

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Poliklinik für Parodontologie, Präventive Zahnmedizin und Zahnerhaltung

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Thomas Beikler

Einfluss von 10-Methacryloyloxydecyldihydrogenphosphat (MDP) auf die Kariesinfiltration

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Floris Y.-T. Hasse
aus Hamburg

Hamburg 2023

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 25.04.2024**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. Reinhard Friedrich

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Ulrich Schiffner

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Arbeitshypothese und Fragestellung | 8 |
| 2 | Einleitung | 9 |
| 2.1 | Humaner Zahnschmelz | 9 |
| 2.1.1 | Chemische Zusammensetzung | 9 |
| 2.1.2 | Histologische Struktur | 10 |
| 2.2 | Bovine Zahnproben | 12 |
| 2.3 | Karies | 13 |
| 2.3.1 | Ätiologie und Pathogenese | 13 |
| 2.3.2 | Chemische Grundlagen der Karies | 15 |
| 2.3.3 | Schmelzkaries | 16 |
| 2.4 | Modellformen zur Untersuchung von Zahnhartsubstanz | 18 |
| 2.4.1 | Methoden zur Herstellung künstlicher Läsionen | 19 |
| 2.4.2 | Grundlagen der chemischen Herstellung subfizieller Läsionen | 21 |
| 2.5 | Infiltration | 21 |
| 2.6 | MDP | 24 |
| 3 | Material und Methoden | 26 |
| 3.1 | Materialien | 26 |
| 3.2 | Entwicklung eines Läsionsmodells | 27 |
| 3.3 | Herstellung der Demineralisationslösungen | 28 |
| 3.4 | Vorbereitung der Prüfkörper | 30 |
| 3.4.1 | Zahnproben | 30 |
| 3.4.2 | Demineralisation | 30 |
| 3.4.3 | Herstellung der Schnitte | 31 |
| 3.5 | Vorversuche | 32 |
| 3.5.1 | Herstellung der künstlichen Läsionen | 32 |
| 3.5.2 | Ermittlung des Infiltrationsprotokolls | 33 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.6 | Hauptversuch - Infiltration DRY vs. PRIME | 35 |
| 3.7 | Lichtmikroskopie..... | 36 |
| 3.7.1 | Messung der Läsionstiefe..... | 36 |
| 3.8 | Fluoreszenz-Mikroskopie | 37 |
| 3.8.1 | Messung der Penetrationstiefe | 37 |
| 3.8.2 | Messung der Läsions- und Infiltrationsfläche..... | 37 |
| 3.9 | Statistische Auswertung | 37 |
| 4 | Ergebnisse..... | 39 |
| 4.1 | Vorversuch..... | 39 |
| 4.1.1 | Lichtmikroskopische Analyse und Messung der Läsionstiefe..... | 39 |
| 4.1.2 | Methode 1 - Lösungsreihe A1-A3..... | 39 |
| 4.1.3 | Methode 1 - Lösungsreihe B (B1 - B3)..... | 43 |
| 4.1.4 | Methode 1 - Lösungsreihe C (nach ten Cate)..... | 46 |
| 4.1.5 | Methode 1 - Lösungsreihe D (HEC) | 47 |
| 4.1.6 | Methode 2-B2: Lichtmikroskopische Analyse und Messung der Läsionstiefe.. | 48 |
| 4.1.7 | Methode 3-B2: Lichtmikroskopische Analyse und Messung der Läsionstiefe.. | 48 |
| 4.1.8 | Methode 4-B2: Lichtmikroskopische Analyse und Messung der Läsionstiefe.. | 50 |
| 4.1.9 | Zusammenfassung der Vorversuche (Methoden 1 - 4) zur Demineralisierung . | 51 |
| 4.2 | Ermittlung des Infiltrationsprotokolls | 52 |
| 4.3 | Hauptversuch DRY vs. PRIME..... | 55 |
| 4.3.1 | Übersicht der Proben und Aufnahmen | 55 |
| 4.3.2 | Qualitative Analyse der Infiltration..... | 56 |
| 4.3.3 | Quantitative Analyse der Infiltration..... | 58 |
| 5 | Diskussion | 62 |
| 5.1 | Diskussion der Methoden | 62 |
| 5.1.1 | Rinderzähne im artifiziiellen Läsionsmodell | 62 |
| 5.1.2 | Methoden zur Herstellung künstlicher Läsionen | 62 |
| 5.1.3 | Läsionsherstellung..... | 65 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 5.1.4 | Methodenentwicklung zur Infiltration | 67 |
| 5.1.5 | Darstellung von Läsionen und infiltrierten Anteilen..... | 67 |
| 5.2 | Diskussion der Ergebnisse (Hauptversuch)..... | 69 |
| 5.3 | Ausblick..... | 72 |
| 5.4 | Fazit | 73 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 74 |
| 7 | Abkürzungsverzeichnis | 76 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 77 |
| 9 | Danksagung | 86 |
| 10 | Lebenslauf..... | 87 |
| 11 | Eidesstattliche Versicherung..... | 88 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung der HAP-Kristallstruktur, Schmelzkristalle und rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Zahnschmelzprismen..... | 11 |
| Abbildung 2: Histologischer Schnitt durch eine schmelzbegrenzte kariöse Läsion | 17 |
| Abbildung 3: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lösungsreihe A1..... | 40 |
| Abbildung 4: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lösungsreihe A2..... | 41 |
| Abbildung 5: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lösungsreihe A3..... | 42 |
| Abbildung 6: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lösungsreihe B1 | 43 |
| Abbildung 7: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lösungsreihe B2..... | 44 |
| Abbildung 8: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lösungsreihe B3 | 45 |
| Abbildung 9: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lösungsreihe C..... | 46 |
| Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lösungsreihe D..... | 47 |
| Abbildung 11: Exemplarische Läsionsausschnitte von Methode 2 und 3 der Lösungsreihe B2 | 49 |
| Abbildung 12: Exemplarische Läsionsausschnitte aus Versuch 4 B2 | 50 |
| Abbildung 13: Säulendiagramme der LT-Mittelwerte aus Methode 1 - 4..... | 51 |
| Abbildung 14: Exemplarische Darstellung infiltrierter Läsionen und Vergleich verschiedener Infiltrationsprotokolle (Gruppe DRY-A vs. Gruppe DRY-B) | 53 |
| Abbildung 15: Exemplarische Darstellung infiltrierter Läsionen und Vergleich verschiedener Infiltrationsprotokolle (Gruppe DRY-B 10 s vs. 5 s)..... | 54 |
| Abbildung 16: Exemplarische Ausschnitte infiltrierter Läsionen DRY vs. PRIME..... | 56 |
| Abbildung 17: Exemplarische erodierte Läsionen der Gruppen DRY und PRIME | 57 |
| Abbildung 18: Exemplarische Läsionen in 2,5-facher Vergrößerung | 58 |
| Abbildung 19: Läsions- und Penetrationstiefen DRY vs. PRIME..... | 59 |
| Abbildung 20: Läsions- und Infiltrationsflächen DRY vs. PRIME | 60 |
| Abbildung 21: Prozentuale Penetrationen der Läsionsfläche und -tiefe DRY vs. PRIME | 60 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Übersicht über Materialien und Hersteller | 26 |
| Tabelle 2: Lösungsansätze bezüglich pH-Wert, Volumen und Fluorid-Konzentration..... | 28 |
| Tabelle 3: Lösungsansätze der Demineralisationslösungen und Stammlösungen | 29 |
| Tabelle 4: Technische Parameter für Präzisionstrennscheider IsoMet 500 | 31 |
| Tabelle 5: Materialien für die Infiltration | 34 |
| Tabelle 6: Ermittlung des Infiltrationsprotokolles | 35 |
| Tabelle 7: Probenanzahl | 55 |
| Tabelle 8: Zusammenfassung der Mittelwerte (in Klammern Standardabweichung) und p-Werte aller analysierten Parameter | 59 |

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Das Ziel einer erfolgreichen Infiltrationstherapie mit Icon® (Dental-Material Gesellschaft mbH, Hamburg (DMG)) ist eine Arretierung der Initialkaries und vollständige Maskierung der Schmelzveränderung durch eine möglichst vollständige Penetration des Infiltranten in den porösen Zahnschmelz. Im klinischen Alltag werden Läsionen häufig nicht vollständig infiltriert. Um Defizite im klinischen Protokoll und Behandlungsmisserfolge zu verringern, soll das Infiltrationsverfahren verbessert werden. Einen guten Ansatzpunkt bietet die Trocknungskomponente Icon Dry® (Ethanol 99 %), da eine Modifikation von Icon Dry® ohne Veränderung des klinischen Anwendungsprotokolls möglich ist.

Der Untersuchung liegen folgende Hypothesen zugrunde: Die Ethanol-Lösung Icon Dry® kann durch Zugabe von 10-Methacryloyloxydecyldihydrogenphosphat (MDP) modifiziert werden, um in der Funktion eines *Primers* die initialkariöse Läsion zu konditionieren und die chemische Interaktion zwischen dem funktionellen Monomer MDP und Hydroxylapatit (HAP) zu vermitteln. Dadurch kann die Penetration des Infiltranten in die Schmelzläsion beeinflusst und die Penetrationstiefe (PT) und infiltrierte Fläche (IF) erhöht werden. Inwiefern die Modifikation der Trocknungskomponente Icon Dry® durch die Zugabe von MDP Einfluss auf die Infiltration nimmt, soll an künstlich hergestellten Rinderzahnschmelzläsionen (RZL) untersucht werden.

Um eine komparative Untersuchung der MDP-modifizierten Trocknungskomponente (Icon® Prime) und der unveränderten Kontrollgruppe (Icon® Dry) durchzuführen, sind ausreichend tiefe Läsionen nötig, die eine vergleichbare partielle Infiltration ermöglichen. Dafür soll zunächst in einem Vorversuch eine Methode zur Herstellung künstlicher Läsionen mit möglichst hoher Läsionstiefe (LT) und Charakteristika entwickelt werden, die klinisch entstandenen Initialläsionen (IC) entsprechen. In einem weiteren Vorversuch soll ein Infiltrationsprotokoll ermittelt werden, welches eine partielle Infiltration und damit einen Vergleich des Infiltrationsverhaltens der Untersuchungsgruppen ermöglicht.

Im Hauptversuch soll die Infiltration von künstlichen RZL mit MDP-modifizierter Trocknungskomponente als Experimentalgruppe PRIME im Vergleich zur Kontrollgruppe DRY (reine Ethanol-Lösung) untersucht werden. Anschließend soll die Darstellung und Analyse des Infiltranten am Lichtmikroskop ermöglicht werden. Zielparameter sind die LT, die Läsionsfläche (LF), die PT und IF sowie die prozentuale Penetration (PP) des Infiltranten in die Läsion bezogen auf die LT (PP(LT)) und die LF (PP(LF)).

2 Einleitung

2.1 Humaner Zahnschmelz

Der Zahnschmelz entsteht embryologisch in mehreren Phasen im Rahmen der Amelogenese. In der sekretorischen Phase sezernieren Ameloblasten Matrixproteine, die eine Schmelzmatrix bilden und die primäre Mineralisation initiieren (Whittaker, 1987).

Der Großteil der Proteine wird während der Reifephase im Rahmen der sekundären Mineralisation durch Mineralien ersetzt. Über die Ameloblasten wird Calcium und Phosphat in die Schmelzmatrix transportiert und es kommt zu einer Kristallisation von Calcium-Phosphat-Verbindungen (Deporter, 1977; Hanawa et al., 1990).

Die Schmelzmatrix wird resorbiert und durch Wasser ersetzt. Dadurch bilden sich Porositäten, die durch wachsende Kristalle aufgefüllt werden (Robinson et al., 1971). Der bis zum Zahndurchbruch ablaufende Mineralisationsprozess wird als präeruptive Schmelzreifung bezeichnet. Mit dem Durchbruch des Zahnes endet die Amelogenese unter Verschmelzung des Schmelzepithels mit den oralen Epithelzellen (Ekstrand und Zero, 2012).

Während der posteruptiven Schmelzreifung werden verbliebene Mikroporositäten durch Aufnahme von Calcium und Phosphat aus dem umliegenden Milieu aufgefüllt. Der ausgereifte Schmelz ist avaskulär, azellulär und besitzt keine zellulären Reparaturmechanismen. Er bedeckt die anatomische Zahnkrone mit einer individuell variablen Schichtdicke von wenigen Mikrometern zervikal bis hin zu mehreren Millimetern in Regio der Inzisalkanten, Höckerspitzen und Randleisten (DeRocher et al., 2020; Gillings und Buonocore, 1961).

Mit einer durchschnittlichen Knoop-Härte von 250 (Knoop hardness, HK) und 390 HK an der Schmelzoberfläche ist der Zahnschmelz die härteste, sprödeste und am stärksten mineralisierte Substanz des menschlichen Körpers (Elmar Hellwig et al., 2018; Meyer-Lückel et al., 2012; Schroeder, 1987). Die Dichte des Zahnschmelzes nimmt von der Schmelzoberfläche bis zur Schmelz-Dentin-Grenze ab und beträgt ca. 2,8 - 3 mg /mm³ (Carlström et al., 1963; Weatherell et al., 1967).

2.1.1 Chemische Zusammensetzung

Seine charakteristischen Eigenschaften erhält der Schmelz durch seine chemische Zusammensetzung. Er besteht mit ca. 93 - 98 Gew.-% also fast ausschließlich aus

anorganischem Material. Der zweitgrößte Bestandteil ist Wasser mit ca. 1,5 - 4 Gew.-%. Der Rest setzt sich mit ca. 0,49 - 1,95 Gew.-% aus organischen Verbindungen wie Proteinen und Lipiden zusammen (Deakins und Volker, 1941; LeFevre und Manly, 1938).

Nach Volumenanteilen besteht der Zahnschmelz zu ca. 86 % aus Mineral, ca. 12 % aus Wasser und ca. 2 % aus organischem Material, mit abnehmendem Mineralvolumen vom äußeren zum inneren Schmelz (Setally Azevedo Macena et al., 2014; Whittaker, 1987). Die Schmelzzusammensetzung kann variabel sein, da sie vielen verschiedenen Faktoren wie dem Alter, der Ernährung und der Untersuchungsmethodik unterliegt (Sakae, 2006).

Der anorganische Anteil besteht hauptsächlich aus Calciumphosphatverbindungen, die als kleinste, sich wiederholende Einheit in reiner Form im Kristallgitter als HAP $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ vorliegen (Abbildung 1). Durch den Austausch von Calcium-, Phosphat- und Hydroxidionen durch Carbonat, Hydrogenphosphat und andere Elemente wie z. B. Magnesium, Natrium, Kohlenstoff und Chlorid liegen Calcium und Phosphat im Zahnschmelz in der Regel als nicht-stöchiometrische Apatitkristalle vor, die besser durch die Formel $Ca_{10-x}Na_x(PO_4)_{6-y}(CO_3)_z(OH)_{2-u}F_u$ beschrieben werden (Hellwig et al., 2018; Meyer-Lückel et al., 2012). Es sind verschiedene Substitutionen der Ionen im HAP möglich. So entstehen z. B. Carbonathydroxylapatit, Magnesiumhydroxylapatit oder Fluorhydroxylapatit (FHAP), welche unterschiedliche physikochemische Eigenschaften aufweisen. (DeRocher et al., 2020; Robinson et al., 1971; Wang et al., 2008; Young, 1974). Die Löslichkeit des HAP ist abhängig von den substituierten Ionen. FHAP weist beispielsweise eine geringere Löslichkeit als HAP auf (ten Cate und Featherstone, 1991).

Flüssigkeiten wie Wasser oder Alkohol können den Zahnschmelz relativ frei durchströmen (Poole et al., 1963). Für Ionen verhält sich der Zahnschmelz wie eine Ionenaustausch-Membran, deren Selektivität gegenüber dem Ionen-transport abhängig von den umgebenden Elektrolyten ist (Waters, 1971). Durch chemischen Ionenaustausch kann der Zahnschmelz ohne zellulären Mechanismus seine Kristallstruktur verändern. Permeabilitätsstudien an post-eruptivem Zahnschmelz zeigen einen u. a. durch Kristallwachstum bedingten Verlust an Porosität bei gleichzeitiger Zunahme an Dichte und Härte (Brudevold et al., 1982).

2.1.2 Histologische Struktur

Der humane Zahnschmelz weist im Querschnitt eine hexagonale Struktur der HAP-Kristalle auf (Reyes-Gasga et al., 2012). Die Kristalle, die normal zu ihrer Längsachse ausgerichtet sind,

zeigen sich mikroskopisch als längliche Polygone mit einer Kantenlänge von ca. $20 - 50 \times 70 - 170$ nm (DeRocher et al., 2020). Die Länge der Kristalle kann zwischen $100 - 1000$ nm variieren (Wang et al., 2008) (Abbildung 1 A).

In der Literatur wird häufig von einer die HAP-Kristalle umgebenden Schicht aus Wasser, Proteinen und Lipiden gesprochen. Neuere Studien zeigen im ausgereiften Schmelz jedoch eine nahezu vollständige Resorption der Proteinmatrix durch Kristallwachstum und liefern keinen Hinweis auf eine Kristall-umgebende Proteinhülle (Daculsi und Kerebel, 1978; Kallistova et al., 2017; Kerebel et al., 1979).

Die HAP-Kristalle lagern sich zu säulen- bzw. stäbchenförmigen Verbänden zusammen, die als Schmelzprismen bezeichnet werden. Der Durchmesser der Schmelzprismen steigt von ca. $4 \mu\text{m}$ zentral auf ca. $8 \mu\text{m}$ in Richtung der Schmelzoberfläche an (Boushell und Sturdevant, 2019). Die Prismen zeigen häufig einen schlüssellochförmigen Querschnitt, einen Prismenkopf mit parallel ausgerichteten Kristallen und einem Prismenschwanz, in dem die Kristalle in einem Winkel von ca. 60° zur Prismenachse auseinanderlaufen (Meckel et al., 1965).

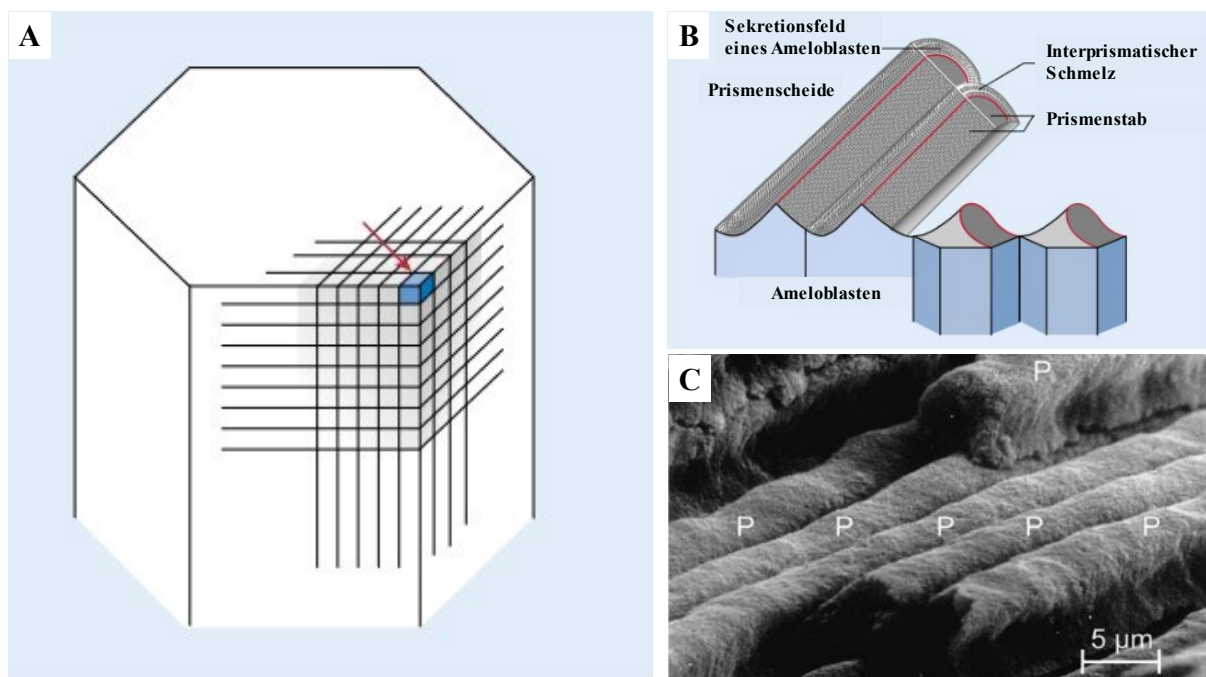


Abbildung 1: Schematische Darstellung der HAP-Kristallstruktur, Schmelzprismen und rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Zahnschmelzprismen

A: Schematische Darstellung der Struktur eines HAP-Kristalls. **B:** Schematische Darstellung der dreidimensionalen Anordnung der Zahnschmelzprismen in den Schmelzprismen. **C:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Zahnschmelzprismen. Die einzelnen Schmelzprismen sind mit „P“ markiert. Modifiziert nach Ekstrand und Zero (Ekstrand und Zero, 2012).

Zwischen den Schmelzprismen liegen ungeordnete Apatitkristalle, die als interprismatischer Schmelz bezeichnet werden. An der Oberfläche befindet sich häufig eine 20 - 30 µm breite prismenfreie Zone mit dicht gepackten, senkrecht zur Oberfläche ausgerichteten Schmelzkristallen (Hellwig et al., 2018). Dieser Schmelzbereich wird als aprismatischer Schmelz bezeichnet und kann beim Ätzen des Zahnschmelzes z. B. für adhäsive Verfahren Probleme im Haftverbund verursachen, da aufgrund der fehlenden Schmelzprismen keine mikroretentive Verankerung zwischen Adhäsiv und Zahnschmelz entstehen kann (Ekstrand und Zero, 2012, Hellwig et al., 2018).

Innerhalb eines Schmelzprismas verlaufen die HAP-Kristalle bis zur Prismenscheide parallel zur Prismenlängsachse. Dort ändern die Kristalle abrupt ihre Richtung, um in der Peripherie quer zu verlaufen (Pearce und Nelson, 1989). Deshalb ist der interkristalline Raum zwischen den HAP-Kristallen in der Peripherie größer als im Prismeninneren. An den Prismengrenzen treffen die Peripheriebereiche mehrerer Prismen aufeinander, was zu deutlich vergrößerten interkristallinen Räumen im Vergleich zum Prismenkern führt (Abbildung 1, B). Diese Bereiche sind aus chemischer und kariesätiologischer Sicht von großer Relevanz, da z. B. Säuren oder andere Stoffe die Bereiche größeren Porenvolumens leichter penetrieren können (Ekstrand und Zero, 2012). Aufgrund der verschiedenen räumlichen Anordnungen der Prismen zeigen sich licht- und polarisationsmikroskopisch typische histologische Charakteristika des Zahnschmelzes wie z. B. Hunter-Schregersche-Streifen, Schmelzspindeln, Imbrikationslinien, Perikymatien und Retzius-Streifen (Hunter und Bell, 1839; Retzius, 1837; Whittaker, 1987).

2.2 Bovine Zahnproben

Bovine Zahnproben eignen sich für viele Laborstudien als Alternative zu Humanzähnen, da sie menschlichen Zähnen in der chemischen Zusammensetzung und den mechanischen Eigenschaften ähnlich sind (Esser et al., 1998). Im Vergleich zu Humanzähnen sind Rinderzähne zudem größer, kostengünstiger, in hoher Stückzahl, ohne kariöse Veränderungen und in einer gleichmäßigeren Zusammensetzung verfügbar. Insbesondere bovine Inzisiven besitzen eine breite, flache, vestibuläre Schmelzfläche, die sich gut für experimentelle Studien eignet (Mellberg, 1992).

In der Mikromorphologie weisen humane und bovine Zähne viele Ähnlichkeiten auf. Es wurden aber moderate Unterschiede in der Anzahl und Größe der Schmelzkristalle sowie in der Anordnung der Schmelzprismen gefunden. Rinderzähne zeigen eine zwischengereihte,

lamellare Anordnung der Schmelzprismen im Vergleich zur Schlüssellochform der Humanzähne (Osborn und Dahlberg, 1972). Zudem besitzen die Schmelzkristalle der Rinderzähne einen größeren Durchmesser und einen breiteren interprismatischen Raum im Vergleich zu humanen Zähnen (Edmunds et al., 1988; Schilke et al., 2000).

Die unterschiedliche Prismenausrichtung kann sich auf die mechanischen Eigenschaften des Schmelzes auswirken (Reeh et al., 1995). So ist boviner Schmelz poröser und weicher als humaner Schmelz. Der vergrößerte interprismatische Raum und die höhere Porosität können erklären, weshalb Rinderzahnschmelz im Vergleich zu humanem Zahnschmelz in vitro mit einer bis zu dreimal höheren Rate demineralisiert (Featherstone und Mellberg, 1981).

Die chemische Zusammensetzung von bovinem und humanem Zahnschmelz ist ebenfalls ähnlich. Unterschiede gibt es aber im Fluoridgehalt; dieser ist bei Rinderzahnschmelz in den äußeren 5 µm mit ca. 200 ppm im Vergleich zu den ca. 1300 ppm Fluorid in Humanzähnen deutlich niedriger (Mellberg und Loertscher, 1974). Nach Davidson et al. (1973) ist der Calciumgehalt von humanem und bovinem Schmelz mit einem Massenanteil von ca. 37 % nahezu identisch und nimmt dabei von der Schmelzoberfläche in Richtung Schmelz-Dentin-Grenze ab. In vitro zeigen sich bei einer linearen diffusionsabhängigen Calciumabgabe von beiden Gruppen jedoch Unterschiede in der Calciumkonzentration. Bis zu einer Lt von mindestens 500 µm weist Rinderzahnschmelz eine homogene Calciumdistribution mit homogenen Calciumkonzentrationen auf, während in humanen Schmelzproben die Konzentration lokal stark variiert (Davidson et al., 1973). Trotz minimaler Unterschiede zeigen Rinderzähne und Humanzähne ähnliche chemische Eigenschaften in In-vitro-Studien. Daher manifestierten Nakamichi et al. bereits 1983 Rinderzähne als adäquaten Ersatz für Humanzähne im Adhäsionstest (Nakamichi et al., 1983).

2.3 Karies

2.3.1 Ätiologie und Pathogenese

In den letzten Jahrzehnten wurden die Entstehungsmechanismen der Karies immer besser verstanden. Karies wird heutzutage als komplexe, multifaktorielle, Biofilm-assoziierte Erkrankung beschrieben, die aus dem Überwiegen von Demineralisationsprozessen im dynamischen Wechsel von De- und Remineralisationsphasen an der Zahnhartsubstanz resultiert (Pitts und Zero, 2016; Selwitz et al., 2007). Weltweit ist Karies die häufigste, nicht-übertragbare chronische Erkrankung weltweit (Marcenes et al., 2013). In einer Übersichtarbeit im Zeitraum

von 1996 - 2016 konnten Carvalho und Schiffner eine Karieserfahrung von mehr als 92 % bei europäischen Erwachsenen feststellen (Carvalho und Schiffner, 2019).

Eine zentrale Rolle bei der Kariesentstehung spielt die regelmäßige Aufnahme von fermentierbaren Kohlenhydraten, vor allem freien Zuckern, die über die Nahrung aufgenommen und von Bakterien im Biofilm zu organischen Säuren verstoffwechselt werden. Die Verstoffwechslung senkt den pH-Wert in der dentalen Plaque (Biofilm), was zu einer Auflösung der Zahnhartsubstanz führt (Shellis, 2012). Insbesondere Saccharose spielt eine entscheidende Rolle in der Kariesentstehung. Sie ist das einzige Substrat für die Synthese extrazellulärer Glucane, die die Akkumulation und Virulenz von Mutans-Streptokokken auf glatten Zahnoberflächen erhöhen. Die extrazellulären Glucane erhöhen die Plaqueporosität, was zu einer verstärkten Säureproduktion unmittelbar an der Zahnoberfläche führt (Zero, 2004). Die Veränderungen der Mikroflora der dentalen Plaque unter dem Einfluss von Saccharose werden durch die ökologische Plaquehypothese erklärt (Marsh, 2003). Sie beschreibt die Verschiebung der Mikroflora in Anwesenheit von Zucker zu einer kariogenen Plaque infolge der unterschiedlichen Reaktionen der Mikroorganismen auf den von Zucker und Säure ausgeübten Selektionsdruck. Die Mikroflora besteht anschließend vermehrt aus unspezifischen, an die Zuckerverwertung angepassten, azidogenen Bakterien (Shellis, 2012).

Das Risiko für die Initiation und Progression der Karies wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst (Harris et al., 2004; Watts, 2004). Ein modernes Konzept der Kariesätiologie schließt neben den genannten, zentralen Elementen individuelle Faktoren (orale Bakterienflora, Speichelfluss), verhaltensbedingte Faktoren (Ernährung, frequente Aufnahme fermentierbarer Kohlenhydrate, Mundhygiene, zahnmedizinische Vorsorge etc.) sowie soziale und psychologische Faktoren (sozioökonomischer Status, Bildungsniveau etc.) mit ein (Pitts et al., 2017; Shellis, 2012).

Ein weiterer bedeutender Faktor in der Kariesentstehung und Prävention in Verbindung mit einer adäquaten Mundhygiene ist Fluorid. Insbesondere die tägliche Anwendung von fluoridhaltiger Zahnpasta im Rahmen einer adäquaten Mundhygiene als gesellschaftliche Norm hat in den letzten Jahrzehnten zu einer weltweiten Reduktion der Kariesprävalenz geführt. Im Zeitraum von 1996 - 2016 konnte bei Erwachsenen ein Rückgang der Kariesprävalenz in Europa um ca. 20 % bezogen auf landesweite Daten ermittelt werden (Carvalho und Schiffner, 2019). Jordan et al. zeigen aus den Ergebnissen der Mundgesundheitsstudien (1997, 2005 und 2014) einen Rückgang der Karieserfahrung in Deutschland von 1997 - 2014 und prognostizieren in Kombination mit einer Bevölkerungsschätzung den weiteren Rückgang der

Karieserfahrung bis zum Jahre 2030 (Jordan et al., 2019). Aus den Daten des Kariesrückgangs sollte jedoch keinesfalls der Bedeutungsverlust der Präventionskonzepte abgeleitet werden. Insbesondere im Milchgebiss konnten bislang nur geringe Reduktionen der Karieslast nachgewiesen werden. Eine aktuelle Übersichtsarbeit zur weltweiten Kariesprävalenz von Kindern zeigt im Zeitraum von 1995 - 2019 eine Kariesprävalenz von 46,2 % im Milchgebiss und 53,8 % im bleibenden Gebiss. Im Milchgebiss ist mit zunehmender Stichprobengröße und fortschreitendem Studienjahr sogar ein Anstieg der Karieserfahrung zu beobachten (Kazemina et al., 2020).

2.3.2 Chemische Grundlagen der Karies

Die chemischen Grundlagen der Karies basieren auf empirischen Definitionen der Löslichkeit und fundamentalen Prinzipien der physikalischen Chemie. Zentrale Prozesse sind die De- und Remineralisation der Zahnhartsubstanz, die einer Auflösung und Ablagerung von Kristallen an der Oberfläche eines in eine wässrige Lösung eingetauchten Festkörpers entsprechen (P. Shellis, 2012). Diese Prozesse sind abhängig von der Löslichkeit und dem Sättigungsgrad des Festkörpers (Zahnschmelz) sowie der Konzentration der Ionen innerhalb der Lösung (Speichel, Plaque) (ten Cate et al., 2003). Hinzu kommen Prozesse der Adsorption von Inhibitorsubstanzen, im Besonderen Makromolekülen wie Peptiden und Proteinen an der Zahnoberfläche, die das Kristallwachstum hemmen und innerhalb biologischer Flüssigkeiten wie Speichel und Plaque zahlreich vorkommen (Acevedo, 2010; Moreno et al., 1979).

Die Aufnahme von fermentierbaren Kohlenhydraten in den dentalen Biofilm initiiert den kariogenen Säureangriff, welcher zum charakteristischen Änderungsmuster des Plaque-pH-Werts, der sogenannten Stephankurve führt (Marsh, 2008). Bei einem Abfall unter den kritischen pH-Wert von ca. pH 5,5 kann es zur Demineralisation der Zahnhartsubstanz (Läsionsbildung) kommen (ten Cate et al., 2003). Chemisch wird die kariöse Läsionsbildung durch die Auflösung der Schmelzminerale, die Diffusion von Säure in die Schmelzmatrix und Diffusion von Schmelz-Ionen nach außen gesteuert (Shellis, 2012). Charakteristisch ist eine Zunahme der Löslichkeit von der Schmelzoberfläche in Richtung der Schmelz-Dentin-Grenze. Die größte Porenstruktur und damit höchste Löslichkeit liegt an den Prismengrenzen (interprismatische Substanz) vor, die im Kariesprozess Diffusionspfade bilden (Johnson, 1967; Shellis, 1996).

Ein typisches Merkmal von kariösen Schmelzläsionen ist die hypermineralisierte Oberflächenschicht (OS). Ten Cate zeigte in In-vitro-Studien an künstlichen Läsionen die Entstehung einer sogenannten pseudointakten OS ausschließlich in Anwesenheit von Fluoridionen (ten Cate and Duijsters, 1983).

In Kapitel 2.1.1 wurde der chemische Aufbau des Zahnschmelzes als Konfiguration des Minerals HAP mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften beschrieben. Während der Austausch von Calcium-, Phosphat- und Hydroxidionen durch sogenannte „Verunreinigungen“ wie Magnesium, Natrium oder Carbonat die Kristallstruktur beeinträchtigt und die Löslichkeit des Hydroxylapatitkristalls erhöht, verdichtet und stabilisiert sich durch den Einbau von Fluoridionen die Kristallstruktur, während die Löslichkeit sinkt (Arends und Christoffersen, 1990; Brown et al., 1977; Christoffersen, 1981; Young und Brown, 1982). Den größten karieshemmenden Effekt hat eine fluoridhaltige, den Zahn umgebende und das HAP benetzende Flüssigkeit. Die Fluoridionen ersetzen Hydroxid-Ionen und stabilisieren die Calcium-Ionen im Kristallgitter. In Abhängigkeit von der Fluoridkonzentration verringert sich die Löslichkeit und die Lösungsrate des HAP innerhalb einer sauren Lösung im Vergleich zu einer nicht fluoridierten Lösung. Im In-Vitro-Modell kann in Abhängigkeit von der Fluoridkonzentration (0 - 10 ppm Fluorid) die Entstehung von Erosionen und initialkariösen White-Spot-Läsionen (WSL) oder ein kompletter Schutz vor Demineralisation erreicht werden (ten Cate und Duijsters, 1983b).

2.3.3 Schmelzkaries

In einer kariogenen Umgebung kann Karies an allen exponierten Zahnoberflächen wie Schmelz, Dentin oder Wurzelzement auftreten.

Im Folgenden werden die Grundlagen des klinischen und histologischen Erscheinungsbildes der Schmelzkaries zusammengefasst. Die Schmelzkaries tritt in der Regel in Plaqueretentionsbereichen, sogenannten Prädilektionsstellen (Fissuren, Approximalflächen), unter einer akkumulierten Plaqueschicht auf. Der Kariesprozess beginnt mit mikroskopisch feinen, reversiblen Demineralisationen des Zahnschmelzes unterhalb einer kariogenen und hinsichtlich der Schmelz-Ionen untersättigten Plaque (Buchalla, 2012; Thylstrup et al., 1994).

Im Anfangsstadium der Karies vergrößert sich durch die Demineralisation die Porengröße der Schmelzkristalle, wodurch ein höherer Anteil des einfallenden Lichtes reflektiert wird und die Initialkaries weißlich-opak erscheint. In der Literatur wird sie häufig als WSL bezeichnet

(Buchalla, 2012; Ekstrand et al., 1998; Munjal et al., 2016). Die Bewertung und Diagnose des klinischen Erscheinungsbildes der Karies erfolgt standardisiert nach dem *International Caries Detection and Assessment System* (ICDAS) (Pitts, 2004; Pitts und Ekstrand, 2013). Die Initialkaries kann sich entlang der Schmelzprismen häufig kegelförmig bis zu mehrere Hundert Mikrometer in den Schmelz ausbreiten. Mithilfe der Durchlicht- und Polarisationsmikroskopie konnte das gesamte histologische Erscheinungsbild der Schmelzkaries erschlossen werden (Buchalla, 2012). In Abhängigkeit vom optischen Brechungsindex können durch unterschiedliche Imbitionsmedien bis zu vier voneinander abgrenzbare Zonen unterschieden werden (Abbildung 2). Nach der Einlage in Wasser zeigt das traditionelle histologische Schmelzpräparat im senkrechten Schnitt zur Läsionsoberfläche die OS und den Läsionskörper. Mithilfe eines öligen Imbitionsmediums (z. B. Chinolin), ist eine dunkle Zone (DZ, Abbildung 2) am Läsionskörper von einer transluzenten Zone (TZ, Abbildung 2) im Schmelzinneren in Richtung Dentin zu unterscheiden (Hellwig et al., 2018). Der optische Effekt innerhalb der transluzenten Zone entsteht durch eine Vergrößerung der Poren in der Prismenperipherie, welche größer als die Moleküle des Chinolins sind (Silverstone et al., 1981). Das Porenvolumen in der transluzenten Zone kann von 0,1 % bei gesundem Schmelz auf bis zu 1 % erhöht sein, während die Schmelzkristalle geringfügig kleiner sind, was auf eine beginnende Demineralisation hindeutet (Buchalla, 2012; Darling, 1958).

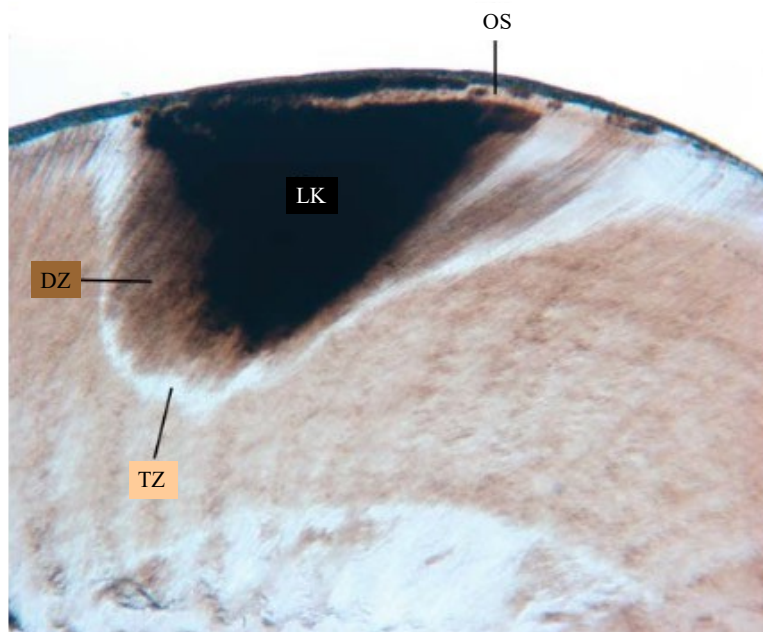


Abbildung 2: Histologischer Schnitt durch eine schmelzbegrenzte kariöse Läsion

Die durchlichtmikroskopische Aufnahme zeigt von außen nach innen die OS, den Läsionskörper (LK), die dunkle Zone (DZ) und die transluzente Zone (TZ) (modifiziert nach (Buchalla, 2012)).

Die DZ (Abbildung 2) besitzt ein Porenvolumen von ca. 2 - 4 % und kann sehr häufig in Läsionsschnitten nachgewiesen werden. Es gibt Hinweise auf durch Remineralisationsprozesse aufgefüllte Poren innerhalb der DZ, die kleiner als Chinolinmoleküle sind (Silverstone, 1973). Die verkleinerten Poren sind mit Luft gefüllt, wodurch sich die Lichtstreuung innerhalb dieser Zone erhöht und gleichzeitig zu einer verstärkten Rückstreuung führt. Dieses Phänomen erklärt die dunkle Farbe, die im Durchlichtmikroskop erscheint (Buchalla, 2012). Für Remineralisationsprozesse sprechen außerdem Kristalle von höherem Durchmesser (50 – 100 nm) im Vergleich zu gesundem Schmelz (40 nm), die innerhalb der DZ nachgewiesen wurden (Silverstone, 1983).

Der LK kann in allen histologischen Präparaten nachgewiesen werden. Er weist den höchsten Grad der Demineralisation und mit ca. 5 - 25 % das größte Porenvolumen innerhalb aller Zonen der Schmelzkaries auf (Buchalla, 2012; Schroeder, 1996). Die äußerste Schicht der Schmelzkaries ist mit einer Breite von ca. 10 - 120 µm und einem Mineralverlust von 1 - 10 % die pseudointakte OS (Buchalla, 2012; Hellwig et al., 2018). Sie ist gekennzeichnet durch einen relativ hohen Mineralgehalt, der sie im mikroskopischen Bild und klinisch intakt erscheinen lässt (Elmar Hellwig et al., 2018). Durch Remineralisationsprozesse kann das Porenvolumen bei einer Kristallgröße von etwa 40 - 80 nm innerhalb der pseudointakten OS unter 5 % liegen. (Buchalla, 2012). Die charakteristischen Zonen der Schmelzkaries sind ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal von Läsion und Erosion, bei der es zur direkten permanenten Auflösung des Schmelzes durch Säuren kommt (Lussi et al., 2011).

2.4 Modellformen zur Untersuchung von Zahnhartsubstanz

Für die Untersuchung von Zahnhartsubstanz existieren verschiedene Modellformen. Grundsätzlich lassen sich In-vitro-, In-vivo- und In-situ-Studien voneinander unterscheiden. Es können sowohl humane Zähne als auch Zähne tierischen Ursprungs wie z. B. bovine Zähne verwendet werden. Auf die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Modellformen soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

In-vitro-Studien sind Laborstudien, die häufig zu Beginn der Testung neu entwickelter Produkte durchgeführt werden. Im Bereich der Zahnmedizin werden sie z. B. für mechanische-Adhäsionstests und Untersuchungen von De- und Remineralisationsvorgängen der Zahnhartsubstanz verwendet. Dabei wird versucht, in einer kontrollierbaren Umgebung, die Bedingungen der Mundhöhle zu simulieren. Trotz komplexer Studiendesigns ist es schwer, die

Prozesse der natürlichen Kariesentstehung zu imitieren (Yu et al., 2017). Die Vereinfachung der Untersuchungsumgebung im In-vitro-Versuch führt dafür häufig zu reproduzierbaren Versuchen und Ergebnissen (Salli und Ouwehand, 2015).

In-vivo-Studien dienen zur Validierung von Erkenntnissen aus Laborstudien. Sie werden im lebenden Organismus sowohl mit menschlichen Studienteilnehmenden als auch im Tierversuch intraoral durchgeführt. Schwierigkeiten sind nicht kontrollierbare Schwankungen innerhalb der Mundhöhle sowie ethische Probleme (Tang et al., 2003).

In-situ-Studien werden häufig als Schnittstelle zwischen In-vitro- und In-vivo-Versuchen gesehen. Sie bestehen in der Regel aus Zahnhartsubstanz, die über eine Apparatur in der Mundhöhle fixiert ist und werden z. B. für die Kariespräventionsforschung genutzt (Yu et al., 2017). Die Ergebnisse von In-situ-Studien sind schwer kontrollierbar, schwer vergleichbar, schwer reproduzierbar und stark abhängig von der Compliance der Studienteilnehmenden (White, 1992). Im Vergleich zu In-vivo-Studien sind die einwirkenden Parameter jedoch verringert und die intraorale Versuchsdauer ist kürzer.

2.4.1 Methoden zur Herstellung künstlicher Läsionen

Für zahnmedizinische In-vitro-Studien werden häufig Zähne mit initialen Schmelzläsionen bzw. WSL benötigt. Humane Zähne mit natürlichen WSL für Laborstudien sind schwer verfügbar und teuer, da nur wenige Zähne mit natürlichen IC wie z. B. im Rahmen einer kieferorthopädischen Behandlung extraktionsbedürftig sind. Aus diesem Grund kommen für Laborstudien häufig Zähne mit künstlichen Läsionen zum Einsatz. Die Methoden zur Herstellung artifizierlicher Läsionen können erneut in verschiedene Modelle eingeteilt werden. Nach Fontana et al. können bakterielle (Biofilm-) Modelle (Demineralisation durch bakteriell produzierte Säuren, *artificial mouth*, in situ/in vivo) von chemischen Systemen (Demineralisation durch Säuren oder pH-Cycling) unterschieden werden (Fontana et al., 1996).

Aufgrund der hohen Komplexität der Mundflora wurden verschiedenste In-vitro-Biofilm-Modelle entwickelt. Dabei existieren sowohl vereinfachte Monokultur-Modelle als auch komplexe Multispezies-Artificial-mouth-Systeme wie z. B. das *Multi-station continuous-culture biofilm Model* (MSCBM), welches computergesteuert Nährstoffe und Speichel in mehrere Kammern pumpt (Schwendicke et al., 2014). Die vielen variablen Parameter und anspruchsvolle Kultivierbarkeit einiger Mikroorganismen stellen Biofilm-Modelle vor große

Herausforderungen, weshalb sie häufig sehr zeitaufwendig, kostenintensiv und schwer reproduzierbar sind (Maske et al., 2017).

Die häufigsten In-vitro-Studien zur künstlichen Läsionsbildung und Untersuchung von De- und Remineralisationsprozessen sind chemische Systeme (Yu et al., 2017). Oftmals werden Zahnschmelzpräparate mit natürlicher, geschliffener oder polierter Oberfläche in Pufferlösungen oder Gele mit pH-Werten im leicht sauren Bereich eingelagert und demineralisiert. In Abhängigkeit von der Herstellungsmethode bilden sich nach Wochen bis Monaten initiale Schmelzläsionen (Arends und Christoffersen, 1986; Magalhães et al., 2009; Thylstrup et al., 1994). Innerhalb der chemischen Systeme zur Herstellung künstlicher Läsionen lassen sich die Prinzipien der Volumen- und Konzentrationskonstanz sowie pH-Cycling-Modelle unterscheiden.

Bei dem Prinzip der Volumenkonstanz wird eine Zahnprobe in einer Demineralisationslösung mit definiertem Volumen und Ionengehalt gelagert. Typischerweise wird die Lösung während des gesamten Versuchsablaufs nicht gewechselt und das Volumen bleibt unverändert (Kraft und Gängler, 1984). Die Geschwindigkeit der Auflösung des HAP ist eine von Oberflächen- und Diffusionsprozessen abhängige Reaktion (Christoffersen, 1981). In der Lösung kommt es durch akkumulierende Ionen aus der Zahnhartsubstanz (Sättigungsionen) im Laufe der Demineralisation zur Verlangsamung der Reaktion und schließlich zur Ausbildung eines Sättigungsgleichgewichts.

Nach dem Prinzip der Konzentrationskonstanz soll eine annähernd gleichbleibende Konzentration der Demineralisationslösung an der Zahnprobe angestrebt werden. Hierbei können hochvolumige Durchflusssysteme von Titrationssystemen unterschieden werden. Buskes et al. realisierten das Prinzip der Konzentrationskonstanz mithilfe eines 50 Liter-Durchflussapparats, welcher über Elektroden die gleichmäßige Fließgeschwindigkeit, den pH-Wert und die Calcium- und Phosphat-Ionenkonzentration kontrolliert und reguliert (Buskes et al., 1985). Chow und Takagi konnten mithilfe eines Titrationssystems unter Konstanthaltung der Ionenkonzentration der Demineralisationslösung die Geschwindigkeit der Läsionsbildung anhand der Titrationsrate quantitativ beurteilen (Chow und Takagi, 1989).

Eine genauere Simulation der klinischen Kariesentstehung im Rahmen der chemischen Läsionsmodelle ist das pH-Cycling. Dabei werden Schmelzproben in definierten Zeitabständen verschiedenen De- und Remineralisationslösungen ausgesetzt, wodurch der klinische

Kariesprozess mit De- und Remineralisationsintervallen genauer simuliert werden kann (ten Cate und Duijsters, 1982).

2.4.2 Grundlagen der chemischen Herstellung subfizieller Läsionen

Die verschiedenen in Kapitel 2.4.1 genannten Methoden stellen Versuche dar, komplexe Läsionsentstehungen in der Mundhöhle in einem vereinfachten In-vitro-Modell zu simulieren und reproduzierbare Läsionen herzustellen. Grundsätzlich versuchen In-vitro-Läsionsmodelle, möglichst der natürlichen Initialkaries entsprechende Läsionen zu produzieren. Für die Herstellung sogenannter subfizieller Läsionen ist der Erhalt der pseudointakten OS ein wichtiges Merkmal. Mithilfe der pseudointakten OS lassen sich die Läsionen von experimentell erzeugten Erosionen unterscheiden, bei denen diese Schicht fehlt. In der klinischen Situation scheint das Pellikel eine Schutzfunktion gegen Erosionen zu haben (Buchalla, 2012). Im Laborversuch bedarf es einem Oberflächenschutz z. B. Methylendiphosphonsäure (MHDP) (Featherstone et al., 1979), einer Diffusionsbarriere z. B. aus einem natürlichem Makromolekül wie Hydroxyethylcellulose (HEC) (Groeneveld und Arends, 1975) oder einer exakt bestimmten stöchiometrischen Konzentration an Schmelzmineralien (Calcium- und Phosphat-Ionen) innerhalb der Demineralisationslösung, um Erosions- oder Kavitationsdefekte zu vermeiden (Issa et al., 2003; van Dijk et al., 1979; White, 1987).

Ten Cate und Duijsters konnten durch unterschiedliche Zugabe von Fluorid (0-10 ppm) zu sauren Lösungen sowohl Erosionen, WSL als auch einen kompletten Stillstand der Demineralisation erreichen. Eine pseudointakte OS konnte nur in Läsionen festgestellt werden, die in fluoridhaltigen Lösungen hergestellt wurden (ten Cate und Duijsters, 1983b).

Die Läsionsformation ist abhängig von vielen verschiedenen Parametern, insbesondere dem pH-Wert, der Liegedauer in der Demineralisationslösung, dem Sättigungsgrad der Schmelzmineralien, der Anwesenheit von Schmelzauflösungsinhibitoren (Fluorid-Ionen und Proteinen), dem Diffusionskoeffizienten, der Konzentration der undissoziierten Säure sowie Volumen und Viskosität der Lösung (Moron et al., 2013).

2.5 Infiltration

Nach mehrjähriger Entwicklung in Laboren von Universitätszahnkliniken (Meyer-Lueckel et al., 2005, 2007; Mueller et al., 2006; Paris et al., 2007b) wurde im Jahr 2009 mit dem Produkt

Icon® (DMG) die Infiltrationstherapie als mikro-invasives Behandlungsverfahren zur Arretierung von nicht kavittierter Schmelzkaries und Maskierung von mild bis moderat ausgeprägten entwicklungsbedingten Schmelzveränderungen (Fluorose, Trauma) eingeführt. Aufgrund patentrechtlicher Gegebenheiten ist die hier beschriebene Infiltrationstherapie an das Produkt Icon® (DMG, Hamburg) geknüpft. Jedoch wurde bereits seit den 1970er Jahren die grundsätzliche Möglichkeit der Penetration von Kunststoffen in die kapillaren Strukturen humanen Zahnschmelzes beschrieben (Dayila et al., 1975).

Physikalisch werden die penetrierenden Eigenschaften einer Flüssigkeit in einen porösen Festkörper (Schmelzläsion) mithilfe der *Washburn*-Gleichung beschrieben (1). In der Gleichung wird die Schmelzläsion vereinfacht als Bündel von Kapillaren gesehen (Buckton, 2000), in dem die Penetration durch die kapillare Strömung angetrieben wird (Paris et al., 2007a). Der Term in der Klammer entspricht dem sogenannten Penetrationskoeffizienten (PK), (2) (Fan et al., 1975; O'Brien et al., 1978).

$$d^2 = \left(\frac{\gamma \times \cos \theta}{2\eta} \right) r \times t \quad (1)$$

$$PK = \frac{\gamma \times \cos \theta}{2\eta} \quad (2)$$

Zwischen einer Flüssigkeit mit der Viskosität η und Oberflächenspannung γ und einem vollständig benetzbaren Material entsteht ein Kontaktwinkel θ . Je höher die Temperatur und je größer der PK, desto schneller penetriert eine Flüssigkeit durch eine Kapillare mit dem Radius r und legt dabei in der Zeit t den Weg d zurück (Fan et al., 1975).

Im Laufe der Forschung wurden PK verschiedener Monomerkombinationen (Paris et al., 2007a) und deren penetrierenden (Paris et al., 2007b) und kariesinhibierenden (Meyer-Lueckel und Paris, 2008b) Eigenschaften an künstlichen Läsionen untersucht (Meyer-Lueckel und Paris, 2012). Monomerkombinationen mit einem PK > 50 cm/s wurden als Infiltranten bezeichnet (Meyer-Lueckel und Paris, 2008b; Paris et al., 2007b). In verschiedenen Folgeexperimenten wurde die Wirksamkeit der Kariesinfiltration in-vitro und in-situ bestätigt (Paris und Meyer-Lueckel, 2010a, 2010b).

Das Prinzip der Kariesinfiltration ist die Arretierung der Karies durch Penetration eines niedrigviskosen Infiltranten in die poröse Schmelzmatrix. Nach Aushärtung kann eine

gewissermaßen „interne Versiegelung“ der Karies erreicht werden (Meyer-Lueckel und Paris, 2012).

Der klinische Ablauf der Infiltrationsbehandlung beginnt nach absoluter Trockenlegung und Schutz der Nachbarzähne und Schleimhaut mit der Entfernung der hypermineralisierten OS der Kariesläsion oder Schmelzveränderung. Die Läsions-/Schmelzoberfläche wird mithilfe eines HCl-Gels (15 %) für mindestens 2 Minuten angeätzt, um die hypermineralisierte OS zu entfernen und die Schmelzprismen dem Infiltranten zugänglich zu machen. Eine Entfernung der pseudointakten OS mit Phosphorsäuregel ist auch nach längerer Einwirkdauer nicht möglich (Meyer-Lueckel et al., 2007; Paris et al., 2010). Häufig sind mehrere Ätzschritte oder eine Vorbehandlung mittels Mikroabrasion nötig, um eine ausreichende Entfernung der OS zu gewährleisten. Der Ätzerfolg kann anhand der Assimilierungsgeschwindigkeit der WSL/Schmelzveränderung an den gesunden Schmelz beim Auftragen von Wasser oder Ethanol eingeschätzt werden (Meyer-Lückel et al., 2012). Beim Icon®-Konzept wird nach ausreichender Entfernung der OS die Läsion mithilfe von Ethanol (Icon® Dry) getrocknet und gleichzeitig der Ätzerfolg kontrolliert. Anschließend wird der Infiltrant aufgetragen, welcher unter ausreichender Lichtabschirmung bis zu mehrere hundert µm in den Schmelz hineinpenetrieren kann (Meyer-Lueckel und Paris, 2008a).

Bei nicht-kavittierter Schmelzkaries kann die Kariesinfiltration bei approximalen Läsionen angewendet werden. Bei einem Großteil der nicht-kavitierten approximalen Kariesläsionen kommt es zur Progression, weshalb die mikro-invasive Kariesinfiltration eine sinnvolle Behandlungsalternative zum nicht-invasiven Vorgehen wie z. B. Fluoridierungsmaßnahmen ist (Mejäre et al., 2004; Meyer-Lueckel und Paris, 2012). Die klinische Wirksamkeit der Infiltration von initialkariösen Läsionen an Approximalflächen konnte in zahlreichen Studien belegt werden (Cebula et al., 2023; Ekstrand et al., 2010; Meyer-Lueckel et al., 2012; Paris et al., 2010).

Ein Nebeneffekt der Infiltrationstherapie, der durch das Auffüllen der Läsionsporen entsteht, ist eine Änderung des Brechungsindex des infiltrierten Schmelzbereichs. Dadurch können die WSL und entwicklungsbedingten Schmelzveränderungen maskiert werden (Paris et al., 2013; Paris und Meyer-Lueckel, 2009). Da der Brechungsindex des Infiltrationsmaterials (1,52) im Gegensatz zu den Indizes von Wasser (1,33) und Luft (1,00) nahe am Index von Schmelz/HAP (1,62) liegt, wird die Lichtstreuung mit zunehmendem Infiltrationsgrad reduziert (Houwink, 1974; Wierichs et al., 2017). Aus diesem Grund kommt die Kariesinfiltration heutzutage häufig bei vestibulären kariösen Läsionen nach Nebeneffekten einer kieferorthopädischen

Behandlung, sogenannten *post-orthodontic white spot lesions*, und entwicklungsbedingten (ein Trauma ist nicht entwicklungsbedingt) Schmelzdefekten z. B. durch Trauma oder Fluorose zum Einsatz. Eine aktuelle Übersichtsarbeit bestätigt die ästhetische Maskierung von WSL und Fluorose durch die Infiltrationstherapie (Bourouni et al., 2021). Die Infiltration von Zähnen mit komplexen entwicklungsbedingten Schmelzveränderungen wie MIH ist möglich, jedoch gelingt häufig keine vollständige Infiltration der Läsion, wodurch die klinischen Ergebnisse nicht befriedigend sind. Crombie et al. erreichten in einer In-vitro-Studie an extrahierten MIH-Zähnen eine durchschnittliche Infiltration von $23 \pm 15,2$ % des Läsionsareals und zeigten, dass die Läsionsmuster, das Penetrationsausmaß und die Veränderung der Härte von infiltrierte MIH-Läsionen schwer vorhersehbar sind (Crombie et al., 2014). Weitere Studien werden zur Einschätzung der klinischen Wirksamkeit bei komplexen entwicklungsbedingten Veränderung benötigt (Meyer-Lückel et al., 2012).

2.6 MDP

Seit Einführung der dentalen Adhäsivtechnik werden die erhältlichen Adhäsivsysteme stetig vereinfacht und verbessert. Moderne selbstätzende Adhäsive und Universaladhäsivsysteme versprechen eine spezifische chemische Interaktion mit korrespondierenden Strukturen des Zahnes, um eine stabilere und beständigere Adhäsion zu erzielen, ohne dafür eine zusätzliche Zahnpräparation für eine makromechanische Retention zu benötigen (Carrilho et al., 2019).

Die chemische Interaktion wird durch funktionelle Monomere wie dem Phosphatestermonomer 10-Methacryloyloxydecyldihydrogenphosphat (MDP), das 1981 von Kuraray entwickelt wurde, ermöglicht. MDP besteht aus einer endständigen polymerisierbaren Methacrylgruppe, einem flexiblen hydrophoben Alkylenspacer als Verbindungsgruppe und einer hydrophilen, sauren Phosphatgruppe zur Säuredemineralisierung und chemischen Bindung an HAP (Ikemura et al., 2006; Kuraray Noritake Dental, 2021).

Bereits bei der Entwicklung der Dentin-Adhäsive wurde das Phänomen der Hybridisierung entdeckt. Die Hybridisierung beschreibt die Eigenschaft bestimmter bifunktioneller Monomere, in das Dentin einzudringen und nach der Polymerisation innerhalb der Dentin-Matrix eine hybride Schicht aus Kunststoff, Kollagen und HAP zu bilden, die eine hohe Haftfestigkeit, Versiegelung gegen Flüssigkeiten und Säurebeständigkeit aufweist (Nakabayashi, 1992). Ebenso bilden selbstätzende MDP-haltige Adhäsivsysteme Mikrohybridschichten und interagieren chemisch mit dem darin verbliebenen HAP (Shibuya et al., 2019).

In einer In-vitro-Untersuchung an humanen Schmelzproben zeigten Li et al. (2010) bei Anwendung von MDP-haltigen Bonding-Systemen die Ausbildungen einer säure- und basenbeständigen Zone, der *acid and base resistant zone* (ABRZ). MDP zeigte zudem eine stabilere Bindung an HAP im Vergleich zu anderen funktionellen Monomeren, was durch signifikant höhere Mikroscherhaftigkeiten bestätigt werden konnte (Li et al., 2010).

Bei der Anwendung von MDP-haltigen *self-etch*-Adhäsiven kommt es zur partiellen Demineralisation der Dentinoberfläche und Freisetzung von HAP (Yoshida et al., 2004). Daraufhin kommt es zur chemischen Interaktion zwischen MDP und HAP mit anschließender Ablagerung von MDP-Calcium-Salzen. Die MDP-Calcium-Salze sind in saurer Monomerlösung hydrolysebeständig und zeigen eine geringere Löslichkeit als Salze, die von anderen funktionellen Monomeren gebildet wurden (Fukeyawa et al., 2006; Takahashi, 2014). Der atomare Aufbau des MDP-Moleküls begünstigt die chemischen Wechselwirkungen zwischen MDP und HAP. Zudem tragen die wasserunlöslichen MDP-Calcium-Salze zum Schutz der Kollagenfasern des Dentins bei (Carrilho et al., 2019).

Verunreinigungen der funktionellen Monomere und die Bildung von sogenannten 10-MDP-Dimeren beeinträchtigen die Hybridisierung, die Bildung von MDP-Calcium-Salzen und Nanoschichten. Für eine dauerhafte adhäsive Verbindung ist MDP in einem hohen Reinheitsgrad erforderlich (Yoshihara et al., 2015).

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Im Folgenden werden zunächst die Materialien und dann die übergeordneten Methoden beschrieben, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Anschließend wird das unterschiedliche spezielle Vorgehen bei den vielfachen erforderlichen Vorversuchen dargestellt, ehe die im Hauptversuch eingesetzte Methode erläutert wird.

Die experimentellen Untersuchungen wurden in den Laboren von DMG (Dental-Material Gesellschaft mbH, Hamburg) durchgeführt. Alle Materialien, Chemikalien und Instrumente wurden ebenfalls von DMG für die In-vitro-Studie gestellt. Die Chemikalien stammten von den angegebenen Firmen (Tabelle 1) oder aus dem Firmenbestand des DMG-Chemikalienlagers und wurden in höchstmöglicher Qualität bezogen.

Tabelle 1: Übersicht über Materialien und Hersteller

| Chemikalie | Hersteller |
|---|--|
| Calciumchlorid Dihydrat | Merck, Darmstadt |
| Calciumnitrat Tetrahydrat | Merck, Darmstadt |
| Essigsäure | CHEMSOLUTE, TH. Geyer, Renningen |
| Fluorid-Stammlösung | Certipur, Merck, Darmstadt |
| Hydroxyethylcellulose | Dental-Material Gesellschaft mbH, Hamburg |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck, Darmstadt |
| Kaliumhydroxid-Plätzchen | Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten |
| Methylenediphosphonsäure | Merck, Darmstadt |
| Natriumacetat | Merck, Darmstadt |
| Salzsäure | CHEMSOLUTE, TH. Geyer, Renningen |
| Thymol | Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten |
| Kaliumchlorid | Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten |
| MDP | Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten |
| Tinopal OB | BASF, Ludwigshafen am Rhein |
| Materialien für die Infiltration | |
| Icon®-Tinopal OB | Dental-Material Gesellschaft mbH, Hamburg |
| Icon® Dry | Dental-Material Gesellschaft mbH, Hamburg |
| Icon® Prime | Dental-Material Gesellschaft mbH, Hamburg |

3.2 Entwicklung eines Läsionsmodells

Zur Herstellung adäquater artifizieller Schmelzläsionen wurden experimentelle Kariesmodelle aus der Literatur und aus firmeninternen Experimenten beurteilt. Die Lösungsansätze, Lösungszusammensetzungen, die LT und Beschaffenheit der produzierten Läsionen wurden miteinander verglichen. Hierbei erzielten diejenigen Läsionen an Rinderzähnen hinsichtlich LT und Stabilität der Läsionen die besten Ergebnisse, die mit Demineralisationslösungen basierend auf dem Ansatz der Buskes-Lösung erzeugt wurden (Buskes et al., 1985). Außerdem zeigten die Lösungsansätze nach ten Cate (ten Cate und Duijsters, 1983a) und eine Lösung aus Hydroxyethylcellulose (HEC) (Carstens, 2006) bereits nach kurzer Zeit hohe LT.

Da die Buskes-Lösung in der Literatur und in Voruntersuchungen die vielversprechendsten Läsionen hervorbrachten, sollte sie bei unterschiedlichen Fluoridkonzentrationen und pH-Werten weiter untersucht werden. Demnach wurden sechs auf dem Ansatz der Buskes-Lösung basierende MHDP-Lösungen angesetzt. Die Demineralisationslösung basierte auf einem Acetatpuffer mit einem pH-Wert zwischen 4,7 und 4,9.

Für die Entwicklung eines optimalen Läsionsmodells wurden zusätzlich zu den Buskes-Lösungsansätzen eine Acetatpufferlösung nach ten Cate und eine HEC-Lösung nach Carstens angesetzt (ten Cate and Duijsters, 1983; Carstens, 2006). Die ten Cate-Lösung (Lösung C) wurde mit einem pH-Wert von 4,5, die HEC-Lösung (Lösung D) mit einem pH-Wert von 4,9 angesetzt. Die Übersicht über alle Lösungsansätze ist in Tabelle 2 zu finden. Darüber hinaus wurde im Verlauf des künstlichen Kariesmodells eine Remineralisationslösung nach ten Cate und Duijsters angesetzt (ten Cate und Duijsters, 1982).

Die Buskes-Lösungsansätze bestanden aus zwei Gruppen mit jeweils drei Untergruppen; Lösungsreihe A mit einem pH-Wert von 4,9 sowie Lösungsreihe B mit einem pH-Wert von 4,7. Beide Lösungsreihen wurden mit absteigenden Fluoridkonzentrationen in den Untergruppen (A1-A3 und B1-B3) von 0,5 ppm, 0,1 ppm und 0,05 ppm angesetzt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Lösungsansätze bezüglich pH-Wert, Volumen und Fluorid-Konzentration

| Name | Lösung | pH-Wert | Lösungsvolumen | Fluorid-Konzentration |
|------|----------|---------|----------------|-----------------------|
| A1 | Buskes | 4,9 | 360/480 ml | 0,5 ppm |
| A2 | Buskes | 4,9 | 360/480 ml | 0,1 ppm |
| A3 | Buskes | 4,9 | 360/480 ml | 0,05 ppm |
| B1 | Buskes | 4,7 | 360/480 ml | 0,5 ppm |
| B2 | Buskes | 4,7 | 360/480 ml | 0,1 ppm |
| B3 | Buskes | 4,7 | 360/480 ml | 0,05 ppm |
| C | ten Cate | 4,5 | 360/480 ml | 0,05 ppm |
| D | HEC | 4,9 | 360/480 ml | 0 ppm |

3.3 Herstellung der Demineralisationslösungen

Die Buskes-Stammlösung für die Lösungsansätze A1-A3 und B1-B3 wurde in einem 5 l-Erlenmeyerkolben, die Lösungen C und D jeweils in einem 2,5 l-Erlenmeyerkolben angesetzt. Die Chemikalien wurden mit einer Analysewaage (Mettler Toledo, Analysewaage XS204) abgewogen bzw. einer Messpipette/Einkanalpipette (Eppendorf Reference® 2) pipettiert. Die Reagenzien wurden nacheinander in die Erlenmeyerkolben hinzugegeben und die Lösung bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Durchmischung auf einem Magnetrührer mit einem Zylinder-Magnet-Rührstäbchen gerührt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von Kalilauge und Salzsäure unter Kontrolle durch ein pH-Meter (inoLab 720, Messreihe Sen Tix 61) eingestellt. Die Zusammensetzungen der Lösungen und Stammlösungen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Das Verhältnis von Lösungsvolumen der Demineralisationslösung zur exponierten Schmelzfläche der Rinderzahnproben wurde nach Magalhães et al. auf 30 ml Lösung pro $4 \text{ mm} \times 4 \text{ mm} = 16 \text{ mm}^2$ Schmelzfläche festgelegt (Magalhães et al., 2009). Die freigelegte Schmelzfläche pro Rinderzahn betrug demnach exakt 16 mm^2 . Es wurden in den Methoden 1, 2 und 4 parallel 12 Proben in 360 ml Lösung eingelagert und demineralisiert (Kapitel 3.5). In Methode 3 wurden 16 Proben ($16 \times 30 \text{ ml} = 480 \text{ ml}$) in 480 ml Lösung gelagert; das Verhältnis von Lösungsvolumen zu Schmelzfläche blieb gleich.

Tabelle 3: Lösungsansätze der Demineralisationslösungen und Stammlösungen

| Lösung | Lösungs- volumen | Inhaltsstoff | Konzentration | Volumen | Masse |
|------------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------|----------------|--------------|
| Buskes | 5000 ml | Calciumchlorid-Dihydrat | 3,00 mM | | 2,205 g |
| | | Kaliumdihydrogenphosphat | 3,00 mM | | 2,041 g |
| | | MHDP-Stammlösung | 6,00 µM | | 10,000 g |
| | | Eisessig | 0,05 M | | 15,021 g |
| | | KOH-Lösung | 8,66 M | 20 ml | |
| | | Thymol | | | 0,005 g |
| ten Cate | 1500 ml | Kaliumdihydrogenphosphat | 2,20 mM | | 0,450 g |
| | | Calciumnitrat Tetrahydrat | 2,20 mM | | 0,780 g |
| | | Acetatpuffer | 0,05 M | 1500 ml | |
| HEC | 500 ml | Hydroxyethylcellulose | 3,00 % | | 16,000 g |
| | | Kaliumchlorid | 1,00 M | | 37,780 g |
| | | Natriumacetat | 0,200 M | 175 ml | |
| | | Essigsäure | 0,200 M | 75 ml | |
| | | Calciumchlorid-Dihydrat | 150,00 mM | | 8,325 g |
| | | Kaliumdihydrogenphosphat | 90,00 mM | | 6,124 g |
| | | Aqua bidest. | | 250 ml | |
| Kalilauge | 50 ml | Kaliumhydroxid-Plätzchen | 8,66 M | | 28,055 g |
| | | Aqua bidest. | | 50 ml | |
| Salzsäure | 100 ml | Salzsäure | 10,00 % | | 27,000 g |
| | | Aqua bidest. | | 73 ml | |
| MHDP- Stammlösung | 100 ml | Methylendiphosphonsäure | 3,00 mM | | 0,0528 g |
| | | Aqua bidest. | | | 99,950 g |

3.4 Vorbereitung der Prüfkörper

3.4.1 Zahnproben

Für die Studie wurden insgesamt 192 Rinderzähne verwendet. Bis zum Versuchsbeginn lagerten die Zähne in 0,05 % Thymol-Lösung. Die Zähne wurden mit destilliertem Wasser gereinigt und anschließend mittels öl- und wasserfreier Druckluft getrocknet. Nach makroskopischer und mikroskopischer Untersuchung wurden ausreichend große Rinderzähne mit intakter Schmelzoberfläche ausgewählt und in die experimentelle Studie eingeschlossen.

Die Rinderzahnproben wurden getrocknet und mit der vestibulären Fläche nach unten gerichtet in zylinderförmigen Silikonformen (ca. 30 mm Durchmesser) in Einbettkunststoff aus Methylmethacrylat-Kaltpolymerisat (Technovit 4071, Heraeus Kulzer) eingebettet. Die eingebetteten Rinderzahnproben wurden mit einer Schleifmaschine (Struers Tegra Pol 21) und Schleifpapier (#500 Körnung Sic-paper) unter Wasserkühlung geschliffen (150 UpM, 40 s, 25 N, gegenläufig), bis eine ausreichend große Schmelzfläche freigelegt war. Die Politur erfolgte mit einer Diamantscheibe (250 mm, 150 UpM, 2 min, 25 N, gegenläufig) und einer Suspensionslösung (Dia Pro Floc 3 µm, 1 - 1,5 ml Suspension, 2 min Laufzeit) bis eine glatte, glänzende Schmelzoberfläche sichtbar wurde.

Die polierten Rinderzahnproben wurden zum Schutz der Schmelzoberfläche mit Nagellack lackiert, wobei ein 4 × 4 mm großes Schmelzfenster mit einem Papieraufkleber abgedeckt wurde. Die abgedeckten, nicht lackierten Flächen konnten somit der Demineralisationslösung zugänglich gemacht werden und bildeten später die zu untersuchenden Läsionsquadrate. Nach dem Antrocknen des Lackes wurden die Papieraufkleber entfernt und die Zähne bis zum Umfüllen in die Demineralisationslösungen in destilliertem Wasser zwischengelagert.

3.4.2 Demineralisation

Die Demineralisationslösungen wurden für die Läsionsherstellung in lichtundurchlässige Kunststoffbehälter mit Deckel (Polypropylen, Superfos, 192 × 129 × 72 mm, 1200 ml) gefüllt, die eine einschichtige, freie Lagerung der Proben ermöglichten. Der pH-Wert der Lösung wurde mit dem pH-Meter (inoLab 720, Messreihe Sen Tix 61) eingestellt. Die pH-Einstellung wurde in den Kunststoffversuchsgefäßen, die auch zur Lagerung verwendet wurden, vorgenommen, um die Durchführung zu vereinfachen und um Fehler (wie Verlust von Lösung) beim Umfüllen zu vermeiden. Die Rinderzahnproben wurden freiliegend mit nach oben zeigender polierter Schmelzfläche in die Lösungsbehälter gelegt, mit der Demineralisationslösung bedeckt und im

37 °C warmen Trockenschrank inkubiert. Um die Verdunstung der Lösung zu verhindern, waren die Behälter mit einem Deckel verschlossen. Der pH-Wert wurde täglich nach Abkühlung auf Raumtemperatur (nach vier bis fünf Stunden) mit dem pH-Meter gemessen und eingestellt. Dafür wurden alle Proben aus dem Lösungsbehälter genommen. Die Lösung verblieb im Behälter und der pH-Wert wurde nach gründlicher Durchmischung gemessen und durch tropfenweise Zugabe von KOH (8,66 mol/L) oder HCl (10 %) auf eine Genauigkeit von $\pm 0,005$ eingestellt. Nach Entnahme aus den Demineralisationslösungen wurden die Proben unter destilliertem Wasser abgewaschen, getrocknet und mit einer ein bis zwei Millimetern breiten zusätzlichen Kunststoffschicht (Technovit 4071, Heraeus Kulzer) bedeckt. Die Kunststoffschicht diente dem Schutz der Läsion vor der mechanischen Belastung beim Sägen der Schnitte, welche zur Läsionstiefenmessung hergestellt wurden.

Die Rinderzahnproben wurden zwischen zwei bis acht Wochen lang demineralisiert, wobei alle zwei Wochen je zwei Proben aus der Lösung entnommen und analysiert wurden. Bis zur weiteren Verwendung wurden alle Proben nach der Demineralisationszeit in destilliertem Wasser gelagert.

3.4.3 Herstellung der Schnitte

Von den Rinderzahnproben wurden für die lichtmikroskopische Analyse der LT je Prüfkörper zwei Schnitte mittels Präzisionstrennschneider präpariert (Tabelle 4). Die Rinderzahnproben wurden mittig durch das demineralisierte Läsionsquadrat senkrecht zur Zahnoberfläche gesägt. Es wurde die kleinstmögliche Probenstärke von 550 μm , bei der die Probenscheibe gerade nicht brach, ermittelt. Die gesägten Rinderzahnprobenschnitte wurden während der Etablierung der Läsionsherstellungsmethode in destilliertem Wasser gelagert.

Tabelle 4: Technische Parameter für Präzisionstrennschneider IsoMet 500

| | |
|-------------------------|-------------------|
| Scheibendrehzahl | 3000 rpm |
| Vorschubgeschwindigkeit | 15,1 mm/min |
| Schnittlänge | 37 mm |
| Probenstärke | 550 μm |
| Scheibenstärke | 0,635 mm |

3.5 Vorversuche

3.5.1 Herstellung der künstlichen Läsionen

Im Folgenden werden die im ersten Vorversuch durchgeführten Methoden 1 - 4 zur Herstellung der künstlichen Läsionen beschrieben. Alle Lösungen, Proben und Probenschnitte der Methoden 1 - 4 wurden nach den zuvor genannten Verfahren hergestellt.

Methode 1: Alle Lösungen für zwei bis acht Wochen Demineralisationszeit

Im ersten Schritt der künstlichen Läsionsherstellung wurden acht verschiedene Lösungen (A1, A2, A3, B1, B2, B3, C, D) mit je 360 ml Lösungsvolumen und zwölf Proben pro Lösung untersucht. Darin wurden die Proben zwischen zwei bis acht Wochen lang demineralisiert und alle zwei Wochen wurden jeweils zwei Rinderzahnproben aus den Demineralisationslösungen entnommen. Die Proben wurden in jeweils zwei Schnitte gesägt, lichtmikroskopisch untersucht und die LT gemessen. Wurden bei den Untersuchungen zu niedrige LT gemessen, wurde die Demineralisation entsprechend fortgesetzt. Bei der Feststellung von erosiven Defekten innerhalb einer Versuchsreihe wurden alle Proben aus der Lösung entnommen und die Demineralisation wurde abgebrochen. Innerhalb der ersten Methode waren die Ergebnisse der Lösungsreihe B2 aufgrund von hoher LT bei gleichzeitig homogener stabiler Läsionsstruktur am vielversprechendsten.

Methode 2: Lösung B2 – vier Wochen Demineralisationszeit

Die Lösung B2 wurde in vier weiteren Experimenten näher untersucht. Dabei wurde versucht, die LT bei einer größeren Probenanzahl zu reproduzieren und das Herstellungsverfahren der Läsionen zu verbessern. In der zweiten Methode wurden die Versuchsbedingungen verändert. Der pH-Wert wurde nur in der ersten Woche täglich, ab der zweiten Woche unter Kontrolle der pH-Stabilität zwei Mal pro Woche gemessen und eingestellt. Die Methode 2 wurde nach dem Protokoll von Methode 1 wiederholt und zwölf Rinderzähne wurden in je 360 ml Lösungsvolumen für vier Wochen in der Demineralisationslösung gelagert. Dabei wurde erneut die LT nach zwei Wochen an zwei Rinderzahnproben untersucht. Die restlichen Proben wurden nach Ablauf der vier Wochen Demineralisationszeit untersucht.

Methode 3: Lösung B2 – vier Wochen Demineralisationszeit

Da in Methode 2 die LT der Proben aus Lösung B2, welche zuvor mittels Methode 1 bestimmt worden waren, nicht reproduziert werden konnten, sollte in der dritten Methode die Versuchsdurchführung verbessert werden. Um die Messbarkeit des pH-Werts zu verbessern, wurden statt zwölf Proben nun 16 Proben pro Lösung bei gleichem Verhältnis zwischen Lösungsvolumen und LF ($16 \cdot 30 \text{ ml} = 480 \text{ ml}$) in 480 ml statt 360 ml Lösungsvolumen pro Behälter angesetzt. Zusätzlich wurde auf die Klebeabdeckung mit $4 \times 4 \text{ mm}$ Papieraufklebern verzichtet, um Klebereste und Beschädigungen der Läsionsoberfläche zu vermeiden. Stattdessen wurden die Läsionsquadrate exakt ausgemessen und mit Nagellack umzeichnet. Der pH-Wert der Lösung wurde nur in der ersten Woche vier Mal und bereits ab der zweiten Woche zwei Mal pro Woche gemessen und eingestellt. Die Probenvorbereitung, Durchführung und Auswertung erfolgten ansonsten wie in Methode 1.

Methode 4: Lösung B2 – vier Wochen Demineralisationszeit

In Methode 4 wurde das Experiment unter gleichen Versuchsbedingungen wie in Methode 1 mit der Buskes-Lösung B2 bei täglicher pH-Einstellung und einer großen Probenanzahl von insgesamt 96 Rinderzähnen, verteilt auf acht Lösungsbehälter mit je zwölf Rinderzahnproben, in 360 ml Lösungsvolumen wiederholt und auf Reproduzierbarkeit getestet. Nach drei Wochen wurden stichprobenartig vier Proben aus der Lösung genommen und die LT wurde lichtmikroskopisch gemessen, um Erosionen vor Ablauf der Demineralisationszeit auszuschließen. Nach vier Wochen wurden die Proben aus der Lösung genommen und makroskopisch untersucht. Defekte erodierte Proben wurden aussortiert und es wurde exemplarisch an zwei erodierten und zwei intakten Proben die LT gemessen. Die restlichen Rinderzahnproben wurden für das Infiltrationsexperiment verwendet und in destilliertem Wasser zwischengelagert.

3.5.2 Ermittlung des Infiltrationsprotokolls

Vor Beginn des Infiltrationsexperiments wurde in einem weiteren Vorversuch ein geeignetes Protokoll entwickelt, welches die Parameter zur Vorbereitung und Infiltration der Rinderzahnproben festlegte. Zur Ermittlung des Infiltrationsprotokolls wurden vier Gruppen (DRY-A, DRY-B, PRIME-A, PRIME-B) mit unterschiedlichen Protokollen gebildet. „DRY“ kennzeichnet hierbei die Kontrollgruppe, in welcher der Trocknungsschritt mit Icon®-Dry

(Ethanol) erfolgte, wogegen „PRIME“ die Experimentalgruppe kennzeichnet, in welcher Icon®-Prime (1,29 % MDP in Ethanol) für den Trocknungsschritt verwendet wurde (Tabelle 5).

Tabelle 5: Materialien für die Infiltration

| Material | Zusammensetzung |
|-----------------|---|
| Icon® Tinopal | 99,897 % Infiltrant (Methacrylatbasierte Harzmatrix, Additive und Initiatoren) 0,103 % Tinopal OB (2,5-Bis- (5-tert-butyl-2-benzoxazolyl) thiophen) |
| Icon® Prime | 1,29 % MDP in Ethanol |
| Icon® Dry | Ethanol (99 %) |
| Ätzel | Phosphorsäure-Gel (37 %) |

In Gruppe A wurden die Proben mit einem Ätzschritt (37%ige Phosphorsäure), in Gruppe B ohne Ätzschritt vorbehandelt und anschließend infiltriert. Aufgrund der Verwendung von Rinderzähnen anstelle von Humanzähnen wurde im Versuch Phosphorsäure (37 % H₃PO₄) statt Salzsäure (15 % HCl) verwendet, wie es herkömmlicherweise bei einer Icon®-Anwendung der Fall ist. Die Salzsäure wird im klinischen Protokoll für die Entfernung der hypermineralisierten oberflächlichen Schmelzschicht genutzt, die in diesem Experiment fehlt. In beiden Gruppen wurde die Infiltration sowohl mit als auch ohne Phosphorsäureätzung getestet. Das Ziel war es, vergleichbare Ergebnisse der Kontrollgruppe DRY und Experimentalgruppe PRIME zu erhalten.

Da bei niedrigen LT die Läsionen immer vollständig infiltriert werden und sich daher keine vom Material des Trocknungsschrittes abhängigen Unterschiede darstellen lassen, wurden Läsionen mit den höchstmöglichen LT hergestellt. Da jedoch trotz hoher LT beim Vorgehen nach klinischem Herstellerprotokoll noch immer in beiden Gruppen 100%ige Infiltrationen auftraten, musste eine partielle Infiltration der Läsionen über eine Anpassung des Infiltrationsprotokolls an die In-vitro-Bedingungen erreicht werden. Dabei wurden das Infiltrantenvolumen und die Dauer der Infiltration sukzessive verringert, bis eine partielle Infiltration erreicht war. Zu Beginn wurde das Volumen der Trocknungskomponente und des Infiltranten von 5 µl auf 3 µl verringert, da festgestellt werden konnte, dass bereits 3 µl genügen,

um das Läsionsquadrat vollständig zu benetzen. Nachdem aber weiterhin vollständige Infiltrationen auftraten, wurde die Einwirkzeit des Infiltranten schrittweise von 30 s auf 10 s, auf 5 s und schließlich auf 3 s verkürzt. Somit konnte eine unvollständige, partielle Infiltration der Läsion erreicht werden, die einen Vergleich zwischen den Gruppen in Bezug auf die Trocknungskomponente ermöglichte (Tabelle 6).

Tabelle 6: Ermittlung des Infiltrationsprotokolles

| | DRY-A | DRY-B | PRIME-A | PRIME-B* |
|---------------------|---|---------------------------|---|------------------------------|
| Ätzen | 15 s mit H ₃ PO ₄ | Kein Ätzen | 15 s mit H ₃ PO ₄ | Kein Ätzen* |
| Spülen | 30 s mit dest. H ₂ O | | 30 s mit dest. H ₂ O | |
| Trocknung | 3 µl Dry für 60/30 s | 3 µl Dry für 60/30 s | 3 µl Prime für 60/30 s | 3 µl Prime * Für 60/30* s |
| Infiltration | 5/3 µl für 30/10/5/3 s | 5/3 µl für 30/10/5/3 s | 5/3 µl für 30/10/5/3 s | 5/3* µl für 30/10/5/3* s |
| Lichthärten | 40 s | 40 s | 40 s | 40* s |

„*“ markiert die Parameter des final verwendeten Infiltrationsprotokolls

Das finale Infiltrationsprotokoll zeigt, dass kein Ätzschritt für die Infiltration der künstlichen Läsionen nötig ist und dass eine Vorbehandlung der Proben mit 3 ml Icon® Dry für 30 s und eine Infiltration mit 3 µl Icon® Infiltrant für drei Sekunden optimal ist, um vergleichbare partielle infiltrierte Läsionen zu produzieren (Tabelle 6, optimale Infiltrationsbedingungen mit * markiert).

3.6 Hauptversuch - Infiltration DRY vs. PRIME

Insgesamt 70 Rinderzahnproben mit Läsionen nach Methode 4 wurden ausgewählt und im Infiltrationsexperiment verwendet. Die Infiltration wurde nach dem in Kapitel 3.5.2 ermittelten

finalen Infiltrationsprotokoll durchgeführt. Die für die Infiltration verwendeten Materialien sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Für die Applikation des Infiltranten wurde eine Eppendorf-Pipette (0,1 - 10 µl) verwendet. Nach der Infiltration wurde der Überschuss mit wasser- und ölfreier Druckluft verpustet, weitere Überschüsse wurden mit einem Zellstofftuch (Satino prestige, WEPA) vorsichtig entfernt. Anschließend wurde das Areal für 40 s in einem Abstand zur Oberfläche von ca. 1 - 5 mm lichtgehärtet (Mini-LED Supercharged Satelec ACTEON).

Nach Abschluss der Infiltration wurden die Proben zum Schutz der infiltrierten Läsion vor dem Sägen mit einer 1 - 2 mm dicken Kunststoffschicht (Technovit 4071, Heraeus Kulzer) bedeckt. Entsprechend dem Protokoll für die Schnittherstellung der Läsionen (3.4.3 Herstellung der Schnitte) wurden die infiltrierten Rinderzahnproben gesägt und die Schnitte bis zur mikroskopischen Untersuchung in destilliertem Wasser gelagert.

3.7 Lichtmikroskopie

Für die lichtmikroskopische Bestimmung der LT wurden je Probenkörper zwei Schnitte erstellt und untersucht. Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte unter Weißabgleich mittels Auflichtmikroskopie (Leica DFC 295, LEITZ DMRX). Dabei wurden die gesägten Probenscheiben von lateral in Aufsicht auf die gesamte Schnittfläche mikroskopiert. Die Läsionen wurden in 2,5-, 5- und 10-facher Vergrößerung untersucht und mit dem Digitalkamerasystem Leica DFC 295 Bilder in unterschiedlicher Belichtung und Vergrößerung aufgenommen.

3.7.1 Messung der Läsionstiefe

Alle Rinderzahnproben von Methode 1 bis 4 wurden lichtmikroskopisch zur Bestimmung der LT vermessen. Von jeder Rinderzahnprobe wurden zwei Schnitte angefertigt, von denen der jeweils intaktere Schnitt in die Untersuchung eingeschlossen wurde. Die Probenschnitte wurden je nach Größe der Läsion in zwei oder drei Bildausschnitten lichtmikroskopisch in 5-facher Vergrößerung linkseitig, mittig und rechtsseitig untersucht. Mit dem Bildanalyseprogramm Leica Application Suite (LAS) wurden anschließend die LT an mindestens sechs Stellen pro Läsion in µm gemessen, um daraus den Mittelwert zu bestimmen.

3.8 Fluoreszenz-Mikroskopie

3.8.1 Messung der Penetrationstiefe

Für die Analyse und Darstellung des Infiltranten wurde eine Methode mittels Fluoreszenzmikroskopie angewendet. Dafür wurde der Icon® Infiltrant mit Tinopal OB (Icon® Tinopal, Tabelle 5) versetzt. Der Farbstoff Tinopal OB ist ein optischer Aufheller mit einem Absorptionsspektrum im UV-Bereich (Absorptionsmaximum bei 360 - 370 nm). Aus diesem Grund wurde für die Detektion eine zusätzliche UV-Lichtquelle (UVP UVL-4 UV-Lampe, 365 nm) verwendet. Nach dem in Kapitel 3.5.2 beschriebenen Versuchsprotokoll wurde die Infiltration mit Icon® Tinopal durchgeführt. Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte zur Detektion des Tinopal-Signals und Darstellung des Infiltranten unter UV-Licht. Die Positionierung der Lampe war entscheidend für die korrekte Darstellung des Infiltranten im Lichtmikroskop und abhängig von der Läsionsbeschaffenheit, Menge des Infiltranten sowie Intensität der UV-Lampe. Die UV-Lampe wurde individuell für jede Probe positioniert, um ein ausreichend starkes, nicht überbelichtetes Signal zu erhalten. Für die Bestimmung der Penetrationstiefe (P_t) des Infiltranten wurden Aufnahmen mit Auflicht, Auflicht- und UV und reiner UV-Belichtung gemacht. In 5-facher Vergrößerung konnten die Läsionsstruktur und P_t am besten beurteilt werden. Die P_t wurde abhängig von der Läsionsbreite an sechs bis neun Stellen der Läsion gemessen und der Mittelwert wurde berechnet.

3.8.2 Messung der Läsions- und Infiltrationsfläche

Mit 2,5-facher Vergrößerung wurden Aufnahmen von allen Proben aus dem Infiltrationsversuch erstellt. Es wurde die gesamte Fläche der Läsion und des fluoreszierenden Bereichs in einem Bild aufgenommen sowie die Läsionsfläche und die infiltrierte Schmelzfläche ausgemessen. Anschließend wurde das Verhältnis des detektierten Infiltranten im Vergleich zur LF als PP berechnet (Leica Application Suite, LAS).

3.9 Statistische Auswertung

Die ermittelten Daten wurden mit SPSS® Statistics 29.0.1 (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt. Für jede Methode und Versuchsreihe wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Standardfehler des Mittelwerts für alle Zielparameter (LT, PT, PP(LT), LF, IF, und PP(LF)) berechnet. Mithilfe des Levene-Tests

wurde die Varianzgleichheit geprüft. Um die Ergebnisse der Experimentalgruppe und der Kontrollgruppe miteinander zu vergleichen, wurde der t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Zur Annahme statistisch signifikanter Differenzen wurde das zu unterschreitende Signifikanzniveau auf $\alpha = 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuch

4.1.1 Lichtmikroskopische Analyse und Messung der Läsionstiefe

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Läsionstiefenmessung aller acht untersuchten Demineralisationslösungen aus Methode 1 dargestellt (Kapitel 3.5). Es konnten deutliche Unterschiede zwischen den Proben der verschiedenen Lösungen hinsichtlich der LT und Läsionsbeschaffenheit festgestellt werden.

Es zeigt sich in allen Demineralisationslösungen innerhalb der Läsionsformation eine Abhängigkeit vom pH-Wert und der Fluoridkonzentration. Je niedriger der pH-Wert und die Fluoridkonzentration der Lösung waren, desto schneller produzierte die Lösung Läsionen mit einer höheren LT im Vergleich zu Lösungen mit höherem pH-Wert und höherer Fluoridkonzentration.

Kam es im Laufe der Demineralisationszeit zu erosiven Defekten innerhalb der verschiedenen Lösungsreihen, wurde durch Lagerung in einer Remineralisationslösung versucht, die Defekte zu remineralisieren. Trotz Lagerung in einer Remineralisationslösung konnten bei keiner der erodierten Proben aus der Lösungsreihe die Defekte vollständig wiederhergestellt werden.

Nur die Lösungen B1, B2, B3 und C zeigten $LT > 300 \mu\text{m}$ mit relativ intakter OS, von denen jedoch alle Lösungen ab Woche vier bis sechs erosive Veränderungen zeigten. Die lichtmikroskopische Auswertung der Proben der Lösung B2 zeigte nach vier Wochen die stabilste Läsionsstruktur bei der höchsten LT von $400 \mu\text{m}$ in beiden Proben und einer relativ intakten OS. In drei weiteren Methoden wurde versucht, die in Lösung B2 nach vier Wochen erreichten LT und homogene Läsionsstruktur mit einer größeren Probenanzahl zu reproduzieren.

4.1.2 Methode 1 - Lösungsreihe A1-A3

Die Lösungen A1-A3 basierten auf einer Buskes-Lösung mit einem pH-Wert von 4,9 und unterschiedlichen Fluoridkonzentrationen (A1: 0,5 ppm, A2: 0,1 ppm, A3: 0,05 ppm; Tabelle 2: Lösungsansätze bezüglich pH-Wert, Volumen und Fluorid-Konzentration).

Lösung A1

In Lösung A1 zeigten sich nach zwei Wochen noch keine läsionsähnlichen Veränderungen. Der Schmelz wies ein einheitliches Muster ohne erkennbare Demineralisationen auf. Die Grenze zwischen Schmelz und Kunststoff verlief einheitlich und ohne Einbrüche (Abbildung 3, A). Nach vier Wochen konnten mit $285 \mu\text{m}$ ($\text{SD} = 5$) die höchsten LT der Lösungsreihe A gemessen werden. Eine gleichmäßige mattweiße Läsion mit ansteigender LT in Richtung der Läsionsmitte zeigte sich im lichtmikroskopischen Bild (Abbildung 3, B). Auffällig war, dass beide Proben, die in Woche sechs untersucht wurden, keine nachweisbaren Läsionen mehr aufwiesen. Beide untersuchten Proben zeigten eine gleichmäßige Schmelzfläche ohne Demineralisation oder Einbrüche sowie eine intakte OS (Abbildung 3, C). Nach acht Wochen imponierte eine schwach weiß-matte LF mit minimalen Einbrüchen der OS bei einer verringerten LT auf $260 \mu\text{m}$ ($\text{SD} = 0$) in beiden Proben (Abbildung 3, D).

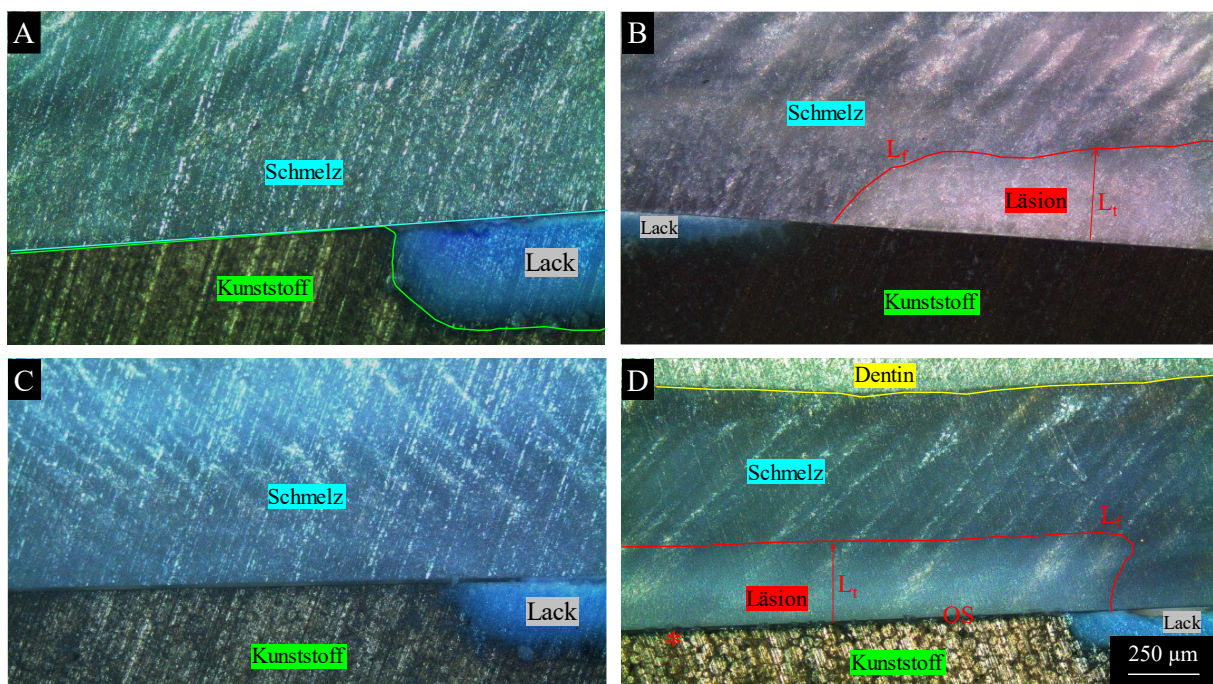


Abbildung 3: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lösungsreihe A1

(A): Läsionsausschnitt nach zwei Wochen Demineralisation. Der Kunststoff (grün) und der Lack (blau) im unteren rechten Bildrand bedecken den Schmelz, der noch keine Läsion zeigt. (B): Nach vier Wochen rot umrandete weiße LF. Die Läsionstiefe ist mit L_1 angegeben. (C): Nach sechs Wochen ist keine Läsion mehr erkennbar. (D): Nach acht Wochen schwach mattweiße LF mit minimalen Einbrüchen (*) der OS.

Lösung A2

In Lösung A2 (Buskes-Lösung, pH-Wert 4,9, Fluoridkonzentration 0,1 ppm) waren bereits nach zwei Wochen erste Läsionen von 100 μm (SD = 0) LT in beiden Proben erkennbar. Die beginnende Läsion zeichnete sich durch einen moderat dunkleren Läsionskörper vom restlichen Schmelz ab (Abbildung 4, A). Den gleichen Abfall der LT wie in A1 zeigte sich in Lösung A2 nach vier Wochen mit einer Verringerung von 190 μm (SD = 10) auf 130 μm (SD = 20) nach sechs Wochen. Die Läsionen in Woche vier und sechs waren deutlich erkennbar und zeigten eine typische Schichtenbildung mit einer intakten OS (Abbildung 4, B, C). In Woche acht stieg die LT auf ein Maximum von 200 μm (SD = 0) bei sehr deutlich matt-weißem Läsionskörper und relativ intakter OS mit minimalen lokalen erosiven Defekten (Abbildung 4, D).

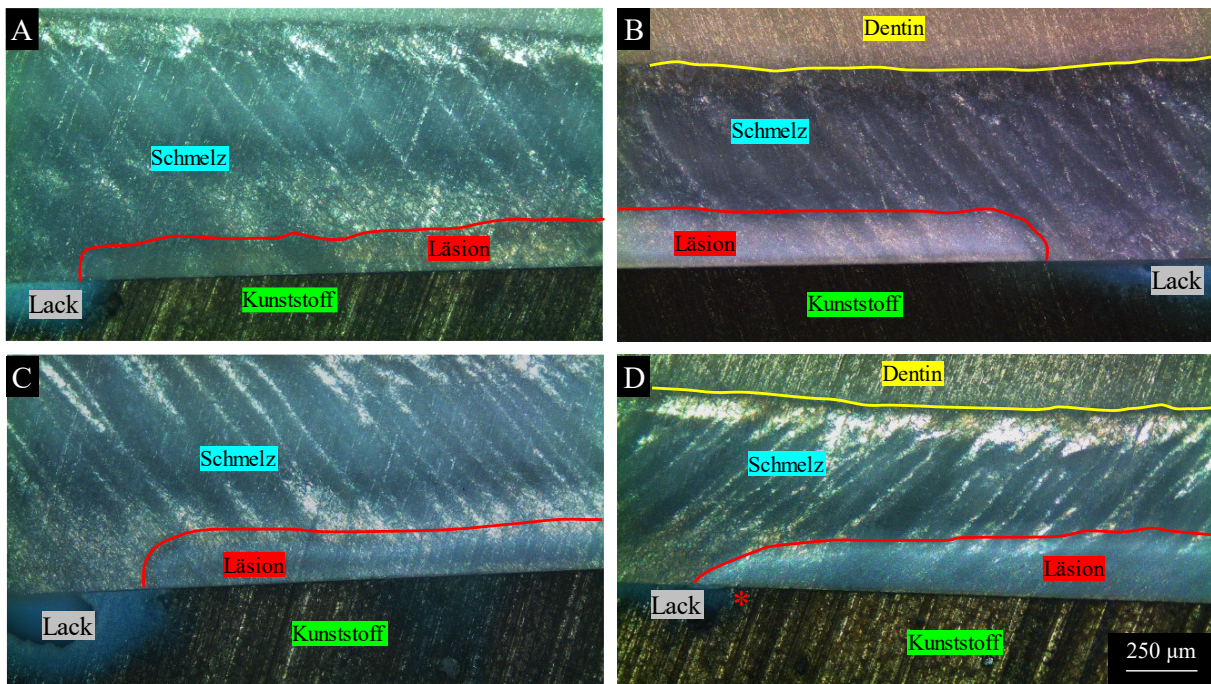


Abbildung 4: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lösungsreihe A2

(A): Probe nach zwei Wochen zeigt eine schwach ausgeprägt moderat dunkle LF. (B): Nach vier Wochen weiße LF. (C): Nach sechs Wochen Abfall der LT, helle und dunkle Zonen innerhalb der LF. (D): Nach acht Wochen Anstieg der LT und deutliche weiß-bläuliche Lf.

Lösung A3

In Lösung A3 (Buskes-Lösung, pH-Wert 4,9, Fluoridkonzentration 0,05 ppm) konnten ebenfalls bereits nach zwei Wochen erste Läsionen von 110 μm (SD = 10) LT gemessen werden. Die Läsionen zeigten hier im Vergleich zu A1 und A2 nach zwei Wochen bereits eine deutlichere Läsionsformation (Abbildung 5, A). Die LT stieg von 185 μm (SD = 55) in Woche vier auf 202,5 μm (SD = 2,5) in Woche sechs kontinuierlich an. Die Läsionen zeigten ein gleichmäßiges Bild mit typischen Läsionszonen, Läsionskörper und intakter OS (Abbildung 5, B, C). Nach acht Wochen reduzierte sich die LT wieder auf ihren finalen Wert von 190 μm (SD = 0). Die LF zeigte einen deutlich matt-weißen Läsionskörper und eine relativ intakte OS mit minimalen lokalen erosiven Defekten (Abbildung 5, D).

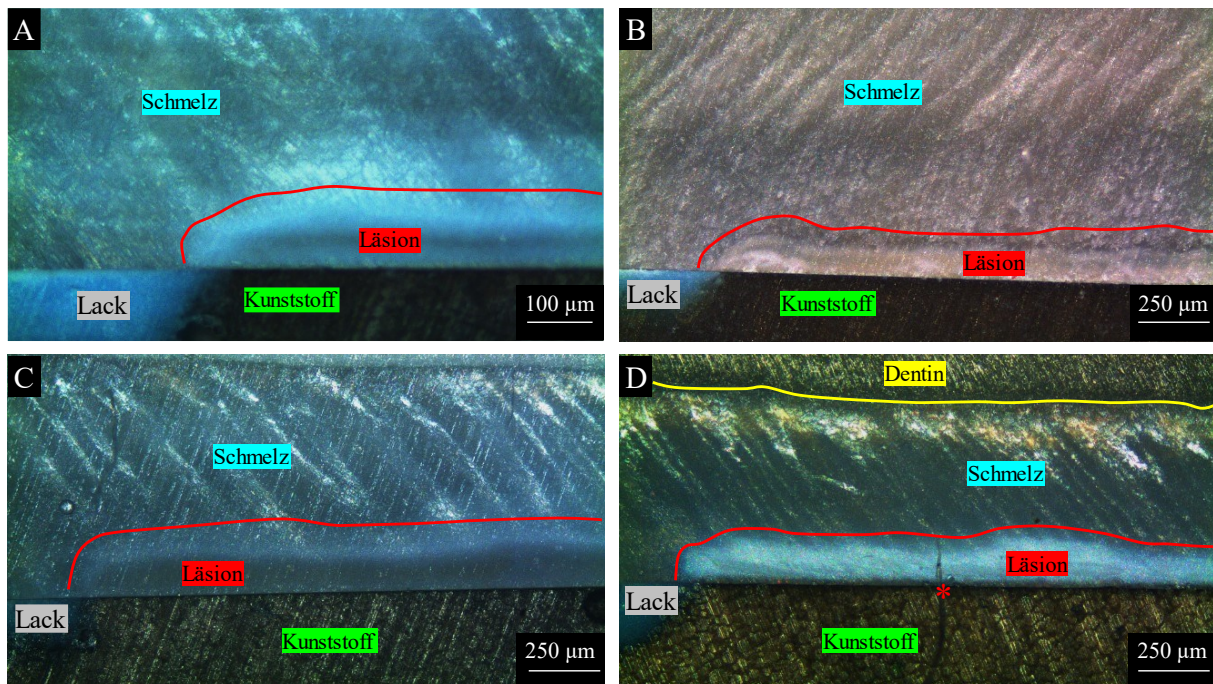


Abbildung 5: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lösungsreihe A3

(A): Nach zwei Wochen ist eine LF erkennbar. (B): Nach vier Wochen deutliche Läsionszonen. (C): Nach sechs Wochen Läsionszonen mit dunkler LF, und leichtem Anstieg der LT. (D): Nach acht Wochen deutliche matt-weiße LF mit minimalen Einbrüchen der OS, kontinuierlicher Anstieg der LT und gleichmäßige Läsionszonen über die gesamte Demineralisationszeit. Defekt (*)

Insgesamt zeigte die lichtmikroskopische Auswertung der Proben zur Lösungsreihe A nach vier bis acht Wochen Demineralisationszeit unregelmäßige, flache Läsionen mit durchschnittlichen LT von 205 μm (SD = 44,6).

4.1.3 Methode 1 - Lösungsreihe B (B1 - B3)

Die Lösungen B1 bis B3 basierten auf einer Buskes-Lösung mit einem pH-Wert von 4,7 und unterschiedlichen Fluoridkonzentrationen (B1: 0,5 ppm, B2: 0,1 ppm, B3: 0,05 ppm).

Lösung B1

Nach zwei Wochen zeigten sich in Lösung B1 (0,5 ppm Fluorid) bereits Läsionen mit hellen und dunklen Demineralisationszonen bei einer LT von 100 μm (SD = 0) (Abbildung 6, A). Die LT stieg in Woche vier auf 200 μm (SD = 0) an. Hier zeigten sich lichtmikroskopisch sehr deutlich helle und dunkle Zonen der Demineralisation (Abbildung 6, B). In Woche sechs stieg die LT auf ein Maximum von 350 μm (SD = 50) und fiel nach acht Wochen wieder auf 223 μm (SD = 20,55) ab. Die Läsionen zeigten sowohl nach sechs Wochen als auch nach acht Wochen deutlich weißliche LF mit breiter pseudointakter OS (Abbildung 6, C, D).

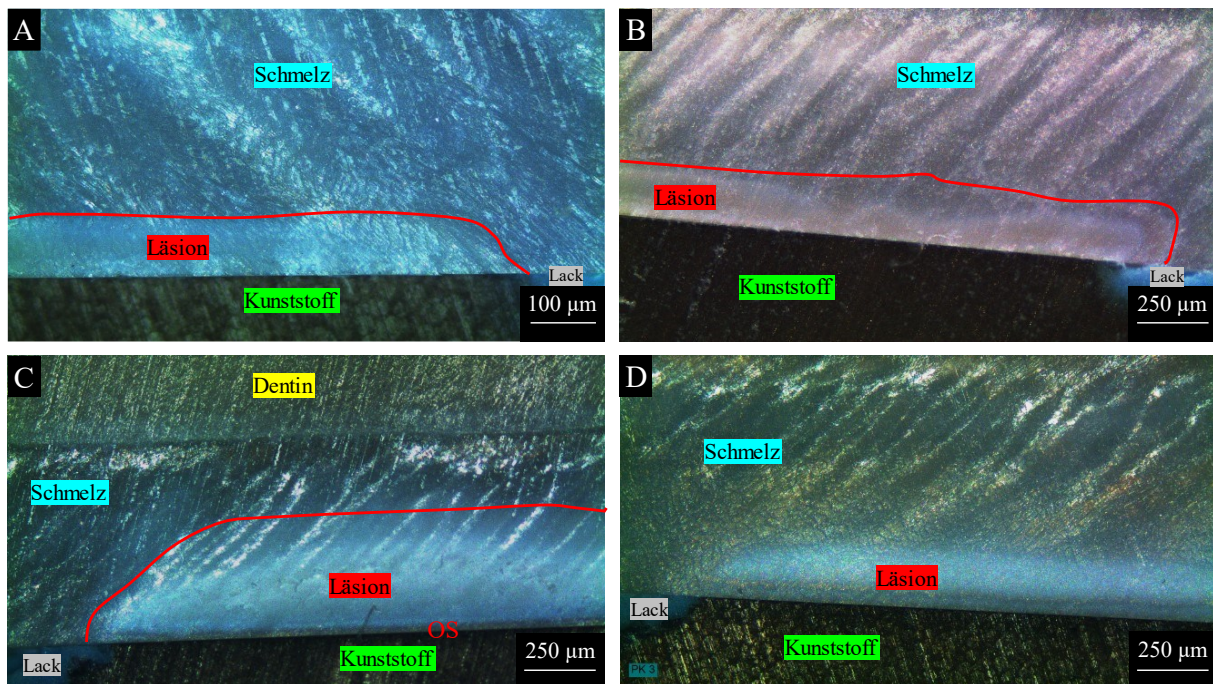


Abbildung 6: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lösungsreihe B1

(A): Der Probenausschnitt nach zwei Wochen zeigt in 10-facher Vergrößerung bereits eine Läsionsformation. **(B):** Nach vier Wochen deutliche LF und Läsionszonen. **(C):** Nach sechs Wochen LF mit hoher LT **(D):** Nach acht Wochen LF mit flacherer LT und breiter OS.

Lösung B2

Lösung B2 (0,1 ppm Fluorid) wies nach zwei Wochen mit 200 μm (SD = 5) eine doppelt so hohe LT wie B1 mit 100 μm (SD = 0) auf. Die LF grenzte sich bereits makroskopisch deutlich durch eine weiße Färbung vom restlichen Schmelz ab. Die Läsionsoberfläche zeigte bereits Anfänge einer Separierung zum restlichen Läsionskörper, aber noch keine pseudointakte OS (Abbildung 7, A). Nach vier Wochen zeigte sich in beiden Proben eine gleichmäßige Läsion mit deutlich erkennbaren Läsionszonen und intakter OS. Die LT lag gleichmäßig in beiden Proben bei 400 μm (SD = 0) (Abbildung 7, B). In Woche sechs zeigten die Läsionen bereits starke erosive Defekte, Einbrüche und die LT sank auf 347,5 μm (SD = 30,7) (Abbildung 7, C, D).

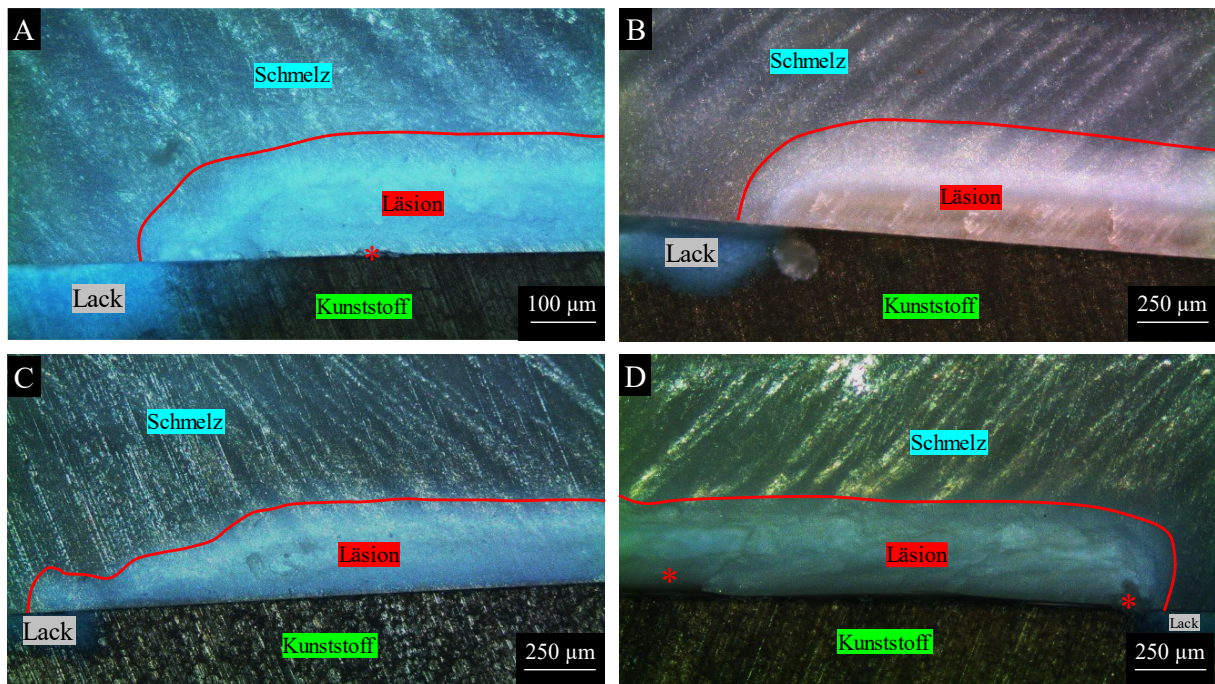


Abbildung 7: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lösungsreihe B2

(A): Der Probenausschnitt nach zwei Wochen zeigt in 10-facher Vergrößerung eine breite LF. (B): Nach vier Wochen deutliche Läsionszonen und hohe LT. (C): Nach sechs Wochen deutliche LF mit abflachender LT. (D): Läsionsausschnitt nach sechs Wochen mit deutlichen Erosionen der OS (*) und Defekten innerhalb des Läsionskörpers.

Lösung B3

Nach zwei Wochen zeigte Lösung B3 (mit 0,05 ppm Fluorid) ebenfalls bereits eine LT von 205 μm (SD = 45) bei gleichmäßiger weißer LF im lichtmikroskopischen Bild (Abbildung 8, A). Nach vier Wochen waren die Proben deutlich von hellen und dunklen Demineralisationszonen geprägt. Der Läsionskörper zeigte schollenartige Defekte mit minimalen Einbrüchen der OS. Die LT betrug nach vier Wochen 435 μm (SD = 65) (Abbildung 8, B). Nach sechs Wochen sank die LT wieder auf 383,75 μm (SD = 31), während die Erosionen und großlumigen eisschollenartigen Defekte zunahmen. Dabei zeigten sich kavitierende Defekte der OS bis tief in den Läsionskörper hinein (Abbildung 8 C, D).

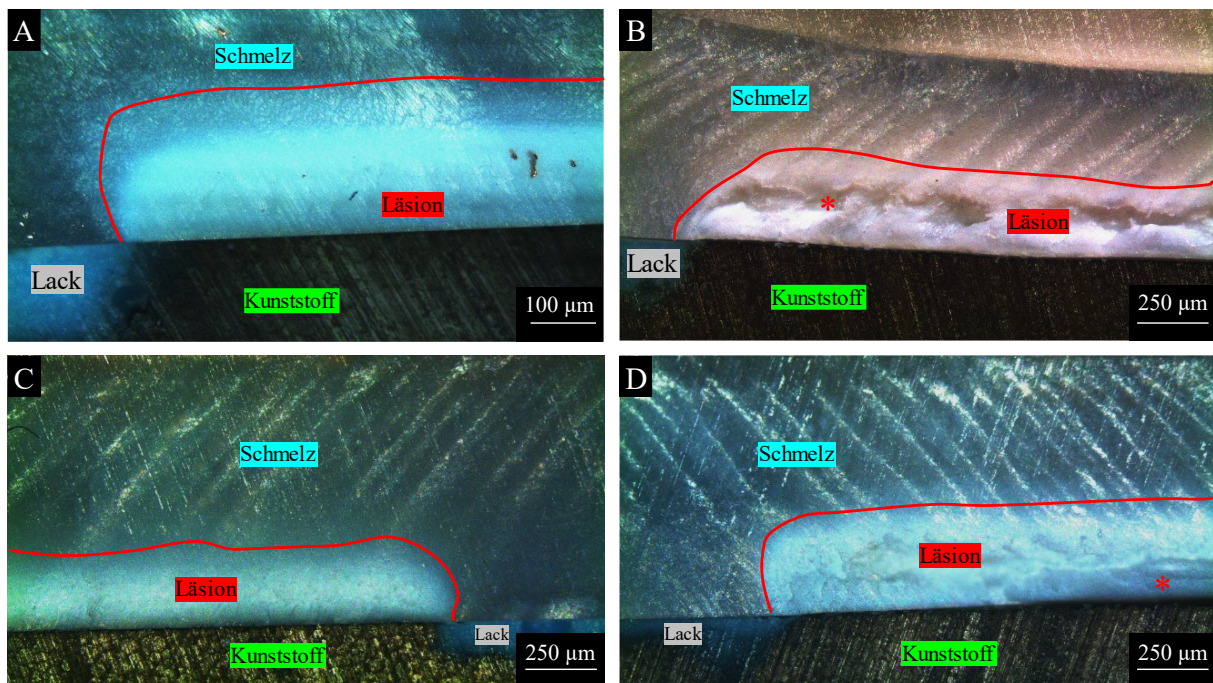


Abbildung 8: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lösungsreihe B3

(A): Der Probenausschnitt nach zwei Wochen zeigt in 10-facher Vergrößerung eine breite LF. (B): Nach vier Wochen deutliche helle und dunkle Läsionszonen und Defekte (*) (C): Nach sechs Wochen matt-weiße LF mit abflachender LT (D): Läsionsausschnitt nach sechs Wochen mit deutlichen Erosionen der OS (*) und Defekten innerhalb des Läsionskörpers.

4.1.4 Methode 1 - Lösungsreihe C (nach ten Cate)

Die Lösung C hatte mit einem pH-Wert von 4,5 den niedrigsten pH-Wert aller Lösungen und gleichzeitig eine relativ hohe Fluoridkonzentration von 0,5 mg/l. Die lichtmikroskopische Auswertung der Proben der Lösungsreihe C zeigte mit 265 μm (SD = 5) die höchsten LT aller Lösungen nach zwei Wochen. Dabei war die Läsion allerdings schwächer ausgeprägt und weniger matt-weiß als bei Lösung B 1-3 (Abbildung 9, A). In Woche vier stieg die LT der Lösung C in beiden Proben auf 300 μm (SD = 0) bei gleichzeitig intakter OS (Abbildung 9, B). Nach sechs Wochen veränderte sich die LT nur noch marginal und blieb bei 300 μm (SD = 0) konstant, nach acht Wochen zeigten sich aber bereits Erosionen in allen Proben mit LT von 330 μm (SD = 42,43) (Abbildung 9, C, D).

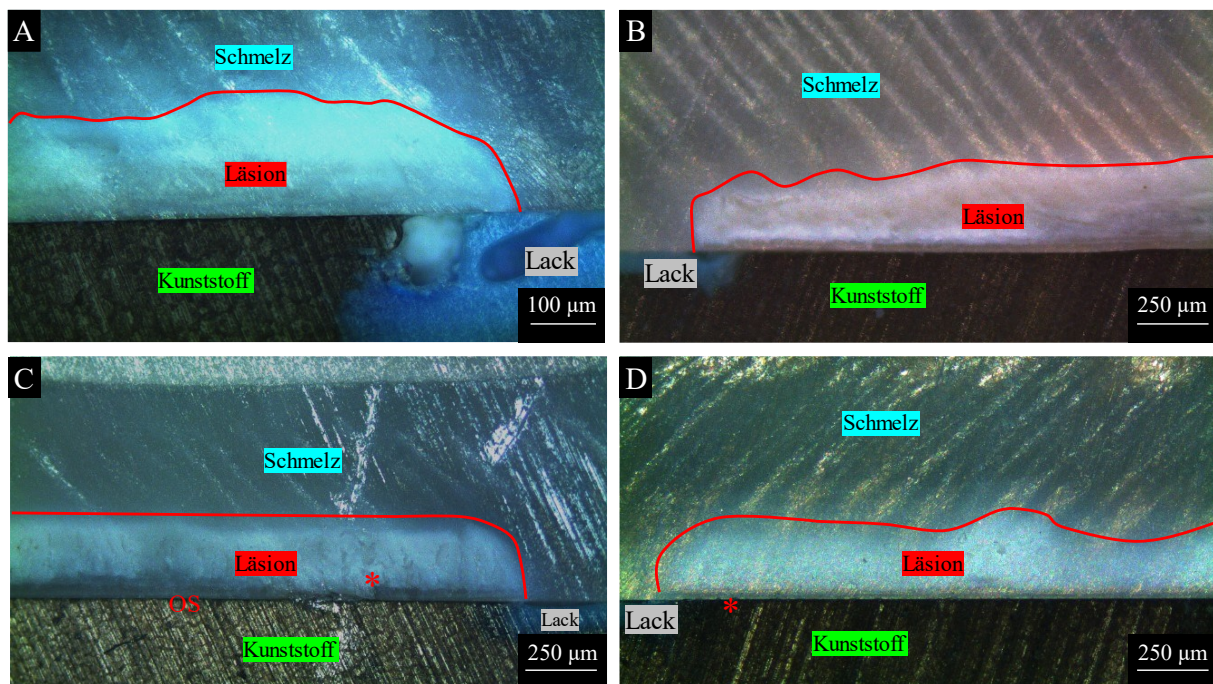


Abbildung 9: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lösungsreihe C

(A): Der Probenausschnitt nach zwei Wochen zeigt in 10-facher Vergrößerung eine breite LF. (B): Nach vier Wochen in 5-facher Vergrößerung zeigen sich deutliche Läsionszonen und eine breite OS (C): Nach sechs Wochen weiße LF mit breiter OS. (D): Läsionsausschnitt nach acht Wochen, homogene matt-weiße LF.

4.1.5 Methode 1 - Lösungsreihe D (HEC)

Die Demineralisationslösung der Lösungsreihe D war die einzige Lösung im Läsionsmodell mit einer Gel-Komponente (HEC) und wurde mit einem pH-Wert von 4,9 ohne Fluoridzusatz angesetzt. Lichtmikroskopisch konnten bereits nach zwei Wochen starke Erosionen bei einer LT von 130 μm (SD = 30) festgestellt werden (Abbildung 10, A). Nach vier Wochen Lagerung in der Demineralisationslösung vergrößerten sich die erosiven Defekte zu großlumigen Erosionen über die gesamte Läsionsbreite und einer LT von 290 μm (SD = 10) (Abbildung 10, B). Ab Woche drei wurde parallel zur Demineralisation eine Remineralisationslösung angesetzt, und es wurde versucht, dadurch einen Teil der erodierten Proben zu remineralisieren (ten Cate und Duijsters, 1982) (Abbildung 10, C). Nach drei Wochen Demineralisation und zehn Tagen Lagerung in der Remineralisationslösung zeigten sich noch immer großflächige Defekte und Erosionen bei einer LT von 230 (SD = 0) - 315 μm (SD = 0) (Abbildung 10, D).

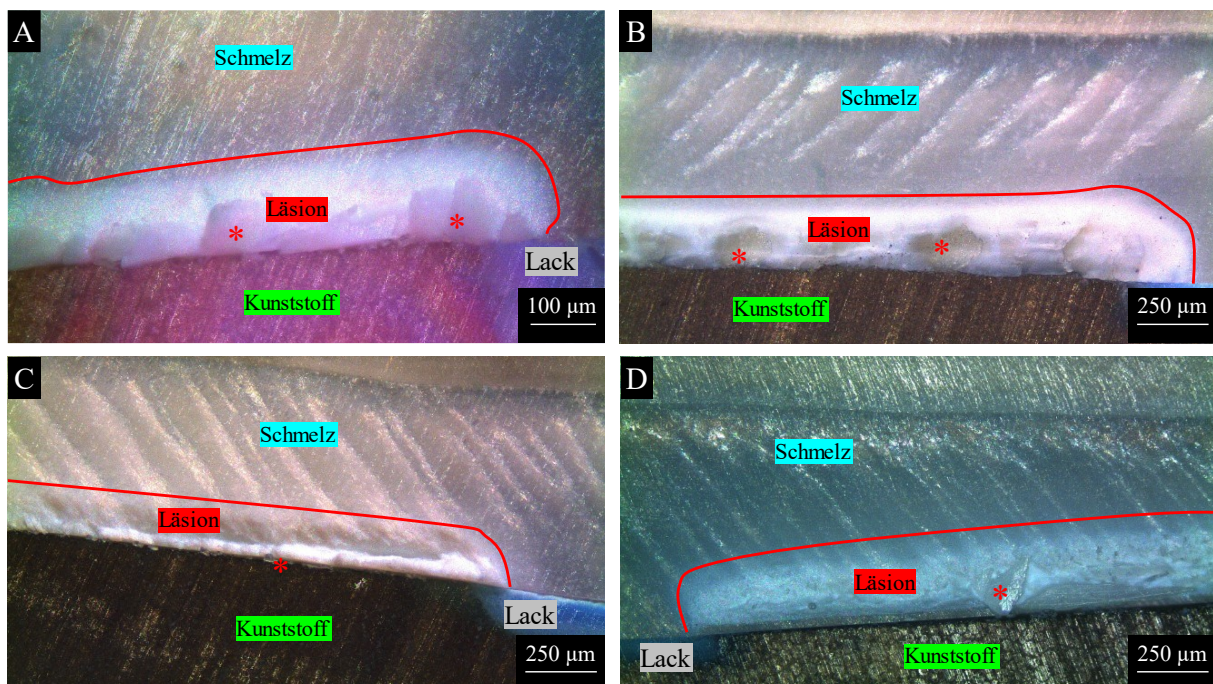


Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Lösungsreihe D

(A): Der Probenausschnitt nach zwei Wochen zeigt in 10-facher Vergrößerung Erosionen und Einbrüche (*). **(B):** Ausschnitt nach vier Wochen in 5-facher Vergrößerung, starke Erosionen (*) durch die gesamte Läsionsbreite. **(C):** Nach drei Wochen Demineralisation und zehn Tagen Lagerung in der Remineralisationslösung: Helle und dunkle Zonen, Erosionen (*) der OS. **(D):** Läsionsausschnitt nach drei Wochen Demineralisation und drei Wochen Lagerung in der Remineralisationslösung. Inhomogene Läsion mit breiter OS, lokaler Erosion (*).

4.1.6 Methode 2-B2: Lichtmikroskopische Analyse und Messung der Läsionstiefe

Nachdem in Methode 1 die Lösungsreihe B, insbesondere Lösung B2, sowohl die höchste LT als auch die homogenste Läsionsstruktur innerhalb aller Lösungsreihen und Methoden zeigte, sollte in Methode 2 die Eignung der Lösung-B2 näher untersucht werden. Aus diesem Grund wurden weitere Vorversuche zur Optimierung einer reproduzierbaren Herstellung sich konstant gleichender Läsionen der Lösung B2 durchgeführt. Die Untersuchung der übrigen Demineralisationslösungen wurde eingestellt.

Die Läsionen der Methode 2-B2 zeigten sich im lichtmikroskopischen Bild nach vier Wochen mit einer homogenen intakten LF und pseudointakter OS. Die LT variierte jedoch zwischen den Proben teils stark und betrug durchschnittlich 242 μm (SD = 28,5). Die LT von 400 μm aus Methode 1-B2 konnte nicht reproduziert werden. Erosionen und minimale Defekte der pseudointakten OS konnten (bis auf zwei Proben) nicht festgestellt werden (Abbildung 11, A, B). Aufgrund der stark variierenden Ergebnisse und verhältnismäßigen niedrigen LT sollte in einer weiteren Methode die Lösung B2 erneut untersucht werden.

4.1.7 Methode 3-B2: Lichtmikroskopische Analyse und Messung der Läsionstiefe

In Methode 3-B2 wurde das Protokoll der Probenvorbereitung dahingehend modifiziert, dass auf den Papieraufkleber zur Läsionsabdeckung verzichtet wurde, um Klebereste und Beschädigungen der Läsionsoberfläche zu vermeiden. Stattdessen wurden die Läsionsquadrate exakt ausgemessen und mit Nagellack umzeichnet. Außerdem wurde eine höhere Probenanzahl (16 Rinderzähne) in einem größeren Lösungsvolumen (480 ml) verwendet, um die Messbarkeit des pH-Werts zu verbessern.

Nach vier Wochen konnte mit 273 μm (SD = 37) eine durchschnittlich höhere mittlere LT im Vergleich zu Proben aus Methode 2-B2 gemessen werden. An zwei Proben wurden Erosionen und minimale Defekte der pseudointakten OS festgestellt. Der Großteil der Läsionen zeigte eine homogene LF mit vollständiger pseudointakter OS (Abbildung 11, C, D).

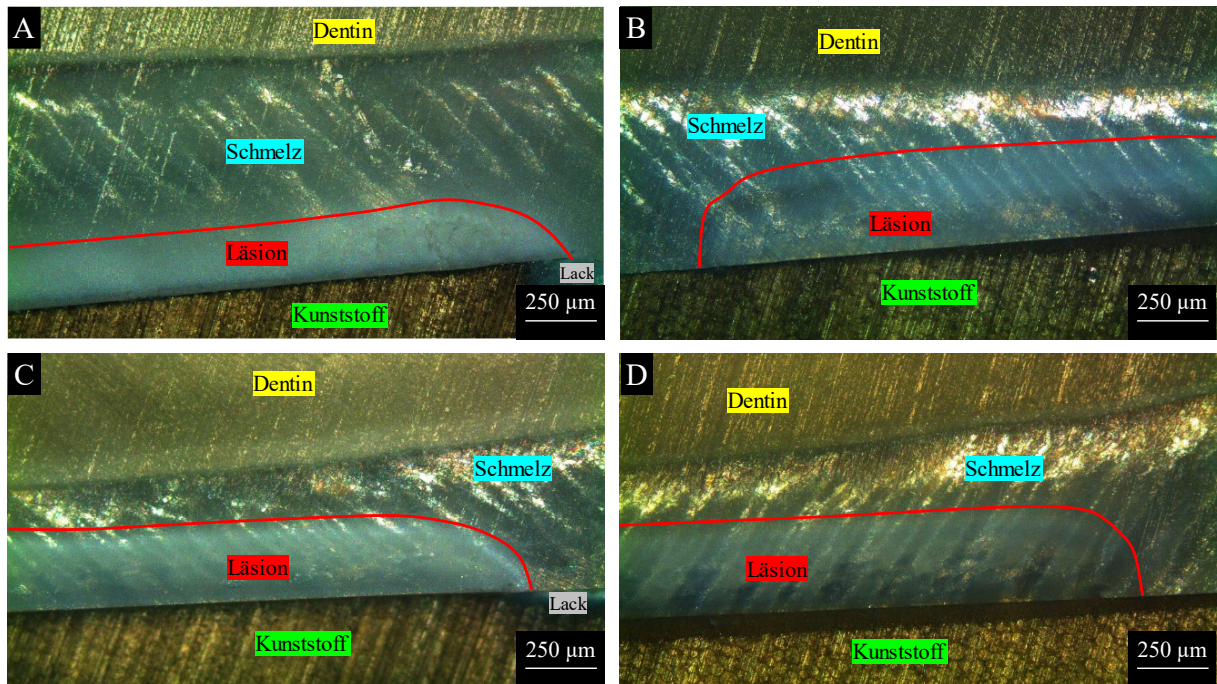


Abbildung 11: Exemplarische Läsionsausschnitte von Methode 2 und 3 der Lösungsreihe B2

(A): Methode 2-B2 zeigt nach vier Wochen eine homogene LF ohne Einbruch der OS. (B): Methode-B2 nach vier Wochen, Probenausschnitt mit weiß-bläulich verschwimmenden Läsionszonen. (C): Methode 3-B2 zeigt nach vier Wochen eine intakte Läsion mit breiter OS. (D): Methode 3-B2 erzeugt nach vier Wochen eine intakte breite bläulich-weiße LF mit intakter OS.

Da in keiner der Methoden 2 - 3 ähnlich hohe LT wie in Methode 1 erreicht werden konnten, wurde für die letzte Methode zur Herstellung reproduzierbarer Läsionen das Protokoll aus Methode 1 verwendet. Das Ausmessen und Umzeichnen der Läsionsquadrate aus Methode 3 wurde übernommen, da es Beschädigungen an der Läsionsoberfläche verhindert und die Probenvorbereitung vereinfacht.

4.1.8 Methode 4-B2: Lichtmikroskopische Analyse und Messung der Läsionstiefe

Zur Absicherung, damit es im eigentlichen Hauptversuch nicht zu einem vorzeitigen Erodieren der gesamten Proben-Charge käme, wurden in Methode 4-B2 stichprobenartig vor Ablauf der vollen Demineralisationsdauer bereits nach drei Wochen acht Proben aus der Lösung entnommen und auf Defekte untersucht. Nach drei Wochen zeigten die Läsionen eine homogene LF mit teils großen Poren in den Läsionskörpern und minimalen Einbrüchen der OS an einigen Proben. Zum Großteil waren die Proben aber intakt mit homogenen LF und pseudointakter OS (Abbildung 12, A, B). Die LT war mit durchschnittlich $255 \mu\text{m}$ ($\text{SD} = 43$) jedoch noch zu gering, weshalb die Proben noch eine Woche bis zum vollständigen Ablauf der Demineralisationszeit in der Lösung belassen wurden. Nach vier Wochen wurden die Proben aus der Lösung entnommen, makroskopisch untersucht und erodierte Proben wurden aussortiert. Der Großteil der Proben zeigte eine homogene matt-weiße LF mit ineinander übergehenden Läsionszonen und unbeschädigter pseudointakter OS (Abbildung 12, C, D). Die lichtmikroskopische Analyse und Messung der LT zeigte nach vier Wochen an 14 Proben eine mittlere LT von $274 \mu\text{m}$ ($\text{SD} = 42,3$). Die restlichen Proben wurden ebenfalls makroskopisch untersucht und die intakten Proben wurden für den Hauptversuch (Kapitel 3.6) verwendet.

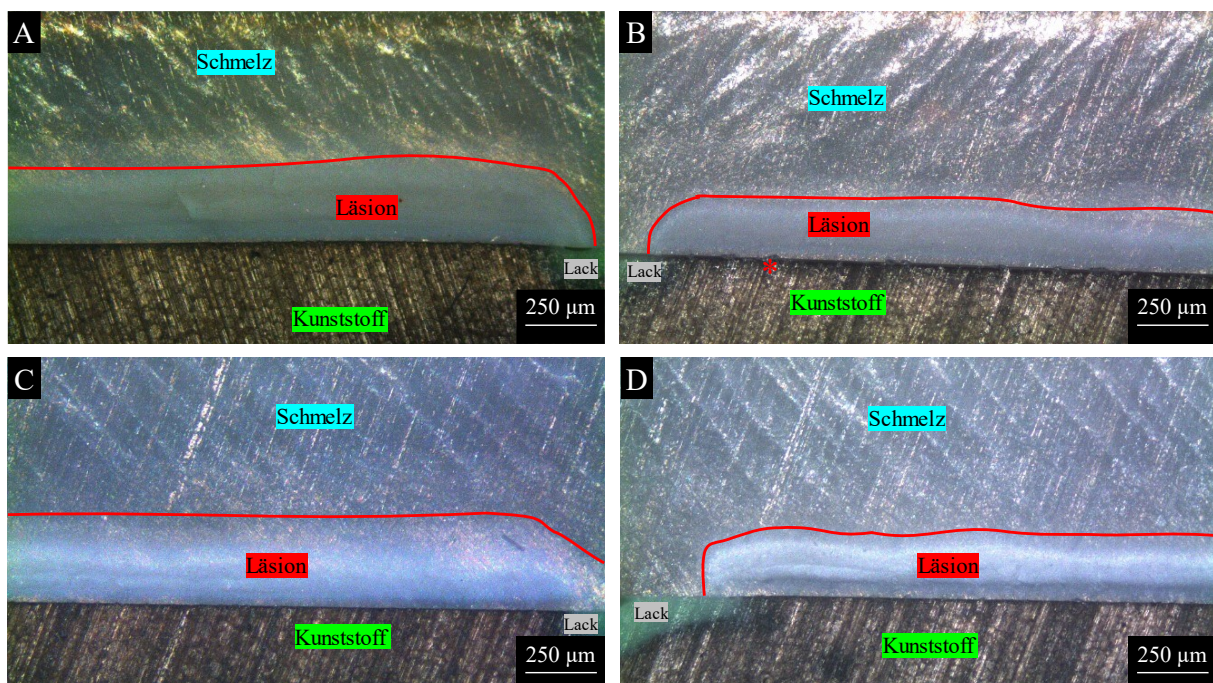


Abbildung 12: Exemplarische Läsionsausschnitte aus Versuch 4 B2

(A): Methode 4-B2 zeigt nach drei Wochen eine LF mit großporigem Defekt im Läsionskörper ohne Einbruch der OS. (B): Hier zeigen sich an einem weiteren Probenausschnitt minimale Einbrüche der OS. (C): Methode 4-B2 zeigt nach vier Wochen eine intakte Läsion mit deutlicher weiß-bläulicher LF. (D): Probenausschnitt nach vier Wochen einer matt-weißen Läsion mit breiter dunklerer OS.

4.1.9 Zusammenfassung der Vorversuche (Methoden 1 - 4) zur Demineralisierung

Alle ermittelten LT der Methode 1 sind in Abbildung 13 zusammengefasst und einander gegenübergestellt. In den Diagrammen zeigt sich eine Häufung hoher LT im Zeitraum von vier bis sechs Wochen durch die Demineralisation mit Lösung B1, B2, B3 und C, während besonders A2, A3 und Lösung D verhältnismäßig flache Läsionen produzierten.

Der Vergleich aller Demineralisationslösungen zeigt, dass die Lösung B2 nach vier Wochen die vielversprechendsten Ergebnisse hinsichtlich LT und Oberflächenintegrität liefert. Die nachfolgenden Methoden 2, 3 und 4 zielten darauf ab, das Ergebnis mit einer größeren Probenanzahl zu reproduzieren und zu bestätigen.

Die Entwicklung der Läsionstiefenmessung der Lösung B2 in allen Methoden (1 - 4) sind in Abbildung 13 (IX) dargestellt. Es zeigt sich nach der höchsten gemessenen LT von 400 μm in Methode 1 ab Methode 2 ein kontinuierlicher Anstieg der mittleren LT von 240 μm (SD = 29) in Methode 2, 273 μm (SD = 37) in Methode 3 und dem Maximum von 274 μm in Methode 4.

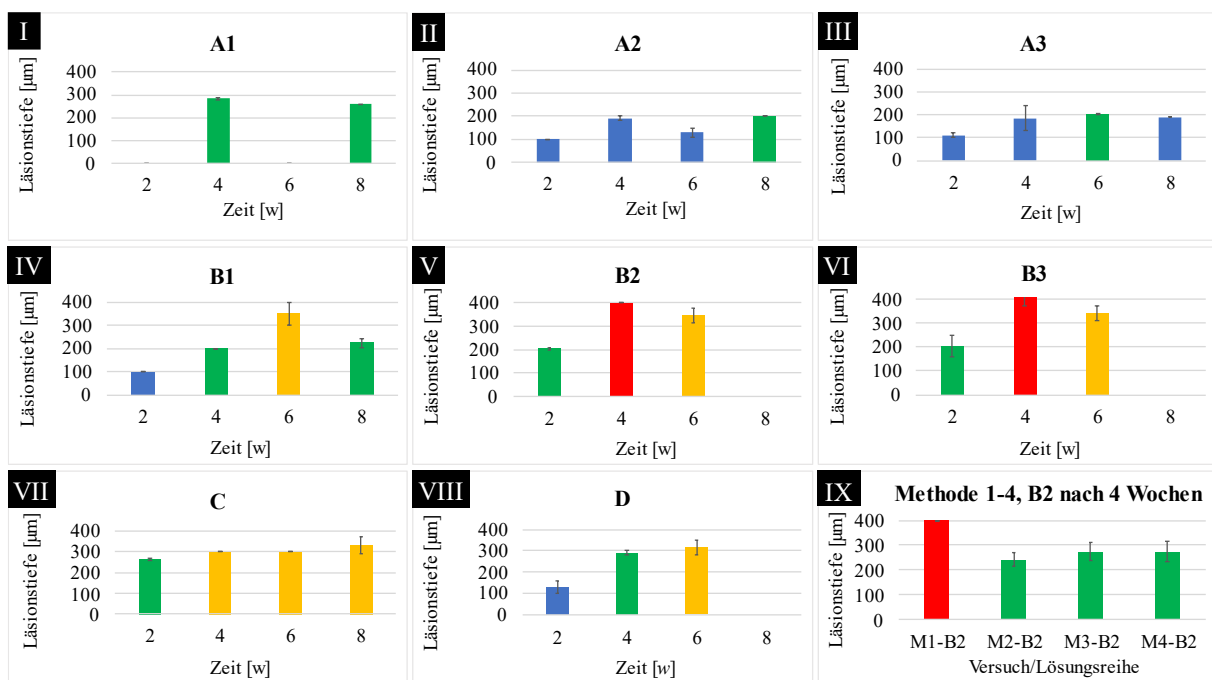


Abbildung 13: Säulendiagramme der LT-Mittelwerte aus Methode 1 - 4

I - VIII: Lösungsreihen A, B, C und D des ersten Vorversuchs über einen Zeitraum von zwei bis acht Wochen.
 IX: Lösung B2 nach vier Wochen in Methode 1 - 4. Farbliche Markierungen: Rot: $LT \geq 400 \mu\text{m}$; gelb: $LT \geq 300 \mu\text{m}$; grün: $LT \geq 200 \mu\text{m}$; blau: $LT < 200 \mu\text{m}$.

4.2 Ermittlung des Infiltrationsprotokolls

Vor Beginn des Infiltrationsversuchs wurde das abschließende Infiltrationsprotokoll ermittelt. Die Ergebnisse der Ermittlung des Infiltrationsprotokolls werden im Folgenden zusammengefasst. Die Rinderzahnproben wurden nach dem Protokoll aus Kapitel 3.5.2 in Gruppe DRY-A (geätzt, 5 μ l Infiltrant, 30 s Infiltrationsdauer) und DRY-B (nicht geätzt, 5 μ l Infiltrant, 30 s Infiltrationsdauer) eingeteilt und infiltriert. Für die Ermittlung des Infiltrationsprotokolls wurden schrittweise verschiedene Parameter verändert, bis eine partielle Infiltration erreicht wurde (Tabelle 6). Die infiltrierten Schmelzläsionen wurden lichtmikroskopisch unter UV-Licht untersucht.

Abbildung 14 zeigt in der Bildreihe A - C exemplarisch Läsionsausschnitte der Gruppe DRY-B bei 30 s Infiltrationsdauer in 5-facher Vergrößerung. Die Läsion befindet sich im türkis-blauen Schmelz und wird an der Oberfläche bis zum unteren Bildrand von einer grau-grünen Kunststoffschicht bedeckt. Bild A zeigt eine infiltrierte Läsion unter reiner Auflichtmikroskopie. Sie erscheint im Vergleich zu nicht-infiltrierten Läsionen als grau-weiße, matte LF, die sich farblich als dunklere, gräuliche Fläche vom restlichen Schmelz abgrenzt. Durch einen Übergang vom hellen zum dunkleren Bereich innerhalb der Läsion lässt sich der Infiltrant bereits unter Auflichtmikroskopie von nicht-infiltrierten Läsionsabschnitten abgrenzen. Es zeigt sich eine LT von 394,6 μ m (SD = 2,4) (Abbildung 14, A). In der Auflicht-UV-Aufnahme in Bild B erscheint der Infiltrant rosa bis violett innerhalb des orange-schwarz gestreiften Schmelzmusters unter der dunkleren Kunststoffschicht. In der Aufnahme B kann eine PT von 394,3 μ m (SD = 2) gemessen und damit eine vollständige Infiltration der Läsion bestätigt werden (Abbildung 14, B). In der reinen UV-Aufnahme ist das stark blau fluoreszierende Tinopal-Signal zu erkennen, das eine PT > 400 μ m zeigt (Abbildung 14, C). In Gruppe A wurden bei mehreren Proben bei Ätzung mit Phosphorsäure (37 %) für 15 s starke Erosionen festgestellt. Dies zeigte sich an der erodierten OS und den großlumigen Defekten innerhalb der LF (Abbildung 14, D). Im Vergleich zur Gruppe B (ohne Ätzschritt) konnten in Gruppe A (mit Ätzschritt) insgesamt häufiger Erosionen festgestellt werden. Diese sind in Abbildung 14, D - F abgebildet. Bei schrittweise verkürzter Infiltrationsdauer scheint die Säureätzung eine 100%ige Infiltration zu begünstigen. In Bild E und F ist unter UV-Licht die inhomogene tiefe Infiltration der erodierten Läsion zu erkennen (Abbildung 14).

Dry/Prime für 30 s, Infiltration mit 3 µl Icon®-Tinopal für 3 s und anschließender Lichthärtung für 40 s (Kapitel 3.5.2).

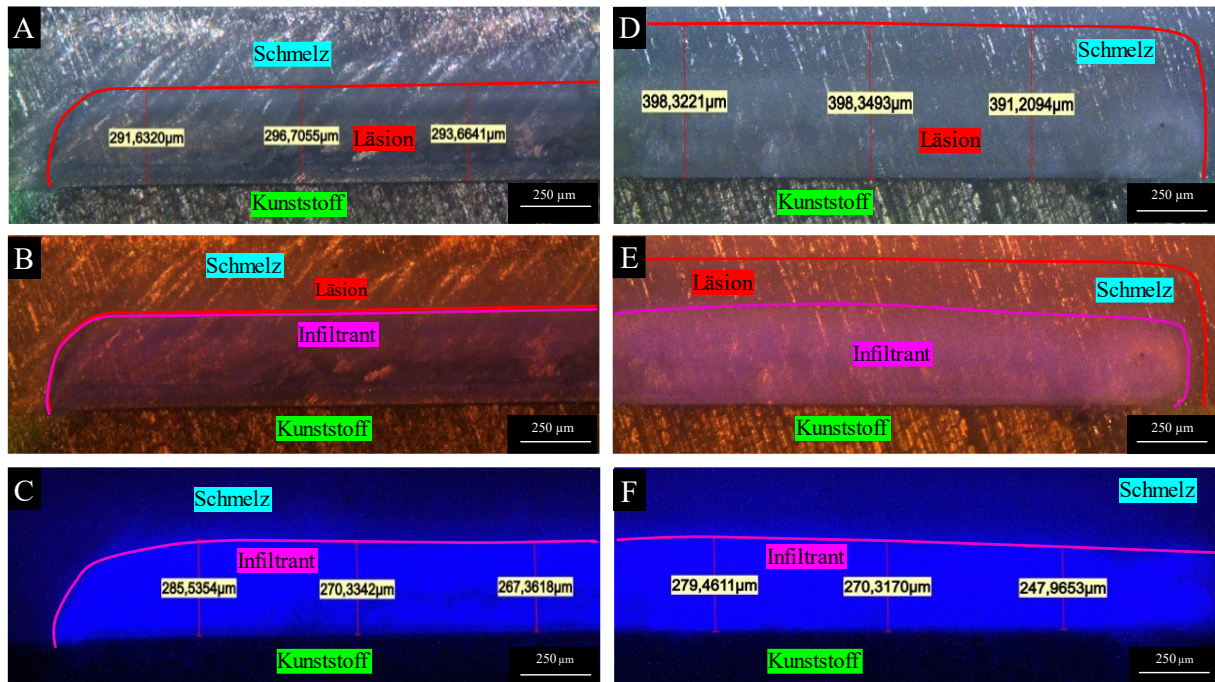


Abbildung 15: Exemplarische Darstellung infiltrierter Läsionen und Vergleich verschiedener Infiltrationsprotokolle (Gruppe DRY-B 10 s vs. 5 s)

A, B, C: Gruppe DRY-B 5 µl, 10 s infiltriert. Nach Reduktion der Infiltrationszeit auf 10 s zeigt die lichtmikroskopische Analyse eine nahezu vollständige Infiltration der Läsion. D, E, F: Gruppe DRY-B 3 µl, 3 s infiltriert. Nach Reduktion der Infiltrationszeit auf 3 s kann eine unvollständige Infiltration festgestellt werden. Bild F zeigt eine PT von 265 µm im Vergleich zur LT von 400 µm in Bild D.

4.3 Hauptversuch DRY vs. PRIME

Wie in Kapitel 3.6 beschrieben, wurden im Infiltrationsversuch 35 Rinderzahnproben je Gruppe entweder mit Icon Dry® (Kontrollgruppe DRY) oder Icon® Prime (Experimentalgruppe PRIME) vorbehandelt und entsprechend des in 3.5.2 ermittelten Infiltrationsprotokolls infiltriert. Es wurden nach dem in Kapitel 3.4.3 beschriebenen Verfahren Schnitte der Rinderzahnproben zur mikroskopischen Analyse angefertigt. Die Probenschnitte wurden mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie untersucht und die Parameter LT und PT in 5-facher Vergrößerung sowie die LF und IF in 2,5-facher Vergrößerung bestimmt. Hieraus wurde die PP berechnet. Im Folgenden werden die Ergebnisse des Infiltrationsversuches dargestellt.

4.3.1 Übersicht der Proben und Aufnahmen

Für das Infiltrationsexperiment wurden insgesamt 70 Rinderzahnproben, je 35 Rinderzahnproben pro Gruppe, verwendet, die nach Methode 4-B2 im Vorversuch hergestellt wurden. Von diesen 70 Rinderzahnproben wurden jeweils zwei Schnitte, insgesamt also 140 Probenschnitte angefertigt. Es wurden 95 Probenschnitte in die Analyse eingeschlossen. 45 Probenschnitte (19 in Dry, 26 in PRIME) mussten aufgrund von Erosionen, Defekten oder nicht detektierbarem Infiltranten aus der Analyse ausgeschlossen werden. Für die Messung der PT in 5-facher Vergrößerung wurden in Abhängigkeit von der Läsionsgröße zwei bis drei Aufnahmen erstellt, um die gesamte Breite der Läsion auszuwerten. Durch die variable Läsionsgröße der Rinderzahnproben ergab sich eine unterschiedliche Anzahl untersuchter Läsionsausschnitte für beide Gruppen. Die Messung der IF in 2,5-facher Vergrößerung konnte mit einer Aufnahme pro Läsion in jeder Belichtungseinstellung durchgeführt werden, da bei diagonaler Probenausrichtung die gesamte Läsion in einer Aufnahme abgebildet werden konnte. Eine Übersicht über die Probenanzahl und ausgeschlossene Rinderzahnprobenschnitte ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Probenanzahl

| | DRY | | PRIME | |
|-----------------------|--------|---------|--------|---------|
| | Anzahl | Prozent | Anzahl | Prozent |
| Probenschnitte | | | | |
| insgesamt | 70 | 100 % | 70 | 100 % |
| eingeschlossen | 51 | 73 % | 44 | 63 % |
| ausgeschlossen | 19 | 27 % | 26 | 37 % |

4.3.2 Qualitative Analyse der Infiltration

Folgend wird der qualitative Vergleich der Infiltration in Kontrollgruppe DRY- und Experimentalgruppe PRIME in 5-facher Vergrößerung zusammengefasst. In Abbildung 16 sind exemplarisch Läsionen aus DRY (Aufnahmen A – C) Läsionen aus PRIME (Aufnahmen D -F) gegenübergestellt. In beiden Gruppen ist eine homogene Infiltration zu erkennen. Die infiltrierten Läsionen der Kontrollgruppe zeigen größtenteils nicht erodierte Läsionen mit einer breiten pseudointakten OS und homogener Verteilung des Infiltranten durch die gesamte Läsionsbreite. Es zeigt sich eine unversehrte, pseudointakte OS mit homogener Infiltration. Der Infiltrant zeichnet sich gleichmäßig vom dunkel begrenzten, nicht infiltrierten Bereich am Boden der Läsion ab (Abbildung 16, A, B, C). In der UV-Aufnahme (Abbildung 16, Bild C) bestätigt sich die homogene Infiltration, die ein gleichmäßiges Tinopal-Signal durch die gesamte LF aufweist. In Abbildung 16, Bildreihe D, E, F ist exemplarisch eine ebenfalls homogen infiltrierte, intakte PRIME-Läsion abgebildet.

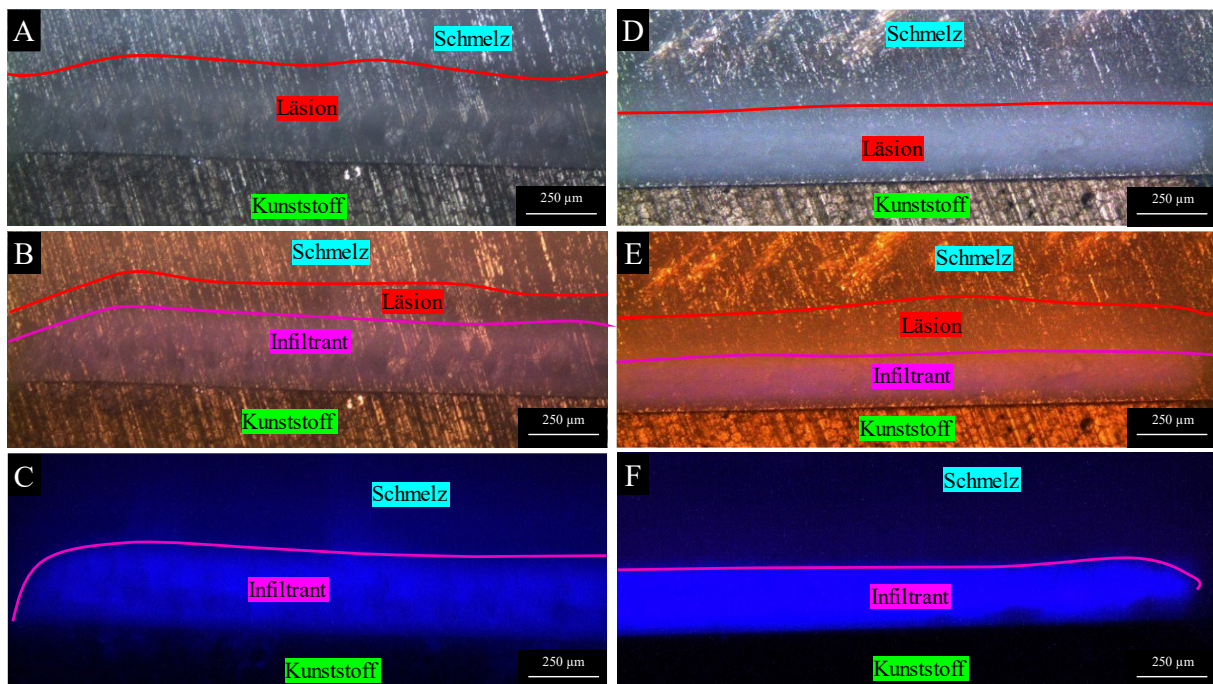


Abbildung 16: Exemplarische Ausschnitte infiltrierter Läsionen DRY vs. PRIME

A-C: Exemplarische Ausschnitte infiltrierter Läsionen aus DRY. **A:** Infiltrierte Läsion im Auflicht. **B:** Auflicht und UV-Belichtung. **C:** Reine UV-Belichtung. **D-F:** Aufnahmen einer PRIME-Läsion zum Vergleich.

Erosive Defekte konnten in beiden Gruppen nachgewiesen werden. In PRIME wurden jedoch häufiger erodierte Proben als in der DRY gefunden. In diesen Läsionen konnte oftmals ein am

oberen oder unteren Läsionsrand konzentrierter Infiltrant nachgewiesen werden. Im LK zeigten sich stark demineralisierte Zonen, die eine kleine Menge inhomogen verteilten Infiltranten enthielten. Insgesamt erscheint die Infiltration in den PRIME-Läsionen weniger homogen und unvollständiger im Vergleich zu DRY-Läsionen. In Abbildung 17 sind exemplarisch eine moderat erodierte Läsion der DRY-Gruppe (A - C) und eine erodierte Läsion der PRIME-Gruppe (D - F) dargestellt. Es zeigen sich verteilte Defekte der breiten pseudointakten OS und die marmorierte Struktur der LF mit großlumigen Defekten und verschiedenen inhomogenen Zonen. Auffällig ist außerdem die Auflagerung des Infiltranten auf die LF, insbesondere auf die pseudointakte OS im unteren rechten Bildrand (Abbildung 17, F). In der UV-Aufnahme (Abbildung 17, C und F) bestätigt sich die inhomogene Infiltrantenverteilung und die lokalisierte Konzentration des Infiltranten im Kunststoff auf der Läsionsoberfläche, an der die Infiltration nicht vollständig durch die pseudointakte OS ins Läsionsinnere penetrieren konnte.

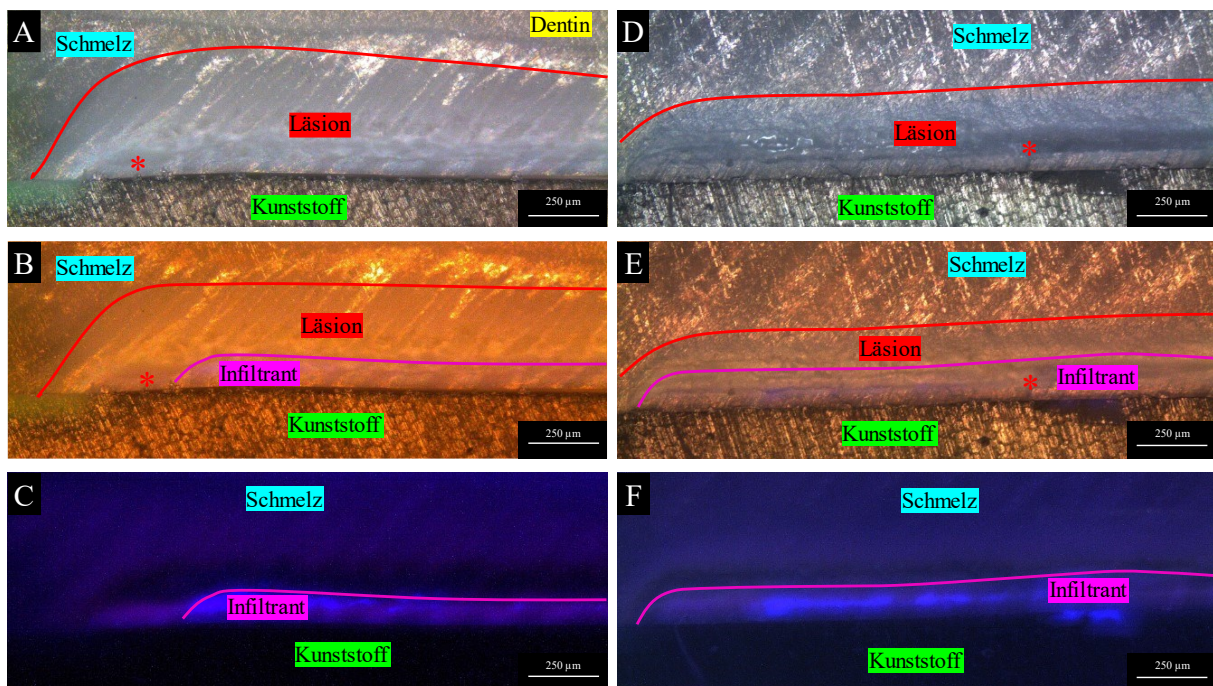


Abbildung 17: Exemplarische erodierte Läsionen der Gruppen DRY und PRIME

A-C: Erosierte Läsion der DRY-Gruppe. D-F: PRIME-Gruppe. Erosionen und Defekte sind mit „*“ markiert.

Die Aufnahmen der Messung der Infiltrationsfläche und damit des Anteils an infiltrierter LF als PP sind exemplarisch an einer Beispielläsion in Abbildung 18 dargestellt. In 2,5-facher Vergrößerung und Diagonalansicht ist die gesamten LF in Auflicht, Auflicht plus UV-Licht und in reiner UV-Belichtung abgebildet.

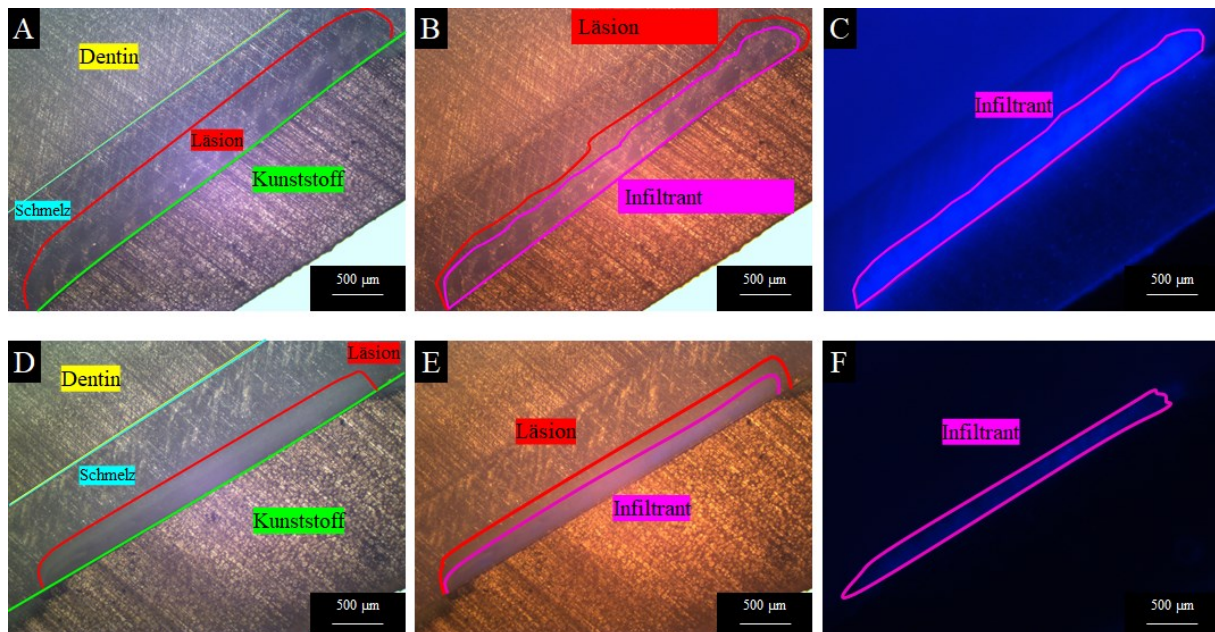


Abbildung 18: Exemplarische Läsionen in 2,5-facher Vergrößerung

A-C: DRY. D-F: PRIME. A/D: Auflicht. B/E: Auflicht- und UV-Belichtung mit Messung LF und IF. C/F: UV-Aufnahme mit deutlichem UV-Signal des Infiltranten und Flächenmessung.

4.3.3 Quantitative Analyse der Infiltration

Im Folgenden werden die Ergebnisse der quantitativen und statistischen Analyse der ermittelten Zielparameter LT, PT, LF, IF, sowie die PP(LT) und PP(LF)) präsentiert. Tabelle 8 fasst die in beiden Versuchsgruppen erhaltenen mittleren Messwerte aller bestimmten Parameter und die jeweiligen im statistischen Vergleich (t-Test für unabhängige Stichproben) ermittelten p-Werte zusammen.

Die einzelnen Messwerte der LT weisen in beiden Gruppen eine auffällig große Streuung auf. Der Mittelwert für die LT aller Proben aus Methode 4 inklusive aller Proben, die im Infiltrationsversuch verwendet wurden, zeigt dabei eine beachtliche durchschnittliche LT von 307,9 µm bei einer SD von 49,8. Auffällig sind einzelne LT von > 400 µm in DRY, die im Vorversuch nicht reproduzierbar waren.

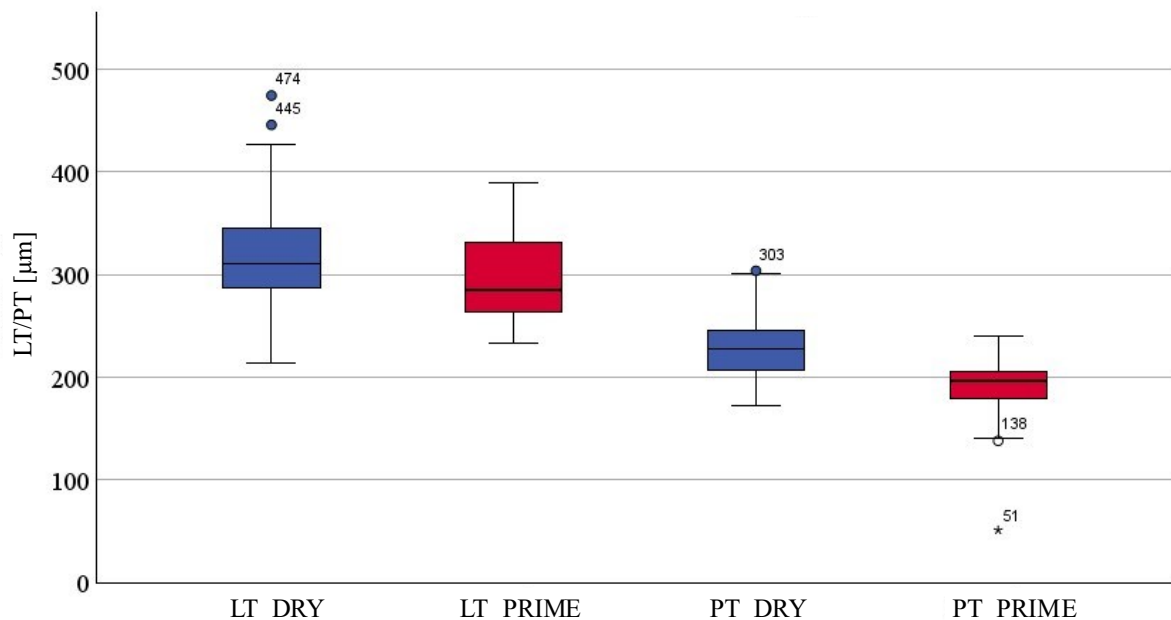
Bei der statistischen Auswertung der lichtmikroskopischen Messwerte der LT und PT zeigt sich ein signifikanter Unterschied der LT ($p = 0,01$) und ein hochsignifikanter Unterschied der PT ($p < 0,001$) zwischen der Experimentalgruppe PRIME und Kontrollgruppe DRY. Dabei liegen die Werte von PRIME sowohl bei Betrachtung der LT als auch bei der PT unterhalb derer der Kontrollgruppe DRY.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Mittelwerte (in Klammern Standardabweichung) und p-Werte aller analysierten Parameter

| | DRY | PRIME | p |
|--------------------------------------|---------------|---------------|----------|
| LT [μm] | 320 (52) | 296 (45) | 0,01 |
| PT [μm] | 227 (28) | 190 (31) | < 0,001 |
| PP(LT) [%] | 72 (12) | 65 (12) | 0,003 |
| LF [mm^2] | 1,238 (0,290) | 1,168 (0,235) | 0,1 |
| IF [mm^2] | 0,831 (0,135) | 0,699 (0,175) | < 0,001 |
| PP(LF) [%] | 69 (12) | 62 (16) | 0,006 |
| n | 51 | 44 | |

| | |
|--------------------------------------|--|
| LT [μm] | Läsionstiefe in μm |
| PT [μm] | Penetrationstiefe des Infiltranten in μm |
| PP(LT) [%] | Prozentuale Penetration des Infiltranten in die demineralisierte Schmelzfläche in Bezug auf die LT |
| LF [mm^2] | Demineralisierter Schmelzbereich in mm^2 |
| IF [mm^2] | Infiltrierter Schmelzbereich in mm^2 |
| PP(LF) [%] | Prozentuale Penetration des Infiltranten in die demineralisierte Schmelzfläche in Bezug auf die LF |
| n | Anzahl der analysierten Probenschnitte |

Abbildung 19 stellt die Mediane und Verteilungen der Messwerte der Experimentalgruppe PRIME und Kontrollgruppe DRY graphisch dar.

**Abbildung 19: Läsions- und Penetrationstiefen DRY vs. PRIME**

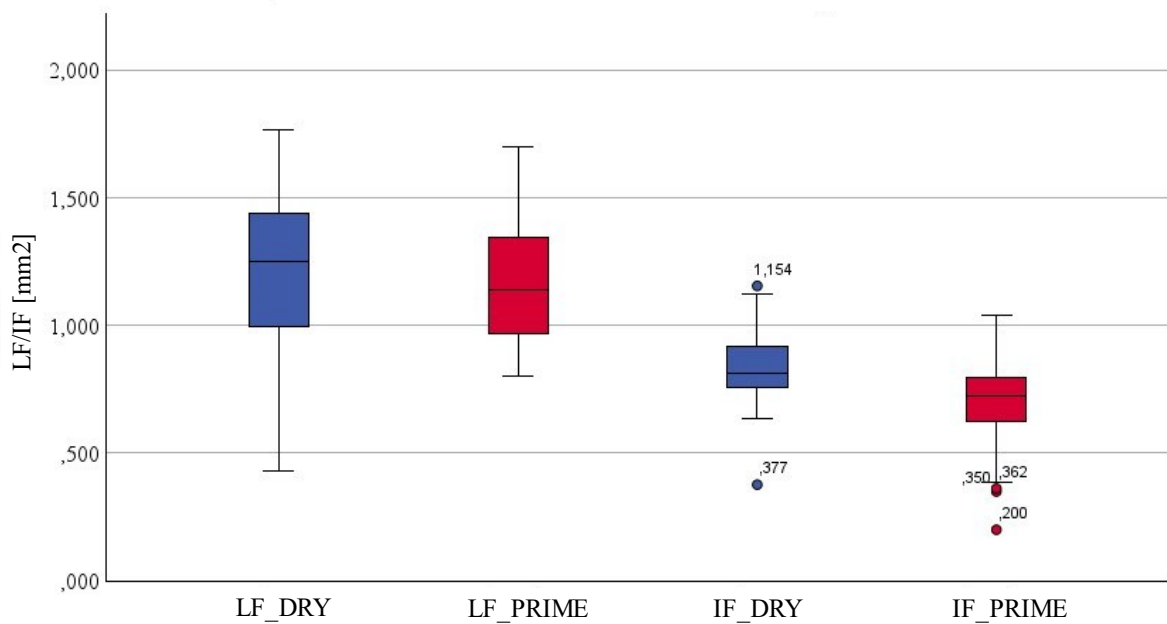


Abbildung 20: Läsions- und Infiltrationsflächen DRY vs. PRIME

Ebenso können für die LF Gruppe PRIME mit $0,699 \text{ mm}^2$ hochsignifikant niedriger als in Gruppe DRY mit $0,831 \text{ mm}^2$ ($p < 0,001$). Sogar die gemessene LF ist in DRY mit durchschnittlich $1,238 \text{ mm}^2$ marginal höher als in PRIME mit $1,168 \text{ mm}^2$, unterscheidet sich aber nicht signifikant ($p = 0,1$). Die Abb. 21 zeigt den Vergleich der PP für DRY vs. PRIME.

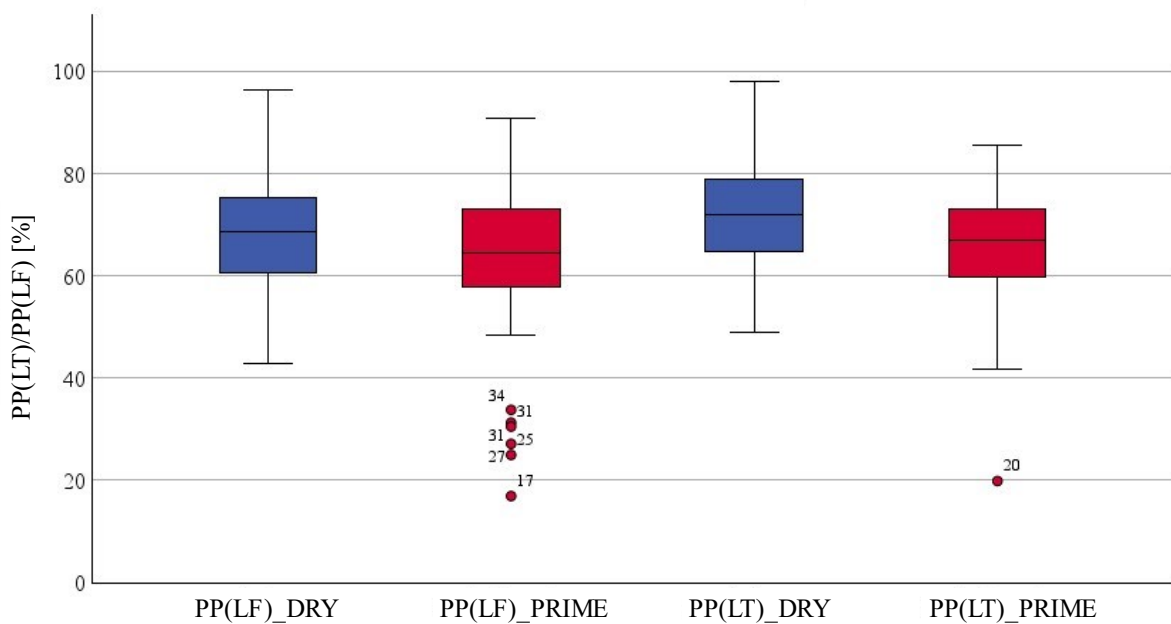


Abbildung 21: Prozentuale Penetrationen der Läsionsfläche und -tiefe DRY vs. PRIME

Die PP wurde jeweils einmal in Bezug auf die LT und einmal in Bezug auf die LF für beide Gruppen berechnet.

Auch für die PP ergeben sich sowohl für PP(LF) als auch PP(LT) signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen DRY und PRIME. Der Wert für die PP(LT) liegt in der Gruppe PRIME mit 65,0 % signifikant unter dem Wert von DRY, der 72,1 % ausmacht ($p = 0,003$). Ein entsprechender Unterschied errechnet sich mit Bezug auf die PP(LF), die bei PRIME 61,6 % gegenüber 69,2 % bei DRY ausmacht ($p = 0,006$, Abbildung 21 und Tabelle 8).

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass in allen bestimmten Parametern bis auf die LF signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen DRY und PRIME festgestellt werden konnten. Dabei liegen die Werte der Experimentalgruppe PRIME immer etwas unterhalb derer der Kontrollgruppe DRY.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Rinderzähne im artifiziellen Läsionsmodell

In dieser experimentellen Arbeit wurden Rinderzähne verwendet, da sie in ausreichend großer Menge und konstanter Qualität erhältlich sind und humanen Zähnen in chemischen sowie histologischen Eigenschaften ähneln. Trotz struktureller Besonderheiten unterscheiden sich humane und bovine Zähne in der Mineralabgabe und Strukturveränderung im künstlichen Läsionsmodell nur wenig (Edmunds et al., 1988). Rinderzähne sind zur Herstellung ausreichend tiefer Läsionen geeignet, da boviner Schmelz poröser und weniger hart als humaner Schmelz ist (Arends et al., 1989) und eine bis zu dreimal höhere Demineralisationsrate aufweist (Featherstone und Mellberg, 1981). Außerdem zeigen Rinderzähne eine gleichmäßigere Schmelzbeschaffenheit als humane Zähne, was zu reproduzierbareren Ergebnissen im In-vitro-Experiment führt (Mellberg, 1992). Gelegentlich wird die unterschiedlich hohe Fluoridaufnahme von Rinderzahnschmelz in Abhängigkeit von der Fluoridquelle kritisiert. Mellberg und Loertscher konnte eine Fluoridaufnahme von 334 ppm aus einer 1,2%igen Natriumfluoridlösung im Vergleich zu 1496 ppm aus einer 1,2%igen Aminfluoridlösung in Rinderzahnschmelz bestimmen, wohingegen humaner Zahnschmelz eine gleichmäßig hohe Fluoridaufnahme zeigte (Mellberg und Loertscher, 1974). Aufgrund der Unterschiede in der relativen Fluoridaufnahme sollten in Fluoridaufnahmestudien nur Humanzähnen als suffiziente Probenkörper betrachtet werden. In der vorliegenden Studie wurde die Fluoridaufnahme der Proben jedoch nicht untersucht. Das Hauptaugenmerk der Untersuchung lag auf der Produktion ausreichend tiefer, intakter Läsionen mithilfe der Demineralisationslösungen, in denen die Fluoridkomponente zur Stabilisierung der De- und Remineralisationsprozesse und der Geschwindigkeit der Läsionsbildung verwendet wurde.

5.1.2 Methoden zur Herstellung künstlicher Läsionen

Die Lösungsansätze zur Herstellung künstlicher Läsionen aus firmeninterner Forschung (DMG, firmeninterne Forschung) und der Literatur - basierend auf dem Ansatz der Buskes-Lösung - (Buskes et al., 1985) wurden miteinander verglichen. Die verwendeten Buskes-Lösungen waren bis auf Unterschiede in der Säurekomponente (Essigsäure, Milchsäure) und dem pH-Wert ähnlich. Sie besaßen die gleichen Konzentrationen an Calciumchlorid,

Kaliumdihydrogenphosphat und MHDP. Auch in der Literatur zeigt sich eine Favorisierung von MHDP-haltigen Lösungen mit Acetatpuffer. Moron et al. (2013) konnten in ihren Untersuchungen die höchsten LT mit einer MHDP-Lösung im Vergleich zu Methylcellulose-Milchsäure-Gel, Polyacrylsäuregel, Acetatpuffer-Lösung und einer pH-Zyklus-Gruppe erreichen. Wie in Kapitel 2.4.2 bereits beschrieben, sind viele verschiedene Parameter für die Läsionsformation entscheidend, insbesondere der pH-Wert, die Liegedauer in der Demineralisationslösung, der Sättigungsgrad der Schmelzminerale, die Anwesenheit von Schmelzauflösungsinhibitoren (Fluorid-Ionen und Proteinen), der Diffusionskoeffizient, die Konzentration der undissoziierten Säure sowie Volumen und Viskosität der Lösung (Moron et al., 2013).

Als Säurekomponente wurde eine Acetat-Pufferlösung (Buskes et al. 1985) benutzt, da bei gleicher Konzentration und pH-Wert Acetat-Pufferlösungen schneller (ca. 1,5-fach) tiefere Läsionen als Laktat-Pufferlösungen produzieren. Dies geschieht, obwohl Milchsäure ($pK_s = 3,86$) formal eine stärkere Säure als Essigsäure ($pK_s = 4,76$) ist, da bei jeder Konzentration und jedem pH-Wert Essigsäure zu mehr Anteilen in der unionisierten Form vorliegt, welche schneller in den Schmelz diffundiert (Featherstone, 1977; Holly und Gray, 1968).

Neben der höheren LT ist das Vorhandensein einer intakten OS für die Infiltration entscheidend, die die initialkariöse Demineralisation von einer Erosion abgrenzt. Dies ist eine Voraussetzung, da der Kariesinfiltrant (Icon®) nur für nicht-kavitierte Läsionen oder entwicklungsbedingte Schmelzveränderungen durch Fluorose oder Trauma indiziert ist, die eine klinisch intakte OS zeigen. Nach ten Cate und Duijsters (1983) kann eine pseudointakte OS mittels Mikroradiographie nur bei Läsionen festgestellt werden, die in fluoridhaltigen Lösungen hergestellt worden sind. Deshalb sollte Fluorid in der Demineralisationslösung enthalten sein. Darüber hinaus sind Calcium- und Phosphat-Ionen entscheidend, da sie in Acetat-Pufferlösungen die Lösung partiell sättigen und eine sogenannte „subsurface lesion“ mit pseudointakter OS bilden. Sie können eine charakteristische Schichtenbildung erzeugen, die natürlichen Läsionen ähneln (ten Cate und Duijsters, 1983b).

Demzufolge lag der Fokus auf einer fluoridhaltigen Buskes-Lösung. In einer Studie der Charité konnte bei Rinderzähnen in Buskes-Lösung (pH-Wert = 5) über 200 Tage eine mittlere LT von „nur“ 280 (79) μm erzeugt werden (Askar et al., 2015). Die pseudointakte OS blieb bei Lagerung in Buskes-Lösung (pH-Wert = 5) über einen großen Zeitraum bestehen, wobei aber keine höheren LT erreicht wurden. Deshalb sollte in der vorliegenden Studie der pH-Wert

verringert werden, um tiefere Läsionen zu erreichen. Da die Löslichkeit von HAP stark pH-abhängig ist (um den Faktor 10 pro pH-Einheit), konnte der pH-Wert nur in kleinen Intervallen verändert werden. Bei der Entwicklung der Läsionsherstellungsmethode wurden bei pH-Werten $< 4,7$ starke Erosionen nach nur kurzer Zeit festgestellt (Kapitel 4.1.3, Methode 1, Lösung B3 nach vier Wochen). Folglich sollte sich der pH-Wert der Buskes-Lösungsansätze zwischen 4,7 - 4,9 bewegen. Um weitere In-vitro Demineralisationsmethoden zu untersuchen, wurde zusätzlich zu den Buskes-Lösungsansätzen eine HEC-Demineralisationslösung (Lösung D) und eine Demineralisationslösung nach ten Cate et al. (Lösung C) angesetzt, da diese zu den etabliertesten Demineralisationslösungen zählen (ten Cate und Duijsters, 1983b). Die HEC-Lösung wurde nach dem Lösungsansatz von Carstens hergestellt (Carstens, 2006).

Für die Läsionsherstellung sind ein genauer Lösungsansatz, Temperierung und pH-Einstellung der Lösungen entscheidend. Um die Messbarkeit mittels pH-Meter zu gewährleisten, wurden die Prüfkörper in flachen, verschließbaren Kunststoffbehältern gelagert. Diese verhinderten ein Verdampfen der Lösung im Trockenschrank und ermöglichten außerdem eine flache Lagerung der Rinderzahnproben mit freier, nach oben gerichteter LF, die vollständig von Lösung umgeben war, sodass Demineralisations- und Diffusionsprozesse ungehindert ablaufen konnten. Nach den ersten Ergebnissen der artifiziellen Kariesauslösung konnten bei den darauffolgenden Methoden mit der Demineralisationslösung B2 durch die Modifikation der Probenvorbereitung viele Parameter des Demineralisationsprozesses verbessert werden. Das Abkleben der Läsionsquadrate konnte durch eine genaue Abmessung ersetzt werden, wodurch Klebereste und Einbrüche der Läsionsoberfläche vermieden wurden. Außerdem wurde der Einfluss der pH-Einstellung untersucht und optimiert. Das Ansteigen der SD des pH-Wertes der Lösung bei seltenerer pH-Einstellung deutet auf eine entscheidende Rolle der regelmäßigen pH-Einstellung hin. Durch die pH-Einstellung wurde außerdem die regelmäßige Lösungsdurchmischung gewährleistet.

Die Lagerung der Rinderzähne im Trockenschrank kann zu abrupten, starken temperaturgetriebenen Demineralisationsreaktionen geführt haben. Da der Trockenschrank in Heizintervallen beheizt wurde, imitierte die intervallartige Temperaturänderung den kariogenen Säureangriff. Die Lagerung in einem Inkubator mit konstanter Temperatur hätte ein gemäßigteres Umfeld geboten und dadurch hätten womöglich homogenere Läsionen erzeugt werden können. Darüber hinaus bedarf es weiterer Untersuchungen, ob durch ein pH-Cycling-Modell oder einen vollautomatisierten Versuchsaufbau mit automatischer

Lösungsdurchmischung, pH-, Temperatur- und Konzentrationseinstellung reproduzierbarere Versuchsbedingungen geschaffen und tiefere Läsionen hätten erzeugt werden können.

Rinderzahnproben unterliegen als biologisches Probenmaterial einer natürlichen Variabilität in Beschaffenheit und Schmelzaufbau, welche sich ebenfalls in den Ergebnissen der Läsionsschnitte zeigte. Der unterschiedlich gewählte Fluoridgehalt der Demineralisationslösungen spiegelte sich ebenfalls in der pH-Messung wider. Je höher die Fluoridkonzentration, desto geringer die SD des pH-Wertes der Lösung. Außerdem wirkte sich der Fluoridgehalt der Lösung auf die Geschwindigkeit der Läsionsbildung und die Läsionsbeschaffenheit aus. Je höher die Fluoridkonzentration, desto langsamer und flacher bildeten sich die Läsionen und umso stabiler war die Läsionsbeschaffenheit.

Die Vorbereitung der Rinderzahnproben (Auswahl, Reinigung, Schliff und Politur) erfolgte nach einem standardisierten Herstellungsverfahren für die Vorbereitung boviner Zahnproben nach Askar et al. (2015). Darüber hinaus wurde eine zusätzliche Kunststoffschicht des Einbettkunststoffes zum Schutz der Läsion vor dem Sägen direkt nach dem Schleifen aufgebracht. Dadurch konnten Schäden an den Schmelzläsionen der Rinderzahnproben vermieden werden.

5.1.3 Läsionsherstellung

Im Vorversuch wurden in Methode 1 zur Herstellung ausreichend tiefer und intakter Läsionen acht verschiedene Demineralisationslösungen mit unterschiedlichen Zusammensetzungen, pH-Werten und Fluoridgehalten untersucht. Es zeigten sich umso schneller tiefere Läsionen, je niedriger der pH-Wert und die Fluoridkonzentration der Lösung waren. Bei den Lösungen A1 und B1 kam es sogar zum Rückgang der Läsionstiefe (Abbildung 6) oder zum vollständigen Verschwinden der Läsion (Abbildung 3) im Laufe der Demineralisationszeit. Dieses Phänomen kann auf die hohe Fluoridkonzentration der Lösungen A1 und B1 von 0,5 ppm zurückgeführt werden, welche die Demineralisationsvorgänge stabilisiert und nach Erreichen eines Sättigungsgleichgewichts sogar zur einer Remineralisierung geführt hat (ten Cate und Duijsters, 1983a).

Im Verlauf der Entwicklung der Läsionsherstellung konnten die höchsten LT bei gleichzeitig homogenster und stabilster Läsionsformation mit pseudointakter OS in der Lösung B2 festgestellt werden. Gründe dafür können das ideale Verhältnis zwischen Calcium- und Phosphat-Ionen der partiell gesättigten Buskes-Lösung, eine wirkungsvolle Säurekomponente

(Acetat- und MHDP-Puffer) und der niedrigere pH-Wert von 4,7 gewesen sein. In den Methoden 2- und 3-B2 wurden die 400 μm LT aus Versuch 1 jedoch nicht erreicht. Dies kann durch größere pH-Schwankungen, die seltenere pH-Messung und Einstellung (nur zwei Mal wöchentlich ab Woche zwei) im Vergleich zur täglichen Messung und damit auch eine geringere Durchmischung der Lösung (HAP- und Fluorid-Ionen) erklärt werden. Aufgrund des höheren Volumens von 480 ml in Methode 3-B2 (Kapitel 4.1.7) im Vergleich zu 360 ml in Methode 2 stieg der Lösungsspiegel in den Lösungsgefäßen an. Im Vergleich zum Lösungsvolumen von 360 ml, bei dem das Diaphragma der pH-Elektrode nur gerade eben bedeckt war, konnte mit dem Volumen von 480 ml eine ausreichende Bedeckung des Diaphragmas der pH-Elektrode gesichert werden.

Die Ergebnisse der Lösung C zeigten eine geringe Streuung und relativ hohe LT, erreichten aber keine LT über 300 μm . Dies ist mit dem niedrigen Lösungs-pH-Wert von 4,5 bei gleichzeitig hoher Fluoridkonzentration von 0,5 ppm zu erklären, wodurch die Demineralisationsvorgänge stabilisiert wurden. Die Lösung D produzierte bereits nach kurzer Zeit starke Erosionen. Gründe dafür können die hohe Viskosität des Cellulose-Gels und eine damit verbundene unzulängliche Durchmischung der Lösung sein, wodurch kein homogenes Ionen-Gleichgewicht hergestellt werden konnte. Dadurch kam es zu Konzentrations-Gradienten, die in kurzer Zeit zu erhöhten Diffusionsprozessen und einer hohen Schmelzauflösung führten. Auch durch die Lagerung in einer Remineralisationslösung (ten Cate und Duijsters, 1982) konnten die Läsionen nicht remineralisiert werden, da bereits zu große kavitierte erosive Defekte entstanden waren. Durch eine häufigere Stichprobenuntersuchung der LT oder ein anderes künstliches Läsionsmodell wie z. B. pH-Cycling könnte untersucht werden, ob eine frühzeitige Erosion hätte vermieden werden können.

In den Ergebnissen aus dem Vorversuch der Methoden 1-4 ist die Entstehung tieferer Läsionen bei niedrigerem pH-Wert und einer niedrigeren Fluoridkonzentration in kürzerer Zeit zu erkennen. Dies liegt an den bereits diskutierten chemischen Einflüssen des pH-Werts der Lösung. Es ist eine Häufung hoher LT, um Woche vier bis sechs mit wieder abfallenden LT ab Woche sechs festzustellen. Dies kann durch die allmähliche Sättigung der Lösungen mit Calcium- und Phosphat-Ionen erklärt werden. Nach vier bis sechs Wochen waren die Lösungen vollständig gesättigt und konnten keine weiteren Schmelz-Ionen aufnehmen, weshalb sich die Demineralisation verlangsamt und sich ein Sättigungsgleichgewicht einstellte. Das Gleichgewicht ist abhängig vom Verhältnis zwischen exponierter Schmelzfläche, Lösungsvolumen und Löslichkeitsprodukt der HAP-Ionen wie z. B. Calcium und Phosphat. Das

verwendete Läsionsmodell erfolgte nach dem Prinzip der Volumenkonstanz, bei der i. d. R. die Demineralisationslösung nicht gewechselt wird. Eine Beschleunigung und Fortsetzung der Demineralisation könnten durch das Austauschen der gesättigten Lösung untersucht werden. Der Austausch sollte unter Kontrolle der Ionenkonzentration und LT erfolgen, um Erosionen und Kavitationsdefekte zu vermeiden.

Die durchschnittliche LT in der Gesamtauswertung und Analyse aller verwendeten Rinderzähne lag bei 307,9 μm (SD = 49,8). Somit konnte nach einer Demineralisationszeit von nur vier Wochen aufgrund des niedrigeren pH-Wertes eine höhere LT als in vergleichbaren Studien erreicht werden. Askar et al. erreichten mit der Buskes-Lösung und einer Einlagerungszeit von 200 Tagen eine durchschnittliche LT von 280 μm (SD = 79) bei einem pH -Wert von 4,9 (Askar et al., 2015).

5.1.4 Methodenentwicklung zur Infiltration

In dieser In-vitro-Studie sollte die Hypothese überprüft werden, dass sich die mitunter klinisch feststellbare, nur partielle Infiltration von Läsionen durch eine Modifikation des Trocknungsschrittes der Infiltrationsprozedur verringern oder verhindern lässt. Um solche Unterschiede zwischen den Gruppen (DRY und PRIME) nachweisen zu können, war ein Infiltrationsprotokoll grundlegende Voraussetzung, bei dem die Infiltration gezielt nur partiell erfolgte. Da über das vorgegebene, künstliche Läsionsmodell keine LT erreicht werden konnten, die nicht nach dem durch die Gebrauchsinformation vorgegebenen Infiltrationsprotokoll vollständig infiltriert wurden, musste das Infiltrationsprotokoll modifiziert werden. Abweichend vom klinischen Herstellerprotokoll wurde hierbei auf die Phosphorsäureätzung, die routinemäßig mit HCL (15 %) durchgeführt wird, verzichtet. Im Vorversuch zeigte sich, dass ein Phosphorsäuregel wegen der höheren Porosität des bovinen Schmelzes eine zu erosive Wirkung auf den geschliffenen Schmelz ausübte. An erodierten Proben kam es zudem häufiger zu einer Auflagerung vom Infiltranten auf die Läsionsoberfläche.

5.1.5 Darstellung von Läsionen und infiltrierten Anteilen

Entscheidend für Untersuchungen der (Karies-)Infiltration ist außerdem die Darstellung des Infiltranten. Ein häufig verwendetes Verfahren ist die durch Paris und Meyer-Lückel et al. (2009) entwickelte „indirect staining“-Technik, bei der die Läsionen indirekt mittels Rhodamin

B Isothiocyanat eingefärbt werden. Anschließend werden die Proben mit Wasserstoffperoxid gebleicht und ungebundener Farbstoff wird ausgewaschen. Vor dem Mikroskopieren werden nicht infiltrierte Bereiche mit Fluorescein-Natriumsalz eingefärbt. Die Analyse erfolgt mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (KLSM) (Paris et al., 2009). Das Verfahren ist aufwendig und benötigt für die Analyse der Läsionen ein Laser-Scanning-Mikroskop.

In dieser Untersuchung wurde der Infiltrant in einem lichtmikroskopischen Verfahren über eine Markierung mit dem UV-Fluoreszenzfarbstoff Tinopal OB analysiert. Vorteile des Verfahrens waren eine gute eindeutige Darstellung mit starkem UV-Signal des Tinopal, sowohl bei reiner UV-Beleuchtung als auch bei kombiniertem normalen Aufsicht plus UV-Belichtung. Entscheidend war die genaue manuelle Einstellung der UV-Lichtquelle, da die infiltrierte Läsionen durch unterschiedliche Läsionsformationen und Infiltrantenmengen innerhalb der Läsionen unterschiedliche Mengen Tinopal aufwiesen. Deshalb wurde die UV-Lampe für jede Probe individuell eingestellt, um eine scharfe Aufnahme zu erhalten. Von Vorteil ist die deutliche Vereinfachung der Probenanfärbung und damit die Sicherstellung der vollständigen Färbung des Infiltranten, da der Farbstoff bereits vor der Infiltration dem Infiltranten zugegeben wird. Darüber hinaus konnte die Analyse an einem Lichtmikroskop mithilfe einer UV-Lampe erfolgen und benötigte kein Laser-Scanning-Mikroskop.

Die Aufnahmen in 5- und 10-facher Vergrößerung eigneten sich gut für die qualitative und quantitative Bestimmung der LT und PT. Dabei konnte durch die hohe Vergrößerung in mehreren Ausschnitten die Läsion vollständig analysiert und abgebildet werden. Die Aufnahmen in 2,5-facher Vergrößerung ermöglichten in der Diagonalen die Aufnahme der gesamten LF. Somit konnten auch Parameter wie die LF, IF und PP bestimmt werden. Diese Parameter liefern Informationen über mögliche Unterschiede zwischen Kontroll- und Experimentalgruppe in der LF. Infolgedessen konnte zusätzlich zur Analyse der LT ein Einfluss der MDP-Modifikation auf die Penetration des Infiltranten in der horizontalen Läsionsebene untersucht werden. Durch die diagonale Ausrichtung und Aufnahme der gesamten LF in einem Bild konnten entsprechend weniger Aufnahmen pro Läsion im Vergleich zur 5- bis 10-fachen Vergrößerung angefertigt werden.

Zielparameter waren somit die LT, PT, LF, IF sowie die PP(LT) und PP(LF). Über die Bestimmung der PP erfolgte eine vergleichende Analyse der relativen Penetration des Infiltranten in die Läsion im Verhältnis zur LT und LF. Die PP(LT) und PP(LF) sind interessant, da die erfolgreiche Infiltrationstherapie abhängig von einer möglichst vollständigen Infiltration der Läsion in die Tiefe und auf der gesamten Läsionsfläche ist.

5.2 Diskussion der Ergebnisse (Hauptversuch)

Die Infiltrationstherapie mit dem Produkt Icon® (DMG, Hamburg) ist ein seit über zehn Jahren etabliertes, mikroinvasives Therapieverfahren für die Kariesarretierung von nicht kavittierter Initialkaries und Maskierung entwicklungsbedingter Schmelzdefekte durch Fluorose oder Trauma. Die klinische Wirksamkeit der Kariesarretierung (vestibulär und approximal) sowie die erfolgreiche Maskierung von vestibulären Schmelzveränderungen wurde in zahlreichen klinischen Studien bestätigt (Bourouni et al., 2021; Cebula et al., 2023).

Häufige Fehlerquellen im klinischen Protokoll sind die multiplen Ätzintervalle und lange Infiltrationsdauern, die nötig sind, um die Läsionen vollständig zu infiltrieren. Darüber hinaus gibt es Schwierigkeiten bei der Infiltration von komplexen, entwicklungsbedingten Schmelzveränderungen wie bei MIH, da die Fläche, die Tiefe der Veränderung und das Penetrationsausmaß der infiltrierten MIH-Läsion schwer vorhersehbar sind (Crombie et al., 2014). Um Defizite im Infiltrationsprotokoll zu optimieren und die Behandlung komplexer entwicklungsbedingter Schmelzveränderungen zu ermöglichen, sollte ein Verfahren zur Verbesserung der Infiltration untersucht werden.

Im Hauptversuch wurde zur Minimierung der klinisch vorkommenden Infiltrationsdefizite der Icon®-Trocknungskomponente das funktionelle Monomer MDP hinzugefügt. MDP hat sich in der Adhäsivtechnik als funktionelles Monomer bewährt. Untersuchungen über die Verwendung von MDP im Zuge der Adhäsivtechnik zeigen die Bildung von Mikrohybridschichten (Shibuya et al., 2019), ABRZ (Li et al., 2010) und MDP-Calcium-Salzen (Fukeygawa et al., 2006; Takahashi, 2014) und erklären eine hohe chemische Wechselwirkung von MDP mit HAP. Ein Großteil dieser Studien entstand während der Entwicklung der Dentinadhäsive. Mittlerweile ist bekannt, dass der Einbau funktioneller Monomere wie MDP in dentale Adhäsivsysteme, die chemische Interaktion mit HAP verbessert, was zu höheren Adhäsionskräften im Vergleich zur rein mikromechanischen Adhäsion führt (Carrilho et al., 2019). Allerdings untersuchte keine der Studien den Einfluss von MDP auf die Infiltration von IC oder Schmelzveränderungen.

Darüber hinaus wurde der Einfluss von MDP auf die Infiltration in einem Glaskapillarversuch untersucht (Firmeninterne Forschung DMG, Hamburg). Die Methode diente zur Beurteilung der Infiltrationstiefe anhand der Steighöhe des Infiltranten in Kapillaren. Die Schmelzläsionskanäle können vereinfacht als Bündel von Kapillaren gesehen werden, in dem die Penetration durch die kapillare Strömung angetrieben wird (Buckton, 2000; Paris et al., 2007a). In der Methode zeigte sich bei einer mit Icon® Prime benetzten Glaskapillare eine um 30 % erhöhte Steighöhe des Infiltranten im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Icon® Dry. Bisher

war jedoch nicht bekannt, wie sich MDP im In-vitro-Experiment auf die Infiltration auswirkt. Deshalb wurde in dieser Studie der Einfluss einer Modifikation der Trocknungskomponente durch Zugabe von MDP auf die Infiltration untersucht.

Die Trocknungskomponente Icon® Dry wird bisher für die Trocknung der Läsion und zur Kontrolle des Ätzerfolgs benutzt. Das Icon® Dry ist darüber hinaus eine gute Stellschraube für eine Modifikation des Verfahrens, da es ein isolierter Arbeitsschritt ist. Die Ethanol-Lösung kann mit MDP modifiziert werden, ohne dass das klinische Protokoll verändert werden muss. Somit kann die MDP-Ethanol-Lösung (Icon® Prime) die Läsion zusätzlich zur Trocknung in der Funktion eines *Primers* auf die Infiltration vorbereiten.

Der qualitative Vergleich der Ergebnisse des Infiltrationsversuchs zeigte in beiden Gruppen größtenteils intakte Läsionen mit einer homogenen Penetration des Infiltranten in die Schmelzläsion. Jedoch wiesen die Läsionen der Experimentalgruppe PRIME häufiger unregelmäßige Infiltrantenverteilungen und erosive Defekte auf, infolgedessen es zu einer erhöhten Dropoutrate ungeeigneter Schnitte kam. Die Auswertung und der quantitative Vergleich bestätigten einen Ausschluss von 10 % mehr Rinderzähnen in der Gruppe PRIME aufgrund von Erosionen (27 % in DRY, 37 % in PRIME). Diese Defekte der PRIME-Läsionen können durch die starken Wechselwirkungen zwischen dem HAP und MDP erklärt werden, durch die eine Verbesserung der Infiltration erzielt werden sollte. Bei der Applikation der MDP-Ethanol-Lösung kann es durch die starken Adhäsionskräfte sowie Wechselwirkungen zwischen HAP, MDP und dem Infiltranten zu Spannungen innerhalb der Läsion gekommen sein, die zu Defekten geführt haben. Die hydrophile saure Phosphatgruppe des MDP, die in der Adhäsivtechnik zur partiellen Demineralisation der Dentinoberfläche führt, könnte die demineralisierte Schmelzmatrix der künstlichen Kariesläsion erosiv schädigen (Ikemura et al., 2006; Li et al., 2010).

Im Hauptversuch wurden die Parameter LT, PT, LF, IF, sowie PP(LT) und PP(LF) bestimmt. In allen Parametern mit Ausnahme der LF lagen die Ergebnisse der Anwendung von Icon® Prime statistisch signifikant unter denen der DRY-Gruppe (t -Test, $p < 0,05$). Die PT und die IF waren in der Testgruppe mit $190 \mu\text{m}$ vs. $227 \mu\text{m}$ bzw. $0,699 \text{ mm}^2$ vs. $0,831 \text{ mm}^2$ mit $p < 0,001$ hochsignifikant geringer als in der Kontrollgruppe.

Die für die PRIME-Gruppe signifikant geringere LT ist methodisch oder ursächlich nicht zu erklären. Sie dürfte allein auf einer zufällig ungleichen Aufteilung der Probekörper vor Anwendung des Trocknungsschrittes beruhen. Grundsätzlich kann zwar eine Beeinflussung der Läsionstiefenbestimmung durch den Trocknungsschritt nicht ausgeschlossen werden, eine

logische Erklärung bezüglich einer Veränderung der Messung durch die Anwendung von Icon® Prime erschließt sich jedoch nicht.

Es kann davon ausgegangen werden, dass flachere Läsionen eher vollständig mit dem Infiltranten penetrierbar sind als tiefere Läsionen. Die Studie zeigte aber ein umgekehrtes Ergebnis: Obwohl sich die mit Icon® Prime getrockneten Läsionen als flacher darstellen, ist die PT absolut und in prozentualer Relation zur LT weniger ausgeprägt als in der DRY. Dadurch erhält die Feststellung, dass der mit MDP versehene Trocknungsschritt eine vollständigere Infiltration nicht fördert, zusätzliche Sicherheit.

Die von Carrilho et al. (2019) durchgeführte Literaturanalyse von mehr als 800 Artikeln hat die Beurteilung der von MDP-haltigen Adhäsivsystemen erzeugten Grenzfläche zum Dentin im Hinblick auf die Parameter Mikrohybridschichten, ABRZ und Adhäsionsstabilität zum Inhalt. Die Analyse ergab u. a., dass für eine langzeitstabile Haftverbindung eine manuelle Einarbeitung des Adhäsives z. B. mit der „Scheuertechnik“ entscheidend sein kann, um das Eindringen der Monomere zu verbessern. Das MDP benötigt Zeit, um in das Dentin vorzudringen, es zu hybridisieren und das MDP-Calcium-Salz bilden zu können, wodurch die Stabilität des Adhäsives verbessert wird (Carrilho et al., 2019). Bei dem hier durchgeführten Versuch wurde die MDP-haltige Ethanol-Lösung (Icon® Prime) ohne Scheuertechnik aufgetragen und für 30 s auf der Läsionsoberfläche belassen. Nach dieser Zeit hatte sich die Ethanol-Lösung bereits vollständig verflüchtigt. Ob ein höheres Volumen oder ein manuelles Einarbeiten der PRIME-Lösung zu besseren Ergebnissen im Infiltrationsversuch führt, wäre weiter zu untersuchen. Dies würde aber ein Abweichen vom bisherigen klinischen Anwendungsprotokoll bedeuten.

Die weniger tiefe Penetration des Infiltranten in die Läsion und die geringere Infiltration der LF könnten zudem durch die starken Adhäsionskräfte des MDP erklärt werden. Das Haftmonomer MDP geht aufgrund seiner bifunktionellen chemischen Eigenschaften sowohl mit dem HAP des Zahnschmelzes als auch dem hydrophoben Infiltranten chemische Wechselwirkungen ein (Shibuya et al., 2019). Das MDP benetzt bei Zugabe der Prime-Lösung gemeinsam mit dem Ethanol die Läsionskanäle in der Tiefe. Durch die starke chemische Interaktion von MDP und HAP wird das HAP angelöst und es bilden sich hydrolysebeständige MDP-Calcium-Salze (Takahashi, 2014). Die Läsionskanäle könnten durch die ausgefallenen MDP-Calcium-Salze eingeengt oder verschlossen werden. Aufgrund einer derartigen Verengung der Läsionskanäle durch MDP-Calcium-Salze, welche sich an die inneren „Wände der Schmelzkapillaren“ anlagern, mag es in der vorliegenden Untersuchung zu einer

langsameren und unvollständigen Penetration des Infiltranten in die Läsion gekommen sein. Somit ist denkbar, dass sich die als Grundlage der Untersuchung angenommene bessere Penetration des MDP-modifizierten Trocknungsschrittes infolge zu starker Bindungskräfte des MDP bereits im oberen Teil der künstlichen Läsionen in das Gegenteil verkehrt haben könnte.

Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass dieses Ergebnis unter einem deutlich vom klinischen Vorgehen abweichenden Infiltrationsprotokoll erzielt wurde. Durch die starke Modifikation des Infiltrationsprotokolls mit Verkürzung der Infiltrationsdauer auf drei s könnte eine tiefere Infiltration (maximale Steighöhe) nach einer längeren Infiltrationsdauer mit Icon® Prime verpasst worden sein. Die starke Verkürzung der Infiltrationsdauer war jedoch nötig, um eine partielle Infiltration und damit Vergleichbarkeit zwischen Kontroll- und Experimentalgruppe zu erreichen.

5.3 Ausblick

Aus der Studie ergeben sich methodische Ausblicke für die weitere Untersuchung der Fragestellung sowie inhaltliche Ausblicke bezüglich der Anwendung von MDP in der Infiltrationstherapie. Mithilfe des in Abschnitt 2.4 beschriebenen automatisierten Verfahrens mit pH-Cycling oder Artificial-Mouth-Systemen könnten die orale Umgebung und die kariogene Läsionsbildung realitätsgetreuer simuliert werden. Möglicherweise erlauben diese Verfahren die Herstellung tieferer reproduzierbarer Läsionen, die eine längere Infiltrationsdauer und bessere Vergleichbarkeit im Infiltrationsexperiment ermöglichen. Eine höhere Aussagekraft hätten auch Versuche an humanen natürlichen Läsionen, die aber vorab auf eine ähnliche Zusammensetzung und eine ausreichend hohe LT z. B. durch Mikro-Radiographie untersucht und selektiert werden müssten.

Die in dieser Arbeit entwickelten Protokolle zur Läsionsherstellung und Infiltration können in weiteren Studien zur Therapie von IC und Infiltration von WSL und Schmelzveränderungen Anwendung finden. Ebenso sind Weiterentwicklungen dieser Methoden, insbesondere die Läsionsherstellung in feiner abgestuften pH-Werten und Fluoridkonzentrationen bei den Demineralisationslösungen über einen längeren Zeitraum, denkbar.

Das Tinopal-OB-Verfahren eignet sich gut zur Darstellung des Infiltranten am Lichtmikroskop und bietet eine praktische Alternative zur KLSM. Die Detektion durch Kombination des Infiltranten mit Tinopal OB kann an Fluoreszenzmikroskopen mit eingebauter UV-Lichtquelle weiterentwickelt werden.

Neben diesen methodischen Ausblicken lassen sich aus der Studie auch Ansätze für weitere Untersuchungen zum Effekt von MDP auf die Kariesinfiltration ableiten. So könnte das MDP in unterschiedlichen Konzentrationen sowohl als *Primer* zum Icon® Dry als auch direkt zum Infiltranten hinzugegeben werden. Damit könnten die beschriebenen chemischen Interaktionen des MDP direkt im Infiltranten untersucht werden.

5.4 Fazit

In dieser In-vitro-Studie konnte durch Veränderung und Weiterentwicklung des Lösungsansatzes der Buskes-Lösung eine Methode zur Herstellung künstlicher Schmelzläsionen entwickelt werden, bei der in vier Wochen Demineralisationszeit mehr als 300 µm tiefe künstliche Initialkaries-ähnliche Läsionen an Rinderzahnproben entstanden. Das in mehreren Vorversuchen untersuchte Verfahren bietet eine verlässliche Methode zur schnellen, reproduzierbaren Läsionsherstellung. In einem weiteren Vorversuch wurde ein Infiltrationsprotokoll entwickelt, welches eine partielle Infiltration der Läsionen gewährleistet. Durch die Kombination des Infiltranten mit Tinopal OB konnte eine praktische Methode zur Analyse von infiltrierten Läsionen am Lichtmikroskop entwickelt werden.

Im Hauptversuch konnte der Einfluss einer MDP-Modifikation der Ethanol-Lösung auf die Kariesinfiltration im Vergleich zwischen Experimentalgruppe PRIME und Kontrollgruppe DRY untersucht werden.

Die der Studie zugrunde gelegten Hypothesen sind wie folgt zu beantworten: Durch eine Modifikation der Ethanol-Lösung (Icon® Dry) mit MDP (Icon® Prime) kann durch die chemische Interaktion zwischen dem funktionellen Monomer MDP und HAP die Penetration des Icon®-Infiltranten in die Schmelzläsionen beeinflusst werden. Die MDP-Zugabe (Gruppe PRIME) verbessert in diesem experimentellen Setup jedoch nicht die Infiltration, sondern führt zu signifikant geringeren PT, IF und PP als die Anwendung der unveränderten Lösung (DRY).

6 Zusammenfassung

Bei der mikroinvasiven Infiltrationstherapie mit Icon® (DMG) werden initialkariöse Läsionen (IC) häufig nicht vollständig infiltriert. In dieser In-vitro-Studie sollte die Auswirkung einer Modifikation des Trocknungsschrittes durch Zugabe von 10-Methacryloyloxydecyl-dihydrogenphosphat (MDP) zur routinemäßig verwendeten 99%igen Ethanol-Lösung (Icon® Dry) auf die Infiltration untersucht werden. MDP ist in der Lage, spezifische chemische Interaktionen zwischen dem Infiltranten und dem Hydroxylapatit (HAP) zu vermitteln.

Daher sollte in dieser In-vitro-Studie an artifiziellen Rinderzahnschmelzläsionen (RZL) untersucht werden, ob eine MDP-Ethanol-Lösung (Icon® Prime) zusätzlich zur Trocknung in der Funktion eines *Primers* die Infiltration von ICs verbessert. Für eine vergleichende Analyse waren ausreichend tiefe Läsionen nötig, die eine partielle Infiltration ermöglichen. In Vorversuchen wurde eine geeignete Methode zur chemischen Läsionsherstellung entwickelt. Die Tiefe und Qualität wurde an geschliffenen, polierten RZL bestimmt. Die höchsten Läsionstiefen (LT) von 307,9 µm (SD = 49,8) bei gleichzeitig homogener Läsionsstruktur konnten mit einer modifizierten Buskes-Lösung (pH 4,7; 0,1 ppm Fluorid) über einen Demineralisationszeitraum von vier Wochen erzeugt werden. In einem weiteren Vorversuch wurde ein Infiltrationsprotokoll entwickelt, das eine partielle Penetration des Infiltranten in die Läsionen erlaubt. Es bestand aus der direkten Trocknung ohne Ätzschritt mit 3 µl Dry/Prime für 30 s, Infiltration mit 3 µl Icon®-Tinopal für 3 s und Lichthärtung für 40 s.

Im Hauptversuch wurden 44 RZL in der Experimentalgruppe PRIME (Ethanol und MDP) und 51 in der Kontrollgruppe DRY (Ethanol) getrocknet und infiltriert. Durch Zugabe von Tinopal OB zum Infiltranten konnte die Infiltration unter UV-Licht lichtmikroskopisch untersucht werden. Es wurden die Parameter LT, Penetrationstiefe (PT), Läsionsfläche (LF), Infiltrationsfläche (IF), sowie die prozentuale Penetration (PP) der LT und LF (PP(LT), PP(LF)) bestimmt. In allen Parametern mit Ausnahme der LF lagen die ermittelten Werte von PRIME statistisch signifikant unter DRY (t-Test, $p < 0,05$). Die PT und die IF lagen in PRIME mit 190 µm vs. 227 µm bzw. 0,699 mm² vs. 0,831 mm² mit $p < 0,001$ hochsignifikant unter DRY. Die Studie zeigt somit unter den gewählten experimentellen Bedingungen eine Verringerung der PT durch die Verwendung von MDP. Dies kann durch zu starke Wechselwirkungen des MDP mit HAP oder durch experimentelle Besonderheiten, mit denen gezielt partielle Infiltrationen erzeugt werden sollten, erklärt werden. Weiterführende Studien an Humanzähnen mit natürlicher IC und längeren Infiltrationsdauern könnten zur Überprüfung eines Effektes des MDP weiteren Aufschluss geben.

Abstract

In infiltration therapy with Icon® (DMG), initial carious lesions (IC) are often not completely infiltrated. The aim of this in vitro study was to investigate the effect of modifying the drying step by adding 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate (MDP) to the routinely used 99% ethanol solution (Icon® Dry) on infiltration. MDP can mediate specific chemical interaction between the infiltrant and the hydroxyapatite (HAP). In this In-vitro study therefore it should be investigated in artificial bovine enamel lesions whether an MDP-ethanol solution (Icon® Prime) improves the infiltration of ICs in addition to drying in the function of a primer.

Sufficiently deep lesions that allow partial infiltration were required for a comparative analysis. A suitable method for chemical lesion production was developed in pre-experiments. The depth and quality of the artificial lesions were determined on ground, polished bovine tooth samples. The highest lesion depths (LT) of 307.9 µm (SD = 49.8) with the most homogeneous lesion structure were produced with a modified Buskes solution (pH 4.7; 0.1 ppm fluoride) over a demineralisation period of four weeks. By analysing further infiltration parameters a protocol was developed that allowed partial penetration of the infiltrant into the lesions. This protocol consisted of direct drying without an etching step with 3 µl Dry/Prime for 30 s, infiltration with 3 µl Icon®-Tinopal for 3 s and subsequent light-curing for 40 s.

In the infiltration experiment 44 bovine enamel samples with demineralisations in the experimental group (PRIME) were dried with Icon® Prime (ethanol and MDP) and 51 samples in the control group (DRY) with Icon® Dry (ethanol). This was followed by infiltration. By adding Tinopal OB to the infiltrant, the infiltration could be analysed under a light microscope using UV light. The parameters LT, penetration depth (PT), lesion area (LF), infiltration area (IF) and the percentage penetration (PP) of the LT and LF (PP(LT), PP(LF)) were determined. In all parameters but LF, the values determined for PRIME were statistically significantly lower than those of DRY (t -test, $p < 0.05$). At 190 µm vs. 227 µm and 0.699 mm² vs. 0.831 mm² respectively, PT and IF were highly significantly lower in PRIME than DRY with ($p < 0.001$).

The study thus shows a reduction in PT using Icon® Prime under the selected experimental conditions. This can be explained by too strong interactions of the MDP with HAP or by experimental conditions with which partial infiltrations were specifically created. Further studies on human teeth with natural initial carious lesions and longer infiltration times could provide additional information to examine the effect of the MDP.

7 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|---|
| ABRZ | <i>acid and base resistant zone</i> |
| DMG | Dental-Material Gesellschaft mbH |
| FHAP | Fluorhydroxylapatit |
| Gew.-% | Gewichtsprozent |
| HAP | Hydroxylapatit |
| HCl | Salzsäure |
| HEC | Hydroxyethylcellulose |
| HK | Knoop <i>hardness</i> |
| ICDAS | <i>International Caries Detection and Assessment System</i> |
| IF | Infiltrationsfläche |
| PT | Penetrationstiefe |
| KOH | Kaliumhydroxid |
| KLSM | Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop |
| LF | Läsionsfläche |
| LT | Läsionstiefe |
| MDP | 10-Methacryloyloxydecyldihydrogenphosphat |
| MHDP | Methylendiphosphonsäure |
| MSCBM | <i>Multi-station continuous-culture biofilm Model</i> |
| OS | Oberflächenschicht |
| pH | negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration |
| PK | Penetrationskoeffizient |
| PP | Prozentuale Penetration |
| PP(LF) | Prozentuale Penetration bezogen auf die Läsionsfläche |
| PP(LT) | Prozentuale Penetration bezogen auf die Läsionstiefe |
| ppm | Parts per million |
| PT | Penetrationstiefe |
| RZL | Rinderzahnschmelzläsionen |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| UV | Ultraviolett |
| WSL | White-Spot-Läsion |

8 Literaturverzeichnis

- Acevedo, A. C. (2010). Saliva and oral health. In *Rev Assoc Med Bras* (3 rd, Vol. 56, Issue 1). BDJ Books.
- Arends, J., & Christoffersen, J. (1986). Invited Review Article: The Nature of Early Caries Lesions in Enamel. *J Dent Res*, 65(1), 2–11.
- Arends, J., & Christoffersen, J. (1990). Nature and role of loosely bound fluoride in dental caries. *J Dent Res*, 69 Spec No, 601–606.
- Arends, J., Christoffersen, J., Ruben, J., & Jongebloed, W. L. (1989). Remineralization of bovine dentine in vitro. The influence of the F content in solution on mineral distribution. *Caries Res*, 23(5), 309–314.
- Askar, H., Lausch, J., Dörfer, C. E., Meyer-Lueckel, H., & Paris, S. (2015). Penetration of micro-filled infiltrant resins into artificial caries lesions. *J Dent*, 43(7), 832–838.
- Bourouni, S., Dritsas, K., Kloukos, D., & Wierichs, R. J. (2021). Efficacy of resin infiltration to mask post-orthodontic or non-post-orthodontic white spot lesions or fluorosis - a systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations*, 25(8), 4711–4719.
- Boushell, L. W., & Sturdevant, J. R. (2019). Clinical significance of dental anatomy, histology, physiology, and occlusion. *Sturdevant's Art & Science of Operative Dentistry*, 1–40.
- Brown, W. E., Gregory, T. M., & Chow, L. C. (1977). Effects of fluoride on enamel solubility and cariostasis. *Caries Res*, 11 Suppl 1, 118–141.
- Brudevold, F., Aasenden, R., & Bakhos, Y. (1982). A preliminary study of posteruptive maturation of teeth in situ. *Caries Res*, 16(3), 243–248.
- Buchalla, W. (2012). Histologisches und klinisches Erscheinungsbild der Karies. In *Karies-Wissenschaft und Klinische Praxis* (pp. 43–65). Georg Thieme Verlag.
- Buckton, G. (2000). Interfacial Phenomena in Drug Delivery and Targeting. In *Interfacial Phenomena in Drug Delivery and Targeting*. Harwood Academic Publishers.
- Buskes, J. A. K. M., Christoffersen, J., & Arends, J. (1985). Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions: A new technique with applications. *Caries Res*, 19(6), 490–496.
- Carlström, D., Glas, J. E., & Angmar, B. (1963). Studies on the ultrastructure of dental enamel. V. The state of water in human enamel. *J Ultrastruct Res*, 8(1–2), 24–29.
- Carrilho, E., Cardoso, M., Marques Ferreira, M., Marto, C. M., Paula, A., & Coelho, A. S. (2019). 10-MDP Based Dental Adhesives: Adhesive Interface Characterization and Adhesive Stability-A Systematic Review. *Materials (Basel, Switzerland)*, 12(5).
- Carstens, N. (2006). Möglichkeiten des mikrostrukturellen Nachweises von Füllungsimperfectionen bei einem Hybridkomposit und deren potentieller Einfluss auf die experimentelle Kariesauslösung. *Med. Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität Jena*.
- Carvalho, J. C., & Schiffner, U. (2019). Dental Caries in European Adults and Senior Citizens 1996-2016: ORCA Saturday Afternoon Symposium in Greifswald, Germany - Part II. *Caries Res*, 53(3), 242–252.
- Cebula, M., Göstemeyer, G., Krois, J., Pitchika, V., Paris, S., Schwendicke, F., & Effenberger,

- S. (2023). Resin Infiltration of Non-Cavitated Proximal Caries Lesions in Primary and Permanent Teeth: A Systematic Review and Scenario Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Clin Med*, 12(2).
- Chow, L. C., & Takagi, S. (1989). A quasi-constant composition method for studying the formation of artificial caries-like lesions. *Caries Res*, 23(3), 129–134.
- Christoffersen, J. (1981). Dissolution of calcium hydroxyapatite. *Calcified Tissue International*, 33(6), 557–560.
- Crombie, F., Manton, D., Palamara, J., & Reynolds, E. (2014). Resin infiltration of developmentally hypomineralised enamel. *Int J Paediatr Dent*, 24(1), 51–55.
- Daculsi, G., & Kerebel, B. (1978). High-resolution electron microscope study of human enamel crystallites: Size, shape, and growth. *J Ultrastruct Res*, 65(2), 163–172.
- Darling, A. I. (1958). Studies of the early lesion of enamel caries: Its nature, mode of spread, and points of entry. *Br Dent J*, 105(4), 119–135.
- Davidson, C. L., Boom, G., & Arends, J. (1973). Calcium distribution in human and bovine surface enamel. *Caries Res*, 7(4), 349–359.
- Dayila, J. M., Buonocore, M. G., Greeley, C. B., & Provenza, D. V. (1975). Adhesive Penetration in Human Artificial and Natural White Spots. *J Dent Res*, 54(5), 999–1008.
- Deakins, M., & Volker, J. F. (1941). Amount of Organic Matter in Enamel From Several Types of Human Teeth. *J Dent Res*, 20(2), 117–121.
- Deporter, D. A. (1977). The early mineralization of enamel - Fine structural observations on the cellular localization of calcium with the potassium pyroantimonate technique. *Calcif Tissue Res*, 24(1), 271–274.
- DeRocher, K. A., Smeets, P. J. M., Goodge, B. H., Zachman, M. J., Balachandran, P. V., Stegbauer, L., Cohen, M. J., Gordon, L. M., Rondinelli, J. M., Kourkoutis, L. F., & Joester, D. (2020). Chemical gradients in human enamel crystallites. *Nature*, 583(7814), 66–71.
- Edmunds, D. H., Whittaker, D. K., & Green, R. M. (1988). Suitability of human, bovine, equine, and ovine tooth enamel for studies of artificial bacterial carious lesions. *Caries Res*, 22(6), 327–336.
- Ekstrand, K. R., Bakhshandeh, A., & Martignon, S. (2010). Treatment of proximal superficial caries lesions on primary molar teeth with resin infiltration and fluoride varnish versus fluoride varnish only: Efficacy after 1 year. *Caries Res*, 44(1), 41–46.
- Ekstrand, K. R., Ricketts, D. N., Kidd, E. A., Qvist, V., & Schou, S. (1998). Detection, diagnosing, monitoring and logical treatment of occlusal caries in relation to lesion activity and severity: an in vivo examination with histological validation. *Caries Res*, 32(4), 247–254.
- Ekstrand, K. R., & Zero, D. T. (2012). Die Ökologie der Mundhöhle. In *Karies-Wissenschaft und Klinische Praxis* (Vol. 1, pp. 8–10). Thieme, Stuttgart.
- Esser, M., Marx, R., & Tinschert, J. (1998). Materialkennwerte der Zahnhartsubstanz des Rindes im Vergleich zur humanen Zahnhartsubstanz. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift : DZZ*, 53, 713–717.
- Fan, P. L., Seluk, L. W., & O'Brien, W. J. (1975). Penetrativity of sealants: I. *J Dent Res*, 54(2), 262–264.

- Featherstone, J. D. B. (1977). Diffusion phenomena during artificial carious lesion formation. *J Dent Res*, *56 Special*, D48-52.
- Featherstone, J. D. B., Duncan, J. F., & Cutress, T. W. (1979). A mechanism for dental caries based on chemical processes and diffusion phenomena during in-vitro caries simulation on human tooth enamel. *Arch Oral Biol*, *24*(2), 101–112.
- Featherstone, J. D. B., & Mellberg, J. R. (1981). Relative Rates of Progress of Artificial Carious Lesions in Bovine, Ovine and Human Enamel. *Caries Res*, *15*(1), 109–114.
- Fontana, M., Dunipace, A. J., Gregory, R. L., Noblitt, T. W., Li, Y., Park, K. K., & Stookey, G. K. (1996). An in vitro microbial model for studying secondary caries formation. *Caries Res*, *30*(2), 112–118.
- Fukegawa, D., Hayakawa, S., Yoshida, Y., Suzuki, K., Osaka, A., & Van Meerbeek, B. (2006). Chemical interaction of phosphoric acid ester with hydroxyapatite. *J Dent Res*, *85*(10), 941–944.
- Gillings, B., & Buonocore, M. (1961). An Investigation of Enamel Thickness in Human Lower Incisor Teeth. *J Dent Res*, *40*(1), 105–118.
- Groeneveld, A., & Arends, J. (1975). Influence of pH and demineralization time on mineral content, thickness of surface layer and depth of artificial caries lesions. *Caries Res*, *9*(1), 36–44.
- Hanawa, M., Takano, Y., & Wakita, M. (1990). An autoradiographic study of calcium movement in the enamel organ of rat molar tooth germs. *Arch Oral Biol*, *35*(11), 899–906.
- Harris, R., Nicoll, A. D., Adair, P. M., & Pine, C. M. (2004). Risk factors for dental caries in young children: A systematic review of the literature. *Community Dent Health*, *21*(1 SUPPL.), 71–85.
- Hellwig, E., Schäfer, E., Klimek, J., & Attin, J. T. (2018). Restauration mit plastischen Füllungsmaterialien. In *Einführung in die Zahnerhaltung* (p. 229). Deutscher Zahnärzterverlag, Köln.
- Hellwig, Elmar, Schäfer, E., Klimek, J., & Attin, T. (2018). Einführung in die Zahnerhaltung. In *Einführung in die Zahnerhaltung* (7th ed.). Deutscher Zahnärzterverlag, Köln.
- Holly, F. J., & Gray, J. A. (1968). Mechanism for incipient carious lesion growth utilizing a physical model based on diffusion concepts. *Arch Oral Biol*, *13*(3), 319–334.
- Houwink, B. (1974). The index of refraction of dental enamel apatite. *Br Dent J*, *137*(12), 472–475.
- Hunter, J., & Bell, T. (1839). *Treatise on the natural history and diseases of the human teeth : explaining their structure, use, formation, growth, and diseases* (Vol. 1). R. Hardwicke.
- Ikemura, K., Tay, F. R., Nishiyama, N., Pashley, D. H., & Endo, T. (2006). Design of new phosphonic acid monomers for dental adhesives - Synthesis of (meth)acryloxyalkyl 3-phosphonopropionates and evaluation of their adhesion-promoting functions. *Dent Mater J*, *25*(3), 566–575.
- Issa, A. I., Preston, K. P., Preston, A. J., Toumba, K. J., & Duggal, M. S. (2003). A study investigating the formation of artificial sub-surface enamel caries-like lesions in deciduous and permanent teeth in the presence and absence of fluoride. *Arch Oral Biol*, *48*(8), 567–571.

- Johnson, N. W. (1967). Some aspects of the ultrastructure of early human enamel caries seen with the electron microscope. *Arch Oral Biol*, *12*(12), 1505–1521.
- Jordan, R. A., Krois, J., Schiffner, U., Micheelis, W., & Schwendicke, F. (2019). Trends in caries experience in the permanent dentition in Germany 1997–2014, and projection to 2030: Morbidity shifts in an aging society. *Sci Rep*, *9*(1), 5534.
- Kallistova, A., Horacek, I., Slouf, M., Skala, R., & Fridrichova, M. (2017). Mammalian enamel maturation: Crystallographic changes prior to tooth eruption. *PLoS ONE*, *12*(2), e0171424.
- Kazeminia, M., Abdi, A., Shohaimi, S., Jalali, R., Vaisi-Raygani, A., Salari, N., & Mohammadi, M. (2020). Dental caries in primary and permanent teeth in children's worldwide, 1995 to 2019: A systematic review and meta-analysis. *Head Face Med*, *16*(1), 22.
- Kerebel, B., Daculsi, G., & Kerebel, L. M. (1979). Ultrastructural studies of enamel crystallites. *J Dent Res*, *58*(Spec Issue B), 844–851.
- Kraft, U., & Gängler, P. (1984). Die mikroanalytische Bestimmung des Ca/P-Verhältnisses bei der De- und Remineralisation des menschlichen Zahnschmelzes. *Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl*, *72*(4), 305–310.
- Kuraray Noritake Dental. (2021). *Kuraray Noritake Dental*. <https://www.kuraraynoritake.eu/de/newsroom/mdp-seit-1981>
- LeFevre, M. L., & Manly, R. S. (1938). Moisture, inorganic and organic contents of enamel and dentin from carious teeth. *J Am Dent Assoc*, *25*(2), 233–242.
- Li, N., Nikaido, T., Takagaki, T., Sadr, A., Makishi, P., Chen, J., & Tagami, J. (2010). The role of functional monomers in bonding to enamel: Acid-base resistant zone and bonding performance. *J Dent*, *38*(9), 722–730.
- Lussi, A., Schlueter, N., Rakhmatullina, E., & Ganss, C. (2011). Dental erosion - An overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res*, *45*(SUPPL. 1), 2–12.
- Magalhães, A. C., Moron, B. M., Comar, L. P., Wiegand, A., Buchalla, W., & Buzalaf, M. A. (2009). Comparison of cross-sectional hardness and transverse microradiography of artificial carious enamel lesions induced by different demineralising solutions and gels. *Caries Res*, *43*(6), 474–483.
- Marcenes, W., Kassebaum, N. J., Bernabé, E., Flaxman, A., Naghavi, M., Lopez, A., & Murray, C. J. L. (2013). Global burden of oral conditions in 1990–2010: A systematic analysis. *J Dent Res*, *92*(7), 592–597.
- Marsh, P. D. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? In *Microbiology* (Vol. 149, Issue 2, pp. 279–294).
- Marsh, P. D. (2008). The oral microflorida and biofilms on teeth. In *Dental caries: the disease and its clinical management* (Vol. 2, Issue 5, pp. 163–187). Blackwell Publishing, Oxford.
- Maske, T. T., van de Sande, F. H., Arthur, R. A., Huysmans, M. C. D. N. J. M., & Cenci, M. S. (2017). In vitro biofilm models to study dental caries: a systematic review. *Biofouling*, *33*(8), 661–675.
- Meckel, A. H., Griebstein, W. J., & Neal, R. J. (1965). Structure of mature human dental enamel as observed by electron microscopy. *Arch Oral Biol*, *10*(5), 775–783.
- Mejàre, I., Stenlund, H., & Zelezny-Holmlund, C. (2004). Caries Incidence and Lesion

- Progression from Adolescence to Young Adulthood: A Prospective 15-Year Cohort Study in Sweden. *Caries Res*, 38(2), 130–141.
- Mellberg, J. R. (1992). Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. *J Dent Res*, 71 Spec No, 913–919.
- Mellberg, James R., & Loertscher, K. L. (1974). Comparison of In Vitro Fluoride Uptake by Human and Bovine Enamel from Acidulated Phosphate-Fluoride Solutions. *J Dent Res*, 53(1), 64–67.
- Meyer-Lückel, H., Paris, S., & Ekstrand, K. (2012). *Karies: Wissenschaft und Klinische Praxis*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Meyer-Lueckel, H., Bitter, K., & Paris, S. (2012). Randomized controlled clinical trial on proximal caries infiltration: Three-year follow-up. *Caries Res*, 46(6), 544–548.
- Meyer-Lueckel, H., Mueller, J., Paris, S., Hummel, M., & Kielbassa, A. M. (2005). [The penetration of various adhesives into early enamel lesions in vitro]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 115(4), 316–323.
- Meyer-Lueckel, H., & Paris, S. (2008a). Improved resin infiltration of natural caries lesions. *J Dent Res*, 87(12), 1112–1116.
- Meyer-Lueckel, H., & Paris, S. (2008b). Progression of artificial enamel caries lesions after infiltration with experimental light curing resins. *Caries Res*, 42(2), 117–124.
- Meyer-Lueckel, H., & Paris, S. (2012). Kariesinfiltration. In *Karies-Wissenschaft und Klinische Praxis* (pp. 272–273). Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Meyer-Lueckel, H., Paris, S., & Kielbassa, A. M. (2007). Surface layer erosion of natural caries lesions with phosphoric and hydrochloric acid gels in preparation for resin infiltration. *Caries Res*, 41(3), 223–230.
- Moreno, E. C., Varughese, K., & Hay, D. I. (1979). Effect of human salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium phosphate. *Calcif Tissue Int*, 28(1), 7–16.
- Moron, B. M., Comar, L. P., Wiegand, A., Buchalla, W., Yu, H., Buzalaf, M. A. R., & Magalhães, A. C. (2013). Different protocols to produce artificial dentine carious lesions in vitro and in situ: Hardness and mineral content correlation. *Caries Res*, 47(2), 162–170.
- Mueller, J., Meyer-Lueckel, H., Paris, S., Hopfenmuller, W., & Kielbassa, A. M. (2006). Inhibition of lesion progression by the penetration of resins in vitro: Influence of the application procedure. *Oper Dent*, 31(3), 338–345.
- Munjal, D., Garg, S., Dhindsa, A., Sidhu, G. K., & Sethi, H. S. (2016). Assessment of white spot lesions and in-vivo evaluation of the effect of CPP-ACP on white spot lesions in permanent molars of children. *J Clin Diagn Res*, 10(5), ZC149–ZC154.
- Nakabayashi, N. (1992). The hybrid layer: a resin-dentin composite. *Proc Finn Dent Soc*, 88 Suppl 1, 321–329.
- Nakamichi, I., Iwaku, M., & Fusayama, T. (1983). Bovine Teeth as Possible Substitutes in the Adhesion Test. *J Dent Res*, 62(10), 1076–1081.
- O'Brien, W. J., Fan, P. L., & Apostolides, A. (1978). Penetrativity of sealants and glazes. The effectiveness of a sealant depends on its ability to penetrate into fissures. *Oper Dent*, 3(2), 51–56.

- Osborn, J. W., & Dahlberg, A. A. (1972). Dental Morphology and Evolution. In *Evolution* (Vol. 26, Issue 4, p. 676). Chicago University Press.
- Paris, S., Hopfenmuller, W., & Meyer-Lueckel, H. (2010). Resin infiltration of caries lesions: An efficacy randomized trial. *J Dent Res*, 89(8), 823–826.
- Paris, S., & Meyer-Lueckel, H. (2010a). Infiltrants inhibit progression of natural caries lesions in vitro. *J Dent Res*, 89(11), 1276–1280.
- Paris, S., & Meyer-Lueckel, H. (2010b). Inhibition of caries progression by resin infiltration in situ. *Caries Res*, 44(1), 47–54.
- Paris, S., Schwendicke, F., Keltsch, J., Dörfer, C., & Meyer-Lueckel, H. (2013). Masking of white spot lesions by resin infiltration in vitro. *J Dent*, 41(SUPPL.5), e28-34.
- Paris, S., Bitter, K., Renz, H., Hopfenmuller, W., & Meyer-Lueckel, H. (2009). Validation of two dual fluorescence techniques for confocal microscopic visualization of resin penetration into enamel caries lesions. *Microsc Res Tech*, 72(7), 489–494.
- Paris, Sebastian, Dörfer, C. E., & Meyer-Lueckel, H. (2010). Surface conditioning of natural enamel caries lesions in deciduous teeth in preparation for resin infiltration. *J Dent*, 38(1), 65–71.
- Paris, Sebastian, & Meyer-Lueckel, H. (2009). Masking of labial enamel white spot lesions by resin infiltration--a clinical report. *Quintessence Int*, 40(9), 713–718.
- Paris, Sebastian, Meyer-Lueckel, H., Cölfen, H., & Kielbassa, A. M. (2007a). Penetration coefficients of commercially available and experimental composites intended to infiltrate enamel carious lesions. *Dent Mater*, 23(6), 742–748.
- Paris, Sebastian, Meyer-Lueckel, H., Cölfen, H., & Kielbassa, A. M. (2007b). Resin infiltration of artificial enamel caries lesions with experimental light curing resins. *Dent Mater J*, 26(4), 582–588.
- Pearce, E. I. F., & Nelson, D. G. A. (1989). Microstructural Features of Carious Human Enamel Imaged with Back-scattered Electrons. *J Dent Res*, 68(2), 113–118.
- Pitts, N. (2004). “ICDAS” - An international system for caries detection and assessment being developed to facilitate caries epidemiology, research and appropriate clinical management. In *Community Dent Health* (Vol. 21, Issue 3, pp. 193–198).
- Pitts, N. B., & Ekstrand, K. (2013). International caries detection and assessment system (ICDAS) and its international caries classification and management system (ICCMS) - Methods for staging of the caries process and enabling dentists to manage caries. *Community Dent Oral Epidemiol*, 41(1), e41-52.
- Pitts, N. B. Z. D. (2016). World Dental Federation-Colgate Caries Prevention Partnership: white paper on dental caries prevention and management. *Int Dent J*.
- Pitts, Nigel B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F., Tagami, J., Twetman, S., Tsakos, G., & Ismail, A. (2017). Dental caries. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17030.
- Poole, D. F. G., Tailby, P. W., & Berry, D. C. (1963). The movement of water and other molecules through human enamel. *Arch Oral Biol*, 8(6), 771–772.
- Reeh, E. S., Douglas, W. H., & Levine, M. J. (1995). Lubrication of human and bovine enamel compared in an artificial mouth. *Arch Oral Biol*, 40(11), 1063–1072.

- Retzius, A. (1837). Bemerkungen über den inneren Bau der Zähne, mit besonderer Rücksicht auf dem in Zahnknochen vorkommenden Röhrenbau. In *Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medizin* (pp. 486–566). G. Eichler, Berlin; Veit & Comp, Leipzig.
- Reyes-Gasga, J., Martínez-Piñeiro, E. L., & Brès, É. F. (2012). Crystallographic structure of human tooth enamel by electron microscopy and x-ray diffraction: Hexagonal or monoclinic? *J Microsc*, 248(1), 102–109.
- Robinson, C., Weatherell, J. A., & Hallsworth, A. S. (1971). Variation in composition of dental enamel within thin ground tooth sections. *Caries Res*, 5(1), 44–57.
- Sakae, T. (2006). Variations in Dental Enamel Crystallites and Micro-Structure. *J Oral Biosci*, 48(2), 85–93.
- Salli, K. M., & Ouwehand, A. C. (2015). The use of in vitro model systems to study dental biofilms associated with caries: A short review. *J Oral Microbiol*, 7(1), 1–7.
- Schilke, R., Lisson, J. A., Bauß, O., & Geurtsen, W. (2000). Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol*, 45(5), 355–361.
- Schroeder, H. E. (1987). *Orale Strukturbiologie Entwicklungsgeschichte: Struktur und Funktion normaler Hart-und Weichgewebe der Mundhöhle und des Kiefergelenks* (Vol. 5, pp. 156–157). Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Schroeder, H. E. (1996). Karies und Erosion. In *Pathobiologie oraler Strukturen* (p. 95). Karger, Freiburg i.B.
- Schwendicke, F., Dörfer, C., Kneist, S., Meyer-Lueckel, H., & Paris, S. (2014). Cariogenic effects of probiotic lactobacillus rhamnosus GG in a dental biofilm model. *Caries Res*, 48(3), 186–192.
- Selwitz, R. H., Ismail, A. I., & Pitts, N. B. (2007). Dental caries. *Lancet*, 369(9555), 51–59.
- Setally Azevedo Macena, M., De Alencar E Silva Leite, M. L., De Lima Gouveia, C., De Lima, T. A. S., Athayde, P. A. A., & De Sousa, F. B. (2014). A comparative study on component volumes from outer to inner dental enamel in relation to enamel tufts. *Arch Oral Biol*, 59(6), 568–577.
- Shellis, P. (2012). Ätiologie und Pathogenese der Karies. In *Karies: Wissenschaft und klinische praxis*. Thieme. In *Karies-Wissenschaft und Klinische Praxis* (pp. 23–38). Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Shellis, R. P. (1996). A scanning electron-microscopic study of solubility variations in human enamel and dentine. *Arch Oral Biol*, 41(5), 473–484.
- Shibuya, K., Ohara, N., Ono, S., Matsuzaki, K., & Yoshiyama, M. (2019). Influence of 10-MDP concentration on the adhesion and physical properties of self-adhesive resin cements. *JDRE*, 44(4), e45.
- Silverstone, L. M. (1973). Structure of carious enamel, including the early lesion. *Oral Sci Rev*, Vol. 3, 100–160.
- Silverstone, L. M., Johnson, N. W., Hardie, J. M., & Williams, R. A. D. (1981). Enamel Caries. In *Dental Caries: Aetiology, Pathology and Prevention* (pp. 133–161). Macmillan, London.
- Silverstone L.M. (1983). Remineralization and enamel caries: new concepts". In *Dental Update*

- (Vol. 10, Issue 4, pp. 261–73). IRL Press, Oxford.
- Takahashi, H. (2014). Effect of calcium salt of 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate produced on the bond durability of one-step self-etch adhesive. *Dent Mater J*, 33(3), 394–401.
- Tang, G., Yip, H.-K., Cutress, T. W., & Samaranayake, L. P. (2003). Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. *J Dent*, 31(3), 161–171.
- ten Cate, J. M., & Duijsters, P. P. (1982). Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res*, 16(3), 201–210.
- ten Cate, J. M., & Duijsters, P. P. (1983a). Influence of fluoride in solution on tooth demineralization. I. Chemical data. *Caries Res*, 17(3), 193–199.
- ten Cate, J. M., & Duijsters, P. P. (1983b). Influence of fluoride in solution on tooth demineralization. II. Microradiographic data. *Caries Res*, 17(6), 513–519.
- ten Cate, J. M., & Featherstone, J. D. (1991). Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2(3), 283–296.
- ten Cate, J. M., Larsen, M. J., Pearce, E., Fejerskov, O., & Kidd, E. A. M. (2003). Chemical interactions between the tooth and oral fluids. In *Dental Caries. The Disease and its Clinical Management*. (pp. 9–69). Blackwell Publishing, Oxford.
- Thylstrup, A., Bruun, C., & Holmen, L. (1994). In vivo caries models--mechanisms for caries initiation and arrestment. *Adv Dent Res*, 8(2), 144–157.
- van Dijk, J. W., Borggreven, J. M., & Driessens, F. C. (1979). Chemical and mathematical simulation of caries. *Caries Res*, 13(3), 169–180.
- Wang, L., Guan, X., Yin, H., Moradian-Oldak, J., & Nancollas, G. H. (2008). Mimicking the self-organized microstructure of tooth enamel. *J. Phys. Chem. C*, 112(15), 5892–5899.
- Waters, N. E. (1971). The selectivity of human dental enamel to ionic transport. *Arch Oral Biol*, 16(3), 305–322.
- Watts, A. (2004). Dental Caries: The Disease and its Clinical Management. In *Eur J Dent Educ* (Vol. 8, Issue 3). Blackwell Munksgaard.
- Weatherell, J. A., Weidmann, S. M., & Hamm, S. M. (1967). Density patterns in enamel. *Caries Res*, 1(1), 42–51.
- White, D. J. (1987). Use of synthetic polymer gels for artificial carious lesion preparation. *Caries Res*, 21(3), 228–242.
- White, D. J. (1992). The comparative sensitivity of intra-oral, in vitro, and animal models in the “profile” evaluation of topical fluorides. *J Dent Res*, 71 Spec No, 884–894.
- Whittaker, D. K. (1987). Human oral embryology and histology. In *J Dent* (1., Vol. 15, Issue 3). Munksgaard, Copenhagen.
- Wierichs, R. J., Kogel, J., Lausch, J., Esteves-Oliveira, M., & Meyer-Lueckel, H. (2017). Effects of Self-Assembling Peptide P11-4, Fluorides, and Caries Infiltration on Artificial Enamel Caries Lesions in vitro. *Caries Res*, 51(5), 451–459.
- Yoshida, Y., Nagakane, K., Fukuda, R., Nakayama, Y., Okazaki, M., Shintani, H., Inoue, S., Tagawa, Y., Suzuki, K., De Munck, J., & Van Meerbeek, B. (2004). Comparative study

- on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res*, 83(6), 454–458.
- Yoshihara, K., Nagaoka, N., Okihara, T., Kuroboshi, M., Hayakawa, S., Maruo, Y., Nishigawa, G., De Munck, J., Yoshida, Y., & Van Meerbeek, B. (2015). Functional monomer impurity affects adhesive performance. *Dent Mater*, 31(12), 1493–1501.
- Young, R. A. (1974). Implications of Atomic Substitutions and Other Structural Details in Apatites. *J Dent Res*, 53(2), 193–203.
- Young, R. A., & Brown, W. E. (1982). Structures of biological minerals. In G. H. Nancollas (Ed.), *Biological Mineralization and Demineralization* (pp. 101–141). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Yu, O. Y., Zhao, I. S., Mei, M. L., Lo, E. C.-M., & Chu, C.-H. (2017). A Review of the Common Models Used in Mechanistic Studies on Demineralization-Remineralization for Cariology Research. *Dent J*, 5(2).
- Zero, D. T. (2004). Sugars - the arch criminal? *Caries Res*, 38(3), 277–285.

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. U. Schiffner für die bereitwillige Betreuung dieser Arbeit sowie großzügige Unterstützung bei der Erarbeitung des Themas bedanken. Die aufwendigen Korrekturen und kritischen Anregungen waren eine große Hilfe.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. S. Effenberger für die Überlassung des Themas und das Ermöglichen der einzigartigen Kooperation mit DMG, insbesondere mit der Klinischen Forschung. Seit meinem ersten Tag bei der DMG wurde ich in allen Belangen wie dem Erstellen dieser Arbeit unterstützt und gefördert. Dafür bin ich sehr dankbar.

Herzlich möchte ich mich bei Dr. Mariam Samadi für die Betreuung und unermüdliche Unterstützung während der gesamten Laborzeit, Verschriftlichung und Korrektur der Arbeit bedanken. Deine Genauigkeit, freundliche Kritik und hilfreichen Ratschläge haben mir in der gesamten Zeit sehr geholfen.

Bei Christin Staude, Susan Miericke, und den Auszubildenden von DMG möchte ich mich für die Unterstützung bei der Probenherstellung und pH-Messung bedanken.

Axel Nowak danke ich für die Unterstützung mit der IsoMet 500 Säge und Jörg Fick für die Erklärungen am Lichtmikroskop.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, meiner Freundin Johanna, meiner Mutter und meiner Schwester für das Korrekturlesen, die ständige Unterstützung und Motivation. Ihr habt mir die Möglichkeit und Kraft gegeben, dieses Ziel zu erreichen.

10 Lebenslauf

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: