, Prime&Bond® NT mit / ohne SÄT nach mikrobiologischer Belastung für 10 d im Kariesmodell. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Restaurationsmaterialien sind durch unterschiedliche Großbuchstaben gekennzeichnet (ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$). Bei Abweichungen von der Normalverteilung sind statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Restaurationsmaterialien durch unterschiedliche Kleinbuchstaben dargestellt (Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$).

Demineralisation µm [SD]	Schmelz						
	SB	D-FR	S-FR	DG-FR	D-500	S-500	DG-500
Photac Fil	2[8] ^a	41[15] ^A	1[4] ^a	42[15] ^A	53[14] ^A	6[12] ^a	60[17] ^A
Ketac Molar	0[0] ^a	43[18] ^{A,B}	3[8] ^a	46[22] ^{A,C}	61[18] ^A	2[6] ^{a,b}	62[17] ^A
SÄT, P&B NT, Ceram X	2[6] ^a	61[22] ^B	6[13] ^a	67[19] ^B	55[20] ^A	7[12] ^a	61[17] ^A
P&B NT, Ceram X	0[0] ^a	56[21] ^{A,B}	10[17] ^a	65[23] ^{B,C}	55[14] ^A	9[15] ^{a,c}	64[17] ^A

SB Spaltbreite, D-FR Demineralisation am Füllungsrand, S-FR Substanzverlust durch Demineralisation am Füllungsrand, DG-FR Gesamtdemineralisation am Füllungsrand, D-500 Demineralisation in 500 µm Entfernung vom Füllungsrand, S-500 Substanzverlust durch Demineralisation in 500 µm Entfernung vom Füllungsrand, DG-500 Gesamtdemineralisation in 500 µm Entfernung vom Füllungsrand

5.3.1 Vergleich der Restaurationsmaterialien hinsichtlich der Demineralisationstiefen

Bei Vergleich der Demineralisationstiefen der einzelnen Materialgruppen miteinander waren insgesamt die Demineralisationstiefen (D-FR, D 500) bei den vier Restaurationsmaterialien auf der Schmelzseite geringer als auf der Zement- / Dentinseite (s. Ta-

belle 8, S. 58, und Tabelle 9). Auf der Schmelzseite und der Zement- / Dentinseite wiesen die Demineralisationstiefen der Glasionomerezemente Photac™ Fil Quick Aplicap™ und Ketac™ Molar Aplicap™ im Füllungsrandbereich geringere Werte als in 500 µm Entfernung vom Füllungsrand auf. Die Demineralisation im Schmelz am Füllungsrand unterschied sich bei Gruppe 1 (Photac™ Fil Quick Aplicap™; 41 ± 15 µm) signifikant von Gruppe 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT; 61 ± 22 µm; ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$).

Tabelle 9: Mittelwerte und Standardabweichungen [SD] der Demineralisation und der Spaltbreite des Zements / Dentins [µm] an zwei Messpunkten (Füllungsrand und 500 µm Entfernung davon) für Photac™ Fil Quick Aplicap™, Ketac™ Molar Aplicap™, Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT mit / ohne SÄT nach mikrobiologischer Belastung für 10 d im Kariesmodell. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Restaurationsmaterialien sind durch unterschiedliche Großbuchstaben gekennzeichnet (ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$).

Demineralisation µm [SD]	Zement / Dentin						
	SB	D-FR	S-FR	DG-FR	D-500	S-500	DG-500
Photac Fil	21[11] ^A	65[20] ^A	17[13] ^A	83[18] ^A	82[16] ^A	46[17] ^A	127[16] ^A
Ketac Molar	38[20] ^A	76[22] ^A	27[23] ^A	104[21] ^A	88[17] ^A	55[33] ^A	143[28] ^{A,C}
SÄT, P&B NT, Ceram X	28[19] ^A	71[27] ^A	93[30] ^B	165[31] ^B	69[24] ^A	107[34] ^B	176[35] ^B
P&B NT, Ceram X	28[19] ^A	78[36] ^A	83[27] ^B	161[27] ^B	79[29] ^A	87[29] ^B	166[33] ^{B,C}

SB Spaltbreite, D-FR Demineralisation am Füllungsrand, S-FR Substanzverlust durch Demineralisation am Füllungsrand, DG-FR Gesamtdemineralisation am Füllungsrand, D-500 Demineralisation in 500 µm Entfernung vom Füllungsrand, S-500 Substanzverlust durch Demineralisation in 500 µm Entfernung vom Füllungsrand, DG-500 Gesamtdemineralisation in 500 µm Entfernung vom Füllungsrand

5.3.2 Vergleich der Restaurationsmaterialien hinsichtlich des Substanzverlustes durch Demineralisation

Auch der Substanzverlust (S-FR, S-500) durch Demineralisation war bei den Gruppen 1 – 4 insgesamt auf der Schmelzseite geringer als auf der Zement- / Dentinseite (s. Tabelle 8, S. 58, und Tabelle 9). In 500 µm Entfernung vom Füllungsrand auf der Schmelzseite ließ sich ein signifikant höherer Substanzverlust bei Gruppe 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT) im Vergleich zu Gruppe 2 (Ketac™ Molar Aplicap™) feststellen (Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$). Der höchste Substanzverlust wurde bei Gruppe 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT) mit 107 ± 34 µm auf der Zement- / Dentinseite in 500 µm Entfernung vom Füllungsrand gemessen. Auf der Zement- / Dentinseite im Füllungsrandbereich und in 500 µm Entfernung davon wiesen beide Glasionomerezemente (Photac™ Fil Quick Aplicap™ und Ketac™ Molar Apli-

cap™) signifikant geringere Substanzverluste als die beiden Kompositgruppen (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT und Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT) auf (ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$).

5.3.3 Vergleich der Restaurationsmaterialien hinsichtlich der Gesamtdemineralisation

Die Gesamtdemineralisation (DG-FR, DG-500) wurde definiert als Summe der Demineralisationstiefe und des Substanzverlustes infolge der Demineralisation. Der Vergleich der Gesamtdemineralisationstiefen der vier Gruppen zeigte bei allen geringere Werte auf der Schmelzseite als auf der Zement- / Dentinseite (s. Abbildung 13 und Abbildung 14, S. 61). Auf der Schmelzseite im Füllungsrandbereich wies Gruppe 1 (Photac™ Fil Quick Aplicap™; $42 \pm 15 \mu\text{m}$) signifikant geringere Gesamtdemineralisationstiefen als die Gruppen 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT; $67 \pm 19 \mu\text{m}$) und 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT; $65 \pm 23 \mu\text{m}$) auf (ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$). Des Weiteren zeigten die Gesamtdemineralisationstiefen des konventionellen Glasionomerzementes (Ketac™ Molar Aplicap™) signifikante Unterschiede zu Gruppe 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT; ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$). Bezüglich der Gesamtdemineralisationstiefen auf der Zement- / Dentinseite zeigten beide Glasionomerzemente (Photac™ Fil Quick Aplicap™ und Ketac™ Molar Aplicap™) im Füllungsrandbereich signifikant bessere Resultate in Form geringerer Gesamtdemineralisationswerte als die Kompositgruppen 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT) und 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT; ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$). Des Weiteren ließen sich signifikante Unterschiede in 500 μm Entfernung vom Füllungsrand auf der Zement- / Dentinseite zwischen dem kunststoffmodifizierten Glasionomerzement (Photac™ Fil Quick Aplicap™) und den mit Komposit versorgten Zahnproben aus Gruppe 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT) und Gruppe 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT) feststellen (ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$). Auch der konventionelle Glasionomerzement (Ketac™ Molar Aplicap™) zeigte an diesem Messpunkt signifikant geringere Gesamtdemineralisationen als Gruppe 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT; ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$).

Ergebnisse

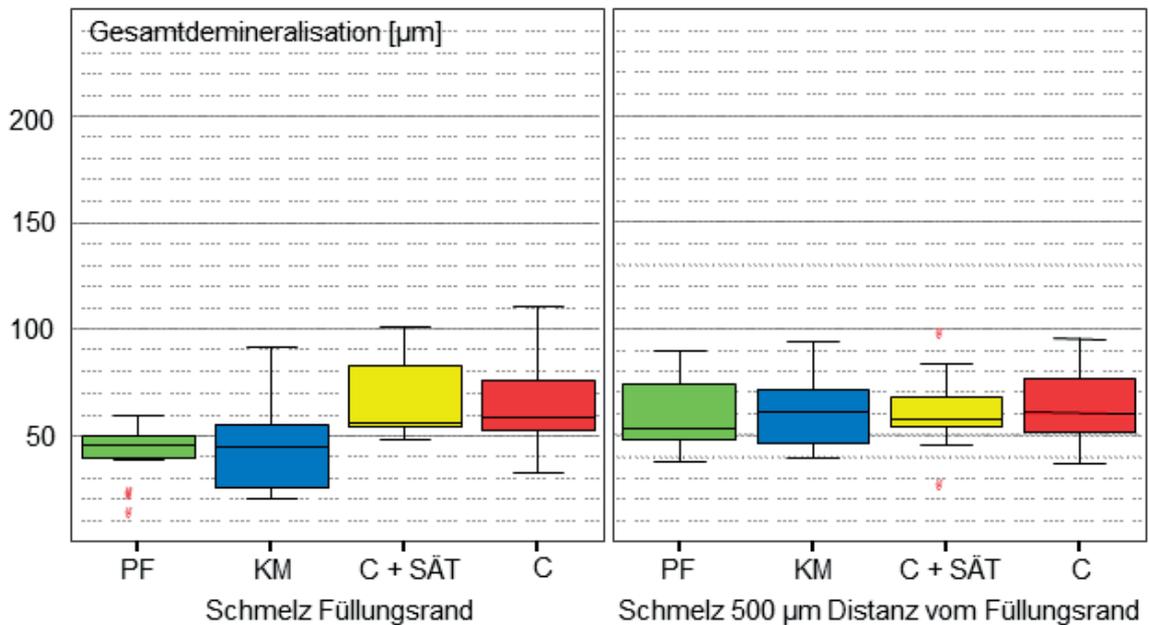


Abbildung 13: Gesamtdemineralisationstiefen [μm] der vier verwendeten Restaurationsmaterialien Photac™ Fil Quick Aplicap™ (PF), Ketac™ Molar Aplicap™ (KM), Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT (C + SÄT) sowie Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT (C) an den zwei Messpunkten auf der Schmelzseite nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d.

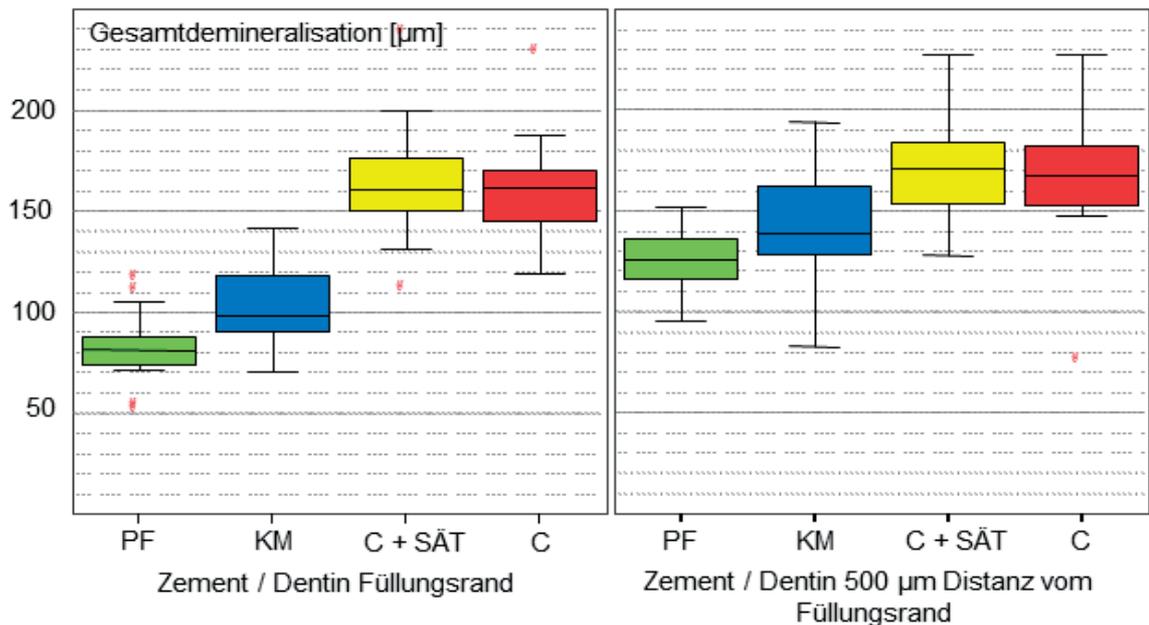


Abbildung 14: Gesamtdemineralisationstiefen [μm] der vier verwendeten Restaurationsmaterialien Photac™ Fil Quick Aplicap™ (PF), Ketac™ Molar Aplicap™ (KM), Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT (C + SÄT) sowie Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT (C) an den zwei Messpunkten auf der Zement- / Dentinseite nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d.

5.3.4 Vergleich der Restaurationsmaterialien hinsichtlich der Randspaltbreite

Unabhängig vom verwendeten Restaurationsmaterial waren die Randspaltbreiten (SB) auf der Schmelzseite geringer als auf der Zement- / Dentinseite (s. Tabelle 8 und Tabelle 9, S. 58 – 59). Exemplarisch zeigt Abbildung 19 (S. 65) eine Randspaltbildung zwischen der Zahnhartsubstanz und dem Restaurationsmaterial (Gruppe 4; Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT) auf der Zement- / Dentinseite.

5.3.5 Vergleich der Gesamtdemineralisationstiefen in Abhängigkeit von der Lage des Messpunktes

Bei der Gruppe 1 (Photac™ Fil Quick Aplicap™) zeigte der Vergleich der Gesamtdemineralisationswerte auf der Schmelzseite mit denen der Zement- / Dentinseite am Füllungsrand und in 500 µm Entfernung davon statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Messpunkten (T-Test, $p < 0,05$; s. Abbildung 15 und Tabelle 10, S. 63). Auch erwies sich der Messpunkt „Füllungsrand“ sowohl auf der Schmelzseite als auch auf der Zement- / Dentinseite signifikant geringer demineralisiert als derjenige in 500 µm Entfernung vom Füllungsrand (T-Test, $p < 0,05$).

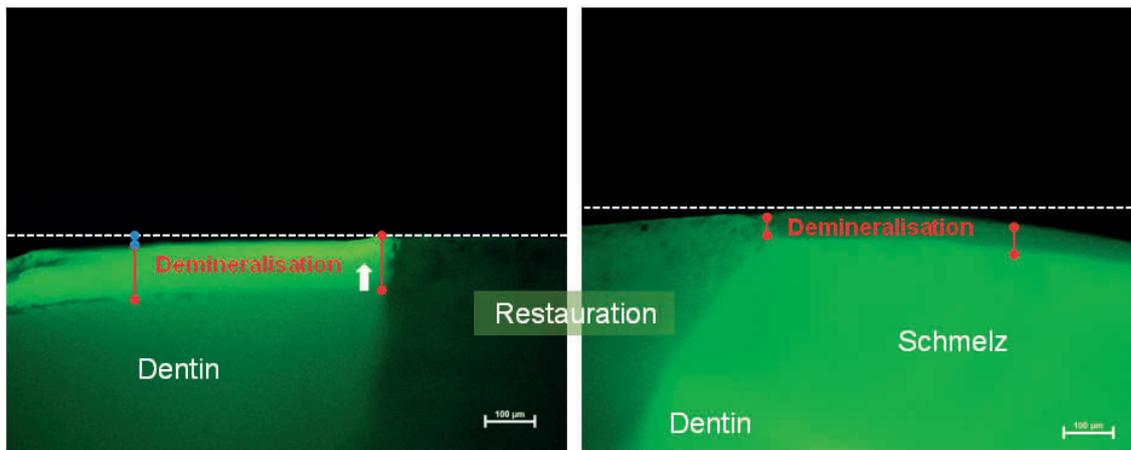


Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Schmelzseite (rechts) und Zement- / Dentinseite (links) von Gruppe 1 (Photac™ Fil Quick Aplicap™) nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d. Am Füllungsrand und in 500 µm Entfernung davon wurden folgende Parameter ausgewertet: Demineralisationstiefe (rot), Substanzverlust durch Demineralisation (blau). Im Bereich des Füllungsrandes ist eine geringere Fluoreszenz der inneren Demineralisationszone feststellbar (weißer Pfeil).

Die Ergebnisse von Gruppe 2 (Ketac™ Molar Aplicap™) zeigten, dass auf der Schmelzseite sowie auf der Zement- / Dentinseite die Gesamtdemineralisation am Füllungsrand signifikant geringer als in 500 µm vom Füllungsrand war (T-Test, $p < 0,05$; s. Abbildung 16, S. 63 und Tabelle 10, S. 63). Des Weiteren waren die Gesamtdeminera-

lisationstiefen am Füllungsrand und in 500 µm Entfernung davon auf der Zement- / Dentinseite statistisch signifikant höher als auf der Schmelzseite (T-Test, $p < 0,05$).

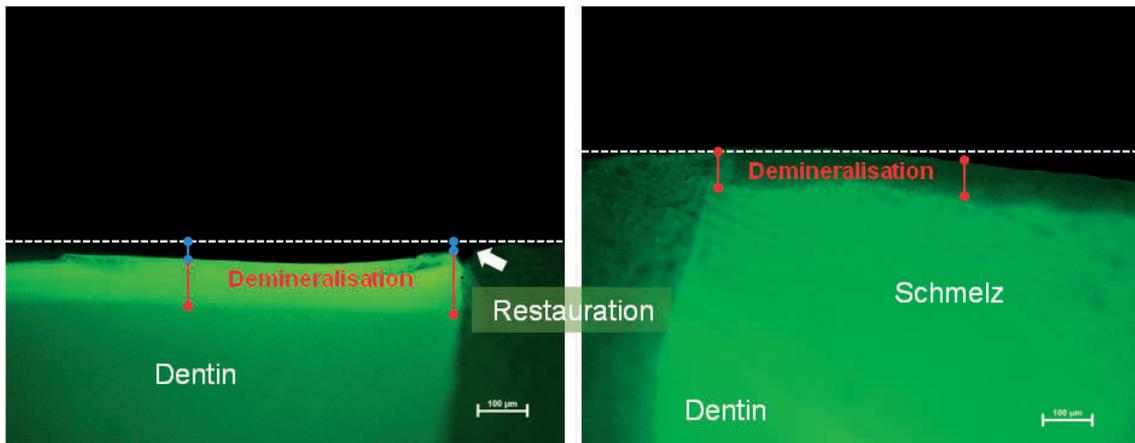


Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Schmelzseite (rechts) und Zement- / Dentinseite (links) von Gruppe 2 (Ketac™ Molar Aplicap™) nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d. Am Füllungsrand und in 500 µm Entfernung davon wurden folgende Parameter ausgewertet: Demineralisationstiefe (rot), Substanzverlust durch Demineralisation (blau). Der weiße Pfeil markiert eine Spaltbildung zwischen der Restauration und der angrenzenden Zahnhartsubstanz.

Tabelle 10: Paarweiser Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen [SD] der Gesamtdemineralisationstiefen [µm] der Gruppen 1 (Photac™ Fil Quick Aplicap™) und 2 (Ketac™ Molar Aplicap™) nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d. Statistisch signifikante Unterschiede der Gesamtdemineralisationen zwischen den Messpunkten sind durch unterschiedliche Großbuchstaben gekennzeichnet (T-Test, $p < 0,05$).

Messpunktpaare		Photac Fil		Ketac Molar	
		<i>n</i>	Mittelwerte [SD] in µm	<i>n</i>	Mittelwerte [SD] in µm
1	DG-FR (S)	15	42 [15] ^A	14	46 [22] ^A
2	DG-FR (Z)	15	83 [18] ^B	14	105 [21] ^B
1	DG-500 (S)	15	60 [17] ^A	14	62 [17] ^A
2	DG-500 (Z)	15	127 [16] ^B	14	144 [29] ^B
1	DG-500 (S)	15	60 [17] ^A	14	62 [17] ^A
2	DG-FR (S)	15	42 [15] ^B	14	46 [22] ^B
1	DG-500 (Z)	15	127 [16] ^A	15	143 [28] ^A
2	DG-FR (Z)	15	83 [18] ^B	15	104 [21] ^B

DG-FR Gesamtdemineralisation am Füllungsrand, DG-500 Gesamtdemineralisation in 500 µm Entfernung vom Füllungsrand, (S) Schmelzseite, (Z) Zement- / Dentinseite

Bei den Kompositgruppen 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT; s. Abbildung 17, S. 64) und 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT; s. Abbildung 18, S. 65) unterschieden sich die Gesamtdemineralisationstiefen auf der Schmelzseite am Füllungsrand signifikant von den ausgemessenen Werten an demselben Messpunkt auf der

Zement- / Dentinseite (T-Test, $p < 0,05$; s. Tabelle 11, S. 64). Gleiches galt für den Messpunkt in 500 μm Entfernung vom Füllungsrand (T-Test, $p < 0,05$). Bei Vergleich der Gesamtdemineralisationstiefe am Füllungsrand mit dem Messwert in 500 μm Entfernung vom Füllungsrand auf derselben Seite ließen sich sowohl auf der Schmelzseite als auch auf der Zement- / Dentinseite bei den beiden Kompositgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellen (T-Test, $p > 0,05$).

Tabelle 11: Paarweiser Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen [SD] der Gesamtdemineralisationstiefen [μm] der Gruppen 3 (Ceram-X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT) und 4 (Ceram-X® mono, Prime&Bond® NT) nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d. Statistisch signifikante Unterschiede der Gesamtdemineralisationen zwischen den Messpunkten sind durch unterschiedliche Großbuchstaben gekennzeichnet (T-Test, $p < 0,05$).

Messpunktpaare		SÄT, P&B NT, Ceram X		P&B NT, Ceram X	
		<i>n</i>	Mittelwerte [SD] in μm	<i>n</i>	Mittelwerte [SD] in μm
1	DG-FR (S)	15	67 [19] ^A	15	65 [23] ^A
2	DG-FR (Z)	15	165 [31] ^B	15	161 [27] ^B
1	DG-500 (S)	15	61 [17] ^A	15	64 [17] ^A
2	DG-500 (Z)	15	176 [35] ^B	15	166 [33] ^B
1	DG-500 (S)	15	61 [17] ^A	15	64 [17] ^A
2	DG-FR (S)	15	67 [19] ^A	15	65 [23] ^A
1	DG-500 (Z)	15	176 [35] ^A	15	166 [33] ^A
2	DG-FR (Z)	15	165 [31] ^A	15	161 [27] ^A

DG-FR Gesamtdemineralisation am Füllungsrand, DG-500 Gesamtdemineralisation in 500 μm Entfernung vom Füllungsrand, (S) Schmelzseite, (Z) Zement- / Dentinseite

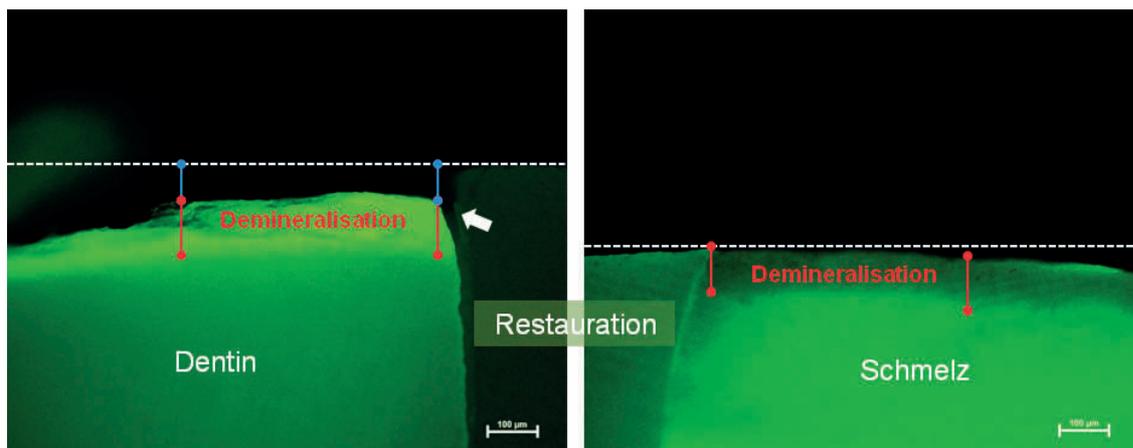


Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Schmelzseite (rechts) und Zement- / Dentinseite (links) von Gruppe 3 (Ceram-X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT) nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d. Am Füllungsrand und in 500 μm Entfernung davon wurden folgende Parameter ausgewertet: Demineralisationstiefe (rot), Substanzverlust durch Demineralisation (blau). Zusätzlich wurde die Randspaltbreite am Füllungsrand auf der Zement- / Dentinseite ausgemessen (weißer Pfeil).

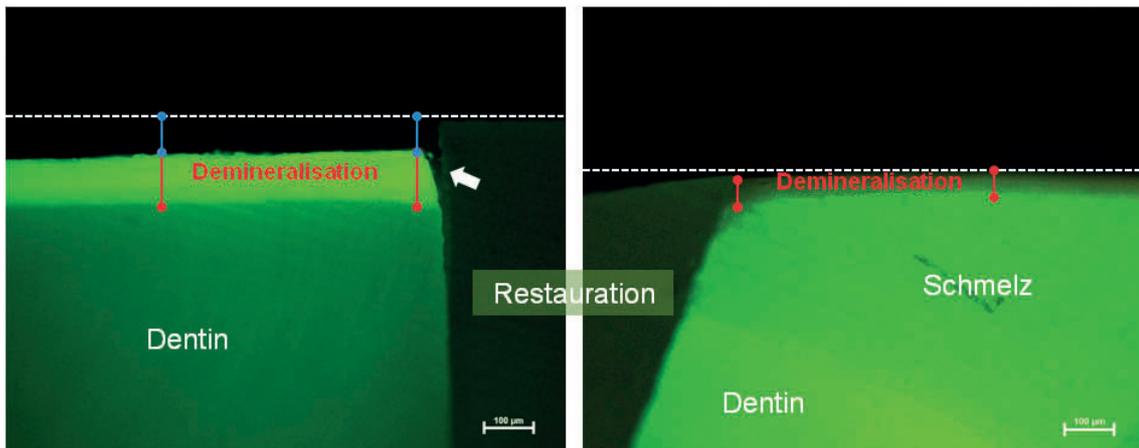


Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Schmelzseite (rechts) und Zement- / Dentinseite (links) von Gruppe 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT) nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d. Am Füllungsrand und in 500 µm Entfernung davon wurden folgende Parameter ausgewertet: Demineralisationstiefe (rot), Substanzverlust durch Demineralisation (blau). Zusätzlich wurde die Randspaltbreite am Füllungsrand auf der Zement- / Dentinseite ausgemessen (weißer Pfeil).

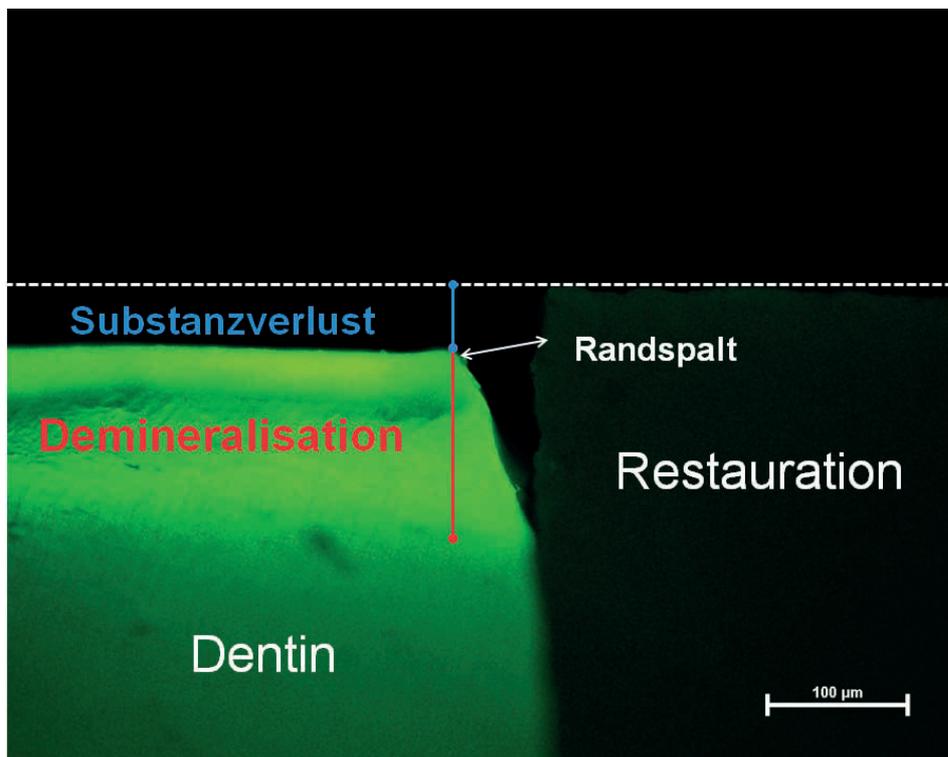


Abbildung 19: Vergrößerte Darstellung einer Randspaltbildung auf der Zement- / Dentinseite nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d (Gruppe 4; Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT). Im Füllungsrandbereich wurde die Randspaltbreite gemessen (weißer Pfeil). Die weiteren Markierungen zeigen die Demineralisation des Zahnhartgewebes (rot) und den Zahnhartsubstanzverlust infolge der Demineralisation (blau).

5.4 Quantitative Randspaltanalyse

Die mithilfe der quantitativen Randspaltanalyse ermittelte prozentuale Verteilung der Randspaltqualitäten (Mittelwerte und Standardabweichungen) zwischen dem jeweiligen Restaurationsmaterial und der Zahnhartsubstanz auf der Schmelzseite sowie auf der Zement- / Dentinseite ist in der Tabelle 12 und der Tabelle 13 (siehe S. 68) sowohl nach der thermozyklischen Belastung als auch nach der mikrobiologischen Belastung im Kariesmodell für 10 d dargestellt.

Tabelle 12: Prozentuale Angabe der Mittelwerte und der Standardabweichungen [SD] von sieben Randspaltqualitäten bei Photac™ Fil Quick Aplicap™ und Ketac™ Molar Aplicap™ auf der Schmelzseite und auf der Zement- / Dentinseite nach thermozyklischer Belastung (nach TC) und nach mikrobiologischer Belastung für 10 d im Kariesmodell (nach KM). Statistisch signifikante Unterschiede der einzelnen Randspaltqualitäten des jeweilig verwendeten Restaurationsmaterials zwischen den beiden Zeitpunkten sind durch unterschiedliche Großbuchstaben gekennzeichnet (Friedman-Test, $p < 0,05$).

Mittelwerte [SD] in %		Photac Fil		Ketac Molar	
		nach TC	nach KM	nach TC	nach KM
Schmelz	Perfekter Rand	84 [16] ^A	79 [15] ^A	63 [17] ^A	44 [23] ^B
	Positive Stufe	9 [13] ^A	7 [11] ^A	5 [5] ^A	1 [2] ^A
	Überschuss	6 [7] ^A	1 [2] ^B	18 [13] ^A	12 [15] ^A
	Negative Stufe	1 [2] ^A	3 [4] ^B	8 [14] ^A	32 [20] ^B
	Spalt	0 [1] ^A	3 [6] ^A	2 [4] ^A	6 [9] ^B
	Fraktur	0 [0]	0 [0]	2 [7] ^A	3 [11] ^A
	Nicht beurteilbar	0 [1] ^A	9 [11] ^B	1 [2] ^A	2 [6] ^A
Zement / Dentin	Perfekter Rand	82 [10] ^A	46 [39] ^A	70 [22] ^A	11 [7] ^B
	Positive Stufe	8 [8] ^A	2 [3] ^B	7 [8] ^A	1 [2] ^A
	Überschuss	7 [12] ^A	6 [12] ^A	12 [15] ^A	7 [11] ^A
	Negative Stufe	0 [0] ^A	20 [26] ^B	4 [12] ^A	42 [31] ^B
	Spalt	3 [8] ^A	23 [36] ^B	7 [10] ^A	36 [35] ^A
	Fraktur	0 [0] ^A	2 [6] ^A	0 [0] ^A	2 [4] ^A
	Nicht beurteilbar	0 [0] ^A	2 [2] ^A	1 [2] ^A	1 [2] ^A

Bei dem kunststoffmodifizierten Glasionomermaterial (Gruppe 1; Photac™ Fil Quick Aplicap™) zeigte sich durch die mikrobiologische Belastung im Kariesmodell für 10 d eine signifikante Zunahme negativer Stufen auf der Schmelzseite und auf der Zement- / Dentinseite (Friedman-Test, $p < 0,05$; s. Abbildung 20, S. 67). Des Weiteren kam es auf der Schmelzseite zu einer signifikanten Reduktion des Überschusses (von $6\% \pm 7\%$ auf $1\% \pm 2\%$; Friedman-Test, $p < 0,05$). Auf der Zement- / Dentinseite nahmen die positiven Stufen signifikant ab (Friedman-Test, $p < 0,05$), während die

Spaltbildungen von $3\% \pm 8\%$ nach der thermozyklischen Belastung auf $23\% \pm 36\%$ nach der mikrobiologischen Belastung im Kariesmodell für 10 d stiegen (Friedman-Test, $p < 0,05$).

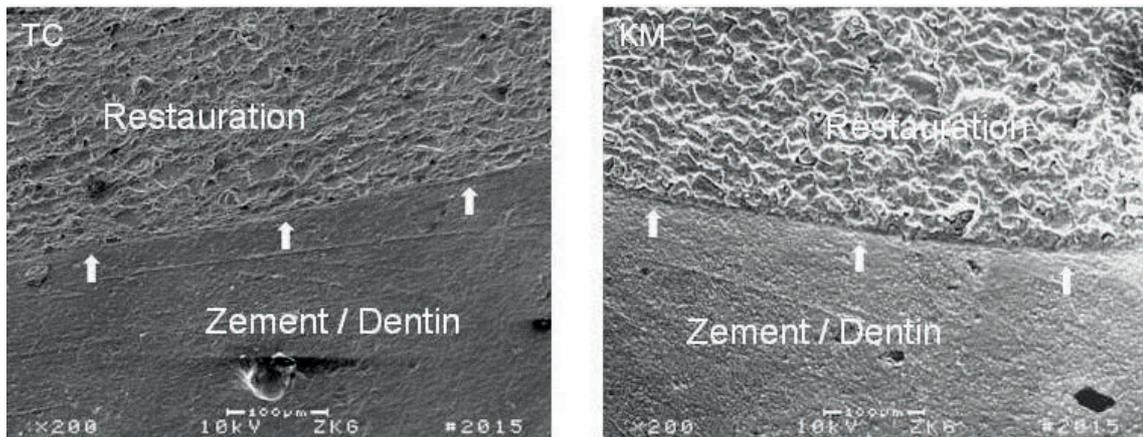


Abbildung 20: Exemplarische rasterelektronenmikroskopische Darstellung (200-fache Vergrößerung) eines Restaurationsrandes von Photac™ Fil Quick Aplicap™ (Gruppe 1) auf der Zement- / Dentinseite nach thermozyklischer Belastung (TC) und mit Ausbildung einer negativen Stufe nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d (KM). Die Pfeile markieren den Verlauf des Restaurationsrandes.

In Gruppe 2 (konventioneller Glasionomerezement namens Ketac™ Molar Aplicap™) ließ sich eine signifikante Reduktion der Randspaltqualität „Perfekter Rand“ durch die mikrobiologische Belastung der Zahnproben im Kariesmodell (10 d) auf der Schmelzseite sowie auf der Zement / Dentinseite feststellen (Friedman-Test, $p < 0,05$; s. Abbildung 21). Darüber hinaus stiegen die prozentualen Anteile negativer Stufen auf beiden Seiten signifikant an (Friedman-Test, $p < 0,05$).

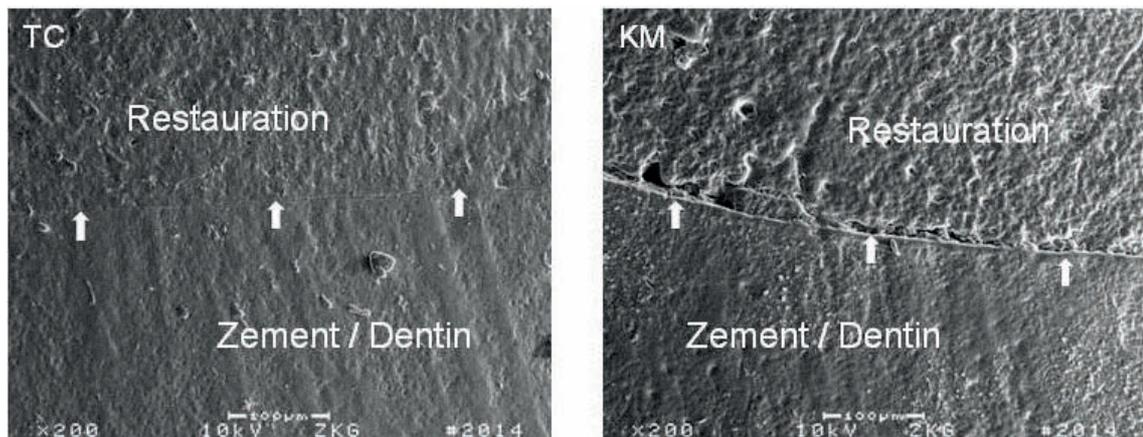


Abbildung 21: Exemplarische rasterelektronenmikroskopische Abbildung eines Restaurationsrandes von Ketac™ Molar Aplicap™ (Gruppe 2) auf der Zement- / Dentinseite bei 200-facher Vergrößerung nach thermozyklischer Belastung (TC) sowie nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d (KM) mit Ausbildung einer negativen Stufe und eines Randspaltes. Die weißen Pfeile markieren den Restaurationsrandverlauf.

Tabelle 13: Prozentuale Angabe der Mittelwerte und der Standardabweichungen [SD] von sieben Randspaltqualitäten bei Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT mit / ohne SÄT auf der Schmelzseite und auf der Zement- / Dentinseite nach thermozyklischer Belastung (nach TC) und nach mikrobiologischer Belastung für 10 d im Kariesmodell (nach KM). Statistisch signifikante Unterschiede der einzelnen Randspaltqualitäten des jeweilig verwendeten Restaurationsmaterials zwischen den beiden Zeitpunkten sind durch unterschiedliche Großbuchstaben gekennzeichnet (Friedman-Test, $p < 0,05$).

Mittelwerte [SD] in %		SÄT, P&B NT, Ceram X		P&B NT, Ceram X	
		nach TC	nach KM	nach TC	nach KM
Schmelz	Perfekter Rand	91 [11] ^A	70 [33] ^A	71 [17] ^A	58 [27] ^A
	Positive Stufe	3 [8] ^A	18 [27] ^B	16 [13] ^A	23 [20] ^A
	Überschuss	4 [9] ^A	1 [1] ^B	6 [11] ^A	6 [10] ^A
	Negative Stufe	0 [0] ^A	2 [5] ^A	0 [0]	0 [0]
	Spalt	1 [2] ^A	8 [19] ^A	7 [9] ^A	13 [15] ^B
	Fraktur	0 [0]	0 [0]	0 [0] ^A	0 [1] ^A
	Nicht beurteilbar	1 [4] ^A	2 [4] ^A	1 [2] ^A	0 [1] ^A
Zement / Dentin	Perfekter Rand	65 [25] ^A	47 [35] ^B	75 [11] ^A	30 [23] ^B
	Positive Stufe	6 [13] ^A	20 [23] ^B	8 [8] ^A	30 [21] ^B
	Überschuss	13 [12] ^A	8 [13] ^A	6 [8] ^A	1 [3] ^B
	Negative Stufe	1 [4] ^A	0 [0] ^A	0 [0]	0 [0]
	Spalt	13 [22] ^A	19 [21] ^A	8 [6] ^A	38 [27] ^B
	Fraktur	0 [1] ^A	2 [3] ^A	0 [0] ^A	0 [1] ^A
	Nicht beurteilbar	2 [4] ^A	4 [6] ^A	3 [6] ^A	1 [2] ^A

Eine signifikante Zunahme positiver Stufen war bei Gruppe 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT) sowohl auf der Schmelzseite (von 3 % ± 8 % auf 18 % ± 27 %) als auch auf der Zement- / Dentinseite (von 6 % ± 13 % auf 20 % ± 23 %) feststellbar (Friedman-Test, $p < 0,05$). Zusätzlich reduzierte sich der Überschuss auf der Schmelzseite signifikant von 4 % ± 9 % auf 1 % ± 1 % (Friedman-Test, $p < 0,05$). Statt 65 % ± 25 % perfektem Rand auf der Zement- / Dentinseite nach der thermozyklischen Belastung zeigte sich nach dem Aufenthalt im Kariesmodell mit 47 % ± 35 % ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Analysezeitpunkten (Friedman-Test, $p < 0,05$; s. Abbildung 22, S. 69).

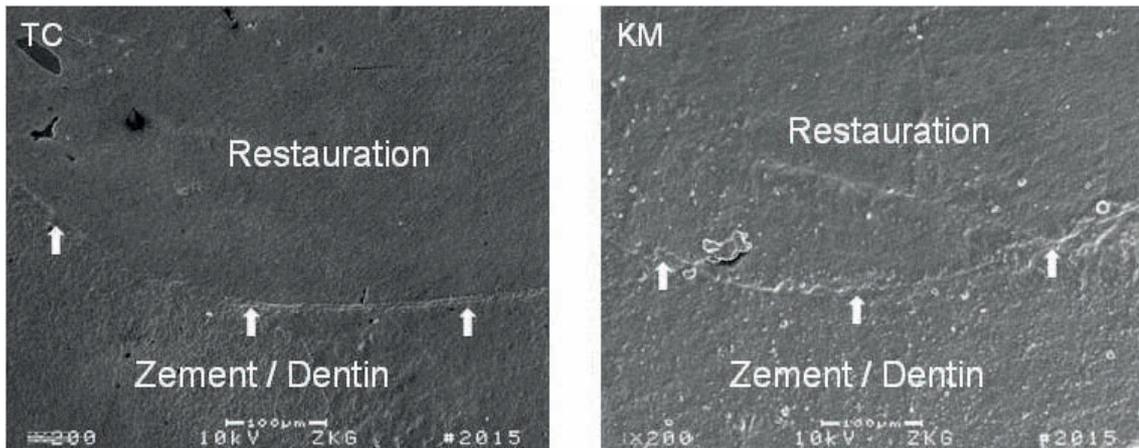


Abbildung 22: Exemplarische rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (200-fache Vergrößerung) eines Restaurationsrandes von Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT (Gruppe 3) auf der Zement- / Dentinseite nach thermozyklischer Belastung (TC) und nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d (KM). Die weißen Pfeile markieren den Verlauf des Restaurationsrandes, welcher nach dem Aufenthalt im Kariesmodell deutlicher sichtbar ist und unebener erscheint.

Die weitere Kompositgruppe (Gruppe 4; Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT) zeigte infolge der mikrobiologischen Belastung im Kariesmodell für 10 d eine signifikante Zunahme von Spaltbildungen auf der Schmelzseite von $7 \% \pm 9 \%$ auf $13 \% \pm 15 \%$ sowie auf der Zement- / Dentinseite von $8 \% \pm 6 \%$ auf $38 \% \pm 27 \%$ (Friedman-Test, $p < 0,05$; s. Abbildung 23). Zusätzlich zeigten sich auf der Zement- / Dentinseite folgende Veränderungen: eine signifikante Abnahme des perfekten Randes von $75 \% \pm 11 \%$ auf $30 \% \pm 23 \%$ und des Überschusses von $6 \% \pm 8 \%$ auf $1 \% \pm 3 \%$ sowie eine signifikante Zunahme positiver Stufen von $8 \% \pm 8 \%$ auf $30 \% \pm 21 \%$ (Friedman-Test, $p < 0,05$).

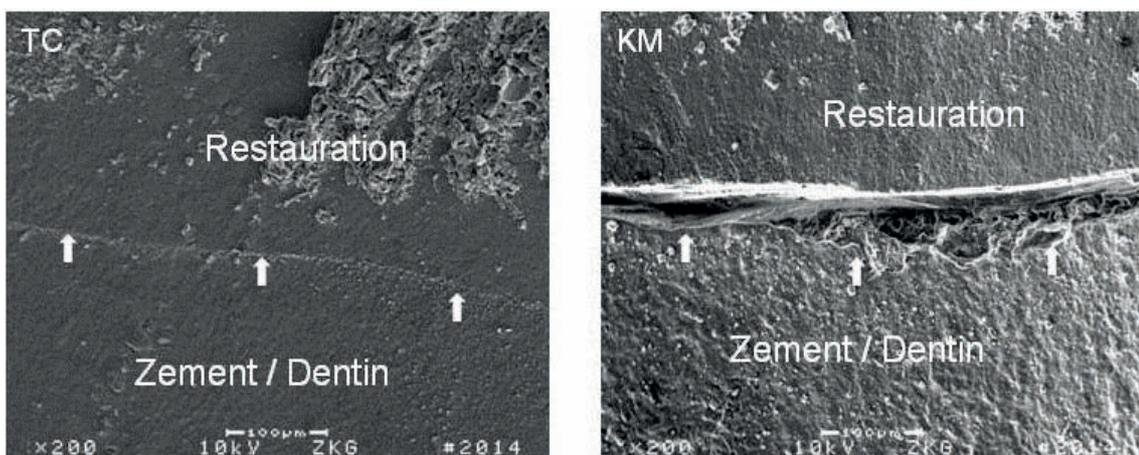


Abbildung 23: Exemplarische rasterelektronenmikroskopische Darstellung (200-fache Vergrößerung) eines Restaurationsrandes von Gruppe 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT) auf der Zement- / Dentinseite nach thermozyklischer Belastung (TC) und nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d (KM) mit sichtbarer Spaltbildung zwischen der Restauration und der angrenzenden Zahnhartsubstanz (KM). Der Verlauf des Restaurationsrandes wird durch weiße Pfeile markiert.

6 Diskussion

6.1 Diskussion von Material und Methode

6.1.1 Zahnproben

Bei der Wahl der Zahnproben zur Erzeugung artifizieller sekundärkariöser Läsionen besteht die Möglichkeit, sowohl Zähne boviner, equiner oder oviner Herkunft als auch humane Zähne zu verwenden. Ein Vorteil der Verwendung boviner Zähne ist, dass diese leicht erhältlich sind [159]. Während sich rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen artifizieller kariöser Läsionen boviner und humaner Zähne strukturell ähneln, weisen die Läsionen equiner und oviner Zähne aufgrund der variierenden Ausrichtung der Schmelzprismen in den äußeren Schmelzbereichen deutliche Strukturunterschiede im Vergleich zu humanen Zähnen auf [37]. Des Weiteren zeigt sich eine etwa dreimal höhere Progressionsrate artifizieller kariöser Schmelzläsionen an bovinen und ovinen Zähnen im Vergleich zu humanen Zähnen [39]. Aufgrund der vorhandenen Unterschiede zwischen Zähnen tierischer und menschlicher Herkunft im Rahmen der *In-vitro*-Erzeugung kariesähnlicher Läsionen und aufgrund der Tatsache, dass artifizielle Mundhöhlen die Gegebenheiten der menschlichen Mundhöhle *in vitro* simulieren, erscheint die Verwendung humaner Zähne realitätsnäher. Deshalb wurden für die vorliegende Studie extrahierte oder operativ entfernte, kariesfreie humane dritte Molaren verwendet. Der Fluoridgehalt des Trinkwassers im Landkreis Gießen, aus dem die Zähne stammten, lag unter 0,1 mg / l (www.stadtwerke-giessen.de/wasser/herkunft-amp-qualitaet.html, Stand 06.04.2015). Da die dritten Molaren entweder impaktiert waren oder nur eine kurze Zeitdauer der Fluoridexposition in der Mundhöhle ausgesetzt waren, konnte angenommen werden, dass die Fluorideinwirkung auf die Zahnhartsubstanzen gering war. Interindividuelle Unterschiede in der Zusammensetzung der Zahnhartgewebe konnten allerdings nicht ausgeschlossen werden. Deshalb erfolgte die randomisierte Verteilung der Zahnproben, um eine Homogenität in der Zusammensetzung der vier Gruppen untereinander zu erzielen. Zur Simulation der intraoralen Bedingungen wurde auf die Herstellung von Probenkörpern verzichtet und die Zähne *in toto* verwendet. Lediglich das apikale Wurzeldrittel musste vor der Befestigung der Zahnproben an den Kausimulatorplatten abgetrennt werden. Allerdings sind die Wurzelbereiche der Zähne auch *in vivo* physiologischerweise nicht den Umgebungseinflüssen der Mundhöhle direkt ausgesetzt, da die Zahnwurzeln im Alveolarknochenfach davor geschützt sind.

Um eine Dehydrierung zu vermeiden und zur Desinfektion der Zähne wurden diese umgehend nach der Extraktion oder der operativen Entfernung in 0,5 %-iger Chloramin-T-Lösung für maximal vier Wochen gelagert. Dieses Lagerungsmedium wurde verwendet, weil sich bei drei- bis vierwöchiger Lagerungsdauer in 1 %-iger Chloramin-T-Lösung im Rahmen der Testung von Dentinhaftvermittlern *in vitro* keine unerwünschten Effekte auf deren Microleakagewerte nachweisen lassen [45]. Der Einfluss des Lagerungsmediums auf die Microleakagewerte unterscheidet sich bei Lagerung für drei bis vier Wochen in 1 %-iger Chloramin-T-Lösung nicht signifikant von den Microleakagewerten frisch extrahierter Zähne [45]. Im Vergleich dazu eignet sich 10 %-ige Formalinlösung nicht zur Aufbewahrung, weil diese vermutlich aufgrund der proteinfixierenden Wirkung zur Stabilisierung der Kollagenfasern beiträgt mit daraus resultierenden besseren *In-vitro*-Ergebnissen von Dentinhaftvermittlern und geringeren Microleakagewerten [45]. Für die weitere Dauer der Versuche wurden die Zähne danach in *Aqua dest.* aufbewahrt, um eine Austrocknung zu vermeiden.

Es wurden Klasse-V-Kavitäten standardisierter Größe präpariert, um eine Reproduzierbarkeit der Versuche zu gewährleisten. Im Vergleich zu Klasse-I-Kavitäten, deren Kavitätenränder aufgrund des Höcker-Fissuren-Reliefs auf unterschiedlichen Höhen verlaufen, haben Klasse-V-Kavitäten einen ebenen Verlauf der Kavitätenränder, was die standardisierte Auswertung der Demineralisationstiefen erleichterte. Des Weiteren ließen sich durch die rechtwinklige Lage der Präparationsgrenzen zur Zahnoberfläche während der Ausarbeitung der Restaurationen Materialüberschüsse leichter einebnen, was auch von *Blunck* (1988) beschrieben wird [6]. Die Einhaltung einer Kavitätenausdehnung von 4 - 5 mm in mesio-distaler Richtung und von 2 - 3 mm in okklusal-apikaler Richtung wurde durch Nachmessen mit einer PA-Sonde (PCPUNC 15, Hu Friedy Mfg. B.V., Rotterdam, Niederlande) überprüft. Durch den Einsatz eines diamantierten Bohrers des Occlusal Reduction Kit mit Tiefenanzeiger (Nr. 8280 017, Hager & Meisinger GmbH) wurde eine standardisierte Tiefe von 1,8 mm eingehalten. Dadurch, dass die Schmelz-Zement-Grenze auf Höhe der halben Breite der Kavität verlief, war die eine Hälfte der Präparation von Schmelz begrenzt und die andere Hälfte von Zement begrenzt. Dies ermöglichte die Untersuchung von zwei unterschiedlichen Grenzflächen, nämlich zwischen der Restauration und dem Zahnschmelz sowie zwischen der Restauration und dem Zement / Dentin. Auch um eine Vergleichbarkeit mit bereits in diesem Kariesmodell durchgeführten Versuchen zu erzielen, wurde das Kavitätendesign vorangegangener Studien übernommen [72,117].

6.1.2 Restaurationsmaterialien und deren Verarbeitung

Ziel der Auswahl der Restaurationsmaterialien war es zu untersuchen, ob nach mikrobiologischer Belastung für 10 d im weiterentwickelten Kariesmodell kariesinhibitorische Effekte fluoridhaltiger Glasionomerzemente (konventioneller und kunststoffmodifizierter Glasionomerzement) durch Fluoridfreisetzung gegenüber einem fluoridfreien Komposit feststellbar sind. Die Freisetzung von Fluoridionen aus Glasionomerzementen und kunststoffmodifizierten Glasionomerzementen wird in verschiedenen Studien beschrieben [2,54,151,156].

Aus diesem Grund wurde in Gruppe 2 ein konventioneller Glasionomerzement (Ketac™ Molar Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) und in Gruppe 1 ein kunststoffmodifizierter Glasionomerzement (Photac™ Fil Quick Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) als Restaurationsmaterial eingesetzt. Durch die Verwendung der Restaurationsmaterialien in Form von vordosierten Kapselsystemen sollte ein gleichmäßiges Mischungsverhältnis und eine vollständige Durchmischung beider Komponenten durch Einsatz eines Anmischgerätes gewährleistet werden. Aufgrund der Empfindlichkeit der Glasionomerzemente gegenüber dem initialen Feuchtigkeitstritt / -verlust während der Abbindereaktion [38] wurde, wie laut Herstellerangaben empfohlen, der konventionelle Glasionomerzement (Gruppe 2; Ketac™ Molar Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) während der Abbindephase mit Ketac Glaze (3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) davor geschützt. Der kunststoffmodifizierte Glasionomerzement (Gruppe 1; Photac™ Fil Quick Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) wurde zusätzlich durch Polymerisation für 40 s ausgehärtet. Die Demineralisationstiefen der beiden mit Glasionomerzement restaurierten Gruppen 1 (Photac™ Fil Quick Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) und 2 (Ketac™ Molar Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d wurden dann mit den als Kontrollgruppen dienenden Kompositgruppen 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT) und 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH) verglichen. Bei Gruppe 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT) wurde die nach Herstellerangaben empfohlene Total-Etch-Technik (Säurekonditionierung von Schmelz und Dentin), heute auch als Etch-and-rinse-Technik bezeichnet [111], angewendet. Bei Gruppe 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH) wurde, im Unterschied zu Gruppe 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT), auf die Anwendung der Etch-and-rinse-Technik verzichtet, um die Entstehung eines Randspaltes zu provozieren.

Da bei der Ausarbeitung der Glasionomerzemente die Verwendung von Al_2O_3 -beschichteten, flexiblen Scheiben als geeignet gilt, wurden diese verwendet [109]. Auch zur Ausarbeitung des kunststoffmodifizierten Glasionomerzementes und des Komposites eignete sich dieses Vorgehen zur sorgfältigen Überschussbeseitigung.

6.1.3 Inkubation und thermozyklische Belastung

Nach dem Legen und Ausarbeiten der Restaurationen wurden die Zahnproben für 28 d in *Aqua dest.* bei 37 °C gelagert. Komposite unterliegen einer Polymerisationsschrumpfung und damit verbundenen Verkleinerung des Volumens nach deren Aushärtung [51,69,145]. Die organischen Polymere dieser Restaurationsmaterialien nehmen nach der Polymerisation Wasser auf, wodurch eine Volumenexpansion feststellbar ist [19,25,51,69,145]. Diese hygroskopische Expansion sollte durch die feuchte Lagerung ermöglicht werden. *Versluis et al.* (2011) untersuchten das Ausmaß der Deformation der Zahnhartsubstanzen durch die Dimensionsänderungen während der Polymerisationsschrumpfung und der anschließenden hygroskopischen Expansion von mod-Restaurationen aus einem Komposit (Filtek Supreme) oder einem kunststoffmodifizierten Glasionomerzement (Ketac Nano) *in vitro* anhand von digitalen Aufnahmen mit einem optischen Scanner. Es wurde festgestellt, dass die Polymerisationsschrumpfung des hydrophoben Komposites nach vierwöchiger Lagerung durch die hygroskopische Expansion kompensiert war, während der hydrophile kunststoffmodifizierte Glasionomerzement die Polymerisationsschrumpfung bereits innerhalb von einer Woche feuchter Lagerung überkompensierte [145]. Da durch die Volumenexpansion Überschüsse der Restaurationsmaterialien auftreten können [145], wurden diese nach einer initialen Lagerungsdauer von 72 h durch erneute Ausarbeitung entfernt.

In der menschlichen Mundhöhle sind die Zähne durch Aufnahme von warmen oder kalten Speisen und Getränken häufig wechselnden Temperaturen ausgesetzt, die zu einer thermischen Belastung der Zahnhartsubstanzen führen. Mehrere Tausend Male jährlich können Inzisivi dadurch Temperaturveränderungen von 50 °C ausgesetzt sein [16]. Das Ausmaß dieser thermischen Belastung ist proportional zum Ausmaß der Temperaturveränderungen innerhalb des Zahnes und führt langfristig zur thermischen Ermüdung [16]. Um Zahnproben und Restaurationsmaterialien *in vitro* einer thermischen Stressbelastung auszusetzen und einen Alterungsprozess zu simulieren, wird die thermozyklische Belastung durchgeführt. Einsatz findet die thermozyklische Belastung unter anderem in Farbstoffpenetrations-, Randspaltanalysen und Haftwertuntersuchungen [43]. Es kann damit untersucht werden, inwiefern sich unterschiedliche Restaurationsmaterialien oder -techniken in der Prävention von Microleakage an der

Grenzfläche zwischen der Restauration und der Zahnhartsubstanz eignen [26]. Bereits nach 1500 Zyklen thermozyklischer Belastung kann eine marginale Leakage in der Grenzfläche zwischen der Zahnhartsubstanz und der Restauration festgestellt werden [26]. Aus kleinen Rissen in menschlichen Zähnen werden nach einer thermozyklischen Belastung von 2000 Zyklen signifikant größere Risse [16]. In der vorliegenden Studie wurden die Zahnproben einer thermozyklischen Belastung von 10 000 Zyklen zur Provokation von Microleakage unterzogen. Ein Zyklus bestand aus einer Verweildauer von 15 s bei + 5 °C, gefolgt von 15 s bei + 55 °C und im Anschluss jeweils einer Abtropfphase von 15 s.

6.1.4 Biofilmbasiertes Kariesmodell

Die Grundlage der vorliegenden Studie bildete ein *S. mutans*-basiertes Kariesmodell zur *In-vitro*-Erzeugung sekundärkariesähnlicher Läsionen [117]. Im Allgemeinen lassen sich Demineralisationen der Zahnhartgewebe sowohl chemisch als auch mikrobiologisch erzeugen. Auf chemische Weise gelingt dies im Rahmen sogenannter „pH-cycling“-Versuche, in denen artifizielle Läsionen durch phasenweise Exposition der Zahnhartsubstanzen gegenüber Demineralisations- und Remineralisationslösungen entstehen [20,21,27,93,146]. Als Demineralisationslösungen werden azide Lösungen [20,21,27,93,146] oder Gele [20,27] eingesetzt, während die Remineralisationslösungen meist einen neutralen pH-Wert haben [20,21,146] und Kalzium- sowie Phosphationen zur Remineralisation enthalten [20,21,27,93,146]. Anhand dieser Modelle lassen sich die grundlegenden Vorgänge periodischer De- und Remineralisationen der Zahnhartsubstanzen simulieren, allerdings berücksichtigen die „pH-cycling“-Modelle nicht die Bedeutung des Biofilms in der Kariesätiologie *in vivo* [125].

Artifizielle kariöse Läsionen können auch durch organische Säuren erzeugt werden, welche durch die bakterielle Metabolisierung niedermolekularer Kohlenhydrate entstehen. Hierfür werden monobakterielle Kulturen [35,36,57,110,113,125], Vereinigungen definierter Bakterienspezies [7,35,36,41,42,52,104,110,125] oder Mikrokosmosbiofilme [127,128,130,152] eingesetzt. Bei Mikrokosmosbiofilmen handelt es um *In-vitro*-Versionen des menschlichen Biofilms [152], was deren großen Vorteil darstellt. Nach *Sissons* (1997) werden Mikrokosmosbiofilme eher durch den Einsatz von plaquereichem Speichel als durch die Verwendung von Plaque erzeugt [127]. Sogenannter plaquereicher Speichel wird beispielsweise dadurch gewonnen, dass Probanden vor der Abgabe einer Speichelprobe für 24 h auf die Anwendung von Mundhygienemaßnahmen verzichten, um den Bakteriengehalt im Speichel zu erhöhen [152]. Nachteile sind jedoch, dass diese Biofilme heterogen und mikrobiell komplex sind. Aufgrund der

Biodiversität ist die Reproduzierbarkeit der mikrobiellen Zusammensetzung gering [127]. Für eine Standardisierung der Versuche sind aus Plaque oder Speichel gewonnene Mikrokosmosbiofilme folglich nicht geeignet [86]. Im Vergleich dazu hat man beim Einsatz von Vereinigungen definierter Bakterienspezies zur Erzeugung artifizieller kariöser Läsionen die Kontrolle über die im Versuch vorhandenen Spezies, wodurch sich die Reproduzierbarkeit der mikrobiellen Zusammensetzung zwischen den Versuchen erhöht [127]. Dies gilt auch für die Verwendung von monobakteriellen Kulturen. In zahlreichen Studien wird *S. mutans* aufgrund seiner herausragenden Rolle in der Kariesätiologie eingesetzt [30,57,72,117,121,123]. Da neben *S. mutans* auch eine erhöhte Anzahl an Laktobazillen aus sekundärkariösen Läsionen isolierbar ist [63,65,66], war das Ziel dieser Studie, neben *S. mutans* auch *L. casei* in dem Kariesmodell zu etablieren und es dadurch ein Stück realitätsnäher zu gestalten. Durch Verwendung definierter Volumina (1 ml je Verdünnung der Übernachtskulturen) zur Inokulation waren die Versuche reproduzierbar. Die Versuchsvorbereitungen wurden jedoch durch die Anzucht von zwei Bakterienspezies komplexer und zeitaufwendiger (s. Tabelle 6, S. 44). Des Weiteren erhöhte sich das Risiko von zeitlichen Verzögerungen des Versuchsstartes im Falle von Misserfolgen oder Komplikationen bei der Anzucht der Bakterien, da die Anzuchtungsphase insgesamt 4 d dauerte. Allerdings ist es durch die Vereinigung von *S. mutans* und *L. casei* in dem Kariesmodell beispielsweise möglich, antikariogene Eigenschaften von Restaurationsmaterialien auf beide Bakterienspezies zu untersuchen. Da sowohl *S. mutans* als auch Laktobazillen regelmäßig aus sekundärkariösen Läsionen isoliert werden [63,65,66], erwies es sich als sinnvoll, mögliche kariesinhibitorische Effekte von Restaurationsmaterialien auf die Gemeinschaft dieser beiden Bakterienspezies zu erforschen.

Der periodische Wechsel von Demineralisations- und Remineralisationsphasen war für die Erzeugung artifizieller sekundärkariöser Läsionen von Bedeutung. Wie *Ritzmann* (2008) zeigte, kam es bei ausgedehnten Demineralisationsphasen von 20 – 22 h zu stark ausgeprägten, flächigen Demineralisationen der Zahnhartsubstanzen [117]. Es stellte sich heraus, dass eine Summe von 4 h Demineralisation in 24 h über eine Versuchsdauer von 10 d am geeignetsten zur Erzeugung artifizieller sekundärkariöser Läsionen war [122]. Zur Simulation von vier kariogenen Mahlzeiten pro Tag wurde ein Versuchsprotokoll gewählt, bei dem ein Zyklus aus 1 h Demineralisation gefolgt von 5 h Remineralisation bestand. Nach dem Einleiten der Bakterienlösung in die Reaktionskammer sank der pH-Wert darin auf einen Mittelwert von 4,17 (4,05 – 4,3). Durch die bakterielle Metabolisierung der Kohlenhydrate des Nährmediums, in diesem Fall Glukose (s. Tabelle 4, S. 40), sank der pH-Wert unter einen kritischen pH-Wert für die

Demineralisation des Zahnschmelzes von 5,0 – 5,5 [11,80]. Nach einer einstündigen Demineralisationsphase wurde die Flüssigkeit aus der Reaktionskammer ausgeleitet und artifizieller Speichel für eine Remineralisationsphase von 5 h eingeleitet. Um einen konstanten mittleren pH-Wert von 7,04 (6,9 – 7,15) während dieser Dauer zu gewährleisten, bedurfte es allerdings der viermaligen Spülung der Reaktionskammer mit artifiziellem Speichel (s. Abbildung 24 und Abbildung 25, S. 77).

Als Remineralisationslösung kann humaner oder artifizieller Speichel verwendet werden. Von Vorteil bei der Verwendung von humanem Speichel ist, dass neben den anorganischen Bestandteilen die organischen Bestandteile (z. B. Glykoproteine, Proteine, Enzyme) und Komponenten der Wirtsabwehr (sekretorisches IgA, IgG, IgM, Lysozym, Laktoferrin *etc.*) enthalten sind [68]. Allerdings weist die Speichelzusammensetzung interindividuelle Unterschiede auf, was sich ungünstig auf die Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Versuche auswirken kann. Aus diesem Grund wurde in dieser Studie artifiziellem Speichel als Remineralisationslösung verwendet, dessen Zusammensetzung aufgrund definierter Mengenangaben bei den einzelnen Versuchen konstant war (s. Tabelle 5, S. 41). Außerdem wurde für einen Versuchsdurchlauf eine Menge von ca. 35 l Speichel benötigt und die Bereitstellung dieser Menge an humanem Speichel war nicht realisierbar. Es wurde die Zusammensetzung des artifiziellem Speichels nach *Zampatti et al.* gewählt [157]. Der artifiziellem Speichel enthielt einen Phosphatpuffer (2,20 mmol / l KH_2PO_4 , 4,59 mmol / l K_2HPO_4) und Kalzium- sowie Phosphationen zur Remineralisation. Der pH-Wert des artifiziellem Speichels lag nach dem Ansetzen bei 7,0, sodass keine demineralisierenden Einflüsse beim Einwirken dieser Flüssigkeit auf die Zahnoberfläche zu erwarten waren.

Der pH-Wert innerhalb der Reaktionskammer wurde kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet, um die pH-Werte von De- und Remineralisationsphasen zu kontrollieren und zu überwachen. Während der fünf Versuchsdurchläufe mit *S. mutans* und *L. casei* war es möglich, reproduzierbare pH-Wertkurven zu erzeugen (s. Abbildung 24 und Abbildung 25, S. 77). Diese waren vergleichbar mit den vorangegangenen monobakteriellen Versuchsdurchläufen mit *S. mutans* [72,117,122].

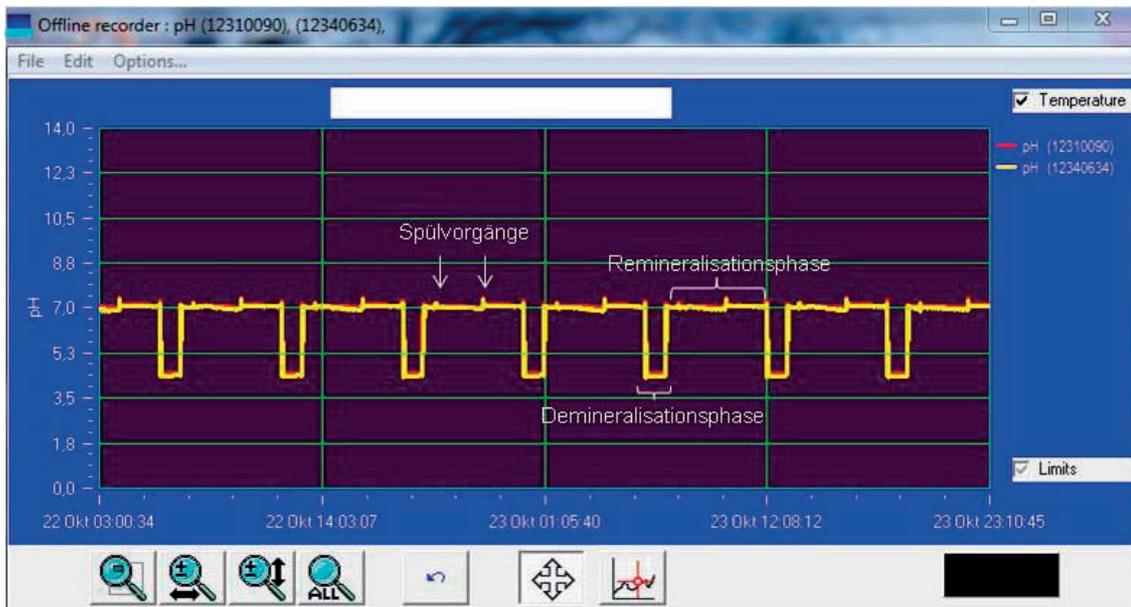


Abbildung 24: Überlagerte Ausschnitte von zwei aufgezeichneten pH-Wertkurven innerhalb der Reaktionskammer bei monobakterieller Inokulation des Kariesmodells mit *S. mutans* (gelb) beziehungsweise *L. casei* (rot).

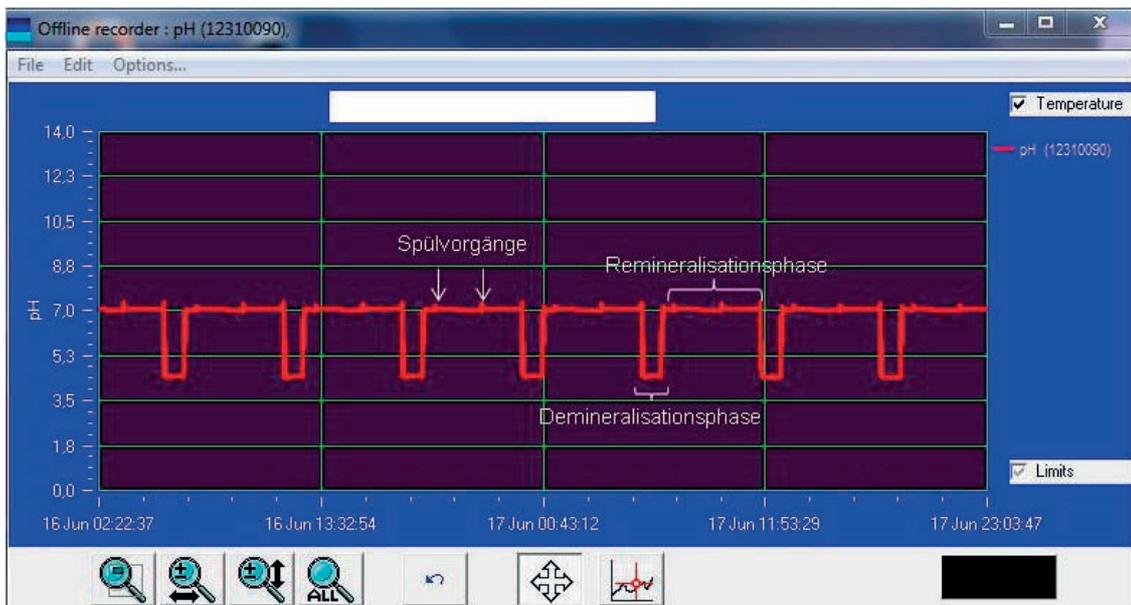


Abbildung 25: Ausschnitt einer aufgezeichneten pH-Wertkurve innerhalb der Reaktionskammer bei Inokulation des Kariesmodells mit *S. mutans* und *L. casei*.

Durch die Automatisierung und die Steuerung der Flüssigkeitsbewegungen über peristaltische Pumpen mittels eines Computerprogramms wurde das Risiko unerwünschter Kontaminationen mit Fremdkeimen durch Eingriff in das System minimiert. Trotz der Automatisierung bedurfte es allerdings der dreimal täglichen Kontrolle der störungsfreien Funktion des Kariesmodells sowie des regelmäßigen Austausches der Abfallgefäße, um ein Überlaufen zu vermeiden und das Risiko einer unangenehmen Geruchsentwicklung zu reduzieren.

Keimzahlbestimmungen und Reinheitskontrollen erfolgten bei jedem Versuchsdurchlauf mindestens zweimal, nämlich zu Versuchsbeginn und nach Versuchsende. Zu Beginn des Versuches wurden die zur Inokulation verwendeten Bakterienkulturen und zu Versuchende wurde die aus der Reaktionskammer abgepumpte Flüssigkeit der letzten Demineralisationsphase ausplattiert. Nach 48-stündiger Inkubation erfolgte die Bestimmung der Keimzahlen durch das Auszählen der Einzelkolonien. Die Reinheitskontrollen wurden zum einen anhand des optischen Erscheinungsbildes und des Geruches der abgepumpten Flüssigkeit und zum anderen anhand der Kulturmorphologie der ausplattierten Einzelkolonien vorgenommen. Während der fünf Versuchsdurchläufe waren keine unerwünschten Kontaminationen mit Fremdkeimen feststellbar.

Wie in vorangegangenen Studien bewiesen wurde, eignete sich das *S. mutans*-basierte Kariesmodell dazu, unter standardisierten *In-vitro*-Bedingungen reproduzierbare sekundärkariöse Läsionen zu erzeugen [72,117]. Durch die Standardisierung und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse können kariesinhibitorische Effekte unterschiedlicher Restaurationsmaterialien unter kontrollierten Bedingungen untersucht werden. Die Kontrolle der Versuchsbedingungen ist ein bedeutender Vorteil von *In-vitro*-Studien [123]; es besteht die Möglichkeit der Manipulation, der Änderung der Nährstoffzufuhr, der pH-Wertkontrolle und der Wiederholung der Versuche, wodurch sich eine große Anzahl an Versuchsproben zur Auswertung generieren lässt [128]. Bei *In-vivo*-Studien dagegen ist die Versuchskontrolle reduziert; zum einen herrschen interindividuelle Unterschiede in den Gegebenheiten innerhalb der menschlichen Mundhöhle (Speichelfluss, Speichelzusammensetzung, orale Mikrobiota *etc.*) und zum anderen besteht eine Abhängigkeit von der Compliance der Probanden [86]. Im Vergleich zur Sekundärkariesforschung *in vivo* stehen die Zähne bei *In-vitro*-Studien für weitere Untersuchungen außerhalb der artifiziellen Mundhöhle zur Verfügung. So können beispielsweise Zahnschnitte angefertigt werden, welche zur fluoreszenz- oder rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung zur Verfügung stehen. Es ist jedoch auch zu erwähnen, dass es sich bei der *In-vitro*-Untersuchung in dem Kariesmodell um eine Vereinfachung der intraoralen Bedingungen handelt. So lassen sich damit nicht die individuellen Faktoren der Wirtsabwehr sowie die Komplexität des oralen Biofilms darstellen und die sekundärkariösen Läsionen werden durch ausgewählte Bakterienspezies (in diesem Falle *S. mutans* und *L. casei*) erzeugt. Hinsichtlich möglicher ethischer Konflikte bei *In-vivo*-Studien [123,128,152] und der Vielzahl neuer Materialien besteht ein Bedarf an *In-vitro*-Modellen, welche die Materialeigenschaften im Rahmen von Voruntersuchungen bewerten [28,123]. Allerdings können diese Studien *In-vivo*-Studien nicht ersetzen und es bedarf der Bestätigung der *in vitro* gewonnen Erkenntnisse *in vivo* [128]. Deshalb

erscheint die Einhaltung einer Versuchshierarchie von Laborstudien über Tierversuche bis hin zu humanen *In-situ*- und *In-vivo*-Studien sinnvoll [86].

6.1.5 Replikaherstellung

Die Beurteilung der Randspalten zwischen den Restaurationen und den Zahnhartsubstanzen erfolgte anhand von Replikas im Rahmen der quantitativen Randspaltanalyse nach thermozyklischer Belastung und nach mikrobiologischer Belastung in dem Kariesmodell für 10 d. Durch die Replikaherstellung konnten die Randspaltqualitäten der Zahnproben zu definierten Versuchszeitpunkten miteinander verglichen werden, ohne dass die Qualität der Zahnproben davon negativ beeinflusst wurde oder die Zähne für die weitere Versuchsdurchführung nicht mehr verwendbar waren (z. B. durch Besputterung mit Goldpartikeln). Die Anwendung der Replikatechnik ermöglichte somit die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Veränderungen im Restaurationsrandbereich. *Seichter* und *Herforth* (1980) untersuchten die Wiedergabegenauigkeit von unterschiedlich hergestellten Replikas zur quantitativen Randspaltanalyse. Es konnte festgestellt werden, dass die beste Wiedergabegenauigkeit der Replikas und Reproduzierbarkeit der Messergebnisse durch Abformung der Zahnoberfläche mit einem gummielastischen Abformmaterial und direktes Ausgießen mit einem Epoxidharz erzielt wurden, bedingt durch das gute Fließverhalten des Epoxidharzes. Im Vergleich dazu zeigten galvanisch verkupferte und mit einem Modellzement ausgegossene Replikas Differenzen in der Oberflächenstruktur im Vergleich zum Originalzahn. Am ungünstigsten erwiesen sich nach galvanischer Versilberung hergestellte Replikas, da der Randspalt verglichen mit dem Originalzahn größer war und die Zahnoberfläche unebener erschien [124]. Deshalb wurden die Replikas durch direktes Ausgießen der Abformungen mit einem Polyurethan hergestellt.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Diskussion der mikrobiologischen Ergebnisse

Im Rahmen der Weiterentwicklung des vorhandenen *S. mutans*-basierten Kariesmodells sollte eine weitere Bakterienspezies etabliert werden, um eine komplexere Zusammensetzung der bakteriellen Plaque zu erzielen. Da neben *S. mutans* auch Laktobazillen aus sekundärkariösen Läsionen isolierbar sind [63,65,66], wurde der Versuch zur Etablierung dieser Bakterienspezies (*L. casei*) in dem Kariesmodell unternommen. Die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten von *S. mutans* und *L. casei* bei der Inokulation und nach dem Versuchsende zeigte, dass beide Bakterienspezies gemeinsam in dem Kariesmodell überlebten und sich nach der zehntägigen Versuchsdauer

die Anzahl an koloniebildenden Einheiten je Spezies um das Zehnfache vermehrte (s. Tabelle 7, S. 56). Zur Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten wurde die nach der letzten Demineralisation aus der Reaktionskammer abgepumpte Flüssigkeit verwendet. Eine Alternative bietet das Auszählen der koloniebildenden Einheiten aus der adhärennten Plaque der Zahnoberfläche. Die von *Fontana et al.* (1999) bestimmte Anzahl koloniebildender Einheiten auf den Zahnoberflächen nach siebentägiger Versuchsdauer in einer artifiziellen Mundhöhle lag für *S. mutans* zwischen $5,0 \times 10^7 \pm 3,5 \times 10^7$ und $2,4 \times 10^8 \pm 1,5 \times 10^8$ sowie für *L. casei* zwischen $5,2 \times 10^7 \pm 3,4 \times 10^7$ und $2,2 \times 10^8 \pm 1,2 \times 10^8$. Es finden sich keine Angaben zu der Anzahl an koloniebildenden Einheiten, die zur Inokulation verwendet wurde [42]. Die Verwendung der adhärennten Plaque zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten hat den Vorteil, dass von jeder Zahnprobe die Anzahl anhaftender Bakterien (*S. mutans* und *L. casei*) bekannt ist, während bei der Bestimmung aus der abgepumpten Flüssigkeit ein durchschnittlicher Wert der planktonischen und der von der Zahnoberfläche abgelösten Mikroorganismen ausgezählt wird. Jedoch kann es bei der Entnahme der Plaqueproben von der Zahnoberfläche zu Verletzungen der nach der mikrobiologischen Belastung empfindlicheren Oberflächen kommen, wodurch die Zahnproben für weitere Auswertungen mitunter unbrauchbar werden. Um diesem Risiko zu entgehen, wurde auf die Anwendung dieser Methode verzichtet.

Der mittlere pH-Wert während der Demineralisationsphasen lag in den durchgeführten Versuchen mit *S. mutans* und *L. casei* bei 4,17 (4,05 – 4,3) und war somit vergleichbar mit dem von *Krämer et al.* (2015) beschriebenen mittleren pH-Wert von 4,2 (4,0 – 4,5) bei der monobakteriellen Inokulation mit *S. mutans* [72].

Exemplarisch wurde der Biofilm auf den Oberflächen einiger zusätzlicher Zahnproben nach der mikrobiologischen Belastung in dem Kariesmodell für 10 d mittels der LIVE/DEAD® *BacLight*™ - Färbemethode (Molecular Probes Europe BV) dargestellt, welche auf zwei nukleinsäurebindenden Farbstoffen basiert [8,108]. Der grün fluoreszierende Farbstoff (SYTO® 9) kann sämtliche bakterielle Zellmembranen durchdringen, bindet an die DNA und färbt intakte Bakterien grün [8,108]. Der rot fluoreszierende Farbstoff (Propidiumiodid) ist nur in der Lage beschädigte bakterielle Zellmembranen zu durchdringen und färbt somit beschädigte sowie tote Mikroorganismen rot [8,108]. Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ließ sich feststellen, dass sich nach einer Versuchsdauer von 10 d ein Biofilm auf den Zahnoberflächen bildete und dieser zum überwiegenden Anteil aus intakten, vitalen Bakterien bestand (s. Abbildung 10 und Abbildung 11, S. 57). Somit zeigte sich, dass ein Überleben der Bakterien unter

den im Kariesmodell vorherrschenden Umgebungsbedingungen bei einer Versuchsdauer von 10 d gewährleistet war.

Im Allgemeinen können zur Untersuchung des Biofilms auf abiotischen Oberflächen verschiedene analytische Techniken angewendet werden. So gibt es kolorimetrische Techniken, welche die Matrix des Biofilms (z. B. Methylblau, Fluorescein-Diacetat) oder lebende Zellen (z. B. LIVE/DEAD® *BacLight*™) quantitativ darstellen. Weitere genetische Methoden, wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH), dienen der Bestimmung der bakteriellen Population [108]. Zu den Vorteilen der hier angewendeten LIVE/DEAD® *BacLight*™ - Technik zählen die schnelle und einfache Anwendung sowie die Reliabilität der Färbemethode [8]. Die Anwendung ermöglicht die gleichzeitige Darstellung der lebenden sowie der Gesamtzahl der Bakterien, wobei eine einfache Differenzierung zwischen den vitalen und den beschädigten beziehungsweise avitalen Bakterien aufgrund der Fluoreszenzunterschiede möglich ist [8]. Allgemein eignen sich einfache mikroskopische Analysetechniken aufgrund der mangelnden Darstellbarkeit morphologischer Unterschiede zwischen den Bakterien nur unzureichend zur verlässlichen Identifikation der einzelnen Bakterienarten [101]. Im Rahmen der Weiterentwicklung des Kariesmodells wäre aufgrund dessen eine Darstellung des Biofilms mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung vorstellbar, wodurch sich die unterschiedlichen Bakterienarten auf den Zahnoberflächen visualisieren, auszählen, lokalisieren und identifizieren lassen [101]. Mittels der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung hybridisieren fluoreszenzmarkierte Sonden an die komplementären Nukleinsäuresequenzen der Zielzellen [101]. Durch den Einsatz von Sonden mit Fluorochromen unterschiedlicher Anregungs- und Emissionswellenlänge können unterschiedliche Bakterienarten gleichzeitig durch differierende Farbsignale dargestellt werden [101]. Dadurch wäre es dann beispielsweise möglich, die anteilmäßige Zusammensetzung des Biofilms aus *S. mutans* und *L. casei* nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d durch die Anwendung der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung darzustellen.

6.2.2 Diskussion der fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse

Bei der Betrachtung der Zahnprobenoberflächen nach der mikrobiologischen Belastung in dem Kariesmodell für 10 d und vor der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung fielen makroskopisch die matten, weiß-opak veränderten und rau erscheinenden Zahnschmelzoberflächen auf. Weißliche Veränderungen der Zahnoberflächen werden auch von *Seemann et al.* (2005) nach dem Aufenthalt in der artifiziellen Mundhöhle beschrieben [123]. *Kidd* und *Fejerskov* (2004) beschreiben, dass aktive kariöse Schmelz-

läsionen aufgrund der bakteriellen Säureproduktion durch Erosionen der Oberfläche und durch Porositäten unterhalb der Oberfläche gekennzeichnet sind. Die Erosion des Zahnschmelzes wird am wahrscheinlichsten als bedingt verantwortlich für die matte Erscheinung des Zahnschmelzes angesehen. Die Porositäten der unterhalb der Oberfläche befindlichen Läsion sind verantwortlich für die weiß-opake Veränderung der Zahnoberfläche. In die Porositäten lagert sich beim feuchten Zahn Wasser und beim trockenen Zahn Luft ein, deren Brechungsindizes sich von dem des gesunden Schmelzes (Brechungsindex 1,62) unterscheiden. Da der Brechungsindex von Luft (1,0) kleiner als der Brechungsindex des Wassers (1,33) ist und somit der Unterschied zum Brechungsindex des gesunden Zahnschmelzes größer wird, werden kariöse Läsionen im getrockneten Zustand der Zähne deutlicher sichtbar [64]. Auch bei der klinischen Untersuchung *in vivo* kann sich die Außenläsion einer Sekundärkaries als „White-Spot“-Läsion darstellen [67].

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Begutachtung ließen sich an sämtlichen Zahnprobenhälften sowohl auf der Schmelzseite als auch auf Zement- / Dentinseite Demineralisationen an der Zahnoberfläche und entlang der Kavitätenwand feststellen (s. Abbildung 15 – Abbildung 19, S. 62 – 65). Während die demineralisierten Bereiche auf der Schmelzseite in einem dunkleren Grün als die gesunde Zahnhartsubstanz fluoreszierten, zeigten die Demineralisationen auf der Zement- / Dentinseite eine hellere Grünfluoreszenz. Das Erscheinungsbild der entstandenen Läsionen ist hierbei in Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien [72,117,122].

Unabhängig vom verwendeten Restaurationsmaterial zeigte die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zahnproben geringere Demineralisationstiefen, Substanzverluste und Gesamtdemineralisationstiefen auf der Schmelzseite als auf der Zement- / Dentinseite sowohl im Füllungsrandbereich als auch in 500 µm Entfernung vom Füllungsrand. Dies kann aus dem unterschiedlichen Mineralgehalt der Zahnhartgewebe und folglich den Unterschieden in deren kritischem pH-Wert, ab dem ein Netto-Mineralverlust auftreten kann, resultieren. Der Zahnschmelz besteht zu 93 – 98 Gew.-% aus anorganischen Verbindungen, 1,5 – 4 Gew.-% aus Wasser und der Rest setzt sich aus organischen Verbindungen (z. B. Lipide und Proteine) zusammen [53]. Während das Dentin noch zu ca. 70 Gew.-% aus Mineralien besteht, enthält das Wurzelzement nur noch etwa 65 Gew.-% anorganische Bestandteile [53]. Dafür erhöht sich der Anteil organischer Bestandteile im Wurzelzement auf 23 Gew.-% [53]. Während der kritische pH-Wert für den Zahnschmelz somit bei 5,0 - 5,5 liegt [11,80], wird dieser für das Wurzelzement und Wurzelentin mit 6,2 – 6,7 angegeben [53].

Der Vergleich der Gesamtdemineralisationstiefen der einzelnen Gruppen zeigte, dass auf der Schmelzseite im Füllungsrandbereich signifikante Unterschiede zwischen dem kunststoffmodifizierten Glasionomerzement (Photac™ Fil Quick Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) und den Kompositgruppen 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT) und 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH) feststellbar waren (ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$). Die Gesamtdemineralisationstiefen des konventionellen Glasionomerzementes (Ketac™ Molar Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) erwiesen sich auf der Schmelzseite im Füllungsrandbereich als signifikant geringer im Vergleich zu Gruppe 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT; ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$). Auf der Zement- / Dentinseite wiesen sowohl der konventionelle Glasionomerzement (Ketac™ Molar Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) als auch der kunststoffmodifizierte Glasionomerzement (Photac™ Fil Quick Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) im Füllungsrandbereich signifikant geringere Gesamtdemineralisationstiefen als die mit dem fluoridfreien Komposit restaurierten Gruppen 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT) und 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH) auf (ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$). In 500 µm Entfernung vom Füllungsrand auf der Zement- / Dentinseite zeigte der kunststoffmodifizierte Glasionomerzement (Photac™ Fil Quick Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) noch signifikant geringere Werte in der Gesamtdemineralisation als die Zähne der Kompositgruppen 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT) und 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH), für den konventionellen Glasionomerzement (Ketac™ Molar Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) lagen signifikant geringere Gesamtdemineralisationen an diesem Messpunkt im Vergleich zu Gruppe 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT) vor (ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$). Antikariogene Eigenschaften durch Fluoridfreisetzung lassen sich für Glasionomerzemente *in vitro* bei der Simulation kariogener Bedingungen nachweisen [151], was in Übereinstimmung mit der vorliegenden Studie ist. Die bakteriostatischen und antikariogenen Eigenschaften variieren dabei in Abhängigkeit von der Fluoridfreisetzung des jeweiligen Restaurationsmaterials (Zusammensetzung der Füllkörper, Partikelgröße *etc.*) [156].

Xu und Burgess (2003) untersuchten *in vitro* die Druckfestigkeit, Fluoridfreisetzung und Fluoridaufladeprofile von 15 fluoridfreisetzenden Restaurationsmaterialien und stellten fest, dass die Restaurationsmaterialien mit einer höheren Fluoridfreisetzung eine geringere Druckfestigkeit aufwiesen. Sämtliche untersuchten konventionellen und

kunststoffmodifizierten Glasionomerezemente, darunter Ketac Molar und Photac Fil, zeigten initial eine hohe Fluoridfreisetzung von $\geq 40 \mu\text{g} / \text{cm}^2$. Diese Freisetzung nahm nach den ersten drei Tagen rapide ab („Burst-Effekt“) und danach ließ sich eine geringere Fluoridfreisetzung über einen längeren Zeitraum feststellen. Ketac Molar zeigte in dieser Studie für 3 d eine Fluoridfreisetzung von $\geq 10 \mu\text{g} / \text{cm}^2 / \text{d}$, während Photac Fil für mindestens 10 d diese Menge ($\geq 10 \mu\text{g} / \text{cm}^2 / \text{d}$) freisetzte [156].

Mayanagi et al. (2014) konnten *in vitro* nachweisen, dass der durch *S. mutans* (NCTC 10449) induzierte pH-Wertabfall an der Grenzfläche zwischen den Bakterien und dem Restaurationsmaterial bei fluoridfreisetzenden Restaurationsmaterialien im Vergleich zu einer fluoridfreien Kontrollgruppe reduziert ist. Bei Messungen des pH-Wertes 90 min nach einer Glukosegabe lag der pH-Wert an der Grenzfläche zum konventionellen Glasionomerzement bei 4,98 – 5,18, zum kunststoffmodifizierten Glasionomerzement bei 4,77 – 4,99, zum Komposit bei 4,62 – 4,75 und zum Flowable-Komposit bei 4,54 – 4,84. Im Vergleich dazu zeigte die fluoridfreie Kontrollgruppe pH-Werte von 4,31 – 4,49. Das Ausmaß der Inhibition des pH-Wertabfalls schien mit der Fluoridfreisetzung des jeweiligen Restaurationsmaterials zu korrelieren, weshalb geschlussfolgert wurde, dass die Fluoridfreisetzung eine mögliche Ursache für die Inhibition des pH-Wertabfalls sei [94].

Auch nach der Weiterentwicklung des *S. mutans*-basierten Kariesmodells durch Etablierung von *L. casei* ließen sich artifizielle sekundärkariöse Läsionen erzeugen, die morphologisch mit denen durch *S. mutans* erzeugten Läsionen vergleichbar waren [72,122]. Des Weiteren lieferte die Messung der Gesamtdemineralisationstiefen Hinweise auf ein Vorhandensein antikariogener Effekte der fluoridhaltigen Restaurationsmaterialien (Photac™ Fil Quick Aplicap™, Ketac™ Molar Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) durch Fluoridfreisetzung im Vergleich zu den fluoridfreien Kontrollgruppen (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT und Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH).

Bezüglich der Wahl der Restaurationsoberfläche als Referenzpunkt für die Messung des Substanzverlustes stellte sich heraus, dass sich dieser Referenzpunkt bei den Glasionomerezementen aufgrund der säurebedingten Erosion des Restaurationsmaterials unzureichend eignete. Es wird in der Literatur beschrieben, dass sich unter sauren Umgebungsbedingungen in Abhängigkeit von dem pH-Wert Erosionen der Glasionomerezemente in unterschiedlichem Ausmaß feststellen lassen, welche mit Lösung der Ionen aus der Matrix einhergehen [148]. Für zukünftige Studien kann stattdessen ein säurefester Metallstift als Referenzpunkt zur Ermittlung des Substanzverlustes in der Zahnhartsubstanz verankert werden. Alternativ besteht die Möglichkeit, auf die Be-

stimmung des Substanzverlustes durch Demineralisation zu verzichten und die reine Demineralisation auszumessen, da hierbei die fluoreszierende Zone vermessen wird und somit kein zusätzlicher Referenzpunkt zum Ausmessen nötig ist.

6.2.3 Diskussion der quantitativen Randspaltanalyse

Die quantitative Randspaltanalyse wird allgemein zur Beurteilung der marginalen Adaptation von Restaurationsmaterialien und der Qualität der Grenzfläche zwischen der Zahnhartsubstanz und der Restauration nach definierten Kriterien eingesetzt [31,82]. In der vorliegenden Studie sollte durch die quantitative Randspaltanalyse untersucht werden, inwiefern sich die Qualität der Restaurationsränder bei Verwendung unterschiedlicher Restaurationsmaterialien durch die mikrobiologische Belastung für 10 d in dem biofilmbasierten Kariesmodell ändert. Es war feststellbar, dass der prozentuale Anteil des perfekten Randes sowohl bei den Glasionomerezementgruppen (Photac™ Fil Quick Aplicap™, Ketac™ Molar Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) als auch bei den Kompositgruppen 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT) und 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH) nach dem Aufenthalt in dem Kariesmodell reduziert war (s. Tabelle 12, S. 66 und Tabelle 13, S. 68). Sowohl bei dem kunststoffmodifizierten als auch bei dem konventionellen Glasionomerezement war nach der mikrobiologischen Belastung im Kariesmodell eine Zunahme negativer Stufen feststellbar. Dies kann durch eine säurebedingte Erosion dieser Restaurationsmaterialien bedingt sein, weil bei Glasionomerezementen unter sauren Bedingungen Ionen aus der Matrix in Lösung gehen, woraus Erosionen des Restaurationsmaterials resultieren [148]. Da der mittlere pH-Wert während der Demineralisationsphasen mit 4,17 (4,05 – 4,3) im sauren Bereich lag und die Zahnproben einer Summe von 40 h Demineralisation während der Versuche ausgesetzt waren, kann das Auftreten der negativen Stufen bedingt durch die unzureichende Säurefestigkeit der Glasionomerezemente sein. Auch die signifikante Reduktion des Überschusses und die signifikante Abnahme positiver Stufen auf der Schmelzseite bei Gruppe 1 (Photac™ Fil Quick Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) sind möglicherweise darauf zurückzuführen (Friedman-Test, $p < 0,05$). Bei den Kompositgruppen trat auf der Zement- / Dentinseite eine signifikante Reduktion des perfekten Randes in Kombination mit einer signifikanten Zunahme positiver Stufen auf. Da bei den Kompositgruppen im Vergleich zu den Glasionomerezementen geringere säurebedingte Erosionen zu erwarten waren, kann die Ausbildung positiver Stufen aus einer säurebedingten Erosion der Zahnhartsubstanz resultieren. Der prozentuale Anteil positiver Stufen auf der Zement- / Dentinseite stieg bei Gruppe 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT) von 6 % ± 13 % auf 20 % ± 23 %

und bei Gruppe 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH) von $8\% \pm 8\%$ auf $30\% \pm 21\%$ (Friedman-Test, $p < 0,05$). Ein möglicher Grund dafür, dass eine deutliche Ausbildung positiver Stufen auf der Zement- / Dentinseite und nicht auf der Schmelzseite festzustellen war, kann die im Vergleich zum Zahnschmelz größere Anfälligkeit des Zementes / Dentins für säurebedingte Erosionen aufgrund des geringeren Mineralgehaltes [53] und des höheren kritischen pH-Wertes [53] dieser beiden Zahnhartgewebe sein. Bei Gruppe 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH) als negative Kontrollgruppe wurde, im Gegensatz zu Gruppe 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT), bewusst auf die Anwendung der Etch-and-rinse-Technik verzichtet, um eine Randspaltbildung zu provozieren. Die Ergebnisse der quantitativen Randspaltanalyse bestätigen, dass bei Verzicht auf eine Konditionierung der Zahnhartsubstanzen mit 35 %-iger Orthophosphorsäure signifikante Spaltbildungen nach der mikrobiologischen Belastung im Kariesmodell auf der Schmelzseite und auf der Zement- / Dentinseite feststellbar sind (s. Abbildung 23, S. 69).

6.2.4 Vergleich mit artifiziellen Mundhöhlen zur Sekundärkariesforschung

Einige *In-vitro*-Studien beschreiben artifizielle Mundhöhlen, mit denen sich sekundärkariesähnliche Läsionen erzeugen lassen. Allerdings unterscheiden sich diese Modelle in vielen Gesichtspunkten, wie beispielsweise dem Aufbau, den eingesetzten Flüssigkeiten, den zur Inokulation verwendeten Bakterien, dem Versuchsprotokoll, den Auswertungsmethoden und –kriterien voneinander. Dies erschwert mitunter die Vergleichbarkeit der einzelnen artifiziellen Mundhöhlen miteinander.

Fontana et al. (1996) beschrieben eine artifizielle Mundhöhle, in der beschliffene humane Unterkieferinzisivi nach Versorgung mit Kompositrestaurationen zur Erzeugung artifizieller sekundärkariöser Läsionen eingesetzt wurden. Zur Inokulation wurde eine Mischung einer *L. casei*-Kultur und einer *S. mutans*-Kultur verwendet, von der 20 ml vor Versuchsbeginn auf die Zähne pipettiert wurden. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 2 h erfolgten die Platzierung der Zähne in den Versuchsbehältnissen und der Zusammenbau der artifiziellen Mundhöhle. Der Einsatz von *S. mutans* und *L. casei* ist eine Gemeinsamkeit mit der vorliegenden Studie. Allerdings erfolgte die Inokulation vor Versuchsbeginn außerhalb der artifiziellen Mundhöhle, während die Zahnproben in der vorliegenden Studie innerhalb des Kariesmodells automatisiert in Kontakt mit der Bakterienlösung gebracht wurden. Dextrosefreies Trypticase Soja Bouillon mit 5 % Saccharosezusatz (TSBS) diente als Nährmedium und eine Mineralwaschlösung (MWL) wurde als artifizieller Speichel eingesetzt. Bei dieser artifiziellen Mundhöhle erfolgten

die Flüssigkeitsbewegungen über peristaltische Pumpen. Es finden sich keine Angaben dazu, ob die Pumpen manuell oder per Computer gesteuert wurden. Die Versuchsdauer betrug 7 d oder 12 d mit einem zyklischen Wechsel von TSBS (3 x täglich für je 30 min, 0,7 ml / min, 63 ml / d) und MWL (insgesamt 22,5 h, 0,7 ml / min, 945 ml / d). Somit unterscheiden sich sowohl die Versuchsdauer (7 d / 12 d) als auch das gewählte Versuchsprotokoll (insgesamt 1,5 h Demineralisation / d) von der vorliegenden Studie (Versuchsdauer 10 d, insgesamt 4 h Demineralisation / d). Ein pH-Wert von 4,1 – 4,5 wurde in den Versuchsgefäßen der experimentellen Gruppen gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand von konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie nach dem Sägen der Zähne in Hälften und der Anfärbung mit Rhodamin B. Es wurden die Fläche der fluoreszierenden Läsion und die Kavitätenwandläsionstiefe gemessen. Insgesamt wurden zwei Versuchsdurchläufe durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen. Nach einer Versuchsdauer von 12 d ließen sich in Versuch 1 eine mittlere Läsionsfläche von $28,3 \pm 6,5 \mu\text{m}^2 \times 10^3$ und eine mittlere Kavitätenwandläsionstiefe von $224,3 \pm 43,6 \mu\text{m}$ messen. Im Versuch 2 betrug die entsprechenden Werte $34,8 \pm 3,4 \mu\text{m}^2 \times 10^3$ (Läsionsfläche) und $316,9 \pm 34,0 \mu\text{m}$ (Kavitätenwandläsion) [41]. Diese Art der mikroskopischen Auswertung stellt eine Alternative zu den in der vorliegenden Studie gewählten Auswertungskriterien (s. Kapitel 4.7.1, S. 51 f.) dar. Um eine Vergleichbarkeit der Messergebnisse mit vorangegangenen Studien in dem vorhandenen Kariesmodell zu erzielen, wurden in der durchgeführten Studie die Auswertungskriterien der früheren Versuche übernommen [72,122].

Im Rahmen einer weiteren Studie in der von *Fontana et al.* (1996) entwickelten artifiziellen Mundhöhle wurde untersucht [41], ob sich eine antikariogene Wirksamkeit eines Kalzium-, Fluorid- und Hydroxylionen freisetzenden Restaurationsmaterials (Ariston pHc) im Vergleich zu einem fluoridfreien Restaurationsmaterial (Silux) feststellen lässt. Dazu wurden humane Zähne vier Gruppen zugeteilt. Es erfolgte die Versorgung von präparierten Kavitäten mit einem der beiden Restaurationsmaterialien entweder mit oder ohne Anwendung der Säure-Ätz-Technik. Die Auswertung der Versuche erfolgte nach siebentägiger Versuchsdauer mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie durch Messung der Tiefe der demineralisierten Oberflächenläsion, der Läsionstiefe, der absoluten Fluoreszenz und der Tiefe der Kavitätenwandläsion. So zeigten sich beispielsweise bei dem fluoridfreien Restaurationsmaterial (Silux) und bei Verzicht auf Anwendung der Säure-Ätz-Technik eine Oberflächenläsionstiefe von $80,38 \pm 4,86 \mu\text{m}$ und eine Kavitätenwandläsionstiefe von $80,60 \pm 16,60 \mu\text{m}$. Ohne Anwendung der Säure-Ätz-Technik zeigte das ionenfreisetzende Restaurationsmaterial (Ariston pHc)

Messwerte von $48,08 \pm 3,93 \mu\text{m}$ (Oberflächenläsionstiefe) und $21,89 \pm 7,88 \mu\text{m}$ (Kavitätenwandläsionstiefe) [42].

Seemann et al. (2005) untersuchten die Sekundärkariesbildung an 25 kariesfreien, fissurenversiegelten Oberkieferprämolaren in der von ihnen entwickelten artifiziellen Mundhöhle. Die Fissurenversiegelungen der Prämolaren wurden in den mesialen Anteilen nach Herstellerangaben durchgeführt und in den distalen Anteilen wurden durch Speichelkontamination Randspaltbildungen zwischen der Zahnhartsubstanz und dem Fissurenversiegeler provoziert. Bei der Studie wurde eine monobakterielle Inokulation mit *S. mutans* (ATCC 25175) durchgeführt, wodurch sie sich von der vorliegenden Studie unterscheidet. Die Versuchsdauer nach der Inokulation betrug 14 d und somit waren die Zähne 4 d länger den kariogenen Bedingungen in der artifiziellen Mundhöhle ausgesetzt als in der vorliegenden Arbeit. Auch lassen sich beim Versuchsprotokoll Unterschiede zur vorliegenden Studie feststellen; es wurde je im Wechsel für 5 min Trypticase Soja Bouillon (TSB) und für 15 min artifizieller Speichel tropfenweise zugeführt. Eine 10 %-ige Saccharoselösung wurde einmal pro Stunde statt TSB zugegeben. Sowohl bei der beschriebenen artifiziellen Mundhöhle als auch bei dem Kariesmodell erfolgten die Flüssigkeitsbewegungen über peristaltische Pumpen, die computergesteuert waren. Somit handelt es sich bei den beiden artifiziellen Mundhöhlen um automatisierte Modellversionen. Angaben zu pH-Wertmessungen während der Versuche finden sich nicht. Die Auswertung erfolgte anhand konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Es ließen sich an sämtlichen Zähnen der Testgruppen primärkariöse Außenläsionen und Kavitätenwandläsionen feststellen. Im Bereich der *lege artis* versiegelten Fissuren zeigten sich mittlere Demineralisationstiefen der primären Schmelzläsionen von $263 \pm 76 \mu\text{m}$ und Kavitätenwandläsionen von $130 \pm 71 \mu\text{m}$. Bei den mit Speichel kontaminierten Zähnen lagen diese Werte bei $285 \pm 48 \mu\text{m}$ (primäre Schmelzkaries) und $483 \pm 258 \mu\text{m}$ (Kavitätenwandläsion) [123].

Die von *Krämer et al.* (2015) veröffentlichte Studie untersuchte in dem Kariesmodell, das auch die Grundlage der vorliegenden Arbeit bildete, antikariogene Eigenschaften von verschiedenen Konzentrationen an Mikrosilberpartikelzusätzen (0 Gew.-%, 0,1 Gew.-%, 0,5 Gew.-%) zu unterschiedlichen Adhäsiven (Scotchbond 1 XT, Syntac, Futurabond). Die Kavitäten wurden mit dem Komposit Filtek Z250 restauriert. Die Inokulation erfolgte mit *S. mutans* (DSM Nr.: 20523) und nach einer zehntägigen Versuchsdauer wurde die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Demineralisationstiefen vorgenommen. Da die Auswertungskriterien mit der vorliegenden Studie übereinstimmen, lassen sich die Ergebnisse der Gruppen, welche mit Adhäsiven ohne Mikrosilberpartikelzusatz und Komposit versorgt wurden, mit den Kompositgruppen der

aktuellen Studie vergleichen. Die Gesamtdemineralisationstiefen der Gruppen ohne Mikrosilberpartikelzusatz (0 Gew.-%) im Schmelz am Füllungsrand lagen zwischen $64 \pm 11 \mu\text{m}$ (Scotchbond 1 XT, Futurabond) und $69 \pm 14 \mu\text{m}$ (Syntac) sowie in 500 μm Entfernung vom Füllungsrand zwischen $55 \pm 10 \mu\text{m}$ (Futurabond) und $59 \pm 9 \mu\text{m}$ (Syntac). Im Dentin am Füllungsrand wurden Gesamtdemineralisationswerte zwischen $138 \pm 17 \mu\text{m}$ (Scotchbond 1 XT) und $141 \pm 20 \mu\text{m}$ (Syntac) gemessen; in 500 μm Entfernung vom Füllungsrand lagen diese Werte zwischen $123 \pm 22 \mu\text{m}$ (Futurabond) und $126 \pm 27 \mu\text{m}$ (Syntac) [72]. Somit sind die gemessenen Werte im Schmelz am Füllungsrand vergleichbar mit den Werten der Kompositgruppen 3 und 4 dieser Studie ($67 \pm 19 \mu\text{m}$ bzw. $65 \pm 23 \mu\text{m}$). Die Gesamtdemineralisation im Schmelz in 500 μm Entfernung vom Füllungsrand ist in dieser Studie mit $61 \pm 17 \mu\text{m}$ (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT) und $64 \pm 17 \mu\text{m}$ (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH) geringfügig größer. Auf der Zement- / Dentinseite finden sich bei den Gesamtdemineralisationstiefen im Füllungsrandbereich mit $165 \pm 31 \mu\text{m}$ (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT) und $161 \pm 27 \mu\text{m}$ (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH) sowie in 500 μm Entfernung vom Füllungsrand mit $176 \pm 35 \mu\text{m}$ (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT) und $166 \pm 33 \mu\text{m}$ (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH) höhere Messwerte. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass sich die Herkunftsorte der Versuchszähne unterschieden und somit mögliche Variationen in deren strukturellen Zusammensetzung und Fluoridexposition nicht auszuschließen waren. Eventuell vorliegende strukturelle Unterschiede machen sich möglicherweise aufgrund der höheren Säureempfindlichkeit des Wurzelzementes / Wurzel dentins (kritischer pH-Wert 6,2 – 6,7) vor allem an den Messstellen auf der Zement / Dentinseite bemerkbar [53]. Der mittlere pH-Wert nach Etablierung von *L. casei* lag mit 4,17 (4,05 – 4,3) in einem vergleichbaren Bereich wie der von *Krämer et al.* gemessene Wert von 4,2 (4,0 – 4,5) bei monobakterieller Inokulation mit *S. mutans* [72]. Allerdings wurde in der vorliegenden Studie die zweifache Menge an Bakterienlösung zur Inokulation, nämlich 1 ml der *S. mutans*-Verdünnung und ein 1 ml der *L. casei*-Verdünnung, statt nur 1 ml der *S. mutans*-Verdünnung verwendet. Für zukünftige Untersuchungen wäre es vorstellbar zu testen, ob eine Änderung der zur Inokulation verwendeten Volumina im Sinne einer Adaptation des Gesamtvolumens an vorherige Studien in dem Kariesmodell möglich ist. So könnte ein Versuch unternommen werden, in dem je 0,5 ml der *S. mutans*- und der *L. casei*-Verdünnung zur Inokulation verwendet werden, sodass das verwendete Gesamtvolumen auch 1 ml beträgt.

6.3 Diskussion der Nullhypothesen

6.3.1 Nullhypothese 1

Eine Weiterentwicklung des vorhandenen *S. mutans*-basierten Kariesmodells durch Etablierung von *L. casei* ist nicht möglich.

Diese Nullhypothese kann widerlegt werden. Bei der Anwendung des Protokolls zur Anzüchtung von *S. mutans* und *L. casei* und Beimpfung des Kariesmodells (s. Tabelle 6, S. 44) mit je 1 ml der Verdünnung von *S. mutans* (1:20) und *L. casei* (1:10) konnte ein gemeinsames Überleben beider Bakterienspezies in dem Kariesmodell für eine Versuchsdauer von 10 d nachgewiesen werden (s. Tabelle 7, S. 56). Makroskopisch ließ sich bei der Entnahme der Zahnproben aus der Reaktionskammer nach dem Versuchsende einheitlich auf den Zahnprobenoberflächen ein weißlich – gelblicher Plaquebelag feststellen. Ein Plaquebelag auf der Zahnprobenoberfläche reicht als Beweis für den Erfolg der Etablierung von *L. casei* jedoch nicht aus, da dieser Belag nur monobakteriell aus *S. mutans* und extrazellulärer Matrix bestehen könnte. Gleiches gilt für die kolorimetrische Darstellung des Biofilms auf den Zahnprobenoberflächen nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d (LIVE/DEAD® *BacLight*™, Molecular Probes Europe BV). Die Anfärbung zeigte, dass der Plaquebelag überwiegend aus vitalen, intakten Mikroorganismen (grün fluoreszierend) bestand, ermöglichte jedoch keine morphologische Differenzierung zwischen *S. mutans* und *L. casei* zur Bestimmung der Anteile der jeweiligen Bakterienspezies am Biofilm (s. Abbildung 10 und Abbildung 11, S. 57). Durch die Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten zum Zeitpunkt der Inokulation und nach dem Versuchsende zeigte sich, dass sich die Anzahl der koloniebildenden Einheiten beider Bakterienspezies während der Versuchsdauer von 10 d um das Zehnfache erhöhte (s. Tabelle 7, S. 56). Unerwünschte Kontaminationen mit Fremdkeimen waren nicht feststellbar, was als eine zusätzliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Versuchsdurchführung gewertet wurde. Das Ergebnis der Bestimmung der koloniebildenden Einheiten an *S. mutans* und *L. casei* in Kombination mit dem makroskopisch sichtbaren Plaquebelag, dem Nachweis darüber, dass der Plaquebelag überwiegend aus vitalen Mikroorganismen nach dem Versuchsende bestand und dem fehlenden Auftreten unerwünschter Kontaminationen wurden als Kriterien für eine erfolgreiche Etablierung von *L. casei* in dem *S. mutans*-basierten Kariesmodell und somit Weiterentwicklung des Kariesmodells gewertet.

6.3.2 Nullhypothese 2

Es ist nicht möglich, nach Weiterentwicklung des Kariesmodells durch Etablierung von *L. casei* artifizielle sekundärkariöse Läsionen im Füllungsrandbereich zu erzeugen.

Die Ergebnisse der Hauptversuche zeigten, dass die Nullhypothese 2 widerlegt werden kann. Nach vorsichtiger Entfernung der Plaquebeläge wiesen die Zahnprobenoberflächen weiß-opake, rau und matt erscheinende Zahnoberflächen auf, die auch bei Betrachtung der gesägten Zahnprobenhälften mit dem Auflichtmakroskop (AZ 100 M, Nikon) sichtbar wurden (s. Abbildung 12, S. 57). Sowohl das matte als auch das weiß-opake Erscheinungsbild des Zahnschmelzes gelten als klinische Befunde einer aktiven Schmelzkaries [64]. Das Auftreten einer kariösen Läsion unmittelbar angrenzend an eine vorhandene Restauration wird *per definitionem* als „Sekundärkaries“ bezeichnet [53]. Die makroskopische Betrachtung der Zahnproben ließ darauf schließen, dass auch nach der Weiterentwicklung des *S. mutans*-basierten Kariesmodells durch Etablierung von *L. casei* nach einer Versuchsdauer von 10 d artifizielle sekundärkariöse Läsionen in dem Kariesmodell erzeugbar waren. Die anschließende fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte, unabhängig vom verwendeten Restaurationsmaterial (konventioneller Glasionomerzement, kunststoffmodifizierter Glasionomerzement, Komposit, DBA mit und ohne Anwendung der Etch-and-rinse-Technik), sowohl auf der Schmelzseite als auch auf der Zement- / Dentinseite Demineralisationen im Füllungsrandbereich und in 500 µm Entfernung davon (s. Abbildung 15 – Abbildung 19, S. 62 – 65). Diese waren vergleichbar mit den Ergebnissen früherer Studien in dem Kariesmodell bei monobakterieller Inokulation mit *S. mutans* [72,122]. Die erfolgreiche Erzeugung artifizieller sekundärkariöser Läsionen in dem weiterentwickelten Kariesmodell bei mikrobiologischer Belastung der Zahnproben für 10 d war folglich klinisch wie auch fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar.

6.3.3 Nullhypothese 3

Es lassen sich keine Unterschiede in den kariesinhibitorischen Eigenschaften bezüglich der Demineralisationstiefen, der Substanzverluste infolge der Demineralisation, der Gesamtdemineralisationen und der Randspaltbreiten zwischen den einzelnen Restaurationsmaterialien (konventioneller Glasionomerzement, kunststoffmodifizierter Glasionomerzement sowie Komposit, Dentinbondingagent (DBA) mit und ohne Anwendung der Etch-and-rinse-Technik) feststellen.

Die Messwerte (Demineralisation, Substanzverlust durch Demineralisation und Gesamtdemineralisation) der Glasionomerzemente (Photac™ Fil Quick Aplicap™ und Ketac™ Molar Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) auf der Schmelzseite und

auf der Zement- / Dentinseite am Füllungsrand und in 500 µm Entfernung davon zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede untereinander (Mann-Whitney-Test und ANOVA, mod. LSD, $p > 0,05$). Gleiches galt für den Vergleich der Messwerte der Gruppen 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT) und 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH) miteinander (Mann-Whitney-Test und ANOVA, mod. LSD, $p > 0,05$). Somit lässt sich sowohl durch den Vergleich der Messwerte der Glasionomerzementgruppen miteinander als auch durch den Vergleich der beiden Kompositgruppen die Nullhypothese 3 nicht widerlegen.

Es ließen sich allerdings statistisch signifikante Unterschiede bei dem Vergleich der anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen gemessenen Werte für die Demineralisation, den Substanzverlust durch Demineralisation und die Gesamtdemineralisation zwischen den mit Glasionomerzementen (Gruppen 1 und 2) und den mit Komposit (Gruppen 3 und 4) restaurierten Gruppen feststellen (Mann-Whitney-Test und ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$, s. Tabelle 8 und Tabelle 9, S. 58 – 59).

Bei dem kunststoffmodifizierten Glasionomerzement (Photac™ Fil Quick Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) wurden statistisch signifikant geringere Demineralisationstiefen als bei der Gruppe 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT) auf der Schmelzseite im Füllungsrandbereich gemessen (ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$). Der Substanzverlust von Photac™ Fil Quick Aplicap™ (3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) erwies sich auf der Zement- / Dentinseite am Füllungsrand und in 500 µm Entfernung als signifikant geringer als bei den Kompositgruppen 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT) und 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH; ANOVA; mod. LSD, $p < 0,05$). Auch bei den Gesamtdemineralisationstiefen des kunststoffmodifizierten Glasionomerzementes (Photac™ Fil Quick Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) waren signifikante Unterschiede zu den Kompositgruppen 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT) und 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH) an folgenden Messpunkten feststellbar: auf der Schmelzseite sowie der Zement- / Dentinseite am Füllungsrand und auf der Zement- / Dentinseite in 500 µm Entfernung vom Füllungsrand (ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$).

Der konventionelle Glasionomerzement (Ketac™ Molar Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) zeigte signifikante Unterschiede in Form geringerer Substanzverluste durch Demineralisation auf der Schmelzseite in 500 µm Entfernung vom Füllungsrand zu Gruppe 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH;

Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$) sowie auf der Zement- / Dentinseite zu den Kompositgruppen 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT) und 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH) am Füllungsrand und in 500 µm Entfernung davon (ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$). Die Gesamtdemineralisationstiefen der Gruppe 2 (Ketac™ Molar Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) erwiesen sich im Schmelz am Füllungsrand als signifikant geringer im Vergleich zu der Kompositgruppe 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT; ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$). Auf der Zement- / Dentinseite waren die Gesamtdemineralisationen im Füllungsrandbereich signifikant geringer als bei den Kompositgruppen 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT) und 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH), in 500 µm Entfernung vom Füllungsrand war dies noch im Vergleich zu Gruppe 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT; ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$) der Fall.

Ein möglicher Grund für das unterschiedliche Ausmaß an Demineralisationen der Zahnhartsubstanzen in Abhängigkeit von dem gewählten Restaurationsmaterial kann bedingt durch deren unterschiedliche Fluoridfreisetzungsscharakteristika sein. Fluoridhaltige Restaurationsmaterialien sind in Abhängigkeit von ihren werkstoffkundlichen Eigenschaften (Füllkörper, Matrix, Fluoridgehalt *etc.*) in unterschiedlichem Ausmaß zur Fluoridfreisetzung und –wiederaufnahme fähig [151]. Allgemein wird den Fluoriden eine antikariogene Wirksamkeit zugeschrieben [151]. *Xu* und *Burgess* (2003) beschrieben bei den konventionellen Glasionomerzementen und kunststoffmodifizierten Glasionomerzementen eine initial hohe Fluoridfreisetzung von $\geq 40 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ („burst effect“), welche nach drei Tagen rapide abnimmt und danach über lange Zeit konstant bleibt [156]. Die mittlere kumulative Fluoridfreisetzung (SD) innerhalb von 21 d wird in der Literatur für Ketac Molar mit $132 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ ($75 \mu\text{g} / \text{cm}^2$) und für Photac Fil mit $374 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ ($6,6 \mu\text{g} / \text{cm}^2$) beschrieben [156]. Da die Zahnproben in der vorliegenden Studie vor der mikrobiologischen Belastung in dem Kariesmodell einer Inkubationsdauer von vier Wochen und danach einer thermozyklischen Belastung von 10 000 Zyklen ausgesetzt wurden, ist davon auszugehen, dass die Fluoridfreisetzung der Glasionomerzemente während der mikrobiologischen Belastung in dem Kariesmodell auf einem konstanten Niveau lag. Die geringeren Demineralisationstiefen, Substanzverluste durch Demineralisation und Gesamtdemineralisationstiefen der Glasionomerzementgruppen im Vergleich zu den Kompositgruppen lassen sich zum einen so interpretieren, dass die Fluoridfreisetzung der Glasionomerzemente antikariogene Effekte zeigte. Während diese antikariogene Wirksamkeit der fluoridfreisetzenden Restaurations-

materialien in weiteren *In-vitro*-Studien nachweisbar ist, liefern *in vivo* erhobene Daten mitunter widersprüchliche Ergebnisse [151]. Auf der anderen Seite sind die mechanischen Eigenschaften der Glasionomerzemente und der kunststoffmodifizierten Glasionomerzemente, unter anderem aufgrund der löslicheren und schwächeren Kalzium-Aluminium-Fluorosilikat-Füllkörper, im Vergleich zu den Kompositen reduziert [156] und sie neigen zu Erosionen bei niedrigen pH-Werten [148]. Während der Demineralisationsphasen in dem Kariesmodell waren die Zahnproben sauren pH-Werten von 4,17 (4,05 – 4,3) ausgesetzt, weshalb erosiv bedingte Auflösungen des Restaurationsmaterials in den Glasionomerzementgruppen nicht auszuschließen sind. Dies wird auch durch die Ergebnisse der quantitativen Randspaltanalyse bestätigt, da infolge der mikrobiologischen Belastung im Kariesmodell für 10 d bei den Glasionomerzementgruppen (Photac™ Fil Quick Aplicap™ und Ketac™ Molar Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) eine signifikante Zunahme negativer Stufen zwischen dem Restaurationsmaterial und der angrenzenden Zahnhartsubstanz feststellbar war (Friedman-Test, $p < 0,05$; s. Tabelle 12, S. 66). Da die Restaurationsoberfläche als Referenzpunkt für die Messungen des Substanzverlustes verwendet wurde, konnte das mögliche Auftreten von Erosionen die Bestimmung des Substanzverlustes beeinflussen. Für zukünftige Studien empfiehlt sich deshalb zur Bestimmung des Substanzverlustes die Wahl eines anderen Referenzpunktes (z. B. Insertion eines säurefesten Stiftes) oder alternativ die Nichtberücksichtigung des Substanzverlustes bei der Datenauswertung.

Bei dem Vergleich der Gesamtdemineralisationstiefen der einzelnen Restaurationsmaterialgruppen in Abhängigkeit vom Messpunkt ließ sich feststellen, dass bei den vier Gruppen die Gesamtdemineralisationen auf der Schmelzseite am Füllungsrand und in 500 µm Entfernung davon signifikant geringer waren als an den äquivalenten Messpunkten auf der Zement- / Dentinseite (T-Test, $p < 0,05$; s. Tabelle 10 und Tabelle 11, S. 63 – 64). Diese Feststellung lässt sich durch die unterschiedliche Säurelöslichkeit der einzelnen Zahnhartgewebe erklären. Aufgrund des höheren kritischen pH-Wertes des Wurzelzementes / -dentins mit 6,2 – 6,7 [53] im Vergleich zum Zahnschmelz mit 5,0 – 5,5 [11,80] setzten die säurebedingten Demineralisationsvorgänge bei jenen Zahnhartgeweben bei höheren pH-Werten ein, wodurch sich die signifikant höheren Gesamtdemineralisationstiefen auf der Zement- / Dentinseite gegenüber der Schmelzseite erklären lassen.

Zwischen den Messpunkten am Füllungsrand und in 500 µm Entfernung davon zeigten sich bei den Glasionomerzementen (Photac™ Fil Quick Aplicap™ und Ketac™ Molar Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) sowohl auf der Schmelzseite als auch auf der Zement- / Dentinseite signifikant geringere Gesamtdemineralisationen am Fül-

lungsrands als in 500 µm von dem Füllungsrand (T-Test, $p < 0,05$). Bei den Kompositgruppen 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT) und 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH) hingegen ließen sich weder auf der Schmelzseite noch auf der Zement- / Dentinseite signifikante Unterschiede in den Gesamtdemineralisationstiefen am Füllungsrand und in 500 µm Entfernung davon feststellen (T-Test, $p > 0,05$). Die Tatsache, dass bei den Glasionomerzementgruppen signifikant geringere Gesamtdemineralisationstiefen am Füllungsrand als in 500 µm Entfernung vom Füllungsrand feststellbar waren, lässt möglicherweise darauf schließen, dass sich eine antikariogene Wirksamkeit durch Fluoridfreisetzung unmittelbar angrenzend an die Restauration bemerkbar machte. Im Gegensatz dazu zeigten die Kompositgruppen (keine Fluoridfreisetzung) auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gesamtdemineralisationstiefen am Füllungsrand und in 500 µm Entfernung davon.

Folglich lässt sich die Nullhypothese 3 aufgrund der dargestellten Unterschiede in dem Ausmaß an Demineralisationen der Zahnhartsubstanzen zwischen den Hauptrestaurationmaterialgruppen „Glasionomerzement“ (Gruppe 1: Photac™ Fil Quick Aplicap™ / Gruppe 2: Ketac™ Molar Aplicap™; 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) und „Komposit“ (Gruppe 3: Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT / Gruppe 4: Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT; DENTSPLY DeTrey GmbH) widerlegen.

6.4 Schlussfolgerung

Die vorliegende Studie zeigte, dass eine Weiterentwicklung des vorhandenen *S. mutans*-basierten Kariesmodells durch Etablierung einer weiteren Bakterienspezies, in diesem Falle *L. casei*, möglich ist. Da neben *S. mutans* Laktobazillen aus sekundärkariösen Läsionen isolierbar sind [63,66,99], erschien die Wahl dieser Bakterienspezies zur Weiterentwicklung des Kariesmodells sinnvoll. Durch die Verwendung von definierten Volumina der Bakterienlösungen zur Inokulation des Kariesmodells ließ sich eine Reproduzierbarkeit der mikrobiellen Zusammensetzung zwischen den Hauptversuchen erzielen (s. Tabelle 7, S. 56). Dies resultierte darüber hinaus in reproduzierbaren pH-Wertkurven mit konstanten pH-Werten während der Demineralisationsphasen und Remineralisationsphasen (s. Abbildung 25, S. 77). Die erzeugten artifiziellen sekundärkariösen Läsionen waren strukturell vergleichbar mit vorangegangenen Studien in dem Kariesmodell bei monobakterieller Inokulation mit *S. mutans* [72,122]. Auch bei der Inokulation des vorhandenen Kariesmodells mit *S. mutans* ließen sich artifizielle kariöse Läsionen im Füllungsrandbereich erzeugen [72,117,122]. Allerdings stellt die Verwendung einer Monokultur zur Simulation der oralen Mikrobiota eine Vereinfachung

der realen Situation dar. Zur Erhöhung der Komplexität des Biofilms und der realitätsnäheren Gestaltung der mikrobiologischen Komponente des Kariesmodells erscheint es sinnvoll, zukünftig weitere Bakterienspezies darin zu etablieren. Zu berücksichtigen ist dabei jedoch, dass die Versuche durch die Etablierung weiterer Bakterienspezies in dem Kariesmodell arbeitsintensiver, teurer und störanfälliger werden.

Des Weiteren sollte in der Studie untersucht werden, ob sich Unterschiede zwischen den verwendeten Restaurationsmaterialien in den Demineralisationstiefen, den Substanzverlusten durch Demineralisation und den Gesamtdemineralisationstiefen nach der mikrobiologischen Belastung in dem Kariesmodell für 10 d feststellen lassen. Bei der Auswertung, welche sich an den Auswertungskriterien vorangegangener Studien in dem Kariesmodell orientierte [72,122], stellte sich heraus, dass sich die Restaurationsoberfläche als Referenzpunkt zur Ermittlung des Substanzverlustes nur bedingt eignete. Im Sinne der Weiterentwicklung der Auswertungskriterien wäre es sinnvoll, eine neue Auswertungssystematik für diesen Messparameter durch Wahl eines geeigneteren Referenzpunktes zu entwickeln. Die Ergebnisse zeigten geringere Demineralisationen des konventionellen Glasionomerzementes (Ketac™ Molar Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) und des kunststoffmodifizierten Glasionomerzementes (Photac™ Fil Quick Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE) im Vergleich zu den Kompositgruppen (Gruppe 3: Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT / Gruppe 4: Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT; DENTSPLY DeTrey GmbH). Dies lässt sich möglicherweise auf die antikariogenen Eigenschaften der Glasionomerzemente durch Fluoridfreisetzung zurückführen, welche auch in anderen *In-vitro*-Studien beschrieben werden [119,151], wenngleich diese Eigenschaften in klinischen Untersuchungen mitunter nicht nachweisbar sind [96,116,151].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich auch das weiterentwickelte Kariesmodell zur Erzeugung artifizieller sekundärkariöser Läsionen und somit zur Grundlagenforschung zum Thema „Sekundärkaries“ *in vitro* eignet. Die aus den Versuchen gewonnenen Erkenntnisse können dann als Orientierung für die Planung weiterer unverzichtbarer *In-situ*- und *In-vivo*-Studien dienen.

7 Zusammenfassung

7.1 Zusammenfassung

Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Weiterentwicklung eines vorhandenen *S. mutans*-basierten Kariesmodells durch Etablierung einer weiteren Bakterienart, nämlich *L. casei*. Des Weiteren sollten nach erfolgreicher Weiterentwicklung des Kariesmodells die Auswirkungen der Demineralisationen und Remineralisationen auf die Zahnhartgewebe im Füllungsrandbereich untersucht werden.

Material und Methode

Im Rahmen der Vorversuche wurde *L. casei* (DSM Nr.: 20021) im Kariesmodell etabliert. Danach wurden an 60 kariesfreien, extrahierten oder operativ entfernten dritten Molaren standardisierte Klasse-V-Kavitäten präpariert und mit einem der folgenden Restaurationsmaterialien nach Herstellerangaben versorgt: ein kunststoffmodifiziertes Glasionomerzement (PF; Photac™ Fil Quick Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE), ein konventionelles Glasionomerzement (KM; Ketac™ Molar Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE), ein adhäsiv befestigtes Komposit mit (C + SÄT; Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT) und ohne Anwendung der Etch-and-rinse-Technik (C; Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH). Nach der Ausarbeitung wurden die Zahnproben für 28 d bei 37 °C in *Aqua dest.* inkubiert und dann einer thermozyklischen Belastung von 10 000 Zyklen bei + 5 °C und + 55 °C unterzogen. Es erfolgte danach die mikrobiologische Belastung im automatisierten Kariesmodell für 10 d (Summe von 4 h Demineralisation / d) bei kontinuierlicher pH-Wertaufzeichnung. Dabei wurden die Demineralisationen aufgrund der azidogenen Eigenschaften von *S. mutans* (DSM Nr.: 20523) und *L. casei* (DSM Nr.: 20021) durch Metabolisierung niedermolekularer Kohlenhydrate und die Remineralisationen durch Einwirkung von artifiziellem Speichel bewirkt. Exemplarisch wurde danach der Biofilm auf der Zahnprobenoberfläche mithilfe von LIVE/DEAD® BacLight™ (Molecular Probes Europe BV) angefärbt. Vor der fluoreszenzmikroskopischen Analyse (AZ 100 M, Nikon) wurden die Zahnproben durch einen in der Längsachse durch die Restaurationsmitte verlaufenden Sägeschnitt halbiert. Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden die Demineralisationstiefen, die Substanzverluste durch Demineralisation und die Gesamtdemineralisationstiefen jeweils auf der Schmelzseite und auf der Zement- / Dentinseite im Füllungsrandbe-

reich und in 500 µm Entfernung vom Füllungsrand bestimmt. Bei Vorliegen eines Randspaltes im Füllungsrandbereich wurde die Breite dessen vermessen. Sowohl nach der thermozyklischen Belastung als auch nach der mikrobiologischen Belastung im Kariesmodell wurden Replikas auf Polyurethanbasis erstellt, mit denen anhand von REM-Aufnahmen (Amray Modell Turbo 1610, Amray Inc.) eine quantitative Randspaltanalyse durchgeführt wurde. Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung der SPSS Version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Ergebnisse

Folgende Gesamtdemineralisationstiefen ließen sich nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d (4 h Demineralisation / d) im Schmelz am Füllungsrand (A), im Schmelz in 500 µm Entfernung vom Füllungsrand (B), im Zement / Dentin am Füllungsrand (C) sowie im Zement / Dentin in 500 µm Entfernung vom Füllungsrand (D) ermitteln (in µm [SD]; ^x definiert signifikante Unterschiede (ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$): PF: A 42 [15]^A, B 60 [17]^a, C 83 [18]^l; D 127 [16]^α; KM: A 46 [22]^{A,C}, B 62 [17]^a, C 104 [21]^l, D 143 [28]^{α,γ}; C + SÄT: A 67 [19]^B, B 61 [17]^a, C 165 [31]^{ll}, D 176 [35]^β; C: A 65 [23]^{B,C}, B 64 [17]^a, C 161 [27]^{ll}, D 166 [33]^{β,γ}. Die Gesamtdemineralisationen der vier Gruppen waren auf der Schmelzseite signifikant geringer als am korrespondierenden Messpunkt auf der Zement- / Dentinseite (T-Test, $p < 0,05$). Während die Glasionomerzemente auf der Schmelzseite und auf der Zement- / Dentinseite im Füllungsrandbereich signifikant geringere Gesamtdemineralisationen als in 500 µm Entfernung vom Füllungsrand aufwiesen (T-Test, $p < 0,05$), zeigten die Kompositgruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messpunkten (T-Test, $p < 0,05$). Insbesondere auf der Zement- / Dentinseite im Füllungsrandbereich zeigten die Glasionomerzemente signifikant geringere Gesamtdemineralisationstiefen als die Kompositgruppen (ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$). Die quantitative Randspaltanalyse zeigte bei den vier Gruppen signifikante Verschlechterungen der Füllungsrandqualität infolge der mikrobiologischen Belastung (Friedman-Test, $p < 0,05$).

Schlussfolgerungen

Das Fazit der Studie ist, dass die Weiterentwicklung des *S. mutans*-basierten Kariesmodells durch Etablierung von *L. casei* erfolgreich war. Auch in dem weiterentwickelten Kariesmodell ließen sich artifizielle sekundärkariöse Läsionen erzeugen. Die geringeren Demineralisationen der Glasionomerzementgruppen im Vergleich zu den Kompositgruppen angrenzend an die Restaurationen nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d sind möglicherweise auf antikariogene Eigenschaften der Glasionomerzemente durch Fluoridfreisetzung zurückzuführen.

7.2 Summary

Objectives

The present study aimed to extend an existing *S. mutans*-based artificial mouth model by establishing a second bacterial species in it, called *L. casei* (DSM No.: 20021). Following the successful establishment of *L. casei* in the artificial mouth model, the effects of demineralization and remineralization on secondary caries formation were examined.

Materials and methods

During preliminary testing *L. casei* was established in the artificial mouth model. Afterwards, standardized class-V-cavities were prepared on 60 sound, extracted human third molars and restored with one of the following restorative materials as specified by the manufacturer: One resin-modified glass ionomer cement (PF; Photac™ Fil Quick Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE), one conventional glass ionomer cement (KM; Ketac™ Molar Aplicap™, 3M Deutschland GmbH, 3M ESPE), one resin composite with (C + SÄT; Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH, SÄT) and without (C; Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, DENTSPLY DeTrey GmbH) application of etch-and-rinse technique. The specimens were stored for 4 weeks at 37 °C in *Aqua dest.* and then exposed to 10 000 thermocycles (+ 5 °C and + 55 °C). Microbiological loading in the completely automated artificial mouth model was carried out for 10 d with 4 h demineralization / d and ongoing pH-recording. Demineralization was caused by *S. mutans* (DSM No.: 20523) and *L. casei* (DSM No.: 20021) through acid production during glycolysis and remineralization through exposure to artificial saliva. The biofilm on the surface of the specimens after microbiological loading was exemplarily dyed using LIVE/DEAD® BacLight™ (Molecular Probes Europe BV). Before fluorescence analysis the specimens were cut in halves in the longitudinal axis across the center of the restoration. During analysis under the fluorescence microscope (AZ 100 M, Nikon) the following parameters were measured: Demineralization depth, substance loss and overall demineralization depth in enamel and in cementum / dentin, all at restoration margins and in a distance of 500 µm. If gap formations were detectable, the gap width was also measured. Furthermore, two sets of epoxy replicas were manufactured, one after thermocycling and one after microbiological load in order to assess gap formations at restoration margins during analysis under a SEM (Amray Modell Turbo 1610, Amray Inc.) at 200 x magnification. The statistical analysis was done by using SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

The following overall demineralization depths after microbiological loading for 10 d in the artificial mouth model (4 h demineralization / d) were measured in enamel at restoration margin (A) and in 500 µm distance (B) as well as in cementum / dentin at restoration margin (C) and in 500 µm distance (D) (in µm [SD], ^x defines significant differences (ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$): PF: A 42 [15]^A, B 60 [17]^a, C 83 [18][!], D 127 [16]^a; KM: A 46 [22]^{A,C}, B 62 [17]^a, C 104 [21][!], D 143 [28]^{a,y}; C + SÄT: A 67 [19]^B, B 61 [17]^a, C 165 [31][!], D 176 [35]^B; C: A 65 [23]^{B,C}, B 64 [17]^a, C 161 [27][!], D 166 [33]^{B,y}. All in all, the overall demineralization depths of the four groups were significantly smaller in enamel than at the corresponding measuring point in cementum / dentin (T-Test, $p < 0,05$). The glass ionomer cements showed significantly deeper overall demineralization in 500 µm distance from restoration margins than at restoration margins both in enamel and in cementum / dentin (T-Test, $p < 0,05$). This could not be detected for the resin composite groups. Especially in cementum / dentin at restoration margins, the overall demineralization was significantly smaller for the glass ionomer cement groups compared to the resin composite groups (ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$). The quantitative margin analysis of the replicas showed significant decreases of the marginal quality in all groups after microbiological loading.

Conclusions

In conclusion, the extension of the *S. mutans*-based artificial mouth model through the establishment of *L. casei* was successful and artificial secondary caries like lesions were producible. The lower demineralization at restoration margins of the glass ionomer cement groups in comparison to the resin composite groups after microbiological loading in the artificial mouth model for 10 d might be due to anticariogenic properties of glass ionomer cements by releasing fluorides.

8 Literaturverzeichnis

1. Aas J, Paster B, Stokes L, Olsen I, Dewhirst F: Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005;43:5721-5732. DOI 10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005
2. Aboush YE, Torabzadeh H, Lee AR: One-year fluoride release from fluoride-containing restorative materials. *J Dent Res* 1995;74:Abstract No. 478
3. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ et al.: Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 2002;40:1001-1009. DOI 10.1128/JCM.40.3.1001-1009.2002
4. Bibby BG, Huang CT, Zero D, Mundorff SA, Little MF: Protective effect of milk against in vitro caries. *J Dent Res* 1980;59:1565-1570. DOI 10.1177/00220345800590100201
5. Black GV: Konservierende Zahnheilkunde. Die Pathologie der harten Zahngewebe. Hermann Meuser, Berlin 1914, 240-254
6. Blunck U: Rasterelektronenmikroskopische Beurteilung von Kompositfüllungsrandern im Dentin in vitro. *Dtsch Zahnärztl Z* 1988;43:939-943
7. Borczyk D, Piatowska D, Krzemiński Z: An in vitro study of affected dentin as a risk factor for the development of secondary caries. *Caries Res* 2006;40:47-51. DOI 10.1159/000088906
8. Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R: LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods* 1999;37:77-86. DOI 10.1016/S0167-7012(99)00048-2
9. Bowen WH: Rodent model in caries research. *Odontol* 2013;101:9-14. DOI 10.1007/s10266-012-0091-0
10. Bradshaw DJ, Homer KA, Marsh PD, Beighton D: Metabolic cooperation in oral microbial communities during growth on mucin. *Microbiology* 1994;140:3407-3412. DOI 10.1099/13500872-140-12-3407
11. Bradshaw DJ, Lynch RJ: Diet and the microbial aetiology of dental caries: new paradigms. *Int Dent J* 2013;63 Suppl 2:64-72. DOI 10.1111/idj.12082
12. Bradshaw DJ, Marsh PD: Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro. *Caries Res* 1998;32:456-462

13. Bradshaw DJ, McKee AS, Marsh PD: Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communities in vitro. *J Dent Res* 1989;68:1298-1302. DOI 10.1177/00220345890680090101
14. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R: Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 2005;13:20-26. DOI 10.1016/j.tim.2004.11.006
15. Brouwer F, Askar H, Paris S, Schwendicke F: Detecting secondary caries lesions: a systematic review and meta-analysis. *J Dent Res* 2016;95:143-151. DOI 10.1177/0022034515611041
16. Brown WS, Jacobs HR, Thompson RE: Thermal fatigue in teeth. *J Dent Res* 1972;51:461-467. DOI 10.1177/00220345720510023601
17. Burne RA: Oral Streptococci... products of their environment. *J Dent Res* 1998;77:445-452. DOI 10.1177/00220345980770030301
18. Busscher HJ, Norde W, van der Mei HC: Specific molecular recognition and nonspecific contributions to bacterial interaction forces. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:2559-2564. DOI 10.1128/AEM.02839-07
19. Carvalho RM, Pereira JC, Yoshiyama M, Pashley DH: A review of polymerization contraction: the influence of stress development versus stress relief. *Oper Dent* 1996;21:17-24
20. Cate JM ten, Buijs MJ, Damen JJ: pH-cycling of enamel and dentin lesions in the presence of low concentrations of fluoride. *Eur J Oral Sci* 1995;103:362-367
21. Cate JM ten, Duijsters PP: Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res* 1982;16:201-210
22. Chalmers NI, Palmer RJ, Cisar JO, Kolenbrander PE: Characterization of a *Streptococcus* sp.-*Veillonella* sp. community micromanipulated from dental plaque. *J Bacteriol* 2008;190:8145-8154. DOI 10.1128/JB.00983-08
23. Chhour K, Nadkarni MA, Byun R, Martin FE, Jacques NA, Hunter N: Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *J Clin Microbiol* 2005;43:843-849. DOI 10.1128/JCM.43.2.843-849.2005
24. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM: Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:711-745. DOI 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431
25. Crim GA, Garcia-Godoy F: Microleakage: the effect of storage and cycling duration. *J Prosthet Dent* 1987;57:574-576. DOI 10.1016/0022-3913(87)90339-8

26. Crim GA, Swartz ML, Phillips RW: Comparison of four thermocycling techniques. *J Prosthet Dent* 1985;53:50-53. DOI 10.1016/0022-3913(85)90064-2
27. Damato FA, Strang R, Stephen KW: Comparison of solution- and gel-prepared enamel lesions-an in vitro pH-cycling study. *J Dent Res* 1988;67:1122-1125. DOI 10.1177/00220345880670081201
28. DeLong R, Douglas WH: Development of an artificial oral environment for the testing of dental restoratives: bi-axial force and movement control. *J Dent Res* 1983;62:32-36. DOI 10.1177/00220345830620010801
29. Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH et al.: Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:2837-2848. DOI 10.1128/AEM.72.4.2837-2848.2006
30. Diercke K, Lussi A, Kersten T, Seemann R: Isolated development of inner (wall) caries like lesions in a bacterial-based in vitro model. *Clin Oral Investig* 2009;13:439-444. DOI 10.1007/s00784-009-0250-z
31. Dietschi D, Siebenthal G de, Neveu-Rosenstand L, Holz J: Influence of the restorative technique and new adhesives on the dentin marginal seal and adaptation of resin composite Class II restorations: an in vitro evaluation. *Quintessence Int* 1995;26:717-727
32. Dietz VH: In vitro production of plaques and caries. *J Dent Res* 1943;22:423-440. DOI 10.1177/00220345430220060101
33. Dige I, Nilsson H, Kilian M, Nyvad B: In situ identification of streptococci and other bacteria in initial dental biofilm by confocal laser scanning microscopy and fluorescence in situ hybridization. *Eur J Oral Sci* 2007;115:459-467. DOI 10.1111/j.1600-0722.2007.00494.x
34. Dige I, Raarup MK, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B: *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. *Microbiology* 2009;155:2116-2126. DOI 10.1099/mic.0.027706-0
35. Donoghue HD, Perrons CJ, Hudson DE: The role of H₂O₂ and the lactoperoxidase-SCN(-)-H₂O₂ system on the interaction between two bacteria originating from human dental plaque, *Streptococcus rattus* (mutans) BHT and *Streptococcus mitior* LPA-1, grown on human teeth in an artificial mouth. *Arch Oral Biol* 1985;30:519-523
36. Donoghue HD, Perrons CJ: Establishment of defined mixed bacterial plaques on teeth in a laboratory microcosm (model mouth). *Microb Ecol Health Dis* 1988;1:193-200

37. Edmunds DH, Whittaker DK, Green RM: Suitability of human, bovine, equine, and ovine tooth enamel for studies of artificial bacterial carious lesions. *Caries Res* 1988;22:327-336
38. Einwag J., Pieper K., Becker, Jürgen et al.: *Kinderzahnheilkunde*. Elsevier, Urban & Fischer, München, Jena 2008, 136-139
39. Featherstone JD, Mellberg JR: Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. *Caries Res* 1981;15:109-114
40. Fejerskov O, Scheie A, Manji F: The effect of sucrose on plaque pH in the primary and permanent dentition of caries-inactive and -active kenyan children. *J Dent Res* 1992;71:25-31. DOI 10.1177/00220345920710010401
41. Fontana M, Dunipace AJ, Gregory RL et al.: An in vitro microbial model for studying secondary caries formation. *Caries Res* 1996;30:112-118
42. Fontana M, González-Cabezas C, Wilson ME, Appert C: In vitro evaluation of a "smart" dental material for its efficacy in preventing secondary caries using a microbial artificial mouth model. *Am J Dent* 1999;12 Spec No:S8-9
43. Gale M, Darvell B: Thermal cycling procedures for laboratory testing of dental restorations. *J Dent* 1999;27:89-99. DOI 10.1016/S0300-5712(98)00037-2
44. Geddes DA: Acids produced by human dental plaque metabolism in situ. *Caries Res* 1975;9:98-109
45. Haller B, Hofmann N, Klaiber B, Bloching U: Effect of storage media on microleakage of five dentin bonding agents. *Dent Mater* 1993;9:191-197. DOI 10.1016/0109-5641(93)90119-B
46. Hals E, Andreassen BH, Bie T: Histopathology of natural caries around silver amalgam fillings. *Caries Res* 1974;8:343-358
47. Hals E, Nernaes A: Histopathology of in vitro caries developing around silver amalgam fillings. *Caries Res* 1971;5:58-77
48. Hals E, Simonsen LT: Histopathology of experimental in vivo caries around silver amalgam fillings. *Caries Res* 1972;6:16-33
49. Hamada S, Slade HD: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 1980;44:331-384
50. Hannig C, Hannig M: The oral cavity-a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig* 2009;13:123-139. DOI 10.1007/s00784-008-0243-3

51. Hansen EK, Asmussen E: Marginal adaptation of posterior resins: effect of dentin-bonding agent and hygroscopic expansion. *Dent Mater* 1989;5:122-126. DOI 10.1016/0109-5641(89)90142-5
52. Hayati F, Okada A, Kitasako Y, Tagami J, Matin K: An artificial biofilm induced secondary caries model for in vitro studies. *Aust Dent J* 2011;56:40-47. DOI 10.1111/j.1834-7819.2010.01284.x
53. Hellwig E, Klimek J, Attin T: Einführung in die Zahnerhaltung. Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie. Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln 2009, 1-274
54. Hicks J, Garcia-Godoy F, Donly K, Flaitz C: Fluoride-releasing restorative materials and secondary caries. *J Calif Dent Assoc* 2003;31:229-245
55. Hicks MJ, Silverstone LM: Internal morphology of surface zones from acid-etched caries-like lesions: a scanning electron microscopic study. *J Dent Res* 1985;64:1296-1301. DOI 10.1177/00220345850640110901
56. Jokstad A: Secondary caries and microleakage. *Dent Mater* 2016;32:11-25. DOI 10.1016/j.dental.2015.09.006
57. Katz S, Park KK, Stookey GK, Schemehorn BR: Development and initial testing of a model for in vitro formation of pit and fissure caries. *Caries Res* 1986;20:424-428
58. Keijser B, Zaura E, Huse SM et al.: Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res* 2008;87:1016-1020. DOI 10.1177/154405910808701104
59. Keyes PH: The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. *Arch Oral Biol* 1960;1:304-320
60. Kidd EAM: Microleakage. A review. *J Dent* 1976;4:199-206. DOI 10.1016/0300-5712(76)90048-8
61. Kidd EAM: Caries diagnosis within restored teeth. *Adv Dent Res* 1990;4:10-13
62. Kidd EAM: Diagnosis of secondary caries. *J Dent Educ* 2001;65:997-1000
63. Kidd EAM, Beighton D: Prediction of secondary caries around tooth-colored restorations: a clinical and microbiological study. *J Dent Res* 1996;75:1942-1946. DOI 10.1177/00220345960750120501
64. Kidd EAM, Fejerskov O: What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res* 2004;83:C35. DOI 10.1177/154405910408301S07

65. Kidd EAM, Joyston-Bechal S, Beighton D: Microbiological validation of assessments of caries activity during cavity preparation. *Caries Res* 1993;27:402-408
66. Kidd EAM, Joyston-Bechal S, Beighton D: Marginal ditching and staining as a predictor of secondary caries around amalgam restorations: a clinical and microbiological study. *J Dent Res* 1995;74:1206-1211. DOI 10.1177/00220345950740051001
67. Kidd EAM, Toffenetti F, Mjör IA: Secondary caries. *Int Dent J* 1992;42:127-138
68. Klimek J: *StuDent - Speichel und Mundgesundheit. Ein Skript für Studenten zur Examensvorbereitung 2007*
69. Koike T, Hasegawa T, Manabe A, Itoh K, Wakumoto S: Effect of water sorption and thermal stress on cavity adaptation of dental composites. *Dent Mater* 1990;6:178-180. DOI 10.1016/0109-5641(90)90025-A
70. Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LV: Intrageneric coaggregation among strains of human oral bacteria: potential role in primary colonization of the tooth surface. *Appl Environ Microbiol* 1990;56:3890-3894
71. König KG: *Karies und Parodontopathien. Ätiologie u. Prophylaxe.* Thieme, Stuttgart u.a. 1987, 14-17
72. Krämer N, Möhwald M, Lückner S et al.: Effect of microparticulate silver addition in dental adhesives on secondary caries in vitro. *Clin Oral Investig* 2015;19(7):1673-1681. DOI 10.1007/s00784-014-1396-x
73. Lagerlof F, Dawes R, Dawes C: Salivary clearance of sugar and its effects on pH changes by streptococcus mitior in an artificial mouth. *J Dent Res* 1984;63:1266-1270. DOI 10.1177/00220345840630110201
74. Lagerlof F, Dawes R, Dawes C: The effects of different concentrations of sucrose, fructose, and glucose on pH changes by streptococcus mitior in an artificial mouth. *J Dent Res* 1985;64:405-410. DOI 10.1177/00220345850640030201
75. LeGeros RZ, Silverstone LM, Daculsi G, Kerebel LM: In vitro caries-like lesion formation in F-containing tooth enamel. *J Dent Res* 1983;62:138-144. DOI 10.1177/00220345830620021101
76. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW et al.: Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 2004;97:1311-1318. DOI 10.1111/j.1365-2672.2004.02420.x

77. Li YH, Tang N, Aspiras MB et al.: A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in streptococcus mutans is involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 2002;184:2699-2708. DOI 10.1128/JB.184.10.2699-2708.2002
78. Lloyd AW, Faragher RG, Denyer SP: Ocular biomaterials and implants. *Biomaterials* 2001;22:769-785
79. Loe H, Theilade E, Jensen SB: Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965;36:177-187. DOI 10.1902/jop.1965.36.3.177
80. Loesche WJ: Role of Streptococcus mutans in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986;50:353-380
81. Loesche WJ, Eklund S, Earnest R, Burt B: Longitudinal investigation of bacteriology of human fissure decay: epidemiological studies in molars shortly after eruption. *Infect Immun* 1984;46:765-772
82. Lutz F, Krejci I, Barbakow F: Quality and durability of marginal adaptation in bonded composite restorations. *Dent Mater* 1991;7:107-113. DOI 10.1016/0109-5641(91)90055-4
83. Magitot E: Treatise on dental caries. Experimental and therapeutic investigations. Houghton, Osgood and Company, Boston 1878, 121-166
84. Mantzourani M, Gilbert SC, Sulong HNH et al.: The isolation of bifidobacteria from occlusal carious lesions in children and adults. *Caries Res* 2009;43:308-313. DOI 10.1159/000222659
85. Marsh PD: Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994;8:263-271
86. Marsh PD: The role of microbiology in models of dental caries. *Adv Dent Res* 1995;9:244-54; discussion 255-69
87. Marsh PD: Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 2003;149:279-294. DOI 10.1099/mic.0.26082-0
88. Marsh PD: Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 2004;38:204-211. DOI 10.1159/000077756
89. Marsh PD, Bradshaw DJ: Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* 1995;15:169-175
90. Marsh PD, Martin MV: *Orale Mikrobiologie*. Thieme, Stuttgart, New York 2003, 1-121
91. Marsh PD, Moter A, Devine DA: Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol* 2000 2011;55:16-35. DOI 10.1111/j.1600-0757.2009.00339.x

92. Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N: Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J Clin Microbiol* 2002;40:1698-1704. DOI 10.1128/JCM.40.5.1698-1704.2002
93. Matsuda Y, Komatsu H, Murata Y, Tanaka T, Sano H: A newly designed automatic pH-cycling system to simulate daily pH fluctuations. *Dent Mater* 2006;25:280-285
94. Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Domon-Tawaraya H, Takahashi N: Effect of fluoride-releasing restorative materials on bacteria-induced pH fall at the bacteria-material interface: an in vitro model study. *J Dent* 2014;42:15-20. DOI 10.1016/j.jdent.2013.11.006
95. Miller WD: The microorganisms of the human mouth. The local and general diseases which are caused by them. S. S. White Dental MFG. CO., Philadelphia 1890, 165-202
96. Mjör IA: Glass-ionomer cement restorations and secondary caries: a preliminary report. *Quintessence Int* 1996;27:171-174
97. Mjör IA: The location of clinically diagnosed secondary caries. *Quintessence Int* 1998;29:313-317
98. Mjör IA: Clinical diagnosis of recurrent caries. *J Am Dent Assoc* 2005;136:1426-1433
99. Mjör IA, Toffenetti F: Secondary caries: a literature review with case reports. *Quintessence Int* 2000;31:165-179
100. Moons P, Michiels CW, Aertsen A: Bacterial interactions in biofilms. *Crit Rev Microbiol* 2009;35:157-168. DOI 10.1080/10408410902809431
101. Moter A, Göbel UB: Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods* 2000;41:85-112. DOI 10.1016/S0167-7012(00)00152-4
102. Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG: Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol* 2004;42:3023-3029. DOI 10.1128/JCM.42.7.3023-3029.2004
103. Nedeljkovic I, Teughels W, Munck J de, van Meerbeek B, van Landuyt, K. L.: Is secondary caries with composites a material-based problem? *Dent Mater* 2015;31:e247-77. DOI 10.1016/j.dental.2015.09.001
104. Noorda WD, Purdell-Lewis DJ, van Montfort AM, Weerkamp AH: Monobacterial and mixed bacterial plaques of *Streptococcus mutans* and *Veillonella alcalescens* in an artificial mouth: development, metabolism, and effect on human dental enamel. *Caries Res* 1988;22:342-347

105. Nyvad B, Kilian M: Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 1987;95:369-380
106. Nyvad B, Kilian M: Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res* 1990;24:267-272
107. Paddick JS, Brailsford SR, Kidd E, Beighton D: Phenotypic and genotypic selection of microbiota surviving under dental restorations. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:2467-2472. DOI 10.1128/AEM.71.5.2467-2472.2005
108. Pantanella F, Valenti P, Natalizi T, Passeri D, Berlutti F: Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann Ig* 2013;25:31-42
109. Pearson GJ: Finishing of glass-ionomer cements. The effect of finishing an anhydrous glass-ionomer cement with various types of abrasive at various times after initial setting. *Br Dent J* 1983;155:226-228
110. Perrons CJ, Donoghue HD: Colonization resistance of defined bacterial plaques to *Streptococcus mutans* implantation on teeth in a model mouth. *J Dent Res* 1990;69:483-488. DOI 10.1177/00220345900690021301
111. Peumans M, Kanumilli P, Munck J de, van Landuyt KL, Lambrechts P, van Meerbeek B: Clinical effectiveness of contemporary adhesives: a systematic review of current clinical trials. *Dent Mater* 2005;21:864-881. DOI 10.1016/j.dental.2005.02.003
112. Pigman W, Elliott HC, Laffre RO: An artificial mouth for caries research. *J Dent Res* 1952;31:627-633. DOI 10.1177/00220345520310050501
113. Pigman W, Gilman E, Powell R, Muntz L: The action of individual bacterial strains on human teeth under in vitro conditions. *J Dent Res* 1957;36:314-324. DOI 10.1177/00220345570360022501
114. Pigman W, Newbrun E: Evaluation of anticaries agents by the use of the artificial mouth. *J Dent Res* 1962;41:1304-1311. DOI 10.1177/00220345620410060601
115. Quivey RG JR, Kuhnert WL, Hahn K: Adaptation of oral streptococci to low pH. *Adv Microb Physiol* 2000;42:239-274
116. Randall RC, Wilson N: Glass-ionomer restoratives: a systematic review of a secondary caries treatment effect. *J Dent Res* 1999;78:628-637. DOI 10.1177/00220345990780020101
117. Ritzmann C: Ein automatisiertes Kariesmodell zur Erzeugung sekundärkariöser Läsionen. Dissertation, Erlangen 2008

118. Rowles SL, Sidaway DA, Macgregor AB, Marsland EA: An apparatus for the production of dental caries in vitro. *Arch Oral Biol* 1963;8:311-318
119. Sa LT, Gonzalez-Cabezas C, Cochran MA, Fontana M, Matis BA, Moore BK: Fluoride releasing materials: their anti-cariogenic properties tested in in vitro caries models. *Oper Dent* 2004;29:524-531
120. Sansone C, van Houte J, Joshipura K, Kent R, Margolis HC: The association of mutans streptococci and non-mutans streptococci capable of acidogenesis at a low pH with dental caries on enamel and root surfaces. *J Dent Res* 1993;72:508-516. DOI 10.1177/00220345930720020701
121. Schiffner U., Schmeiser R.: Eine Methode zur bakteriellen Erzeugung von Wurzelkaries in einer künstlichen Mundhöhle. *Dtsch Zahnärztl Z* 1995;50:45-48
122. Schmidt M: Zum Randspaltverhalten von Glasionomern in einem künstlichen Kariesmodell. *Oralprophylaxe Kinderzahnheilkd* 2013;35(3):139-140
123. Seemann R, Bizhang M, Kluck I, Loth J, Roulet J: A novel in vitro microbial-based model for studying caries formation-development and initial testing. *Caries Res* 2005;39:185-190. DOI 10.1159/000084796
124. Seichter U, Herforth A: Vergleichende rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen über die Randspaltbreite verschiedener Composites und über die diesbezügliche Wiedergabegenauigkeit unterschiedlicher Replicas. *Dtsch Zahnärztl Z* 1980;35:511-515
125. Shu M, Wong L, Miller JH, Sissons CH: Development of multi-species consortia biofilms of oral bacteria as an enamel and root caries model system. *Arch Oral Biol* 2000;45:27-40. DOI 10.1016/S0003-9969(99)00111-9
126. Sidaway A, Marsland EA, Rowles SL, Macgregor AB: The artificial mouth in caries research. *J R Soc Med* 1964;57:1065-1069
127. Sissons CH: Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res* 1997;11:110-126. DOI 10.1177/08959374970110010201
128. Sissons CH, Cutress TW, Hoffman MP, Wakefield J: A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque growth, metabolism, pH, and mineralization. *J Dent Res* 1991;70:1409-1416. DOI 10.1177/00220345910700110301
129. Sissons CH, Cutress TW, Pearce EI: Kinetics and product stoichiometry of ureolysis by human salivary bacteria and artificial mouth plaques. *Arch Oral Biol* 1985;30:781-790
130. Sissons CH, Wong L, Shu M: Factors affecting the resting pH of in vitro human microcosm dental plaque and *Streptococcus mutans* biofilms. *Arch Oral Biol* 1998;43:93-102

131. Sutherland I: The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 2001;9:222-227. DOI 10.1016/S0966-842X(01)02012-1
132. Svanberg M, Mjör IA, Orstavik D: Mutans streptococci in plaque from margins of amalgam, composite, and glass-ionomer restorations. *J Dent Res* 1990;69:861-864
133. Syed SA, Loesche WJ: Bacteriology of human experimental gingivitis: effect of plaque age. *Infect Immun* 1978;21:821-829
134. Takahashi N, Nyvad B: Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res* 2008;42:409-418. DOI 10.1159/000159604
135. Takahashi N, Nyvad B: The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res* 2011;90:294-303. DOI 10.1177/0022034510379602
136. Takahashi N, Yamada T: Acid-induced acid tolerance and acidogenicity of non-mutans streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 1999;14:43-48
137. Tang G, Yip H, Cutress TW, Samaranayake LP: Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. *J Dent* 2003;31:161-171. DOI 10.1016/S0300-5712(03)00009-5
138. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM: The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ* 2001;65:1028-1037
139. Teughels W, van Assche N, Sliepen I, Quirynen M: Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res* 2006;17 Suppl 2:68-81. DOI 10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x
140. Theilade E: The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1986;13:905-911. DOI 10.1111/j.1600-051X.1986.tb01425.x
141. van Houte J: Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res* 1994;73:672-681
142. van Houte J, Lopman J, Kent R: The final pH of bacteria comprising the predominant flora on sound and carious human root and enamel surfaces. *J Dent Res* 1996;75:1008-1014. DOI 10.1177/00220345960750040201
143. van Houte J, Sansone C, Joshipura K, Kent R: In vitro acidogenic potential and mutans streptococci of human smooth-surface plaque associated with initial caries lesions and sound enamel. *J Dent Res* 1991;70:1497-1502
144. van Palenstein Helderma, WH: Longitudinal microbial changes in developing human supragingival and subgingival dental plaque. *Arch Oral Biol* 1981;26:7-12

145. Versluis A, Tantbirojn D, Lee MS, Tu LS, DeLong R: Can hygroscopic expansion compensate polymerization shrinkage? Part I. Deformation of restored teeth. *Dent Mater* 2011;27:126-133. DOI 10.1016/j.dental.2010.09.007
146. Vieira, AE de Mello, Delbem AC, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF: Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Res* 2005;39:514-520. DOI 10.1159/000088189
147. Wallman C, Krasse B: Mutans streptococci in margins of fillings and crowns. *J Dent* 1992;20:163-166. DOI 10.1016/0300-5712(92)90130-5
148. Walls AW: Glass polyalkenoate (glass-ionomer) cements: a review. *J Dent* 1986;14:231-246
149. Watson PS, Pontefract HA, Devine DA et al.: Penetration of fluoride into natural plaque biofilms. *J Dent Res* 2005;84:451-455. DOI 10.1177/154405910508400510
150. Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE: Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol* 1996;50:513-552. DOI 10.1146/annurev.micro.50.1.513
151. Wiegand A, Buchalla W, Attin T: Review on fluoride-releasing restorative materials- fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent Mater* 2007;23:343-362. DOI 10.1016/j.dental.2006.01.022
152. Wong L, Sissons C, Sissions CH: A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Biol* 2001;46:477-486
153. Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C: Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res* 2000;79:21-27. DOI 10.1177/00220345000790010201
154. Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS: Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000;27:648-657
155. Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS: Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000;27:722-732
156. Xu X, Burgess JO: Compressive strength, fluoride release and recharge of fluoride-releasing materials. *Biomaterials* 2003;24:2451-2461. DOI 10.1016/S0142-9612(02)00638-5

157. Zampatti O, Roques C, Michel G: An in vitro mouth model to test antiplaque agents: preliminary studies using a toothpaste containing chlorhexidine. *Caries Res* 1994;28:35-42
158. Zee KY, Samaranayake LP, Attström R: Predominant cultivable supragingival plaque in chinese "rapid" and "slow" plaque formers. *J Clin Periodontol* 1996;23:1025-1031
159. Zero DT: In situ caries models. *Adv Dent Res* 1995;9:214-30; discussion 231-4

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
ANOVA	Analysis of variance
ATCC	American Type Culture Collection
ATPase	Adenosintriphosphatase
<i>A. naeslundii</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>
<i>A. viscosus</i>	<i>Actinomyces viscosus</i>
BHI	Brain Heart Infusion
CFU	Colony forming unit / Koloniebildende Einheit
DBA	Dentinbondingagent
DNA	Deoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure (DNS)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
Ig A	Immunglobulin A
Ig G	Immunglobulin G
Ig M	Immunglobulin M
<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>L. brevis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>L. buchneri</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
<i>L. casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>

<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>L. salivarius</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
LSD	Least significant difference
mod	Mesial-okklusal-distal
MRS	Lactobacillus Bouillon nach de Man, Rogosa, Sharpe
MWL	Mineralwaschlösung
NCTC	National Collection of Type Cultures
PA	Parodontologie
P&B NT	Prime&Bond® NT
PBS	Phosphate Buffered Saline / Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction / Polymerase-Kettenreaktion
OD	Optische Dichte
SÄT	Säure-Ätz-Technik (hier entsprechend der Etch-and-rinse-Technik)
SD	Standard deviation / Standardabweichung
<i>S. cricetus</i>	<i>Streptococcus cricetus</i>
<i>S. faecalis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>S. ferus</i>	<i>Streptococcus ferus</i>
<i>S. gordonii</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>S. mitior</i>	<i>Streptococcus mitior</i>
<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>S. rattus</i>	<i>Streptococcus rattus</i>

<i>S. salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>S. sanguis</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
<i>S. sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>S. sobrinus</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>
spp.	Spezies
subsp.	Subspezies
TSB	Trypticase Soja Bouillon
TSBS	Dextrosefreies Trypticase Soja Bouillon
var.	Varietät
<i>V. alcalescens</i>	<i>Veillonella alcalescens</i>
<i>V. dispar</i>	<i>Veillonella dispar</i>

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Beschriftung	Seite
Abbildung 1	Kavitätendesign.	30
Abbildung 2	Schematische Darstellung des Kariesmodells. Das Nährmedium wurde über Pumpe 1 in den Bakterienreservoirkolben gepumpt und von dort gelangte die Flüssigkeit über Pumpe 2 in die Reaktionskammer, in der sich die Zahnproben befanden. Pumpe 3 sorgte für den Transport des artifiziellen Speichels in die Reaktionskammer. Das Abpumpen der Flüssigkeiten erfolgte über Pumpe 4 entweder in das Abfallgefäß oder zur Reinheitskontrolle in eine zusätzlich angeschlossene 500 ml Flasche. Der pH-Wert innerhalb der Reaktionskammer wurde kontinuierlich über eine pH-Messelektrode gemessen und aufgezeichnet.	39
Abbildung 3	<i>L. casei</i> , DSM Nr.: 20021.	46
Abbildung 4	<i>S. mutans</i> , DSM Nr.: 20523.	46
Abbildung 5	Grafische Darstellung eines Ausschnittes des pH-Wertverlaufes innerhalb der Reaktionskammer durch Messung mit der pH-Messelektrode.	48
Abbildung 6	Aufbau der Kariesmodelle im Temperierlagerschrank.	50
Abbildung 7	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der oben dargestellten Parameter auf der Schmelzseite und der Zement-/Dentinseite. Jeweils am Füllungsrand und in 500 µm Entfernung davon wurden die Demineralisation und der Substanzverlust infolge der Demineralisation gemessen. Die Summe aus der Demineralisation und dem Substanzverlust durch Demineralisation ergab die Gesamtdemineralisation. Sofern eine Spaltbildung zwischen der Restauration und der Zahnhartsubstanz feststellbar war, wurde die Breite des Randspalts ausgemessen.	52

Abbildung 8	Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme einer Replika der Zahnprobenoberfläche (Gruppe 3: Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT) bei 21 x Vergrößerung (rechts) und exemplarische Darstellung einer Einzelaufnahme des Restaurationsrandes auf der Schmelzseite bei 200 x Vergrößerung (links).	53
Abbildung 9	Rasterelektronenmikroskopische Darstellung eines Füllungsrandes (Gruppe 1: Photac™ Fil Quick Aplicap™) zur quantitativen Randspaltanalyse nach Zusammenfügen der Einzelaufnahmen zu einem Gesamtbild. Die weißen Pfeile markieren den Verlauf des Füllungsrandes.	54
Abbildung 10	Exemplarische Anfärbung des Biofilms auf der Zahnprobenoberfläche nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell mit LIVE/DEAD® BacLight™.	57
Abbildung 11	LIVE/DEAD® BacLight™ Färbung des Biofilms nach zehntägiger mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell (unbeschädigte Mikroorganismen grün, beschädigte rot dargestellt).	57
Abbildung 12	Übersichtsaufnahme eines Zahnschnittes nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell mit deutlich sichtbarer weiß-opaker Veränderung der Schmelzoberfläche sowie Demineralisation auf der Zement- / Dentinseite (weiße Pfeile).	57
Abbildung 13	Gesamtdemineralisationstiefen [μm] der vier verwendeten Restaurationsmaterialien Photac™ Fil Quick Aplicap™ (PF), Ketac™ Molar Aplicap™ (KM), Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT (C + SÄT) sowie Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT (C) an den zwei Messpunkten auf der Schmelzseite nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d.	61

Abbildung 14	Gesamtdemineralisationstiefen [μm] der vier verwendeten Restaurationsmaterialien Photac™ Fil Quick Aplicap™ (PF), Ketac™ Molar Aplicap™ (KM), Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT (C + SÄT) sowie Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT (C) an den zwei Messpunkten auf der Zement- / Dentinseite nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d.	61
Abbildung 15	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Schmelzseite (rechts) und Zement- / Dentinseite (links) von Gruppe 1 (Photac™ Fil Quick Aplicap™) nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d. Am Füllungsrand und in 500 μm Entfernung davon wurden folgende Parameter ausgewertet: Demineralisationstiefe (rot), Substanzverlust durch Demineralisation (blau). Im Bereich des Füllungsrandes ist eine geringere Fluoreszenz der inneren Demineralisationszone feststellbar (weißer Pfeil).	62
Abbildung 16	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Schmelzseite (rechts) und Zement- / Dentinseite (links) von Gruppe 2 (Ketac™ Molar Aplicap™) nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d. Am Füllungsrand und in 500 μm Entfernung davon wurden folgende Parameter ausgewertet: Demineralisationstiefe (rot), Substanzverlust durch Demineralisation (blau). Der weiße Pfeil markiert eine Spaltbildung zwischen der Restauration und der angrenzenden Zahnhartsubstanz.	63
Abbildung 17	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Schmelzseite (rechts) und Zement- / Dentinseite (links) von Gruppe 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT) nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d. Am Füllungsrand und in 500 μm Entfernung davon wurden folgende Parameter ausgewertet: Demineralisationstiefe (rot), Substanzverlust durch Demineralisation (blau). Zusätzlich wurde die Randspaltbreite am Füllungsrand auf der Zement- / Dentinseite ausgemessen (weißer Pfeil).	64

Abbildung 18	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Schmelzseite (rechts) und Zement- / Dentinseite (links) von Gruppe 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT) nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d. Am Füllungsrand und in 500 µm Entfernung davon wurden folgende Parameter ausgewertet: Demineralisationstiefe (rot), Substanzverlust durch Demineralisation (blau). Zusätzlich wurde die Randspaltbreite am Füllungsrand auf der Zement- / Dentinseite ausgemessen (weißer Pfeil).	65
Abbildung 19	Vergrößerte Darstellung einer Randspaltbildung auf der Zement- / Dentinseite nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d (Gruppe 4; Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT). Im Füllungsrandbereich wurde die Randspaltbreite gemessen (weißer Pfeil). Die weiteren Markierungen zeigen die Demineralisation des Zahnhartgewebes (rot) und den Zahnhartsubstanzverlust infolge der Demineralisation (blau).	65
Abbildung 20	Exemplarische rasterelektronenmikroskopische Darstellung (200-fache Vergrößerung) eines Restaurationsrandes von Photac™ Fil Quick Aplicap™ (Gruppe 1) auf der Zement- / Dentinseite nach thermozyklischer Belastung (TC) und mit Ausbildung einer negativen Stufe nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d (KM). Die Pfeile markieren den Verlauf des Restaurationsrandes.	67
Abbildung 21	Exemplarische rasterelektronenmikroskopische Abbildung eines Restaurationsrandes von Ketac™ Molar Aplicap™ (Gruppe 2) auf der Zement- / Dentinseite bei 200-facher Vergrößerung nach thermozyklischer Belastung (TC) sowie nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d (KM) mit Ausbildung einer negativen Stufe und eines Randspaltes. Die weißen Pfeile markieren den Restaurationsrandverlauf.	67

Abbildung 22	Exemplarische rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (200-fache Vergrößerung) eines Restaurationsrandes von Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT (Gruppe 3) auf der Zement- / Dentinseite nach thermozyklischer Belastung (TC) und nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d (KM). Die weißen Pfeile markieren den Verlauf des Restaurationsrandes, welcher nach dem Aufenthalt im Kariesmodell deutlicher sichtbar ist und unebener erscheint.	69
Abbildung 23	Exemplarische rasterelektronenmikroskopische Darstellung (200-fache Vergrößerung) eines Restaurationsrandes von Gruppe 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT) auf der Zement- / Dentinseite nach thermozyklischer Belastung (TC) und nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d (KM) mit sichtbarer Spaltbildung zwischen der Restauration und der angrenzenden Zahnhartsubstanz (KM). Der Verlauf des Restaurationsrandes wird durch weiße Pfeile markiert.	69
Abbildung 24	Überlagerte Ausschnitte von zwei aufgezeichneten pH-Wertkurven innerhalb der Reaktionskammer bei monobakterieller Inokulation des Kariesmodells mit <i>S. mutans</i> (gelb) beziehungsweise <i>L. casei</i> (rot).	77
Abbildung 25	Ausschnitt einer aufgezeichneten pH-Wertkurve innerhalb der Reaktionskammer bei Inokulation des Kariesmodells mit <i>S. mutans</i> und <i>L. casei</i> .	77

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle	Beschriftung	Seite
Tabelle 1	Bakterien der Mundhöhle nach <i>Marsh</i> und <i>Martin</i> (2003) [90].	3
Tabelle 2	In artifiziellen Mundhöhlen verwendete Bakterienstämme.	27
Tabelle 3	Verwendete Restaurationsmaterialien.	31
Tabelle 4	Zusammensetzung von 28,4 g Schaedler Broth (Herstellerangaben).	40
Tabelle 5	Zusammensetzung des artifiziellen Speichels nach <i>Zampatti et al.</i> (1994) [157].	41
Tabelle 6	Anzüchtung von <i>L. casei</i> und <i>S. mutans</i> zur Beimpfung des Kariesmodells.	44
Tabelle 7	Koloniebildende Einheiten von <i>S. mutans</i> und <i>L. casei</i> während der Hauptversuche.	56
Tabelle 8	Mittelwerte und Standardabweichungen [SD] der Demineralisation und der Spaltbreite des Schmelzes [μm] an zwei Messpunkten (Füllungsrand und 500 μm Entfernung davon) für Photac™ Fil Quick Aplicap™, Ketac™ Molar Aplicap™, Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT mit / ohne SÄT nach mikrobiologischer Belastung für 10 d im Kariesmodell. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Restaurationsmaterialien sind durch unterschiedliche Großbuchstaben gekennzeichnet (ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$). Bei Abweichungen von der Normalverteilung sind statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Restaurationsmaterialien durch unterschiedliche Kleinbuchstaben dargestellt (Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$).	58

Tabelle 9	Mittelwerte und Standardabweichungen [SD] der Demineralisation und der Spaltbreite des Zements / Dentins [μm] an zwei Messpunkten (Füllungsrand und 500 μm Entfernung davon) für Photac™ Fil Quick Aplicap™, Ketac™ Molar Aplicap™, Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT mit / ohne SÄT nach mikrobiologischer Belastung für 10 d im Kariesmodell. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Restaurationmaterialien sind durch unterschiedliche Großbuchstaben gekennzeichnet (ANOVA, mod. LSD, $p < 0,05$).	59
Tabelle 10	Paarweiser Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen [SD] der Gesamtdemineralisationstiefen [μm] der Gruppen 1 (Photac™ Fil Quick Aplicap™) und 2 (Ketac™ Molar Aplicap™) nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d. Statistisch signifikante Unterschiede der Gesamtdemineralisationen zwischen den Messpunkten sind durch unterschiedliche Großbuchstaben gekennzeichnet (T-Test, $p < 0,05$).	63
Tabelle 11	Paarweiser Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen [SD] der Gesamtdemineralisationstiefen [μm] der Gruppen 3 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT, SÄT) und 4 (Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT) nach mikrobiologischer Belastung im Kariesmodell für 10 d. Statistisch signifikante Unterschiede der Gesamtdemineralisationen zwischen den Messpunkten sind durch unterschiedliche Großbuchstaben gekennzeichnet (T-Test, $p < 0,05$).	64

Tabelle 12	Prozentuale Angabe der Mittelwerte und der Standardabweichungen [SD] von sieben Randspaltqualitäten bei Photac™ Fil Quick Aplicap™ und Ketac™ Molar Aplicap™ auf der Schmelzseite und auf der Zement- / Dentinseite nach thermozyklischer Belastung (nach TC) und nach mikrobiologischer Belastung für 10 d im Kariesmodell (nach KM). Statistisch signifikante Unterschiede der einzelnen Randspaltqualitäten des jeweilig verwendeten Restaurationsmaterials zwischen den beiden Zeitpunkten sind durch unterschiedliche Großbuchstaben gekennzeichnet (Friedman-Test, $p < 0,05$).	66
Tabelle 13	Prozentuale Angabe der Mittelwerte und der Standardabweichungen [SD] von sieben Randspaltqualitäten bei Ceram•X® mono, Prime&Bond® NT mit / ohne SÄT auf der Schmelzseite und auf der Zement- / Dentinseite nach thermozyklischer Belastung (nach TC) und nach mikrobiologischer Belastung für 10 d im Kariesmodell (nach KM). Statistisch signifikante Unterschiede der einzelnen Randspaltqualitäten des jeweilig verwendeten Restaurationsmaterials zwischen den beiden Zeitpunkten sind durch unterschiedliche Großbuchstaben gekennzeichnet (Friedman-Test, $p < 0,05$).	68

9.4 Publikationsverzeichnis

Aus der vorliegenden Dissertation ist eine Veröffentlichung in Form eines Posterkurzvortrages mit dem Titel „Ein zwei-Spezies-biofilmbasiertes In-vitro-Kariesmodell zur Untersuchung von Sekundärkaries“ hervorgegangen, welcher bei dem DGZMK-BZÄK-Dentsply Förderpreis 2014 im Rahmen des Deutschen Zahnärztetages 2014 präsentiert wurde.

10 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

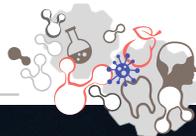
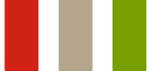
Ort, Datum

Unterschrift

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei:

- Herrn Professor Dr. Dr. Norbert Krämer, Direktor der Poliklinik für Kinderzahnheilkunde des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH (Standort Gießen), für die Überlassung des Promotionsthemas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.
- den Mitarbeitern/innen des Institutes für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH (Standort Gießen), insbesondere bei Herrn Professor Dr. Trinad Chakraborty, Herrn Professor Dr. Eugen Domann, Herrn Dr. Hamid Hossain, Frau Martina Hudel, für die gute Zusammenarbeit und Bereitstellung der Räumlichkeiten zur Versuchsdurchführung.
- Herrn Professor Dr. Karl-Heinz Kunzelmann, leitender Oberarzt und stellvertretender Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Bereitstellung der Software zur Durchführung der quantitativen Randspaltanalyse.
- Frau Dr. Susanne Lücker, Laborleiterin der Poliklinik für Kinderzahnheilkunde des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH (Standort Gießen), für die Unterstützung und den Beistand bei der Umsetzung der Arbeit.
- Frau Ingrid Heidmann für die Hilfe bei der Anfertigung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6544-7



9 783835 196544 7