

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Karies - Korrelation quantitative lichtinduzierte Fluoreszenz, Mikrohärtة und
Mikroradiographie

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Florian Müller-Stahl
aus München

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. dent. Karl-Heinz Kunzelmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Penning
Prof. Dr. I. Rudzki-Janson

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 09.01.2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Aufbau der Zahnhartsubstanzen	3
2.1.1	Aufbau des Schmelzes	3
2.1.2	Aufbau des Dentins	3
2.2	Karies	6
2.2.1	Definition	6
2.2.2	Ätiologie	6
2.2.3	Schmelzkaries	8
2.2.4	Dentinkaries	10
2.2.5	Zusammenhang zwischen Härte, Verfärbung und Besiedlung des kariösen Dentins	12
2.3	Verschiedene Methoden der Kariesdiagnostik	13
2.3.1	Histologie	13
2.3.2	Mikrohärtemessung	15
2.3.3	Transversale Mikroradiographie	17
2.3.4	Quantitative lichtinduzierte Fluoreszenz (QLF)	19
2.3.5	Andere lichtoptische Diagnostikmethoden	33
3	Ziel der Dissertation	37
4	Material und Methode	38
4.1	Versuchsplanung	38
4.2	Anfertigung der Proben	38
4.3	Mikrohärtemessung	40
4.3.1	Vorbereitung der Proben	40
4.3.2	Messung	41
4.4	Transversale Mikroradiographie (TMR)	43
4.4.1	Vorbereitung der Proben	43
4.4.2	Anfertigung der Mikroradiographien	44
4.4.3	Auswertung der Mikroradiographien	45
4.5	Quantitative lichtinduzierte Fluoreszenz (QLF) und histologische Untersuchung	47
4.5.1	Vorbereitung der Proben	47
4.5.2	Messung	47
4.5.3	Auswertung der QLF-Bilder	51
4.5.4	Histologische Untersuchung	51

4.6	Bilddokumentation	53
4.7	Statistische Auswertung.....	55
5	Ergebnisse	56
5.1	Histologie	56
5.2	Mikrohärtemessung	57
5.3	Transversale Mikroradiographie.....	60
5.4	Quantitative lichtinduzierte Fluoreszenz	61
5.5	Statistische Auswertung und Vergleich der Methoden	68
5.5.1	Korrelation der Messstrecken von Mikrohärte und transversaler Mikroradiographie.....	68
5.5.2	Korrelation der Extrempunkte (FITC, TR, HV, MR).....	70
5.5.3	Lage der Extrempunkte.....	78
6	Diskussion.....	84
6.1	Material und Methode	84
6.2	Ergebnisse.....	90
6.2.1	Histologie	90
6.2.2	Mikrohärte.....	91
6.2.3	Mikroradiographie	92
6.2.4	QLF	93
6.3	Verbesserungsvorschläge für zukünftige Untersuchungen.....	97
7	Schlussfolgerung	98
8	Zusammenfassung	99
9	Literaturverzeichnis	101
10	Anhang.....	114
10.1	Abbildungsverzeichnis	114
10.2	Tabellenverzeichnis	115
10.3	Verwendete Geräte und Materialien	116
10.4	Rohdaten.....	118
10.4.1	Benennung der Proben.....	118
10.4.2	Tabelle Schnittdicken.....	119
10.4.3	Tabellarische Darstellung der Messergebnisse.....	120
10.4.4	Graphische Darstellung der Messergebnisse	123
11	Danksagung.....	130
12	Lebenslauf	131

1 Einleitung

Die von Miller 1898 aufgestellte chemoparasitäre Theorie zur Ätiologie der Karies bedeutete den Anfang der zahnmedizinischen Forschung und ist heute in Auszügen mit „Karius und Baktus“ auch schon den Kleinsten geläufig. Aber wie erkennt der praktizierende Zahnarzt, ob eine Kavität kariesfrei ist oder wo die bakterielle Besiedelung des Dentins endet? All dies ist auch heute noch, weit über hundert Jahre nach Millers revolutionärer Theorie, eine sehr subjektive Entscheidung, bei der die Kavität nach Dentinfarbe bzw. Schmelzopazität, sowie taktil mit der Sonde die Härte, beurteilt wird.

Noch zu Beginn der siebziger Jahre wurde von der Gruppe um Fusayama eine These aufgestellt, die die Kariesdiagnostik und –behandlung, zumindest in der Theorie, sehr einfach erscheinen ließ: Eine Dentinläsion besteht aus zwei Zonen, bei denen sich in der äußeren das avitale, infizierte und nicht remineralisierbare Dentin befindet. In der inneren Zone dagegen liegt das noch vitale, nicht infizierte und remineralisierbare Dentin. Dementsprechend wäre bei der Behandlung einer Dentinkaries natürlich die bakteriell infizierte Zahnhartsubstanz vollständig zu entfernen, aber der remineralisierbare, nicht infizierte Bereich der Läsion könnte, unabhängig von Härte oder Verfärbung, belassen werden. Der klinische Schwachpunkt dieser Theorie zeichnete sich allerdings schon wenige Jahre zuvor (1969) bei den Untersuchungen von Terashima et al. ab. Sie zeigten, wie in den folgenden Jahren auch Anderson et al. (1985) und Kielbassa et al. (1994), dass die Grenze zwischen krankem und gesundem Dentin mit subjektiven Methoden nicht sicher erkannt werden kann. Heute liegen, gerade mit Hinblick auf die Unterschiede zwischen chronischer und akuter Karies, noch zahlreiche weitere Studien vor, die belegen, dass es klinisch, aber auch histologisch,

1 Einleitung

ob mit oder ohne Anfärbung, sehr schwierig ist, eine kariöse Läsion in nur zwei Bereiche zu unterteilen, von denen „einfach“ der infizierte zu entfernen ist. Eine der aktuellsten Untersuchungen zu dieser Problematik in der Histologie wurde von Pitts et al. (2001) durchgeführt. Sie haben gezeigt, dass die subjektiven Ungenauigkeiten auch bei der histologischen Untersuchung von Zahnschnitten, die lange als der Goldstandard in der Kariesdiagnostik galt, ganz erheblich sind (s. 2.3.1).

Weiter kompliziert wird die klinische Problematik durch die Anwendung neuer Verfahren wie beispielsweise der chemomechanischen Kariesentfernung mittels Carisolv™. Auch hier wird erweichtes, nicht infiziertes Dentin in der Kavität belassen.

Die äußerst interessante und auch dringend zu lösende Aufgabe, die sich aus dieser Problematik heraus stellt, ist die Suche nach einer objektiven und einfach anzuwendenden Methode zur Kariesdiagnose in vivo, sowie in vitro. Dementsprechend ist es Ziel dieser Dissertation, zu prüfen, ob eben eine solche Methode mit der quantitativen lichtinduzierten Fluoreszenz (QLF) gefunden ist. Die Vorteile dieser neuen Technologie scheinen in der Geschwindigkeit des ablesbaren Ergebnisses, der Reproduzierbarkeit sowie dem Verzicht auf ionisierende Strahlung zu liegen. Verglichen wird das Verfahren in vitro mit den etablierten Methoden der Mikroradiographie, Mikrohärtemessung und der Histologie. Im Vordergrund der Untersuchung stand dabei die Dentinkaries.

2 Literaturübersicht

2.1 Aufbau der Zahnhartsubstanzen

2.1.1 Aufbau des Schmelzes

Der Zahnschmelz ist ein zu 95 % aus anorganischen Verbindungen bestehendes kristallines Gefüge, das sich größtenteils aus Hydroxylapatit und zu geringeren Anteilen auch aus Carbon- und Fluorapatit zusammensetzt. Des Weiteren sind Elemente wie Magnesium und Natrium zu finden, sowie in niedrigeren Konzentrationen mehr als 40 weitere Elemente. Die verbleibenden 5 % setzen sich größtenteils aus Wasser und, in geringen Mengen, aus organischen Verbindungen wie Proteinen und Lipiden zusammen. Die hexagonalen Apatitkristalle haben eine Länge von ca. 160 nm und sind bei einer Breite von 40 nm ca. 26 nm dick. Zusammengefügt bilden die Apatitkristalle die Schmelzprismen, die sich von der Schmelz-Dentin-Grenze fast bis zur Schmelzoberfläche erstrecken. Sie haben einen gewundenen Verlauf und ihr Durchmesser steigt zur Oberfläche hin von ca. 5 µm auf 9 µm an. Die relativ ungeordneten Apatitkristalle zwischen den Prismen werden als interprismatischer Schmelz bezeichnet. Die durchschnittliche Härte des Schmelzes beträgt 300 - 350 HB (Hellwig et al., 1995; Schumacher, 1997).

2.1.2 Aufbau des Dentins

Das Dentin setzt sich zu 70 % aus anorganischen Verbindungen zusammen. Dabei handelt es sich größtenteils ebenfalls um Hydroxylapatitkristalle. Diese sind jedoch mit einer Länge von 20 - 40 nm, einer Breite von 18 nm und einer Dicke von 3,5 nm wesentlich kleiner als diejenigen im Schmelz. Zudem liegen sie nicht in Prismen geordnet vor, wenngleich eine Orientierung am Verlauf kolla-

2 Literaturübersicht

gener Fibrillen zu erkennen ist. Daneben ist auch amorphes Kalziumphosphat zu finden (Hellwig et al., 1995).

Die restlichen 30 % des Dentins setzen sich zu 10 % aus Wasser und dementsprechend zu 20 % aus organischer Matrix zusammen. Diese besteht zu 92 % aus Kollagen Typ I und in geringeren Mengen aus verschiedenen anderen Makromolekülen wie Proteoglykanen, Lipiden, Phosphoproteinen und Carboxyglutamat enthaltenden Proteinen (Schröder, 1992). Nicht nur die Proteoglykane sind dabei mit ihrer ausgedehnten Struktur und durch die Fähigkeit, mit kollagenen Fasern Komplexe zu bilden, für die mechanische Beanspruchbarkeit und Resilienz durchaus von Bedeutung. Diese stark verzweigten Makromoleküle, die sonst vorwiegend im Bindegewebe gefunden werden, bestehen aus einer zentralen Hyaluronsäure, um die herum zahlreiche Kernproteine angeordnet sind. An diesen wiederum befinden sich büstenartig angeordnete Glykosaminoglykane und Oligosaccharide. Kollagenmoleküle sind dagegen relativ „einfach“ aus drei zur Helix verwundenen Aminosäureketten aufgebaut. Diese drei aus mehreren tausend Aminosäureresten bestehenden α -Ketten werden zum einen durch die Aminosäure Glycin charakterisiert, die jede dritte Position besetzt, und zum anderen durch das gehäufte und regelmäßige Auftreten von Prolin und Hydroxyprolin. Die Sekundärstruktur jeder α -Kette besteht aus einer steilen linksgängigen Helix. In der Tertiärstruktur bilden dann je drei α -Ketten die rechtsgängige Super- oder Tripelhelix. Ein solches Kollagenmolekül hat eine Länge von 300 nm und einen Durchmesser von 1,4 nm. Durch die Zusammenlagerung von fünf Kollagentripelhelices entstehen Mikrofibrillen mit einem Durchmesser von 4 nm. (Linde, 1985; Löffler, 1994).

Gebildet wird dieses kollagene Grundgerüst, wie auch das gesamte Dentin, von den Odontoblasten. Diese nach ihrer Differenzierung nicht mehr teilungsfähigen Zellen liegen in der Pulpa an der inneren Dentinoberfläche und entsenden von dort aus ihre Fortsätze durch die bis zu 5000 μm langen Dentinkanälchen bis an die Schmelz-Dentin-Grenze. Der Durchmesser dieser Dentintubuli beträgt zum Schmelz hin abnehmend 1-4 μm , wobei auch die Kanälchendichte von etwa 45.000/ mm^2 an der Pulpa-Dentin-Grenze auf nur noch 15.000/ mm^2 an der Schmelz-Dentin-Grenze, absinkt. Ausgekleidet werden die Tubuli von dem sehr dichten und stark mineralisierten peritubulären Dentin, das mit zunehmendem Alter, aber auch im Rahmen von Abwehrreaktionen dicker wird. Ähnlich den Prozessen in der Pulpa, verengt sich dabei natürlich das Lumen der Kanälchen. Nervenfasern lassen sich nur in einzelnen Tubuli des Prädentins nachweisen. Zwischen den Dentinkanälchen liegt das inhomogenere intertubuläre Dentin. Es ist weniger dicht mineralisiert und enthält in einer Höhe von bis zu 50 % kollagene Fasern.

Der Aufbau des Dentins kann in verschiedene Schichten eingeteilt werden: Von der Zahnpulpa im Zentrum, bis zur Schmelz-Dentin-Grenze in der Peripherie, folgen junges und altes, nicht vollständig mineralisiertes Prädentin, Zwischendentin, das der Zone der Mineralisation entspricht, zirkumpulpales und reifes Manteldentin, aufeinander (Hellwig et al., 1995; Schumacher, 1997, Lehmann et al., 1998).

Die Härte des Dentins nimmt fast kontinuierlich vom Schmelz zur Pulpa hin ab und ist mit ca. 70 KHN etwas unterhalb des Schmelzes am größten. An der Pulpa sind nur noch ca. 20-30 KHN zu messen (Fusayama et al., 1966, Craig et al., 1959, Meredith et al., 1996).

2 Literaturübersicht

2.2 Karies

2.2.1 Definition

Das lateinische Wort „Caries“ bedeutet übersetzt „Morschsein“ oder „Fäulnis“. Dieser heute nicht mehr gebräuchliche Begriff wurde früher im allgemein-pathologischen Sinn für die Zerstörung von Knochengewebe mit eitrigen Einschmelzungen und gelegentlicher Sequesterbildung verwendet. Die „Caries dentinum“ jedoch ist in ihrer Erscheinungsform und ihrem Verlauf einzigartig und an keinem anderen Organ des Körpers zu beobachten (Sauerwein, 1974).

Laut World Health Organisation (WHO) wird Karies als posteruptiver, lokalisierter, pathologischer Prozess exogenen Ursprungs bezeichnet, der die Zahnhartsubstanz angreift und zur Bildung einer Kavität führt.

Auch wenn es nicht in allen Definitionen der Karies explizit zu finden ist, wird doch heute von niemandem mehr bezweifelt, dass dieser exogene Ursprung der Kariesätiologie in Zusammenhang mit Bakterien zu sehen ist (Hellwig et al., 1995; Schumacher, 1997, Lehmann et al., 1998).

2.2.2 Ätiologie

Die im Jahre 1898 von Miller aufgestellte chemoparasitäre Theorie der Kariesentstehung wird heute, wenn auch in modifizierter Form, noch immer als richtig anerkannt. Sie besagt, dass Mikroorganismen der Mundhöhle aus Kohlenhydraten durch enzymatischen Abbau organische Säuren produzieren, die die Fähigkeit haben, Zahnhartsubstanz zu entmineralisieren (Hellwig et al., 1995). Erst 1962 wurde diese Hypothese von Keyes wieder aufgegriffen und weiterentwickelt. Er beschrieb für die Kariesentstehung ein Zusammenspiel dreier Faktoren:

1. Zahnhartsubstanz als Wirt,
2. niedermolekulare Kohlehydrate als Substrat und
3. kariogene Mikroorganismen als Säurelieferanten.

Ihm gelang es auch erstmals, mit einem einzigen isolierten Bakterienstamm und zwar mit Streptokokken, Karies zu erzeugen. König postulierte 1971 die Einwirkungszeit der kariogenen Noxen als 4. Faktor der Kariesentstehung.

Als sekundäre Faktoren der Kariesentstehung sind heute Speichelfluss und -zusammensetzung, Dauer und Häufigkeit der Substratzufuhr, Immunabwehr, genetische und sozioökonomische Faktoren sowie Zahnfehlstellungen und -bildungen anerkannt (Hellwig et al., 1995).

Prädilektionsstellen für die Kariesentstehung sind Bereiche, die der natürlichen Selbstreinigung durch Zunge, Wange und Speichel nur schwer oder überhaupt nicht zugänglich sind. Dabei handelt es sich in der Regel um Approximalräume, Fissuren und Grübchen, sowie den Zahnhalsbereich (Lehmann et al., 1998).

Eine ausreichende Kontaktzeit der Mikroorganismen, und damit auch der von ihnen produzierten Säure zum Zahn, wird durch die anhaftende Plaque gewährleistet. Auf deren Entstehung soll nur in soweit eingegangen werden, als dass die nach wenigen Stunden sich ersten ansiedelnden Bakterien grampositive Kokken, wie z.B. *Streptokokkus sanguis* und Aktinomyzeten sind. Später folgen weitere Streptokokken und Veillonellen. Für die Kariesentstehung können vor allem zwei azidogene und säuretolerante Bakterien verantwortlich gemacht werden: *Streptokokkus mutans* und *Streptokokkus sobrinus*, wobei ersterer aufgrund seiner Stoffwechselleistung eine herausragende Rolle spielt (Kohler et al., 1988; Straetemans et al., 1998; Einwig und Pieper, 1997). Ebenfalls zu dieser Grup-

2 Literaturübersicht

pe gehören Streptokokkus cricetus und rattus. Im weiteren Verlauf sind sowohl Laktobazillen als auch Aktinomyzeten von Bedeutung (Hellwig et al., 1995).

Bei den durch anaerobe Glykolyse aus niedermolekularen Kohlenhydraten produzierten organischen Säuren handelt es sich vorwiegend um Laktat, Pyruvat, Butyrat, und Propionat. Des Weiteren sind vor allem bei der Progression der Karies proteolytische Enzyme (Proteasen, Kollagenasen, Peptidasen) verschiedener Mikroorganismen von Bedeutung. Sie sind für den Abbau der organischen Makromoleküle verantwortlich (Hellwig et al., 1995, Mittermayer, C., 1984).

2.2.3 Schmelzkaries

Sinkt der pH-Wert durch oben genannte Säuren unter den für den Zahnschmelz kritischen pH-Bereich von 5,7, werden Kalzium- und Phosphationen aus den Schmelzkristallen gelöst und wandern in die Plaque. Die Demineralisation hält an, so lange genügend Säuren produziert werden und der Speichel als Puffermedium durch die Plaque abgehalten wird. Kalzium und Phosphat gehen also verloren. Klinisch zeigt sich diese initiale Läsion als ein kreidig weißer Fleck, den so genannten „white spot“. Histologisch können bei Verwendung unterschiedlicher Imbibitionsmedien wie Chinolin und Wasser vier Zonen unterschieden werden, in denen das Porenvolumen des Schmelzes den Normalwert von 0,1 % überschreitet:

1. die pseudointakte Oberflächenschicht mit weniger als 5 % Porenvolumen, Mineralisationsverlust 1-10 %
2. das Läsionszentrum mit 5-25 % Porenvolumen, Zone des größten Mineralverlustes, für Speichel und Proteine permeabel.

3. die dunkle Zone mit 2-4 % Porenvolumen
4. die transluzente Zone mit 1 % Porenvolumen

Am Anfang einer solchen Läsion steht das Herauslösen des weniger resistenten interprismatischen Schmelzes, und insbesondere des Carbonates, durch die organischen Säuren. Entsprechend dem Konzentrationsgradienten können die Säuren dann in der wässrigen Hülle um die Apatitkristalle tiefer diffundieren. Hier kommt es zu einem weiteren Herauswaschen von Kalzium-, Hydroxyl-, Phosphat-, Karbonium-, Fluor- und anderen Ionen. Diese diffundieren wieder entsprechend dem Konzentrationsgradienten durch die erweiterten Poren zur Oberfläche. Nachdem hier ein ausgeglichenes Milieu herrscht, kommt es zur Repräzipitation von Kalzium und Phosphat und somit zur pseudointakten Oberfläche.

Die Rückbildung einer solchen aktiven in eine passive bzw. ruhende Läsion ist zu diesem frühen Zeitpunkt der Karies durch entsprechende Maßnahmen noch möglich. Der verlorengegangene Schmelz kann jedoch nicht in seiner ursprünglichen Form ersetzt werden. Chromophore aus Tabak, Tee, Kaffee und Bakterienbestandteilen lagern sich im Läsionszentrum ein und färben den remineralisierten Schmelz bräunlich. Es bleibt eine Art Schmelznarbe zurück. Die ruhende Läsion erscheint stets glänzend und weist histologisch ein remineralisiertes Läsionszentrum auf.

Dahingegen ist bei ausbleibenden Prophylaxemaßnahmen mit einer Weiterentwicklung zur Dentinkaries zu rechnen (Silverstone, L., 1973, Hellwig et al., 1995).

2 Literaturübersicht

2.2.4 Dentinkaries

Im Dentin breitet sich die kariöse Läsion an der Schmelz-Dentin-Grenze unterminierend und entlang der Dentinkanälchen in Richtung Pulpa aus. Diese beiden Bereiche haben aufgrund ihrer Struktur eine erhöhte Permeabilität für die eindringenden Bakterien und deren Toxine. Es ergibt sich für den Läsionskörper also das Bild eines Kegels mit Basis an der Schmelz-Dentin-Grenze. Der kritische pH-Bereich beginnt schon zwischen 6,2 und 6,7.

Dentin ist im Gegensatz zum Schmelz ein vitales Hartgewebe und kann auch noch nach Durchbruch des Zahnes gebildet werden. Die Odontoblasten reagieren gemeinsam mit der Pulpa aktiv auf das Vordringen von Bakterien und deren Stoffwechselprodukten. Dadurch kommt es neben den Zerstörungsprozessen im Dentin auch zu Umbauprozessen durch die Pulpa-Dentineinheit selbst. Schon vor der Entstehung einer sichtbaren Kavität sind, aufgrund der erhöhten Diffusion von Noxen durch erweiterte Schmelzporen, Abwehrreaktionen zu beobachten. Durch verstärkte peritubuläre Dentinablagerung und Zurückweichen bzw. Mineralisation der Odontoblastenfortsätze kommt es zur tubulären Sklerose. An der Pulpa-Dentin-Grenze wird durch die Odontoblasten Tertiärdentin gebildet. Dieses allgemein auch als irregulär bezeichnete Dentin enthält vor allem bei größeren Dentinwunden zelluläre Einschlüsse und weniger Kanälchen, was in entscheidender Weise die Permeabilität des Dentins beeinflusst. Mjör (1987) vermutet, dass kanälchenfreies Tertiärdentin von Fibroblasten, die aus pluripotenten Pulpazellen hervorgehen (Hellwig et al., 1995), gebildet wird. Es ist lediglich bei vorausgegangener Zerstörung der Odontoblasten zu finden. In geringerem Ausmaß sind oben genannte Prozesse in Pulpa und Tubuli auch bei der Bildung von Sekundärdentin mit regulärer Struktur als normaler Alterungspro-

zess zu beobachten. Die charakteristische histologische Zoneneinteilung einer chronischen Dentinkaries wird von der Pulpa in Richtung der Peripherie wie folgt beschrieben:

1. Tertiärdentin (s.o.)
2. Reguläres Dentin
3. Sklerotisches Dentin (s.o.), das bei Betrachtung eines Zahnschliffs im Durchlicht hell erscheint (Zone der Transluzenz).
4. „Dead tracts“. In diesem Bereich sind keine Odontoblastenfortsätze mehr vorhanden. Er stellt sich dunkel dar.
5. Zone der Demineralisation, in die Säuren, aber noch keine Bakterien vorgedrungen sind. Sie erscheint im Lichtmikroskop relativ unverändert.

Bei fortgeschrittenen Läsionen kommen folgende Zonen zu den genannten hinzu:

6. Zone der Penetration, in die Bakterien eingedrungen sind. Durch deren Stoffwechselaktivität kommt es zu Auftreibungen der Kanälchen (Ampullen und Rosenkranzstrukturen) und der Wachstumslinien (Spalten).
7. Zone der Nekrose, die klinisch sichtbar erweicht ist.

Dabei zeigt das klinische Bild einer akuten, schnell fortschreitenden Karies im Vergleich zur chronischen Läsion eine hellere, gelbbraune und weichere Oberfläche. Sklerose, „dead tracts“ und Tertiärdentinbildung sind bei schnellem Verlauf weniger stark ausgeprägt (Hellwig et al., 1995; Schroeder, 1997).

Neben oben genannter histologischer Beschreibung der Dentinkaries finden in der Kariesdiagnostik auch andere Einteilungen ihre Anwendung. Vor allem von der Gruppe um Fusayama wird eine Dentinläsion in nur zwei Schichten unter-

2 Literaturübersicht

teilt (s. 2.3.1) (Fusayama und Terashima 1972, Ohgushi und Fusayama 1975 sowie Sato und Fusayama 1976).

2.2.5 Zusammenhang zwischen Härte, Verfärbung und Besiedlung des kariösen Dentins

Aufgrund der Gemeinsamkeiten mit dem hier gestellten Thema und dem möglichen Einfluss chromophorer Einlagerungen auf die Epifluoreszenz von Dentin, soll an dieser Stelle gesondert auf oben genannte Untersuchung von Fusayama et al. (1966) eingegangen werden: An Zahnschnitten wurde die makroskopische Verfärbung des Dentins klassifiziert und dann durch Färben nach Gram-Weigert die Frontlinie der mikrobiellen Invasion sichtbar gemacht. Anschließend wurde vom Karieszentrum bis zur Pulpakammer die Knoophärte im 50 µm Abstand gemessen. Auffallend bei den Messungen waren die charakteristisch niedrigeren Härtewerte für akute Karies im Vergleich zu chronischen Läsionen. Für akute Karies lagen die durchschnittlichen Messwerte an der bakteriellen Penetrationsfront bei 4,4 KHN und an der Grenzlinie der makroskopischen Verfärbung bei ca. 17 KHN. Proben mit chronischer Karies wiesen mit bis zu 61 KHN an der Penetrationsfront, und 68 KHN an der Grenzlinie der Verfärbung, deutlich höhere Werte auf. Des Weiteren stellten Fusayama et al. fest, dass:

1. Dentin die größte Härte mit ca. 70 KHN etwa 450µm unterhalb der Schmelz-Dentin-Grenze hat, und die Dentinhärte an der Pulpa mit ca. 20 KHN am geringsten ist (s. 2.3.2),
2. Schmelzkaries die Dentinhärte nicht beeinflusst,
3. sklerotisches Dentin in chronischen Läsionen häufiger auftritt als in akuten (s. 2.2.4),

4. die Erweichung des Dentins sowohl der Verfärbung als auch der bakteriellen Penetration voraussetzt,
5. Härteverlust, Verfärbung und bakterielle Besiedelung parallel zum Verlauf der Dentintubuli ausgeprägter sind als quer zu diesem.

Abschliessend kamen sie zu dem Ergebnis, dass die Ausbreitung einer kariösen Läsion durch Messen der Dentinhärte im Bereich der Karies quantifiziert werden kann.

2.3 Verschiedene Methoden der Kariesdiagnostik

Ziel dieser Arbeit ist es, weniger die klinische Anwendbarkeit von QLF zu prüfen, als zu dokumentieren, ob eine Dentinkariesdiagnostik mittels lichtinduzierter Fluoreszenz dem Vergleich mit etablierten Methoden standhält. Dementsprechend sollen und werden klinische Diagnostikmethoden hier nicht in dem Maße besprochen wie die zur Anwendung gekommenen labordiagnostischen Untersuchungen. Davon ausgenommen ist selbstverständlich ein Überblick über andere lichtoptische Verfahren, die allerdings in der Geschichte der Kariesdiagnostik erst in jüngster Zeit zum Einsatz kommen. Eines der ältesten In-vitro-Verfahren stellt dagegen die Histologie dar, bei der neben oben beschriebener Betrachtung im Durchlichtmikroskop auch unterschiedliche Färbemethoden zum Einsatz kommen.

2.3.1 Histologie

Schon 1950 beschrieben Sognaes et al. die Färbung von Dünnschliffen kariöser Zähne mit Toluidinblau. Dabei wurde die Läsion durch einen nicht anfärbaren

2 Literaturübersicht

Saum in zwei Zonen getrennt. Das kariöse Dentin stellte sich tiefblau, das gesunde Dentin violett dar. Zurück führten sie diese Reaktion auf die in kariösem Dentin depolymerisiert vorliegenden sauren Mukopolysaccharide. Bestätigt wurde diese These von Opdyke 1962. Milton et al. (1970) vermuteten dagegen als Ursache für die Bindung von Farbstoffen an die organische Matrix kariösen Dentins den fehlenden Verbund mit Hydroxylapatitkristallen. Ein mikrobiologischer Nachweis von Bakterien bzw. der bakteriellen Penetrationsfront ist mit der Gram-Färbung möglich (Fusayama et al., 1966).

Wie schon oben angesprochen (s. 2.2.5), teilte auch die Gruppe um Fusayama kariöse Läsionen in nur zwei Schichten ein, von denen die äußere mit Fuchsinrot–Propylenglykol–Lösung anfärbbar war. Sie wies unregelmäßig verteilte granuläre Kristalle, untergegangene Kollagenfasern und mit Bakterien und losen Apatitkristallen gefüllte Tubuli ohne Odontoblastenfortsätze auf. Zudem wurde sie als nicht remineralisierbar bezeichnet. Die innere Schicht hatte aufgeblähte Odontoblastenfortsätze, war nicht bakteriell infiziert und wies die zur Remineralisation notwendigen nadelförmigen Apatitkristalle, die regelmäßig an gesunden Kollagenfasern befestigt sind, auf. Entscheidendes Merkmal dieser Schicht war die Nicht-Anfärbbarkeit. Allerdings räumten sie ein, dass es, gerade bei chronischen Läsionen, eine dritte Schicht mit starken natürlichen Verfärbungen zwischen den beiden Schichten gab. Diese war mit der Fuchsinlösung wenig anfärbbar, aber elektronenmikroskopisch dennoch der ersten, infizierten Schicht zuzuordnen. (Ohgushi et al. 1975, Fusayama und Terashima 1972, Sato et al. 1976). Ogawa et al. (1983) beschrieben, ähnlich der Einteilung in Kapitel 2.2.4, histologisch von der Pulpa ausgehend normales seidig opakes Dentin, darauf folgend eine subtransparente Schicht mit abnehmender Opazität, eine Zone der

Transparenz und darüber eine verfärbt opake Zone. Nach Anfärbung mit Säure-rot-Propylenglykol-Lösung wurde hier diese letzte Schicht hauptsächlich der Schicht der inneren, nicht bakteriell infizierten Karies zugeordnet (s. auch 2.2.4).

Offensichtlich ist es klinisch sowie histologisch, ob mit oder ohne Anfärbung, sehr schwierig, eine kariöse Läsion in nur zwei Bereiche, einen infizierten, zu entfernenden und einen, der belassen werden kann, zu unterteilen (Deery et al., 2000) (s. Einleitung). Von Pitts et al. (2001) wird das Problem, histologische Ergebnisse exakt zu reproduzieren, in einer aktuellen Studie beschrieben: Drei Untersucher beurteilten unabhängig voneinander die Zahnschnitte von 480 kariösen Läsionen (160 okklusal, 320 approximal) je zweimal. Die Übereinstimmung wurde nach Cohen (κ) berechnet, und schwankte innerhalb eines Untersuchers zwischen $\kappa = 0,58$ und $\kappa = 0,82$ für D1 und $\kappa = 0,37$ und $\kappa = 88$ für D3. Zwischen den Untersuchern traten für D1 Schwankungen von $\kappa = 0,46$ bis $\kappa = 0,64$ und für D3 von $\kappa = 0,44$ bis $\kappa = 0,64$ auf. Nicht nur, aber gerade auch für eine als Goldstandard angesehene Diagnostikmethode, kann eine solch schlechte Reproduzierbarkeit von Ergebnissen nicht befriedigend sein.

2.3.2 Mikrohärtemessung

Unter der Härte (technische Härte) versteht man den Widerstand eines Körpers gegen das Eindringen eines anderen Körpers aus einem härteren Werkstoff.

Härteprüfverfahren werden nach der Art der Beanspruchung in solche mit statischer und dynamischer Krafteinwirkung unterteilt, wobei der ersten Gruppe der höhere Stellenwert zukommt. In Abhängigkeit von der Prüfkraft wird zwischen Makro-, Kleinlast-, Mikro- und Ultramikrohärte unterschieden. Bei der Mikro-

2 Literaturübersicht

härtemessung handelt es sich um ein statisches Härteprüfverfahren mit einer Prüfkraft zwischen 0,01 und 2 Newton. Abhängig von der Verwendung unterschiedlicher Eindringkörper gibt es Mikrohärtmessungen nach Brinell, Knoop und Vickers, um nur einige zu nennen. Bei der Universalhärtmessung kommt meist ebenfalls ein Vickersdiamant mit einem Flächenwinkel von 136° als Eindringkörper zum Einsatz. Im Gegensatz zur Vickershärte HV liegt der Berechnung der Universalhärte HU nicht der mittlere Diagonalendurchmesser d des Eindrucks ($HV = 0,1891 \times F/d^2$), sondern die Eindringtiefe h des Prüfkörpers unter der wirkenden Prüfkraft F zugrunde ($HU = F/26,43 \times h^2$; bei Verwendung einer Vickerspyramide) (s. Abb. 1). Dieses Härteprüfverfahren berücksichtigt sowohl die plastische als auch die elastische Deformation beim Prüfkörpereindruck, wodurch sich physikalisch sinnvolle Härtewerte ergeben und ein Vergleich aller Werkstoffe in einer einzigen Härteskala ermöglicht wird. Ein weiterer Vorteil des Verfahrens besteht darin, dass durch die Aufzeichnung des gesamten Prüfvorgangs zusätzliche Informationen wie z.B. plastische Härte oder elastisches Eindringmodul gewonnen werden können (IWT-Bremen, 2004, TU-Ilmenau, 2004, Helmut Fischer GmbH, 2001).

Die Mikrohärtmessung im Dentin beschrieb erstmals Knoop 1939. Weiter folgten Untersuchungen von Craig 1959, Fusayama 1966 und Meredith 1996. Ihre Studien führten bezüglich der Härte von unverändertem Dentin zu ähnlichen Ergebnissen, die wie folgt zusammengefasst werden können: Die Härte des Dentins nimmt fast kontinuierlich vom Schmelz zur Pulpa hin ab, wobei die größte Härte mit ca. 70 KHN etwa 300 – 450 μm unterhalb des Schmelzes zu finden ist und zur Pulpa hin auf 20 – 30 KHN zurückgeht. Direkt an der Schmelz-Dentin-Grenze wird die Dentinhärte von Craig mit 15 KHN als extrem

niedrig angegeben. (Fusayama et al., 1966, Craig et al., 1959, Meredith et al., 1996). Bei kariösem Dentin sind vor allem in Abhängigkeit von der Progressionsgeschwindigkeit der Läsion sehr unterschiedliche Werte zu finden. 1966 ermittelten Fusayama et al. für akute schnell fortschreitende Karies an der bakteriellen Penetrationsfront 4,4 KHN und an der Grenzlinie der makroskopischen Verfärbung 17 KHN. Dagegen wurden bei Proben mit chronischer Karies mit maximal 61 KHN an der Penetrationsfront und 68 KHN an der Grenzlinie der Verfärbung, wesentlich höhere Werte gefunden. 1983 konnten Ogawa et al. in Verbindung mit histologischen Untersuchungen die größte Härte für chronische Läsionen am Übergang von normalem Dentin zur subtransparenten Schicht lokalisieren (s. 2.3.1). Dies deckte sich sowohl mit den Ergebnissen von Fusayama et al. (1966), als auch wurde es durch neuere Untersuchungen von Banerjee et al. (1999) bestätigt. Ebenfalls 1983 fanden Featherstone et al. heraus, dass die Dentinhärte mit dem Mineralisationsgrad korreliert und die Härtemessung folglich zur qualitativen Untersuchung von demineralisierten Zahnbereichen geeignet ist. Als Referenzuntersuchung verwendeten sie die Mikroradiographie.

2.3.3 Transversale Mikroradiographie

Unter dem Prinzip der Mikroradiographie versteht man die Messung der Absorption von monochromatischer Röntgenstrahlung durch eine Probe (Zahn, Knochen) im Vergleich zur Absorption einer gleichzeitig dargestellten Eichtreppe.

In der Zahnmedizin geht die Transversale Mikroradiographie (TMR) auf Thewlis (1940) zurück und wurde 1963 von Angmar et al. zu einer quantitativen Methode zur Bestimmung des Mineralgehalts von Zahnschmelz und Dentin weiter-

2 Literaturübersicht

entwickelt. Es werden dazu sehr dünne 80 – 150 µm (für Dentinschnitte bis 200 µm) dicke planparallele Zahnschliffe benötigt, die transversal von der Zahnseite gewonnen werden. Anschließend werden die Mikroradiographien auf einem hochempfindlichen Röntgenfilm durch Röntgenbestrahlung der Probe hergestellt. Röhrenspannung und Bestrahlungsdauer können individuell auf das zu untersuchende Material eingestellt werden. Mit Hilfe einer zur Kalibrierung gleichzeitig abgebildeten Aluminiumeichtreppe kann nun, bei bekannter Dicke der Probe, der Mineralgehalt in Abhängigkeit zur Tiefe der Läsion exakt quantitativ erfasst werden (Angmar et al., 1963, Featherstone et al. 1983, de Josselin de Jong , 1986, Inspektor, 2004). Kurz erwähnt sei an dieser Stelle auch die longitudinale Mikroradiographie (LMR), bei der im Vergleich zur TMR oberflächenparallele Schmelzproben, vor allem auf De- und Remineralisationsphänomene, untersucht werden. Die Dicke der Proben sollte dabei 300 – 450 µm betragen (de Josselin de Jong et al., 1987, Inspektor, 2004, Universität Giessen, 2004). Dass die TMR als kariesdiagnostische Untersuchungsmethode hervorragend geeignet ist, wird beispielsweise von Arends und Ten Bosch (1992) gezeigt: Sie verglichen neun Analysemethoden, mit denen Läsionstiefe und Mineralverlust einer kariösen Läsion quantitativ oder qualitativ, direkt oder indirekt gemessen werden können. Dabei untersuchten sie die transversale, longitudinale und Wellenlängen unabhängige Mikroradiographie, die Mikrohärtemessung, die Analyse der Läsion mit polarisiertem Licht, mit chemischen Verfahren, mit Iodid-Absorption und –Permeabilität sowie mit Lichtstreuung. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die TMR die praktikabelste, und neben der chemischen Analyse, die beste Methode zur direkten und quantitativen Bestimmung des Mineralgehaltes ist. Heute sind Systeme mit speziell zur Analyse der Mikroradiographien

entwickelter Software erhältlich, die die Auswertung stark erleichtern. Bei diesen wird die Mikroradiographie digitalisiert und der Mineralgehalt der Probe über die Erfassung der Graustufen des mikroradiographischen Bildes automatisch im Vergleich mit den Graustufen der Aluminiumeichtreppe ermittelt. Neben verschiedenen errechenbaren Parametern wie durchschnittlichem Mineralverlust im Läsionsgebiet oder Positionsangabe des Läsionskörpers sind wohl nach wie vor Mineralverlust in Vol%. μm und die Läsionstiefe die primär wichtigsten Informationen. Die Läsionstiefe ist als Distanz zwischen der Probenoberfläche und der Position, an der der Mineralgehalt des gesunden Schmelzes bzw. Dentins 95% beträgt, definiert. Der Mineralgehalt wird als Funktion der Tiefe dargestellt. Durch Überlagerung zweier Mikroradiogramme kann der Mineralverlust als Fläche zwischen dem Mikroradiogramm der kariösen Probe und dem der gesunden Probe dargestellt werden (de Josselin de Jong et al., 1987, Inspektor, 2004, Universität Giessen, 2004). Neben diesen von der Strahlenquelle bis zur Spezialsoftware „geschlossenen“ Systemen ist es selbstverständlich auch möglich, die Mikroradiographien selbst digital über die Grauwertänderungen auszuwerten. Auch die Verwendung des in dieser Studie zum Einsatz gekommenen Faxitron®-Röntgengerätes zur Erstellung von Mikroradiographien ist in der aktuellen Literatur häufig beschrieben. (Wiltfang et al., 2003, Schlegel et al., 2004).

2.3.4 Quantitative lichtinduzierte Fluoreszenz (QLF)

Als Fluoreszenz wird die Art der Photolumineszenz bezeichnet, bei der innerhalb von 0,1 bis 100 ns nach Beginn der Anregung die absorbierte Energie in Form von Strahlung wieder abgegeben wird.

2 Literaturübersicht

Grundlagen

Die Anregung zur Fluoreszenz findet in der Regel durch ultraviolettes, blaues oder grünes, also kurzwelliges Licht statt. Dabei werden Elektronen bestimmter Atome durch auftreffende Photonen auf ein höheres, instabiles Energieniveau gehoben. Beim Rücksprung in einen niedrigeren, stabileren Energiezustand wird die freiwerdende Energie wieder abgestrahlt. Nach der Stokes'schen Regel ist das dabei emittierte Licht immer langwelliger, also energieärmer, als das absorbierte. Dieses Phänomen wurde erstmals im 16. Jahrhundert beobachtet und im Jahre 1852 von jenem oben genannten G. G. Stokes im Sinne der Fluoreszenzspektroskopie für die naturwissenschaftliche Forschung nutzbar gemacht. Grundsätzlich stellt ein Fluoreszenzspektrum die Intensität der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Wellenlänge dar. Man unterscheidet zwischen Anregungs- und Emissionsspektren. Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Emissionswellenlänge bei fester Anregungswellenlänge bezeichnet man als Fluoreszenzemissionsspektrum oder kurz Fluoreszenzspektrum. Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Anregungswellenlänge bei fester Emissionswellenlänge als Fluoreszenzanregungsspektrum oder kurz Anregungsspektrum (Zander, 1981, Wei, 1998, Demtröder, 2000). In der Zahnmedizin ist das Fluoreszenzspektrum dasjenige mit der größeren Bedeutung. Dabei wird es meist nicht in allen Details ausgewertet, sondern mittels Filtersystemen das gesamte emittierte Fluoreszenzlicht oberhalb des jeweils verwendeten Long-Pass-Filters betrachtet. Also eine quantitative licht- oder laserinduzierte Fluoreszenzmessung (QLF). 1911 war Stübel der Erste, der die Fluoreszenz von Zähnen untersuchte und bereits 1929 erkannte Benedict erstmals in zahnmedizinischer Hinsicht die Fluoreszenz als ein möglicherweise zur Kariesdiagnostik nutzbares

Phänomen (Benedict, 1929, Matsumoto et al., 2001). Langsam wieder aufgenommen wurde die Thematik der Fluoreszenzuntersuchung von Zähnen erst in den sechziger Jahren durch Untersucher wie Laurila, Armstrong, Hoerman und Perry (Laurila et al., 1960, Hoerman und Mancewicz, 1964, Matsumoto et al., 2001). Heute hat sich dabei nicht nur in der Zahnmedizin die Fluoreszenzanregung im Auflichtmikroskop gegenüber der Durchlichtanregung durchgesetzt. Bei dieser Untersuchungsmethode werden auf der Beleuchtungsseite Erregerfilter, auch Band-Pass-Filter genannt, eingesetzt, die nur Anregungsstrahlung passieren lassen. Im Beobachtungsstrahlengang befinden sich oben genannte Sperr- oder Long-Pass-Filter, die nur das vom Präparat emittierte langwelligere Fluoreszenzlicht durchlassen. Das Erregerlicht wird über dichromatische Teilerspiegel (Beamsplitter), die kurzwelliges Licht reflektieren und den anschließend langwelligeren Spektralbereich ungehindert passieren lassen, auf das Objekt gelenkt. Die Fluoreszenzstrahlung gelangt also durch diesen Strahlenteiler und den Sperrfilter zum Auge (s. Abb. 4 Kapitel 4.5.2). Die Fluoreszenzmikroskopie ist heute ein weit verbreitetes naturwissenschaftliches Verfahren, mit dem selbstverständlich nicht nur Zähne untersucht werden können. Liegt bei dem zu untersuchenden Gewebe keine ausreichende Autofluoreszenz vor, so können einzelne Gewebebestandteile mit Fluorochromen wie Rhodamin, Acridinorange oder Tetracyclin vor der mikroskopischen Untersuchung markiert, und somit sichtbar gemacht werden. Bei der Immunfluoreszenztechnik werden beispielsweise Antigene sichtbar gemacht, indem die spezifischen Antikörper mit Verbindungen wie Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert werden. Ebenso lässt sich die DNS-Verteilung von Chromosomen mittels Fluoreszenzmarkierung darstellen (Schade, 1993). Allgemein als biogene Fluorophore bekannt sind die drei mit

2 Literaturübersicht

aromatischen Seitenketten bestückten Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin. Dementsprechend fluoreszierend sind meist auch die Proteine, die diese Aminosäuren enthalten. Allerdings kann Fluoreszenz ebenso aus anderen Strukturen entstehen, die neben dem Peptidstrang mit dem Peptid verbunden sind. Ein weiteres Phänomen der Fluoreszenzuntersuchung ist die „Energieübertragung“. Dabei wird die absorbierte Strahlungsenergie von einem Atom oder Molekül auf ein anderes übertragen; die resultierende Fluoreszenzemission ist somit von den Eigenschaften des zweiten Stoffes abhängig. Weitere bekannte Fluorophore sind Riboflavin, Flavin-Mononukleotide (FMN), Flavin-Adenine-Dinukleotide (FAD), die Vitamin B6 Gruppe sowie NADH und NADPH. Dabei kann das NADH-Fluoreszenzsignal als Maß für intrazelluläre Redoxreaktionen zur Bestimmung der Aktivität von Bioprocessen herangezogen werden und findet auf diese Weise heute schon in Bioreaktoren seine Anwendung.

Allgemein nach der Quantentheorie ergibt sich für die Beziehung zwischen Fluoreszenzintensität F und der Konzentration des fluoreszierenden Stoffes c folgende Beziehung: $F = \Phi \cdot I_0 \cdot (1 - e^{-\epsilon \cdot b \cdot c})$ mit Φ als Quantenausbeute, I_0 als Intensität des anregenden Lichtes, ϵ ist der molare Absorptionskoeffizient und b die Schichtdicke der Messzelle. Abgesehen von stark verdünnten Lösungen handelt es sich also um keinen linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration des Fluorophors und der Fluoreszenzintensität (Zander, 1981, Wei, 1998, Demtröder, 2000).

QLF – Fluoreszenz von Schmelz

Grundsätzlich sind zwei unterschiedliche QLF-Systeme bekannt. Zum einen die quantitative laserinduzierte Fluoreszenz (QLF I) und zum anderen die lichtinduzierte (QLF II). Bei Letzterer erfolgt die Anregung mit dem durch Band-Pass-

Filter isolierten blau-violetten (290 – 450 nm) Spektralbereich, beispielsweise einer 25 - 50 Watt Xenon-Lichtbogenlampe. Bei der Betrachtung durch einen 520 nm High-Pass-Filter werden zwei Fluoreszenz-Peaks sichtbar: Ein großer bei ca. 540 nm und ein kleinerer bei ca. 610 nm (Ando et al., 2001). Das QLF-I-System unterscheidet sich lediglich durch die Verwendung eines 488 nm Argonlasers (488 nm und 514 nm Mischlicht) zur Anregung, wodurch auf oben genannte Band-Pass- bzw. Erreger-Filter verzichtet werden kann (de Josselin de Jong et al., 1995, Ando et al., 1997, Ferreira Zandona et al., 1998a, Eggertsson et al., 1999, Tam et al., 2001b). Der Nachteil dieser Variante ist klinisch in den aufwendigen Sicherheitsvorkehrungen, die die Laserapplikation am Patienten erfordern, zu sehen (Tranaeus et al. 2001, Angmar-Mansson et al., 1999, Lagerweij et al., 1999). Die fast identisch gute Funktion der beiden Methoden wird dabei durch den hohen Korrelationskoeffizient zwischen QLF I und II unterstrichen, der für Glattflächenkaries zwischen 0,93 und 0,98 liegt. (Al-Khateeb et al., 1997, Ando et al., 2001). Bei beiden Systemen wird die Lichtintensität des Fluoreszenzsignals, das sich im gesunden Schmelz wie oben beschrieben darstellt, ausgewertet. Dabei vermutet man als Ursache für die Grundfluoreszenz die organischen Bestandteile des Schmelzes und weniger die gesunde kristalline Struktur (Benedict, 1929, Spitzer und Bosch, 1976, Matsumoto et al., 2001). Definitiv geklärt ist dies jedoch nicht (Matsumoto et al., 2001, Tranaeus, 2002b). In kariösen Bereichen ist nun eine deutlich geringere Fluoreszenz zu messen. Erklärt werden kann dieses Phänomen über die Änderung des Brechungsindex von Schmelz. Dieser entspricht bei Unversehrtheit mit 1,62 in etwa dem von Hydroxylapatit. Prismen und interprismatischer Schmelz haben fast identische Brechungsindizes - der unversehrte Schmelz erscheint transluzent. Säurebedingt

2 Literaturübersicht

entstehen um die Kristallite Bereiche mit zwangsläufig optisch geringerer Dichte, die so genannten Poren. Solange die Zahnoberfläche feucht ist (Brechungsindex Wasser: 1,33) erscheint der Zahn meist noch transparent. Wird er jedoch getrocknet und die Poren somit mit Luft gefüllt (Brechungsindex Luft: 1,0), erscheint die Oberfläche opak weiß - das typische Bild einer White-Spot-Läsion ist zu sehen. Für die QLF bedeutet das, dass durch Rückstreuung einerseits weniger Exzitationslicht zu den Fluorochromen vordringt und somit weniger Fluoreszenzlicht generiert wird, und andererseits dieses Fluoreszenzlicht ebenfalls wieder gestreut und vom Sensor wegreflektiert wird. Angmar-Mansson und Ten Bosch (2001) schließen zudem eine Verminderung der Fluoreszenz selbst durch eine Änderung der molekularen Umgebung der Chromophore, bzw. ein Verschwinden dieser im Kariesprozess, nicht aus (Tranaeus, 2002b). Dementsprechend stellen sich kariöse und demineralisierte Areale, entsprechend dem vergrößerten Porenvolumen, auf dem Bildschirm dunkel dar (Thylstrup und Fejerskov, 1999, ten Bosch, 2000, Tranaeus et al. 2001). Die Frage, an welchen Bereichen der Zähne eine aussagekräftige Anwendung der Fluoreszenzmessung möglich ist, ist in zahlreichen Studien untersucht worden. Limitiert wird die Methode dabei natürlich durch oben beschriebene Wirkungsweise: Kann das Anregungslicht z.B. in tiefe Fissuren oder Approximalräume erst gar nicht eintreten, bzw. das Fluoreszenzlicht nicht austreten, ist mit einem Abnehmen der Aussagekraft des Verfahrens zu rechnen. Zahlreiche Untersuchungen haben dagegen gezeigt, dass die QLF für die Beurteilung und das Monitoring von Schmelzläsionen an Glattflächen sowohl in vivo als auch in vitro sehr gut geeignet ist. Für In-vitro-Untersuchungen betrug die Spezifität bis zu 100%, bei einer Sensitivität von bis zu 94% (Shi et al., 2001). Die gute Korrelation von QLF mit dem Mine-

ralverlust wurde über die als Goldstandard angesehene Mikroradiographie (LMR) von vielen Studien mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,73$ bis $0,86$ bestätigt (Hafstrom-Bjorkman et al., 1992, Emami et al., 1996, Shi et al., 2001). Schlechtere Werte werden von Ando et al. mit einer Korrelation von QLF zu TMR für bleibende Zähne mit $r = 0,69 / 0,62$ angegeben. Für Milchzähne berichten sie jedoch über eine sehr gute Korrelation von $r = 0,88$. (Ando et al. 1997 / 2001). Für die in-vivo Untersuchungen werden fast identisch gute Werte in der Literatur gefunden (de Josselin de Jong et al., 1995, Al-Khateeb et al., 1997b, Ferreira Zandona et al., 2000, Ten Cate et al., 2000, Tranaeus et al., 2000). Zudem ist bei der QLF-Kariesdiagnostik eine äußerst gute Inter- und Intra-Untersucher bezogene Korrelation gegeben, die als Grundlage eines erfolgreichen Kariesmonitorings anzusehen ist. Die in verschiedenen Studien ermittelte Korrelation sowohl zwischen den Untersuchern als auch bei den einzelnen Untersuchern selbst, verlief in vivo sowie in vitro innerhalb von $r = 0,93 - 0,99$ (Higham et al., 2001, Pretty et al., 2002, Tranaeus et al., 2000 und 2002). Neben oben genannten Autoren attestierten auch Hall et al. (1997), Angmar-Mansson et al. (1999) und Tam et al. (2001) dem QLF-System eine vorzügliche Einsetzbarkeit an Glattflächen in vivo bzw. in vitro. Reproduzierbare Messergebnisse sind dabei schon ab einer Läsionstiefe von $5 - 10 \mu\text{m}$ (de Jong et al. 1992) und bis zu einer Tiefe von $400 \mu\text{m}$ (Al-Khateeb et al., 1997a, Emami et al., 1996) zu erwarten. Shi et al. (2001) und Tranaeus (2002b) geben sogar bis $800 \mu\text{m}$ eine lineare Beziehung zwischen Fluoreszenzverlust und Läsionstiefe an. Dementsprechend wurde das QLF-System bereits in einigen Untersuchungen erfolgreich zur In-vivo-Verlaufskontrolle von Whitespotläsionen an Glattflächen eingesetzt (Al-Khateeb et al., 1998 und 2000, Tranaeus et al., 1999 und 2001b, Charité, 2004).

2 Literaturübersicht

Die nur mäßig gute Einsetzbarkeit im Approximalbereich (Eggertson et al., 1999) und zur okklusalen Kariesdiagnostik (Ferreira Zandona et al., 1998a/b, Verdonschot et al., 1999, Tam et al., 2001a/b) wurde bereits oben angesprochen und wird durch mehrere Studien bestätigt. In diesen Bereichen ist oft die herkömmliche visuelle Inspektion noch überlegen. Auf dem Markt sind momentan lediglich zwei Systeme erhältlich, die eine klinische Anwendung des Prinzips der Fluoreszenzmessung ermöglichen. Zum einen bietet die Firma Inspektor Research Systems (NL) mit dem QLF oben beschriebenes System an, zum anderen ist das DIAGNOdent®-System von Kavo (DIAGNOdent Kavo, Biberach, D) erhältlich. Bei Ersterem errechnet die zugehörige Software automatisch als wichtigste Parameter Läsionsgröße in mm^2 , Läsionstiefe ausgedrückt in prozentualer Fluoreszenzabnahme $\Delta F \%$ und Läsionsvolumen ΔQ in $\text{mm}^2.\%$ (Inspektor, 2004). DIAGNOdent arbeitet in einem deutlich langwelligeren Anregungsbereich ($\lambda = 655 \text{ nm}$) und zielt damit eher auf die Fluoreszenz der Stoffwechselprodukte von Bakterien ab (Hibst und Paulus, 1999). Dementsprechend erfolgt die Besprechung an anderer Stelle.

QLF – Fluoreszenz von Dentin

Im Gegensatz zur quantitativen lichtinduzierten Fluoreszenz im Schmelz liegt zum heutigen Zeitpunkt keine allgemein anerkannte oder gar marktreife Methode zur kariesdiagnostischen Auswertung von Fluoreszenzphänomenen in Dentin vor. Obwohl dies, wie man meinen sollte, einen erhöhten Forschungsbedarf impliziert, sind zu diesem Thema deutlich weniger Untersuchungen veröffentlicht als zu vergleichbaren Phänomenen im Schmelz. Die anfänglichen Studien in den sechziger Jahren befassten sich zunächst hauptsächlich mit der Untersuchung der Ursache der Grundfluoreszenz von gesundem Dentin. Dabei kamen

im Gegensatz zu Glasser und Fonda 1938 fast alle Untersucher zu dem Ergebnis, dass die Fluoreszenz organischen Ursprungs sei (s. Tabelle 1). Als Quelle werden dabei Hydroxypyridinium, Pyridin, Pyridinolin, Hydroxylapatit-Pyridinolin-Komplexe, allgemein Kollagenbestandteile, aber auch oben angesprochenes Tryptophan genannt. Linde gibt sogar Plasmaproteine wie z.B. Albumin, die über das Kreislaufsystem in die Zahnhartsubstanz gelangen, als mögliche Ursache für die Fluoreszenz an (s. Tabelle 1).

Tabelle 1 Grundfluoreszenz von Dentin

Anregung (nm)	Emission(nm)	Fuoreszenzursache	Untersucher
UV	blau	organisch	Benedict 1929
-	-	mineralisch	Glasser und Fonda 1938 ◊
330	400	Pyridin◊	Laurila et al. 1960
UV	390	-	Armstrong 1963 ◊
271	343	Tryptophan	Hoerman und Mancewicz, 1964
350	410	Kollagenbestandteile	Perry et al., 1969 ◊
366	530	-	Horibe et al. 1974 ◊
285	355	Tryptophan	Foreman 1980
350	410-440	Hydroxypyridinium◊	
410	<540	-	Alfano und Yao, 1981
350	427	Hydroxypyridinium◊	
-	-	Tryptophan aus Plasmaproteinen (Albumin, α 2HS-glycoprotein)	Linde 1984/1987 ◊
366	440	-	Nishigori et al. 1986◊
330	440	Kollagen- Pyridinoline-Hydroxylapatit- Komplex	Fukushima et al. 1987 ◊
-	-	Pyridinoline	Fujimoto et al. 1988◊
540	>600	Porphyrine◊	Kvaal und Solheim 1989
365	450	-	Araki et al. 1990 ◊

◊ nur nach Matsumoto et al., 2001, bzw. Daten nicht aus Primärquelle

Ein im Vergleich mit den Untersuchungen von Schmelzläsionen überraschendes Ergebnis war die stark erhöhte Fluoreszenz der Dentinläsionen gegenüber dem

2 Literaturübersicht

unveränderten Dentin (s. Tabelle 2). Also eine genau entgegengesetzte Entwicklung zur abnehmenden Fluoreszenz in Schmelzläsionen. Zweifelsohne konnten nicht dieselben Vorgänge, die in Schmelzläsionen zu einer Verminderung des Fluoreszenzsignals führten, in Dentinläsionen eine Erhöhung desselbigen hervorrufen. Heute gehen die meisten Autoren davon aus, dass Stoffwechselprodukte von Bakterien oder aber zumindest allgemein exogene Faktoren die Hauptursache der gesteigerten Fluoreszenz sind (s. Tabelle 2).

Tabelle 2 Erhöhte Fluoreszenz kariöses Dentin

Anregung (nm)	Emission(nm)	Fuoreszenzursache	Untersucher
UV	415	-	Armstrong 1963 ◊
410	>540	-	Alfano und Yao, 1981
530	580	-	
488	550	-	Sundström et al. 1985 ◊
398-421	530-633	Bakterienprodukte (versch. Porphyrine)	König et al., 1994◊
407	650-700	Bakterienprodukte (Porphyrin IX) u. Bakterien selbst	König et al. 1993a/b, 1998 u. 2000
488+515	529	Organisch ^{*)} , endogen	van der Veen und ten Bosch, 1996
(285)	(355)	Tryptophan aus Plasmaproteinen ^{*)}	Banerjee et al., 1998, 1999
488	>515	Organisch/Bakterienprod.*)	
380-420	>450	Exogene Faktoren ^{*)}	Shigetani et al., 2003
465-495	515-555		
590-650	603-735		
370-420	>530	Bakterienprodukte ^{*)}	Lennon et al. 2002 und Lennon 2003

^{*)} nur Vermutung, oder auf andere genannte Studie beziehend; ◊ Daten nicht aus Primärquelle

Lediglich van der Veen und ten Bosch (1996) vertreten die Meinung, dass ein endogenes Chromophor in enger Beziehung zu den mineralischen Anteilen des Dentins bei Demineralisationvorgängen die Fähigkeit zur Autofluoreszenz (AF)

entwickelt, bzw. etwaige Auslöschungsphänomene aufgehoben werden. Somit wäre dann die AF vom Mineralgehalt per se abhängig. Belegt wird dies ihrer Meinung nach durch die in vitro durchgeführten Demineralisationsexperimente. Allerdings konnten diese durch Banerjee et al. (1998) nicht nachvollzogen werden. Sie schwanken bei ihren Lösungsansätzen zwischen Bakterienprodukten, die mit der Dentinmatrix interagieren und der Anreicherung oben angesprochener Blutplasmaproteine (Banerjee et al., 1999). Dementsprechend kann die Ursache der Fluoreszenzphänomene sowohl im Dentin als auch im Schmelz guten Gewissens als nicht definitiv geklärt angesehen werden (Tranaeus 2002b). Dies wird allerdings auch von keinem der oben zitierten Autoren für sich in Anspruch genommen. Unabhängig von der genauen Ursache der Fluoreszenz ist eine der interessantesten Fragen, die noch zu beantworten bleibt die, ob es möglich ist, einen Zusammenhang zwischen

1. Fluoreszenzanstieg und Mineralgehalt,
2. Fluoreszenzanstieg und Mikrohärtigkeit,
3. Fluoreszenzanstieg und histologischen Veränderungen oder
4. Fluoreszenzanstieg und bakterieller Infektion des Dentins

herzustellen.

Van der Veen und ten Bosch (1996) kamen mit oben beschriebenen Versuchen als eine der ersten Forschergruppen zu dem Ergebnis, dass das bei der Anregung (Ex) mit Licht einer Wellenlänge von 515 nm entstehende Emissionslicht (Em) der Wellenlänge 529 nm mit dem Mineralverlust korreliert. Zur Mineralgehaltsbestimmung dienten ihnen unter anderem TMR und ESCA (electron spectroscopy for chemical analysis). Banerjee et al. (1998) konnten ebenfalls eine Korrela-

2 Literaturübersicht

tion der AF-Intensität von Dentin (Ex 488 nm / Em >515 nm) mit dessen Mineralgehalt nachweisen. Allerdings war die im CLSM mittels AF dargestellte Tiefe der Läsion signifikant größer als die im BSE-SEM (digital backscattered scanning electron microscopy) bestimmte, tatsächliche Tiefenausdehnung. Ähnliche Probleme bei der Untersuchung der Tiefe von Dentinläsionen hatten Shigetani et al. (2003): Sie verwendeten im Fluoreszenzmikroskop verschiedene Filtersysteme (UV: Ex 380-420 nm / Em 450 nm; FITC: Ex 465-495 nm / Em 515-555 nm; Cy5: Ex 590-650 nm / Em 663-735 nm) und verglichen die gemessene AF mit dem Mineralgehalt, der mittels EPMA (electron probe x-ray microanalyser) bestimmt wurde. Dabei konnte eine Korrelation zwischen der AF im Cy5-Feld und Kalzium- sowie Phosphatgehalt festgestellt werden. Für die beiden anderen Filtersysteme sowie die Tiefenbestimmung der Läsion in Blockpräparaten waren die Ergebnisse weniger aussagekräftig.

In einer anderen Untersuchung unternahmen Banerjee et al. (1999) den interessanten Versuch, die AF (Ex 488 nm / Em >515 nm), gemessen im CLSM mit der Mikrohärtigkeit sowie histologischen Veränderungen wie Verfärbung und transluzenter Zone in Verbindung zu bringen. Dabei korrelierte die AF mit deutlich erweichtem braunem Dentin und endete oberhalb der transluzenten Zone im hellbraun verfärbten, noch leicht erweichten Dentin. Laut Featherstone et al. (1983) korreliert aber die Dentinhärte mit dem Mineralisationsgrad und somit könnte man aus dem Ergebnis der Untersuchung schließen, dass die AF doch zumindest nicht direkt mit demselbigen korreliert. Damit verwerfen aber Banerjee et al. keineswegs ihre Theorie, sondern bringen ein schon bei den Anfärbemethoden zur Kariesdetektion, wie beispielsweise Caries Detector®, gerne verwendetes Argument zurück ins Gespräch: Muss das erweichte Dentin restlos

oder überhaupt entfernt werden oder reicht es, nur die bakteriell infizierten Bereiche zu exkavieren? Diese würden ja, wie schon Fusayama et al. 1966 schreiben, oberhalb der noch erweichten Bereiche liegen (Ohgushi et al. 1975, Fusayama et al. 1972, Sato et al. 1976, Ogawa et al., 1983). Unabhängig von der Beantwortung dieser Frage sollte zuerst geprüft werden ob, wie von Banerjee et al. (1999) vermutet, ein direkter Zusammenhang zwischen AF und bakterieller Invasion von Dentin besteht.

Bereits 1993 beschrieben König et al. diese Möglichkeit der Kariesdetektion mittels Fluoreszenzmessung. Sie machten dabei als Hauptverantwortlichen für die in Dentinläsionen gemessene AF (Ex 407 nm / Em 650 – 700 nm) bzw. 1994 (Ex 398 - 421 nm / Em 530 – 633 nm) die Porphyrine aus. Diese werden von Bakterienstämmen wie den *Bacteroides intermedius* und *Actinomyces odontolyticus*, die selbst eine Eigenfluoreszenz aufweisen, produziert. Auch anderen Bakterien der Mundhöhle, wie den *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibakterium acnes* und *Porphyromonas gingivalis*, konnte eine porphyrinbezogene AF nachgewiesen werden. Leider gelang dies nicht für *Streptokokkus mutans* oder andere direkt mit Dentinkaries assoziierte Bakterien. Dennoch kamen König et al. aufgrund ihrer Ergebnisse zu dem Schluss, dass eine nicht invasive, in vivo anwendbare Kariesdetektion mit dieser Nachweismethode durchaus möglich sei (König et al. 1993a/b, 1994, 1998 u. 2000). Aufbauend auf dieser optimistischen Prognose lässt sich nun, von zwei Überlegungen ausgehend, ein interessanter Lösungsansatz zur bakterienassoziierten lichtoptischen Kariesdiagnose entwickeln. Erstens: Das Hauptaugenmerk bei der Kariesbehandlung sollte auf der Entfernung aller Mikroorganismen aus der Kavität liegen. Und zweitens: Alle Mikroorganismen können in etwa gleich weit in geschädigtes Dentin vordrin-

2 Literaturübersicht

gen. Dementsprechend kann es eigentlich nur eine untergeordnete Rolle spielen, welche der Bakterien oder Bakterienprodukte in der Läsion fluoreszieren – sie müssen in jedem Fall entfernt werden. Um eben dies zu zeigen, führten Lennon et al. 2002 und 2003 die zwei im Folgenden beschriebenen Untersuchungen durch. 2003 exkavierte Lennon unter annähernd klinischen Bedingungen die fluoreszierenden Areale von Kavitäten, die eine Dentinkaries aufwiesen. Bei dieser als Fluorescence-Aided Caries Excavation (FACE) bezeichneten Methode leitete er Licht der Wellenlänge 370 – 420 nm durch die Faseroptik des langsam drehenden, zur Exkavation verwendeten Winkelstückes, und beobachtete dabei die AF durch einen 530 nm High-Pass-Filter. Die Vergleichsgruppe wurde anstelle der Fluoreszenz mit einer scharfer Sonde auf Restkaries überprüft. Zur Kontrolle der erfolgreichen Exkavation färbte Lennon mittels der fluoreszierenden Ethidiumbromid Nukleinsäurefärbung alle in der Kavität verbliebenen Bakterien bzw. deren Zellkerne an und konnte so im CLSM selbst einzelne vorhandene Bakterien nachweisen. Auf diese Weise wurde Restkaries in signifikant weniger mit FACE behandelten Kavitäten als in der Vergleichsgruppe nachgewiesen. Zudem war die Anzahl der verbliebenen Bakterien in positiven FACE-Proben wesentlich geringer als in konventionell exkavierten Läsionen (Lennon, 2003). Dieses vielversprechende Ergebnis zeichnete sich bereits in vorangegangenen Untersuchungen ab. Hier verglichen Lennon et al. (2002) oben beschriebene Fluoreszenzmethode mit drei weiteren Untersuchungsmethoden bezüglich der Fähigkeit, Restkaries in Dentinläsionen zu erkennen. Als Goldstandard diente wiederum oben genannte CLSM-Färbetechnik. Hier zeigte sich für die „neue“ Untersuchungsmethode die höchste Sensitivität (0,94), Spezifität (0,83) sowie die höchste Anzahl richtiger Aussagen insgesamt (88 %). Auf den weiteren Plät-

zen folgten Diagnodent®, visuelle und taktile Kontrolle und mit großem Abstand Caries Detector®. Anzumerken ist noch, dass es sich bei dieser Untersuchung nicht um ein, wie der Autor gerne schreibt, neues System handelt, sondern viel mehr um die Anwendung von oben beschriebenem QLF II-System der Firma Inspektor (NL) auf Dentinkaries.

Des Weiteren soll darauf hingewiesen werden, dass insbesondere bei Matsumoto et al. (2001) nicht alle Daten in der von ihnen angegebenen Primärliteratur nachvollzogen werden konnten. Dementsprechend sind Angaben, die nur auf diese Quelle zurückzuführen waren, ebenso wie Daten, die mit den Primärquellen nicht in Übereinstimmung gebracht werden konnten, entsprechend gekennzeichnet.

2.3.5 Andere lichtoptische Diagnostikmethoden

Als weitere lichtoptische Methoden zur Kariesdiagnostik sind oben genanntes DIAGNOdent®, fiberoptische Transillumination (FOTI) und die konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) zu nennen.

DIAGNOdent®

Bei diesem System erfolgt die Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 655 \text{ nm}$. Dies führt im Bereich kariöser Veränderungen zu einer erhöhten Fluoreszenz im Infrarotbereich, die von dem Gerät gemessen werden kann. Als Hauptursache der erhöhten Fluoreszenz werden dabei Stoffwechselprodukte von Bakterien, insbesondere sog. Porphyrine, vermutet (König et al., 1993a/b, Hibst und Paulus, 1999, Sailer et al., 2001). In dieser Tatsache liegt zum Teil auch das Problem des Systems begründet: Zum einen sind die Metabolite auch in Belägen,

2 Literaturübersicht

Plaque und bereits wieder inaktiven Läsionen zu finden (Featherstone 2000, Pektanov-Schröder 2003) und zum anderen zeigen beispielsweise auch Verfärbungen von schwarzem Tee eine erhöhte Fluoreszenz (Hibst 2001). Laut Hersteller KaVo (Biberach, D) soll das Gerät bei der okklusalen Kariesdiagnostik sowie Glattflächenuntersuchungen eingesetzt werden. Allerdings schneidet für Glattflächenuntersuchungen das QLF-System im direkten Vergleich besser ab (Shi et al. 2001). Über die Qualität der okklusalen Kariesdetektion sind unterschiedliche Beurteilungen zu finden: So belegen Shi et al. (2000) beispielsweise, dass DIAGNOdent besser zur okklusalen Diagnostik geeignet ist als konventionelle Röntgenbilder - was keine Überraschung darstellt. Interessanter ist die Tatsache, dass laut Tam et al. (2001) sowohl klinische Inspektion als auch elektrische Widerstandsmessung (EWM) okklusal bessere Ergebnisse erzielen als DIAGNOdent®. Tranaeus (2002) beurteilt die Funktion des Gerätes ebenfalls als mäßig. Sie berichtet von nur einer einzigen Studie (Lussi et al., 2001), in der gleichzeitig für Sensitivität und Spezifität Werte über 0,8 ermittelt werden konnten. Und dies gilt nur für oberflächliche Läsionen. Angesprochener Lussi beurteilt dagegen auch in vorangegangenen Untersuchungen das System als gut (Lussi et al., 1999 und 2000) und gibt bei okklusalen Läsionen eine höhere Sensitivität und Spezifität für DIAGNOdent® als für die EWM an (Stokey et al., 1999). Obwohl weitere Autoren wie Reich (2000), Hibst (2001) und Pektanov-Schröder (2003) die gute Einsetzbarkeit beschreiben, sollte DIAGNOdent noch nicht als alleiniges Entscheidungskriterium für ein invasives Vorgehen eingesetzt werden (Sheehy et al., 2001).

FOTI - fiberoptische Transillumination

Bei dem zweiten klinischen Anwendungssystem handelt es sich um die fiberoptische Transillumination (FOTI). Mit dieser klassischen, auch als Diaphanokopie bezeichneten Untersuchungsmethode, wird ausschließlich der Intensitätsverlust des Lichtes bei Durchstrahlung des Zahnes beurteilt. Durch oben angesprochene veränderte Lichtbrechung in kariösen Läsionen stellen sich diese dann als dunkle Areale dar. Dabei handelt es sich um eine rein visuelle Bewertung ohne Möglichkeit der Dokumentation oder Verlaufskontrolle. Geändert hat sich das durch die Entwicklung des DIFOTI-Gerätes (digital fiber optic transillumination, EOS, USA), bei dem diese Möglichkeiten durch den Einsatz einer CCD-Kamera gewährleistet werden können (Pekanov-Schröder 2003). Dass FOTI okklusal nicht besser funktioniert als die visuelle Inspektion scheint logisch und wird im Gegensatz zu Stookey et al. (1999) von Côrtes et al. (1999) und Wenzel et al. (1992) bestätigt. Die Stärken des Systems sind klar in der Detektion von Approximalkaries zu sehen. Hier schneidet das System je nach Untersucher im Vergleich mit der klassischen Bissflügelaufnahme besser (Stookey et al., 1999), genauso gut (Peers et al., 1993) oder schlechter (Lussi und Hotz 1995, Hintze et al., 1998) ab. Aber wie E. Reich (2000) richtig bemerkt, scheint FOTI dank einfacher Anwendung und billiger Anschaffung ein interessantes Instrument zum Kariesscreening zu sein.

CLSM - konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Bei der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM), die als Alternative zur Rasterelektronenmikroskopie (REM) und konventionellen Lichtmikroskopie (LM) angesehen werden kann, handelt es sich um eine rein labortechnische Methode. Zum Einsatz kommt sie in der biologischen Forschung, bei chemischen

2 Literaturübersicht

Untersuchungen, bei Materialprüfungen und mittlerweile eben auch in der zahnmedizinischen Forschung (s.o.). Von Lennon (2003) wird dabei das CLSM sogar bereits als der Goldstandard bei der In-vitro-Kariesdiagnostik bezeichnet. Besonders interessant ist dabei, dass im Gegensatz zum REM auch die Analyse von feuchten Proben, wie beispielsweise Dentin, möglich ist. Weitere Vorteile der CLSM sind die durch das Konfokalprinzip ermöglichte selektive Darstellung tomographischer Ebenen bis in Tiefen von 100 μm , die Möglichkeit dreidimensionale Bilder zu generieren, sowie das bessere Auflösungsvermögen gegenüber dem LM. Die Probenanalyse basiert auf der unterschiedlichen Streuung von auftreffendem Laserlicht in verschiedenem Gewebe sowie Fluoreszenzphänomenen, die weitere Informationen liefern können (Charité, 2004).

3 Ziel der Dissertation

Bei der quantitativen lichtinduzierten Fluoreszenz ist gerade im Vergleich mit den anderen lichtoptischen Verfahren noch ein großes Entwicklungspotenzial zu erkennen. Die Vorteile dieser Technologie scheinen in der Geschwindigkeit des ablesbaren Ergebnisses, der Reproduzierbarkeit sowie dem Verzicht auf ionisierende Strahlung zu liegen. Nicht zu vergessen ist in dieser Auflistung, dass eine Anwendung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* möglich scheint. Wie aus den vorangegangenen Kapiteln ersichtlich wird, ist aber der Forschungsbedarf in beiden Richtungen noch enorm. Dies gilt insbesondere im Bezug auf die Dentinkaries. So sind weder die genaue Ursache noch die exakte Ausdehnung der Fluoreszenzphänomene befriedigend geklärt.

Ziel der hier vorliegenden *In-vitro*-Untersuchung war es dementsprechend die quantitative lichtinduzierte Fluoreszenz bei der Diagnostik von Dentinkaries mit den etablierten Verfahren der Mikrohärtemessung, transversalen Mikroradiographie und Histologie zu vergleichen. Zudem soll, wenn vorhanden, ein definierter Endpunkt der Fluoreszenz gefunden werden.

4 Material und Methode

4 Material und Methode

4.1 Versuchsplanung

Um einen exakten Vergleich zwischen den verschiedenen Verfahren zur Kariesdiagnostik, wie bei dieser Arbeit angestrebt, zu erreichen, war es erforderlich, Proben herzustellen, die für QLF, Mikrohärtigkeit und Mikroradiographie geeignet sind. Als wünschenswert wurde es angesehen, eine lichtmikroskopische Untersuchung, die lange als der „Goldstandard“ in der Kariesdiagnostik galt, zu ermöglichen.

Zu diesem Zweck wurden frisch extrahierte, kariöse, menschliche Zähne der zweiten Dentition in Methacrylatkunststoff eingebettet und in der Mitte der kariösen Läsion mittels Inlochsäge in zwei Hälften geteilt. Von diesen beiden Blockpräparaten wurde jeweils an der Schnittstelle ein Schnittpräparat von ca. 150 µm Dicke hergestellt. Dieses Vorgehen ermöglichte es, Mikrohärtigkeitsmessung an dem Blockpräparat und Lichtmikroskopie, Mikroradiographie und QLF-Messung an den Schnittpräparaten für ein und dieselbe Kavität durchzuführen.

Anschließend wurden $n = 21$ Block- und Schnittpräparatenpaare von unterschiedlichen Zähnen mit Dentinkaries ausgewählt und für die jeweilige Untersuchung vorbereitet. Die Lagerung zwischen den Untersuchungen erfolgte in einem mit physiologischer Kochsalzlösung befüllten Hygrophor.

4.2 Anfertigung der Proben

Zur Anfertigung der Proben wurden kariöse, extrahierte, menschliche Zähne der zweiten Dentition verwendet, die nach ihrer Extraktion ca. eine Woche in 0,8%iger Natriumazidlösung zu Desinfektionszwecken gelagert wurden. Die Zähne wurden anschließend mit einer Kürette sorgfältig von Geweberesten und

weichen Belägen gereinigt. Aus diesem Fond wurden 27 Zähne mit einer kariösen Läsion, die eine Dentinbeteiligung erwarten ließ, ausgewählt. Diese Zähne wurden nach vorhergehendem, 30-sekündigem Anätzen mit 37,5 %iger Phosphorsäure (Gluma Etch 20 Gel, Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, D), mittels eigens angefertigten Silikonformen (Addisil® Rose, Siladent-Technik GmbH, Goslar, D) in den selbst polymerisierenden Methacrylatkunststoff Technovit 4004 (Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, D) eingebettet. Die Auspolymerisation fand in einem Drucktopf bei 2 bar statt (s. Abb. 7-Abb. 9).

Anschließend wurden alle 27 Präparate mittels Sekundenkleber (Cyanolit 201, 3M Deutschland GmbH, Neuss, D) auf die für die Inlocksäge (Leica SP 1600, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, D) notwendigen Objekthalter geklebt (s. Abb. 10-Abb. 12). Alle Schnitte wurden mit einem diamantierten Sägeblatt der Dicke 280 µm und einer Umdrehungszahl von 600 U/min durchgeführt. Zudem wurde auf eine ausreichende Wasserkühlung und minimalen Schneidedruck geachtet, um eine Überhitzung oder Verformung der Präparate zu vermeiden. Die Herstellung der Präparate erfolgte für jeden Zahn einzeln und ohne zwischen den einzelnen Schneidevorgängen das jeweilige Präparat aus der Haltevorrichtung zu entfernen. Somit waren absolut parallele Schnittflächen mit minimalem Substanzverlust gewährleistet.

Im ersten Schritt wurde der eingebettete Zahn etwas oberhalb der Mitte der kariösen Läsion geteilt. Anschließend wurden zwei Schnittpräparate von ca. 150 µm Dicke angefertigt (Genauere Schnittdicken s. 10.4.2). Die genaue Dicke wurde mit einer Mikrometerschraube (Mikrometerschraube mit Digitalanzeige, 0 - 35 mm; 0,001 mm Fa. Mitutoyo, Japan) ermittelt. Dann wurden die Proben mittels Kle-

4 Material und Methode

befilmstreifen (Tesa©, Beiersdorf, Hamburg, D) mit der dem jeweiligen Blockpräparat zugewandten Seite nach oben, reversibel auf Objektträgern (Exakt Apparatebau, Norderstedt, D) befestigt (s. Abb. 13).

So entstanden zwei Gruppen von jeweils 27 Zahnhälften, die im Folgenden nummeriert und mit block x und block # bezeichnet wurden. Die jeweils zugehörigen Schnittpräparate wurden lediglich mit x und # sowie der Nummerierung bezeichnet. Die Pulpa wurde extirpiert.

Zähne, die offensichtlich schon lange Zeit avital waren (tiefe Zerstörung bis in die Pulpakammer, Wurzelfüllung u.ä.), sowie solche, die lediglich eine oberflächliche Karies aufwiesen, wurden verworfen. Ebenso wurden keine zwei Kavitätenhälften vom gleichen Zahn in die Studie miteinbezogen.

Es ergaben sich so $n = 21$ Blockpräparate mit zugehörigem Schnittpräparat von unterschiedlichen Zähnen mit Dentinkaries. Diese wurden, ebenso wie auch die für die Studie nicht benötigten Präparate, ab diesem Zeitpunkt sowie zwischen allen Untersuchungen in einem mit physiologischer Kochsalzlösung befülltem Hygrophor gelagert (s. Abb. 14).

4.3 Mikrohärtemessung

4.3.1 Vorbereitung der Proben

Die Schnittflächen der in die Blockpräparate eingebetteten Zähne bildeten die Prüfkörperoberflächen. Diese wurden mit Hilfe einer Poliermaschine (Automatisches Schleif und Poliergerät DAP-7, STRUERS GmbH, Rodovre, Dänemark) und Diamantspray (DP-Diamantspray P, Nr 40600137 SPRON, 1µm. STRUERS GmbH, Rodovre, Dänemark) auf einem Polierdisk (Polishing discs, LECO Corporation, St. Joseph, Michigan, USA) bis zum Hochglanz poliert. Der

Polierdisk lief mit 125 U/min, eine ausreichende Kühlung war durch Befeuchtung mit destilliertem Wasser gewährleistet. Nach der Politur erfolgte die Reinigung mit destilliertem Wasser und anschließende Trocknung mit Druckluft, um die Proben von Resten des Diamantsprays zu befreien. Dann wurde das Präparat mittels Parallelstempel und lichthärtendem Methacrylatkunststoff (Kerr Point 4, Kerr Corporation, U.S.A.) auf einer Standardglasplatte befestigt, so dass eine bei der Mikrohärtmessung senkrecht zur Indentorbewegung ausgerichtete, plane, hochglanzpolierte Fläche entstand.

4.3.2 Messung

Die Messung der Dentinhärte erfolgte mit dem Gerät Fischerscope® H100C XYp (Helmut Fischer GmbH & Co. KG, Sindelfingen, D) (s. Abb. 15). Bei diesem computergesteuerten Messsystem zur Mikrohärtbestimmung wird das Präparat auf dem Messtisch positioniert und die Messstrecke auf dem am PC-Monitor eingeblendeten Videobild definiert. Es ist eine bis zu 40fache optische Vergrößerung mittels Auflichtmikroskop möglich. Die gewünschten Daten können von der verwendeten WIN-HCU®-Software in alle gängigen Datenverarbeitungsprogramme übertragen werden.

Als Eindringkörper wurde eine Diamantpyramide nach Vickers mit 136° Flächenwinkel und quadratischer Grundfläche verwendet.

Bei der Messmethode handelt es sich gemäß DIN 50359, DIN EN ISO 14577-1, DIN 55676 und VDI/VDE-Richtlinie Nr. 2616 um eine „Instrumentierte Eindringprüfung zur Bestimmung der Härte und anderer Werkstoffparameter“. Bei kontinuierlich gesteigerter Prüfkraft wird die zugehörige Eindringtiefe (h) des

4 Material und Methode

Eindringkörpers ermittelt. Unter Berücksichtigung des geometrischen Zusammenhangs zwischen Eindringtiefe und Eindringkörpergeometrie führt diese Messung zu dem physikalisch sinnvollen Universalhärtewert $HU = F/A$ mit $A = f(h)$ = Oberfläche des Eindrucks, bei dem sowohl die plastische als auch die elastische Deformation berücksichtigt werden. Dieser wurde dann von oben genannter WIN-HCU®-Software in den Vickershärtewert umgerechnet.

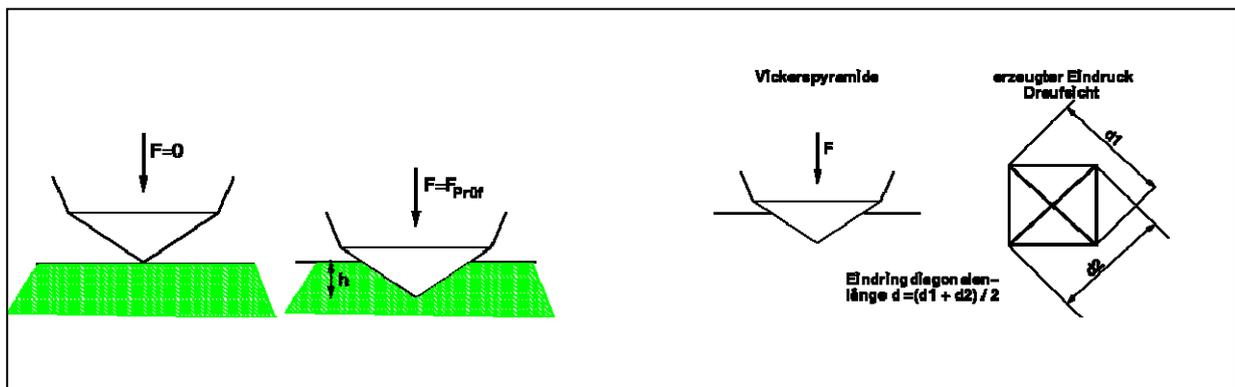


Abb. 1 li.: Prüfung der Universalhärte re.: Prüfung der Vickershärte (TU-Ilmenau, 2004)

Die Messeindrücke wurden durch Belasten des Eindringkörpers mit 500 mN für 20 Sekunden erzeugt. Der Abstand der Messpunkte wurde unabhängig von der Länge der Messstrecke auf 25 μm festgelegt.

Bei jeder Probe wurden zwei Messspuren angelegt, die in gerader Linie von der Schmelz-Dentin-Grenze in Richtung der Pulpa führten. Dabei endete aufgrund der gewählten Schnittebene des Präparates in 4 von 21 Fällen die Messung nicht direkt an der Pulpa. Die erste Messlinie verlief direkt durch die kariöse Läsion. Die zweite wurde als Vergleichsmessung in einen Bereich unter intakten Schmelz, der sowohl klinisch als auch im Auflichtmikroskop als kariesfrei beurteilt werden konnte, gelegt (s. Abb. 2).

Anschließend wurden, um die Messstrecken besser nachvollziehen zu können, im Stereomikroskop (Stemi SV 11, Carl Zeiss, Oberkochen, D) mithilfe einer digitalen Spiegelreflexkamera (Fuji Fine Pix S1 Pro, Fuji Photo Film Europe GmbH, Düsseldorf, D) Auflichtbilder der Größe 2304 x 1536 Pixel gemacht. In dem Bildverarbeitungsprogramm Adobe Photoshop® 7.0 (Adobe Systems GmbH, Unterschleißheim, D) wurden die Messspuren nachgezeichnet. Die optische Vergrößerung betrug 1,5.

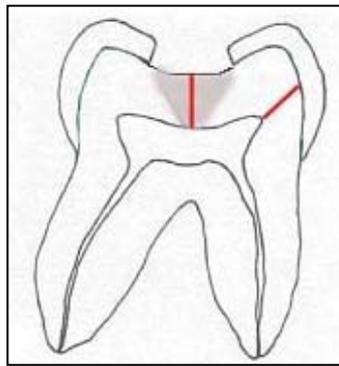


Abb. 2 Ausrichtung der Messspuren (Schema)

Die Tabelle mit den Vickershärtewerten der Messspur „kariös“ wurde für die weitere Auswertung in das Programm Statistical Package for Social Sciences (SPSS) für Windows exportiert und wird im Folgenden als „HV“ bezeichnet.

4.4 Transversale Mikroradiographie (TMR)

4.4.1 Vorbereitung der Proben

Um alle Mikroradiogramme objektiv beurteilen zu können, wurde eine sechsstufige Aluminiumeichtreppe der Stufendicke 100 µm angefertigt, die auf jedem Mikroradiogramm mit abgebildet ist (s. Abb. 3).

4 Material und Methode

Nachdem in Vorversuchen eine Röntgenopazität der Objektträger (Exakt Apparatbau, Norderstedt, D) festgestellt werden konnte, wurden die Schnittpräparate von diesen abgelöst und mit Klebefilmstreifen (Tesa©, Beiersdorf, Hamburg, D) auf den speziellen Röntgenfilmplatten (Millimask HD, Agfa, Köln, D) befestigt. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine zu untersuchende Zahnhartsubstanz überdeckt wurde. Es konnten zusätzlich zur Aluminiumeichtreppe je nach Größe drei bis vier Präparate pro Platte aufgebracht werden (s. Abb. 17). Um die spätere Zuordnung der Mikroradiogramme zu den Schnittpräparaten zu erleichtern, wurden die Platten durchnummeriert und die Position der Präparate schriftlich festgehalten. Selbstverständlich wurden diese vorbereitenden Maßnahmen in einer Dunkelkammer durchgeführt, und der anschließende Transport zum Untersuchungsgerät sowie die Bestrahlung selbst erfolgten in einem vollständig lichtundurchlässigen Behälter. Somit konnte eine vorzeitige Belichtung der Filmplatte ausgeschlossen werden.

4.4.2 Anfertigung der Mikroradiographien

Die Belichtung erfolgte mit dem Faxitron®-Röntgengerät Modell 43855A (Hewlett-Packard Company, McMinnville Division, Oregon, U.S.A.) mit 20 kV Röhrenspannung für 70 min bei 2 mA. Es wurde auf die korrekte Positionierung im Zielfenster und die Unterschreitung des Maximalabstandes von 64,8 cm der Röntgenplatte zur Röntgenquelle geachtet (s. Abb. 16).

Die Entwicklung der belichteten Platten erfolgte in einer Dunkelkammer und genau nach den Herstellerangaben der Firma Fuji. Im ersten Schritt wurden sie für 5 min in Entwicklerlösung (G 282C, Agfa, Köln, D) eingebracht. Dann wurden die Platten kurz mit Leitungswasser gespült und für 10 min in die Fixierlö-

sung (G 333C, Agfa, Köln, D) eingelegt. Anschließend wurden sie unter fließendem Leitungswasser weitere 20 min gewässert. Getrocknet wurden die Platten eine Stunde bei 30°C im Trockenschrank (Köttermann GmbH & Co KG, Hannover, D).

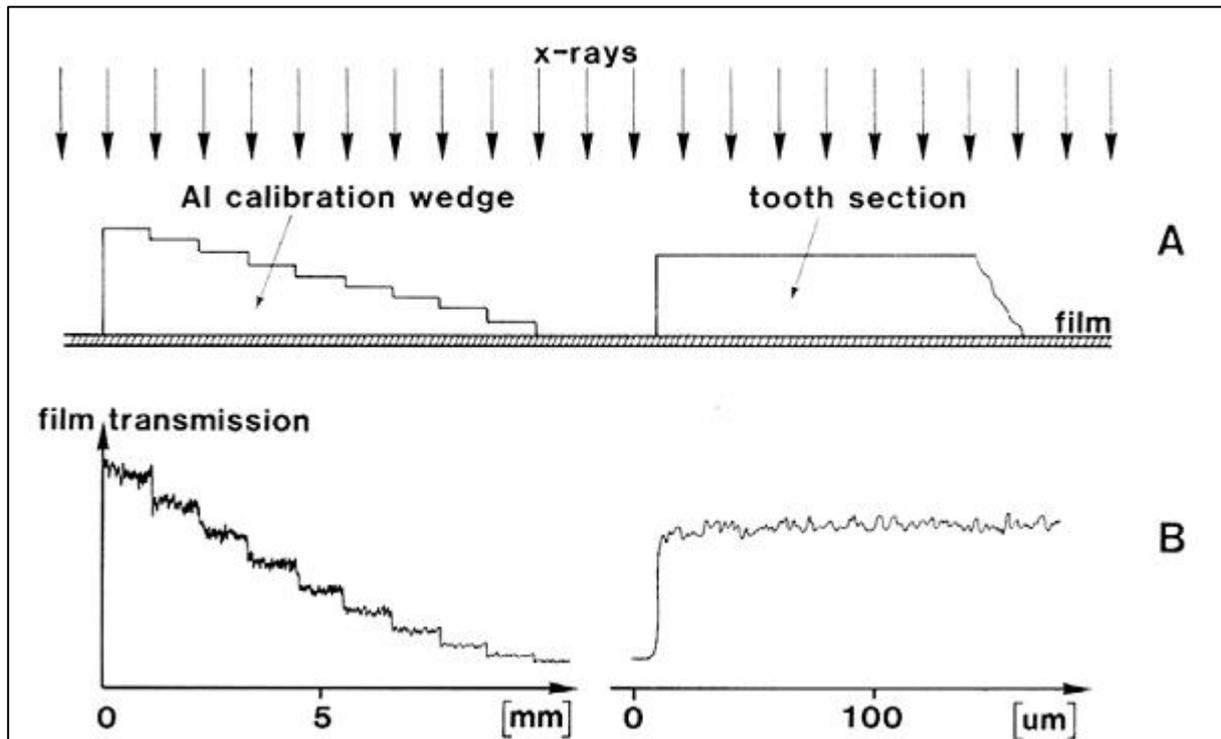


Abb. 3 Schematische Darstellung der mikroradiographischen Methode

A. Konfiguration des Projektionsprinzips

B. Optische Darstellung des eingescannten und entwickelten Films nach Röntgenbestrahlung.

(Originalgraphik von E. de Josselin de Jong (1986); x-rays = Röntgenstrahlen; Al calibration wedge = Aluminiumstufenkeil; tooth section = Zahnprobe; film = Röntgenfilmplatte; transmission = Filmdurchdringung)

4.4.3 Auswertung der Mikroradiographien

Röntgenopake chemische Elemente schwächen die Röntgenstrahlung bei Durchdringung stärker als weniger stark röntgenopake Elemente. Dementspre-

4 Material und Methode

chend stellen sich auf dem Film (Negativ) die demineralisierten Bereiche der Zahnproben dunkler dar.

Die Untersuchung und Digitalisierung der Mikroradiographien erfolgte mit dem Durchlichtmikroskop Zeiss Axiphot (Carl Zeiss, Oberkochen, D) und angeschlossener Digitalkamera (Sony 3CCD Color Video Camera, Sony Deutschland GmbH, Köln, D) am Computerbildschirm. Dafür wurden die Mikroradiogramme mit der Emulsionsseite nach oben auf dem Objektisch fixiert. Die Untersuchung wurde bei Vergrößerungen von 2,5x bis 63x durchgeführt. Die Digitalisierung erfolgte bei einer optischen Vergrößerung von 5,8 und einer am vorhandenen Regler auf drei eingestellten Durchlichtstärke. Die Größe der entstandenen digitalen Bilder betrug 764 x 572 Pixel.

Mit Hilfe der Bildanalysesoftware ImageJ 1.30v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, U.S.A.) wurden dann die Grauwerte entlang einer Linie, die der Härtemessung „kariös“ entspricht, gemessen und ein Diagramm mit entsprechender Tabelle erstellt. Die Anzahl der „Messpunkte“ entsprach der Anzahl der Pixel auf der gemessenen Linie. Anfangs- und Endpunkt wurden per Hand markiert. Es wurde eine Grauwertskala von 0 = Schwarz bis 255 = Weiß gewählt. Die Bilder wurden im 8-bit-Modus bearbeitet.

Die Tabelle wurde für die weitere Auswertung in das Programm Statistical Package for Social Sciences (SPSS) für Windows exportiert und im Folgenden als „Plot mj“ bzw. „MR“ bezeichnet.

4.5 Quantitative lichtinduzierte Fluoreszenz (QLF) und histologische Untersuchung

4.5.1 Vorbereitung der Proben

Alle hergestellten Block- und Schnittpräparate wurden untersucht. Hierfür wurden die Schnittpräparate wie oben beschrieben auf den Objektträgern belassen, die Schnittfläche der Blockpräparate wurde poliert (siehe 4.3.1).

Um alle QLF-Aufnahmen objektiv beurteilen zu können, wurde ein Komposit-eichkörper (Tetric® 210 A3, Ivoclar Vivadent AG, Ellwangen, D) der Dicke 2 mm angefertigt. Dieser hat eine bestimmte Eigenfluoreszenz und wurde auf jeder im Fluoreszenzmikroskop untersuchten Probe mittels Klebefilmstreifen (Tesa©, Beiersdorf, Hamburg, D) so fixiert, dass er auf allen angefertigten Aufnahmen mitabgebildet war, ohne die zu untersuchende Zahnhartsubstanz zu überdecken.

Des Weiteren wurden sowohl die Objektträger (Exakt Apparatebau, Norderstedt, D), das Einbettmedium (Technovit 4004, Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, D) als auch die Klebefilmstreifen (Tesa©, Beiersdorf, Hamburg, D) auf Eigenfluoreszenz unter Untersuchungsbedingungen getestet. Es konnte auch bei maximaler Belichtungsdauer keine Eigenfluoreszenz der untersuchten Materialien nachgewiesen werden.

4.5.2 Messung

Alle Proben wurden mittels Auflichtfluoreszenzmikroskop untersucht (s. Abb. 4). Zur Anwendung kam dabei das Stereomikroskop Stemi SV 11 (s. Abb. 18) (Carl Zeiss, Oberkochen, D) in Verbindung mit einer digitalen Spiegelreflexkamera (Fuji Fine Pix S1 Pro, Fuji Photo Film Europe GmbH, Düsseldorf, D) und

4 Material und Methode

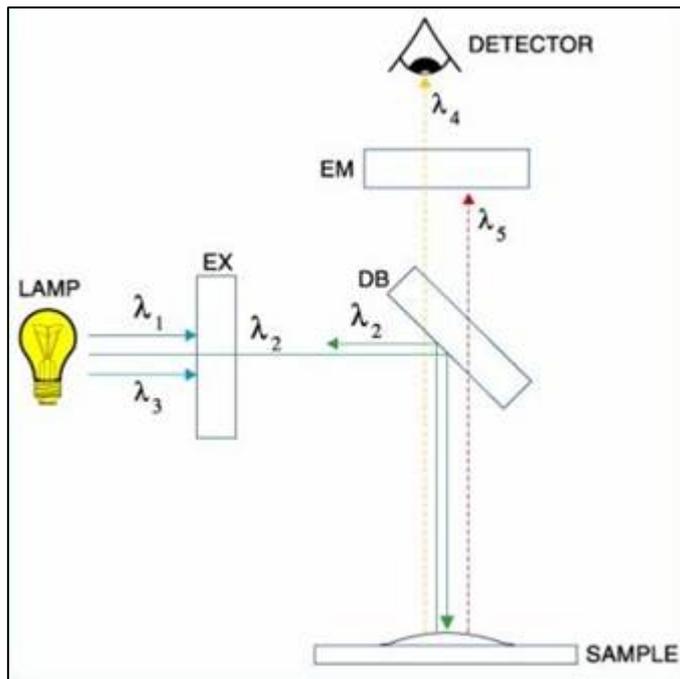
der dazugehörenden Software (Camera Shooting Software, Fuji). Als Lichtquelle wurde eine Quecksilberdampfampe (Leuchte HBO 103W, Carl Zeiss, Oberkochen, D) verwendet. Zum Einsatz kamen zwei verschiedene Long-Pass-Filter-Sets: FITC - Zeiss Filter-Set 09 (Ausführung BP 450-490, Beamsplitter FT 510, Emission LP 515, Carl Zeiss, Oberkochen, D) und Texas-Red – Zeiss Filter-Set 00 (Ausführung BP 530-585, Beamsplitter FT 600, Emission LP 615, Carl Zeiss, Oberkochen, D). Ersterer ermöglichte eine Anregung zwischen 450 nm – 490 nm, die Emission lag oberhalb von 515 nm. Bei dem zweiten Filter lag die Anregung zwischen 530 nm – 585 nm, die Emission oberhalb von 615 nm (s. Abb. 5 und Abb. 6).

Während der Messung wurden alle Auf- und Durchlichtquellen abgeschaltet. Um auch die Streulichtquellen, wie z.B. Tageslicht auszuschalten, wurde unter die Probe sowie lichtdicht um das Objektiv, schwarzes Tonpapier gelegt. Die seitliche Abdichtung wurde mittels einer Metallröhre (Höhe 13 cm, Durchmesser 10 cm) erreicht. Durch zwei passende Löcher konnten Glasfaserlichtleiter in diese eingeführt werden. Zum einen waren die beiden Lichtquellen zur richtigen Positionierung der Proben nötig, zum anderen wurden sie zur Erstellung der Auflichtbilder verwendet. Bei der Quecksilberdampfampe wurde darauf geachtet, dass eine Vorwärmzeit von ca. 10 min eingehalten wurde, bis ein konstantes Spektrum erreicht war. Alle Bilder wurden mit einer optischen Vergrößerung von 1,5x aufgenommen. Die Größe der entstandenen digitalen Bilder betrug 2304 x 1536 Pixel.

Bei den Schnittpräparaten wurden alle QLF-Aufnahmen mit einer Belichtungszeit von 30 s angefertigt. Bei den Blockpräparaten variierte die Belichtungszeit

zwischen 6 s und 15 s, wobei durchschnittlich bei Verwendung des Texas-Red-Filters eine kürzere Belichtungszeit nötig war.

Es wurde darauf geachtet, dass alle Bilder eines Präparates ohne Positionsänderung desselben gemacht wurden.



Auf der Beleuchtungsseite werden Erregerfilter, auch Band-Pass-Filter genannt, eingesetzt, die nur Anregungsstrahlung passieren lassen. Im Beobachtungsstrahlengang befinden sich die jeweiligen Sperr- oder Long-Pass-Filter, die nur das vom Präparat emittierte langwelligere Fluoreszenzlicht durchlassen. Das Erregerlicht wird über dichromatische Teilerspiegel (Beamsplitter), die kurzwelliges Licht reflektieren und den anschließend langwelligeren Spektralbereich ungehindert durchlassen, auf das Objekt gelenkt. Die Fluoreszenzstrahlung gelangt also durch diesen Strahlenteiler und den Sperrfilter zum Auge.

Abb. 4 Aufbau Auflichtfluoreszenzmikroskop

4 Material und Methode

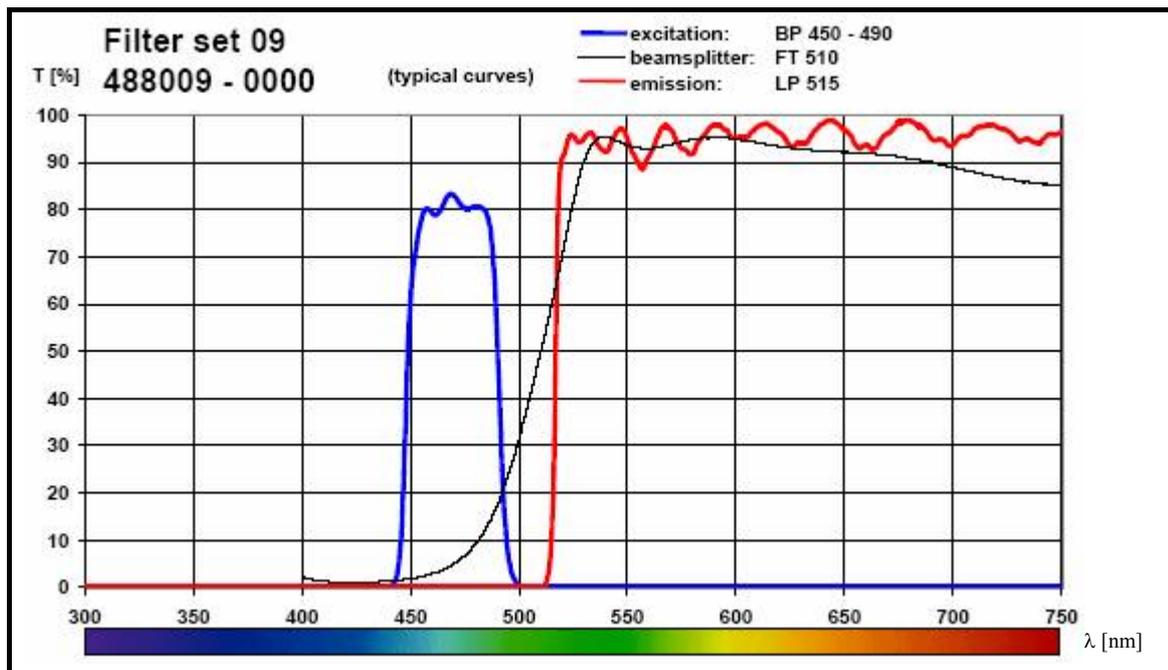


Abb. 5 Filterspektrum FITC-Filter (Originalgrafik Carl Zeiss, Oberkochen, D)

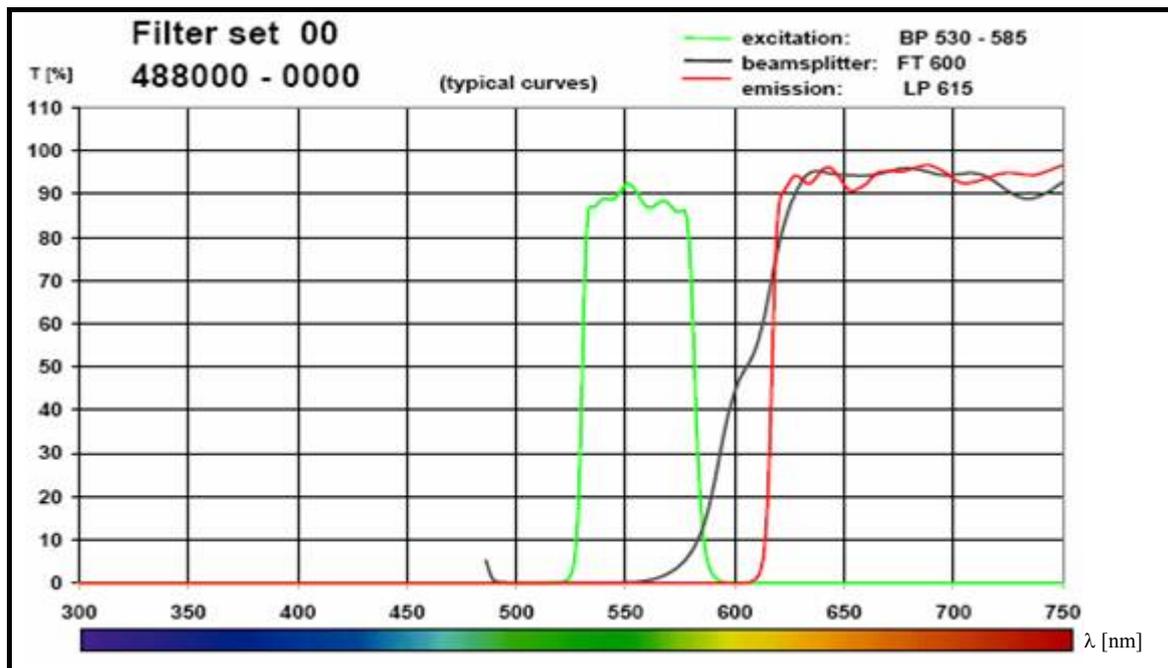


Abb. 6 Filterspektrum Texas-Red-Filter (Originalgrafik Carl Zeiss, Oberkochen, D)

4.5.3 Auswertung der QLF-Bilder

Demineralisierte Bereiche mit erhöhtem Porenvolumen zeigen eine geringere Fluoreszenzlichtintensität, Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen und andere chromophore Einlagerungen erhöhen die Fluoreszenz (s. 2.3.4).

Ausgewertet wurde die reflektierte Lichtintensität der Epifluoreszenz des Zahnes. Für die quantitative Bestimmung wurden die Grauwerte der Schnittpräparatbilder entlang einer Linie, die der Härtemessung „kariös“ entspricht, gemessen. Erfasst wurden die Daten mit der Bildanalysesoftware ImageJ 1.30v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, U.S.A.). Dieses Programm ermöglicht das Ausmessen und die Bestimmung der Grauwerte von Strecken und Flächen, z.B. in histologischen Präparaten. Die Anzahl der „Messpunkte“ entsprach der Anzahl der Pixel auf der gemessenen Linie. Anfangs- und Endpunkt wurden per Hand markiert. Die Bilder wurden im 8-bit-Modus bearbeitet (256 Graustufen, 0 = Schwarz, 255 = Weiß).

Anschließend wurde die Tabelle für die weitere Auswertung in das Programm Statistical Package for Social Sciences (SPSS) für Windows exportiert und im Folgenden als „Plot f“ für die Aufnahmen mit dem FITC-Filter, und mit „Plot r“ für die Aufnahmen mit dem Texas Red Filter, bezeichnet.

Die Bilder der Blockpräparate wurden rein visuell ausgewertet.

4.5.4 Histologische Untersuchung

Die Präparate wurden histologisch mit dem Stereomikroskop Stemi SV 11 (Carl Zeiss, Oberkochen, D) bei einer Vergrößerung von 1,5 x bis 16,5 x untersucht. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei auf die histologischen Charakteristika der Karieszonen gelegt. Die Dokumentation erfolgte wieder mit der digitalen

4 Material und Methode

Spiegelreflexkamera Fuji Fine Pix S1 Pro (Fuji Photo Film Europe GmbH, Düsseldorf, D) sowie der zugehörigen Software (Camera Shooting Software, Fuji), mit der die Bilder auf dem PC abgespeichert wurden. Die Schnittpräparate wurden sowohl im Durchlicht als auch im Auflicht aufgenommen, die Blockpräparate nur im Auflicht. Alle Aufnahmen wurden bei einer 1,5-fachen optischen Vergrößerung gemacht und die Größe der entstandenen digitalen Bilder betrug 2304 x 1536 Pixel.

Mittels der Bildanalysesoftware ImageJ 1.30v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, U.S.A.) wurde nun die Zone der Transluzenz, falls vorhanden, histomorphologisch erfasst und ihre genaue Lage sowie Ausdehnung in den Tabellen aller oben beschriebenen Messungen eingezeichnet.

4.6 Bilddokumentation



Abb. 7 Zahn kariös

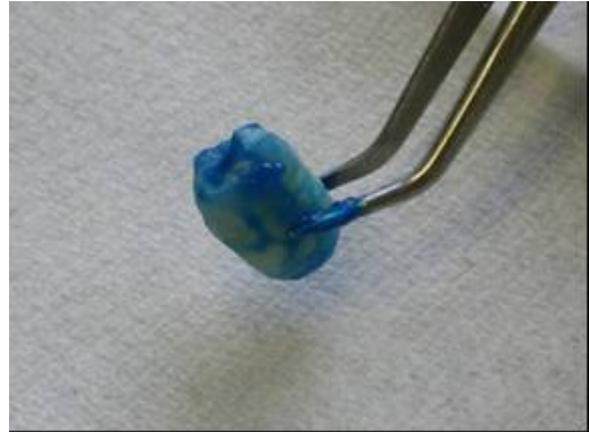


Abb. 8 Zahn geätzt



Abb. 9 Zahn eingebettet



Abb. 10 Vorbereitung für Inlochsäge



Abb. 11 Inlochsäge (1)



Abb. 12 Inlochsäge (2)

4 Material und Methode

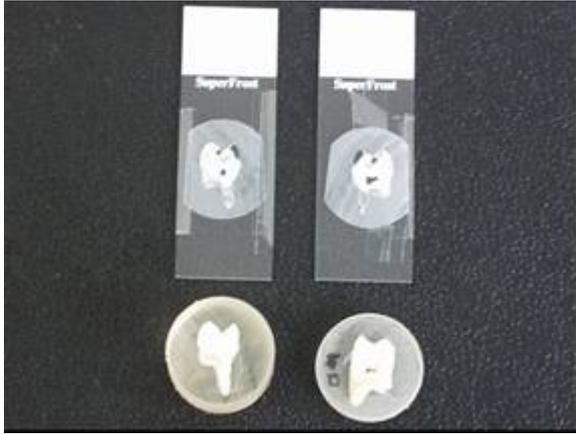


Abb. 13 Block- und Schnittpräparate

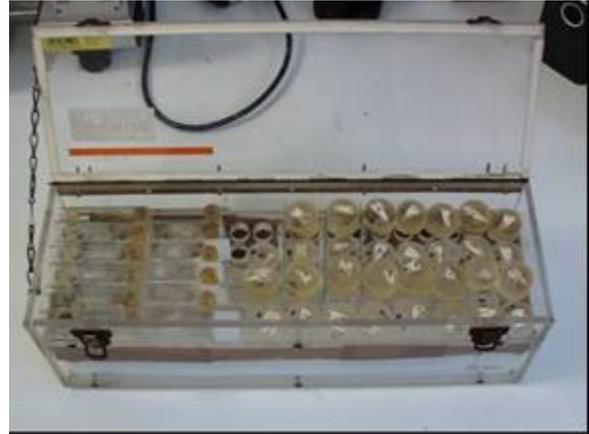


Abb. 14 Hygrophor



Abb. 15 Fischerscope® H100C XYp



Abb. 16 Faxitron®-Röntgengerät



Abb. 17 Röntgenplatte mit Präparaten u. Eichterpe

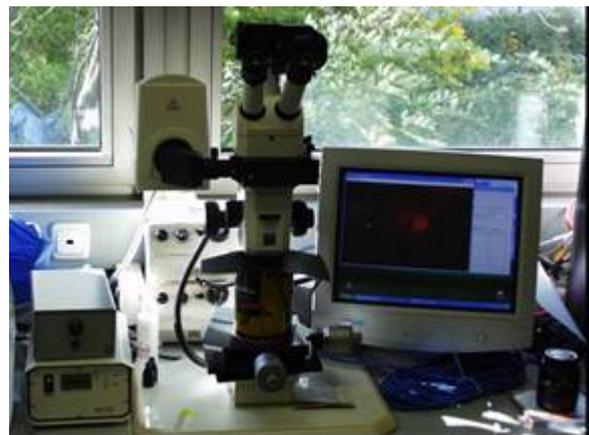


Abb. 18 Stereomikroskop Stemi SV 11

4.7 Statistische Auswertung

Zur Untersuchung stochastischer Zusammenhänge zwischen gleichwertigen Variablen wurden die Messwerte einer Korrelationsanalyse unterzogen. Verwendet wurde dafür die SPSS Software Version 10.1 für Windows.

Begonnen wurde die Auswertung mit dem Vergleich der Ergebnisse aus Mikrohärtemessung (HV) und Mikroradiographie (MR). Da die einzelnen Messpunkte der beiden Untersuchungen zwar auf derselben Messspur liegen, aber aus verfahrenstechnischen Gründen nicht exakt an denselben Positionen gemessen wurden, wurde der jeweilige Wert aus der mikroradiographischen Messung auf die Position des nächst höheren Härtewertes geschoben. Diese Datenverschiebung entspricht einer realen Verschiebung der Messwerte von maximal 8 μm und wird in Kauf genommen um die Korrelation der zwei Plots von HV und MR zu ermöglichen. Ermittelt wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Zu beachten ist hier, dass nicht lediglich die Kariesendpunkte, sondern jeder einzelne Messpunkt der zwei Verfahren, verglichen wurde.

Des Weiteren wurden für die Kariesdiagnostik relevante Messpunkte und -werte wie Opazitätsmaxima der Mikroradiographie, Härtemaxima, Fluoreszenzminima, Beginn und Ende der transluzenten Zone oder anderer Dentinveränderungen erfasst und miteinander verglichen. Gemeinsamer Referenzpunkt war immer entsprechend dem Beginn der Messspur die Schmelz-Dentin-Grenze. Untersucht wurde dabei sowohl die Korrelation der Extrempunkte untereinander als auch der tatsächliche Abstand zwischen den genannten Werten in μm . Ermittelt wurde wieder der Korrelationskoeffizient nach Pearson mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$.

5 Ergebnisse

5 Ergebnisse

5.1 Histologie

Im Durchlichtmikroskop waren neben den Schmelz- und Dentinläsionen an sich auch Strukturveränderungen im Dentin wie Sklerosen, „dead tracts“ und Tertiärdentin von gesunder Zahnhartsubstanz zu unterscheiden. Die in Kapitel 2.2.4 vor allem für chronische Dentinläsionen beschriebene histologische Zoneneinteilung konnte im Wesentlichen bestätigt werden. Von der Pulpa in Richtung der Peripherie fanden sich je nach Probe mehr oder weniger stark ausgeprägt: Tertiärdentin, normales seidig opakes Dentin, im Durchlicht hell erscheinendes sklerotisches Dentin (Zone der Transluzenz), und „dead tracts“. Eine sich an das sklerotische Dentin anschließende, relativ unverändert erscheinende Zone der Demineralisation, war nur sehr schwer auszumachen. Meist war auch die für fortgeschrittene Läsionen typische Zone der Penetration, mit ampullen- und spaltenförmigen Auftreibungen, sowie die Zone der Nekrose sichtbar. In $n = 12$ Fällen konnte vor allem aufgrund der klar abzugrenzenden Zone der Transluzenz eine chronische Karies diagnostiziert werden (s. Abb. 22). $N = 5$ Proben zeigten das Bild einer akuten, schnell fortschreitenden Karies, die keine klar abgrenzbaren Zonen aufwies. Eine eindeutige Definition der Zone der Transluzenz war nicht möglich. Es wurde lediglich der Punkt definiert, ab dem histologisch unverändertes Dentin zu finden war (s. Abb. 28). Bei $n = 4$ Proben konnte entweder der Beginn der kariösen Veränderung nicht verlässlich definiert werden oder aber eine solche war histologisch gar nicht nachweisbar.

5.2 Mikrohärtemessung

Bei allen 21 Proben wurde neben der Messspur durch die kariöse Läsion immer eine zweite Vergleichsspur in gesundem, histologisch unverändertem Dentin angelegt. Die Messungen erfolgten, soweit es die Schnittebene des Präparates zuließ, in gerader Linie von der Schmelz-Dentin-Grenze (S-D-G), bis zur Pulpa (n = 17). In n = 4 Fällen endete die Messung nicht direkt an der Pulpa.

Die erstellten Härteprofile nach Vickers (s.Abb. 19) zeigten sowohl für kariöses als auch für gesundes Dentin einen charakteristischen Verlauf: Im ersten Fall war ein Minimum der Kurve im Läsionszentrum zu finden. Darauf folgte ein Anstieg bis zu einem Maximalwert bzw. Plateau, von dem die Kurve wieder bis zur Pulpa hin auf ein weiteres Minimum abfiel. Je oberflächlicher die Karies war, desto ausgeprägter war das Plateau. Die maximal erreichte Vickershärte (HV_{max-kariös}) von Proben mit chronischer Karies lag durchschnittlich etwas über denen mit akuter Karies. Im Mittel wurde ein Wert von 78,2 HV erreicht. Bei den Vergleichsmessungen in gesundem Dentin lag dieser Wert (HV_{max-vergl.}) um 8,5 % höher bei 84,9 HV. Die Härtekurven der Vergleichsmessung stiegen im allgemeinen von der S-D-Grenze bis auf ein Plateau maximaler Härte und fielen dann bis zu einem Punkt nahe der Pulpa auf ihr Minimum. Der Punkt der größten Härte in gesundem Dentin lag im Mittel 591 µm unterhalb der S-D-Grenze. Das Härteminimum (HV_{min-vergl.}) betrug im Durchschnitt 31,3 HV und lag 138 µm vor der Pulpa (s. Tabelle 3). Dieses trat auch bei Messungen in kariösem Dentin als lokales Minimum auf.

5 Ergebnisse

Bei den beschriebenen Minima und Maxima muss es sich nicht um solche im Sinne einer mathematischen Kurvendiskussion handeln, da die so bezeichneten Punkte durchaus auch den Start- oder Endpunkt einer Kurve bezeichnen können. Dies gilt auch für die folgenden Auswertungen.

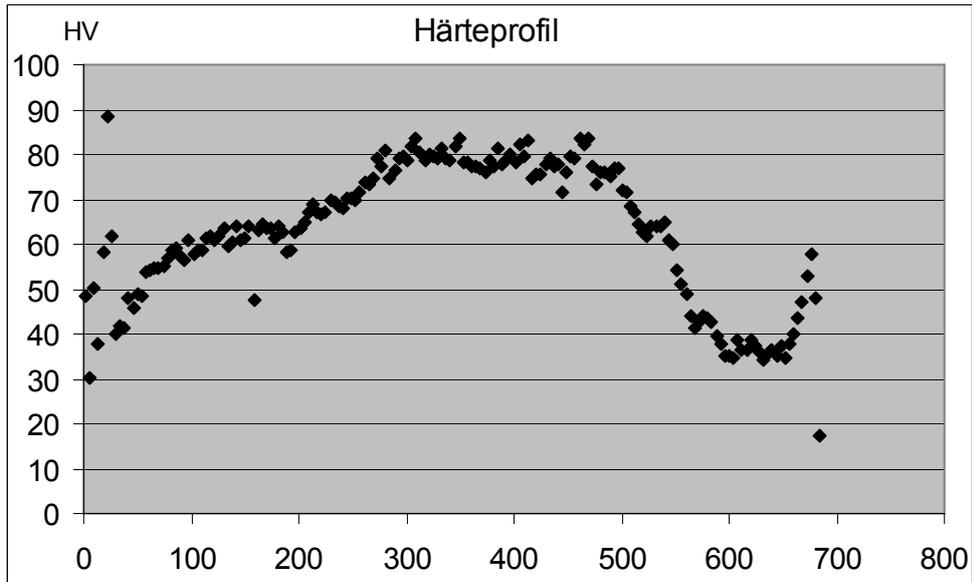


Abb. 19 Beispiel Härteprofil nach Vickers (kariös) (x-Achse in μm)

Tabelle 3 Maxima und Minima der Vickershärte

Maxima und Minima der Vickershärte						
Präparat	HVmax-vergl.	Abstand zur S-D-Grenze* in µm:	HVmin-vergl.	Abstand zur Pulpa in µm		HVmax-kariös
<i>Zone der Transluzenz (ZT) zu erkennen (chronische Karies)</i>						
1#	71,0	425	34,0	600		64,0
4#	89,9	1125	39,1	25		88,7
9x	83,3	975	37,0	350		73,7
11x	81,2	1150	20,8	50		68,1
12#	79,6	325	15,4	50		77,4
13x	86,6	500	10,4	50		77,8
16x	88,8	475	Pulpa nicht erreicht			83,8
19x	100,5	250	12,7	0		77,2
21x	93,9	350	23,0	0		89,0
23#	92,3	225	52,9	0		84,2
24x	Wurzelkaries		Pulpa nicht erreicht			92,6
25#	86,8	700	48,4	50		75,7
Durchschnitt						79,4
<i>Histologische Veränderung ohne ZT (akute Karies)</i>						
3#	79,2	700	7,1	50		66,3
5x	82,7	275	32,4	500		83,7
10x	76,7	1025	28,4	250		69,2
18x	73,7	725	Pulpa nicht erreicht			74,0
22#	92,1	575	Pulpa nicht erreicht			87,5
Durchschnitt						76,1
<i>Histologisch nicht eindeutig beurteilbare Proben</i>						
8x	82,1	575	50,8	200		67,0
14x	78,0	650	37,6	25		70,7
20x	80,4	300	37,1	100		81,5
27#	99,0	500	44,2	50		89,4
Durchschnitt						77,2
Ges. Durchschnitt	84,9	591,3	31,3	138,2		78,2

*Schmelz-Dentin-Grenze

5 Ergebnisse

5.3 Transversale Mikroradiographie

Im Gegensatz zur Härtemessung wurde bei der Mikroradiographie (MR) (s. Abb. 23, Abb. 29) auf eine zweite Messung im unveränderten Dentin verzichtet. Die Messspur durch den kariösen Bereich verlief analog zu der bei der Härtebestimmung.

Die erstellten Mikroradiogramme (s. Abb. 20) zeigten ebenfalls einen charakteristischen Verlauf, der dem der Härteprofile ähnelte. Die Röntgenopazität stieg von einem Minimum im Zentrum der Läsion bis zu einem Maximalwert bzw. einem Plateau an und fiel zur Pulpa hin wieder ab. Je oberflächlicher die Karies war desto ausgeprägter war wiederum das Plateau.

Die maximal erreichte Opazität betrug im Durchschnitt 145,5, wobei dies lediglich die errechnete Graustufe angibt (s. Tabelle 15). Eine Kalibrierung zur Bestimmung des Mineralgehaltes wurde nicht vorgenommen.

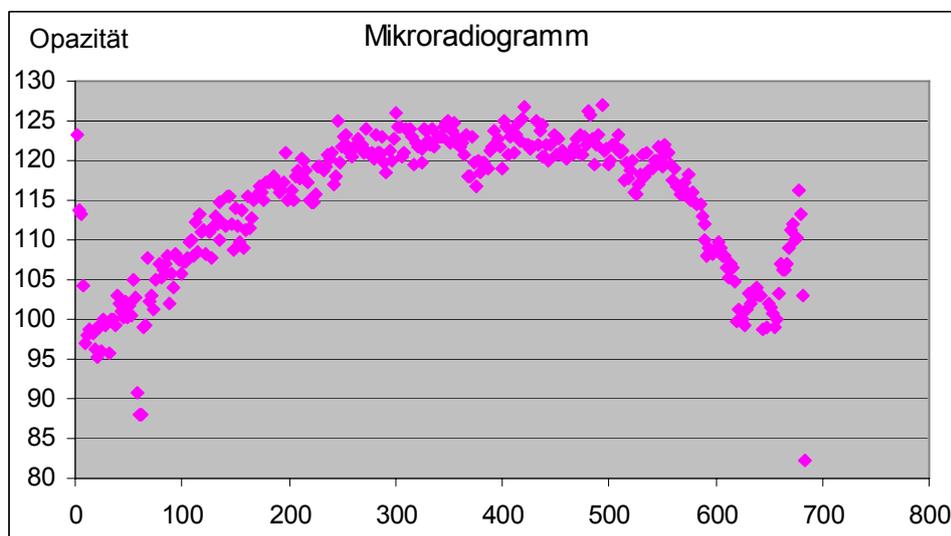


Abb. 20 Beispiel Mikroradiogramm (x-Achse in μm)

5.4 Quantitative lichtinduzierte Fluoreszenz

Bei der Fluoreszenzmessung der Schnittpräparate mit den beiden Filtersystemen FITC (s. Abb. 24, Abb. 30) und Texas Red (TR) (s. Abb. 25, Abb. 31) wurde im Zuge der Auswertung, ebenso wie bei der Mikroradiographie, auf eine zweite Messstrecke im unveränderten Dentin verzichtet. Die Messspur durch den kariösen Bereich verlief wieder analog zu der bei der Härtebestimmung. Die Auswertung der Fluoreszenzmessungen der Blockpräparate (s. Abb. 26, Abb. 27) beschränkte sich auf eine visuelle Untersuchung, die ergab, dass durch Überlagerungen klare Abgrenzungen der Läsion nur schwer zu definieren waren.

Die erstellten „Fluorogramme“ (s. Abb. 21) zeigten ebenfalls einen charakteristischen Verlauf, der sich allerdings in weiten Bereichen entgegengesetzt zu dem des entsprechenden Härteprofils und Mikroradiogramms verhielt. Die Kurve stieg zu einem Maximum, das etwas außerhalb des Läsionszentrums lag, an (Streckenabschnitt A). Von diesem Maximum fiel die Kurve bis zu einem Minimalwert ab (Abschnitt B). Das darauf folgende Plateau (Abschnitt C) zeigte in den meisten Fällen kurz vor dem Erreichen der Pulpa noch eine deutliche Änderung der Steigung (Abschnitt D). Mit stärkerer Ausprägung der Zone der Nekrose verstärkte sich die Peripherverschiebung des Fluoreszenzmaximums. Je oberflächlicher die Karies war, desto länger war das beschriebene Plateau. Die „Fluorogramme“ der beiden Filtersysteme waren sich grundsätzlich sehr ähnlich, es fielen im Vergleich lediglich die bei den FITC-Aufnahmen meist etwas stärker ausgeprägten Maxima und Minima auf.

Das durchschnittliche Fluoreszenzminimum betrug für das FITC-System 44,3 und für das TR-System 24,1 (s. Tabelle 14). Dies gibt wiederum lediglich die errechnete Graustufe an.

5 Ergebnisse

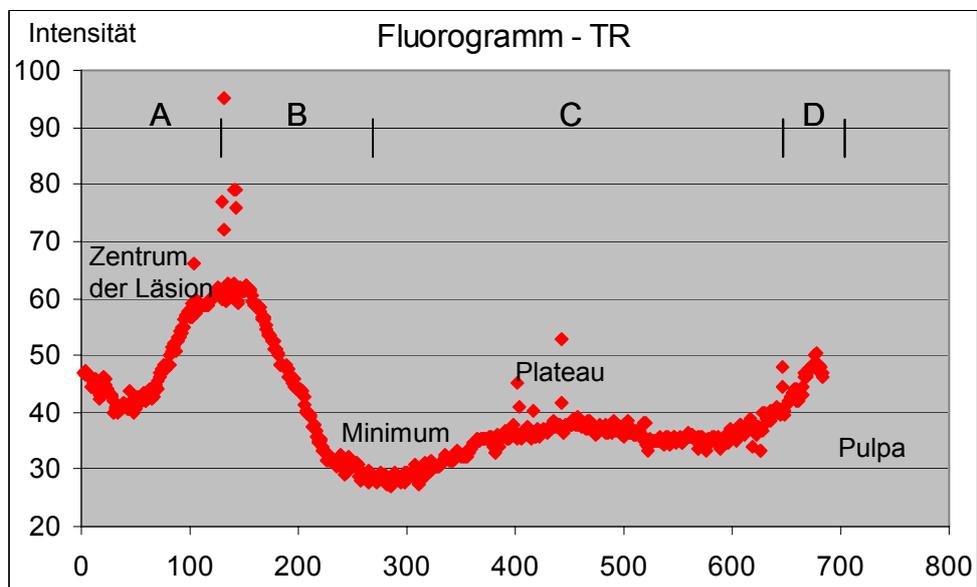
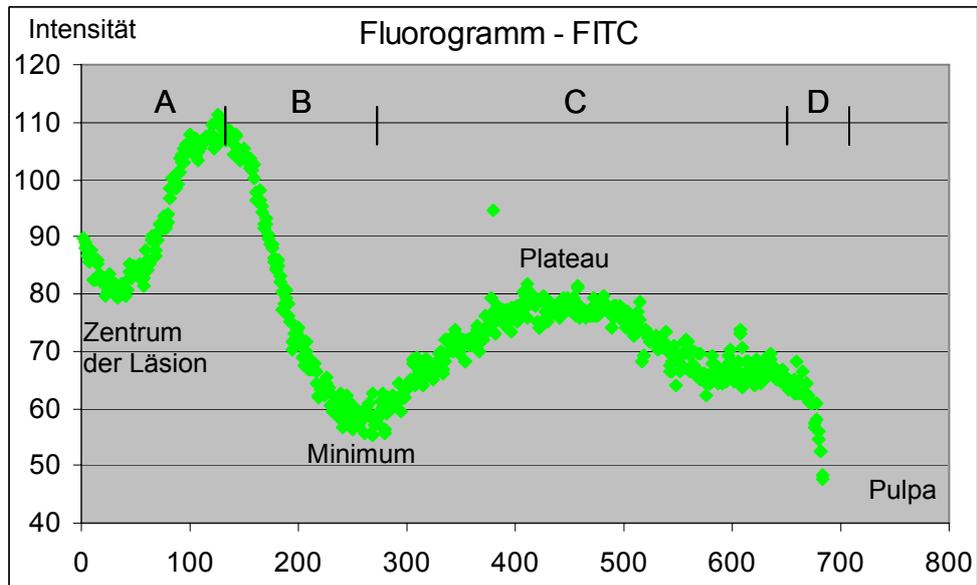
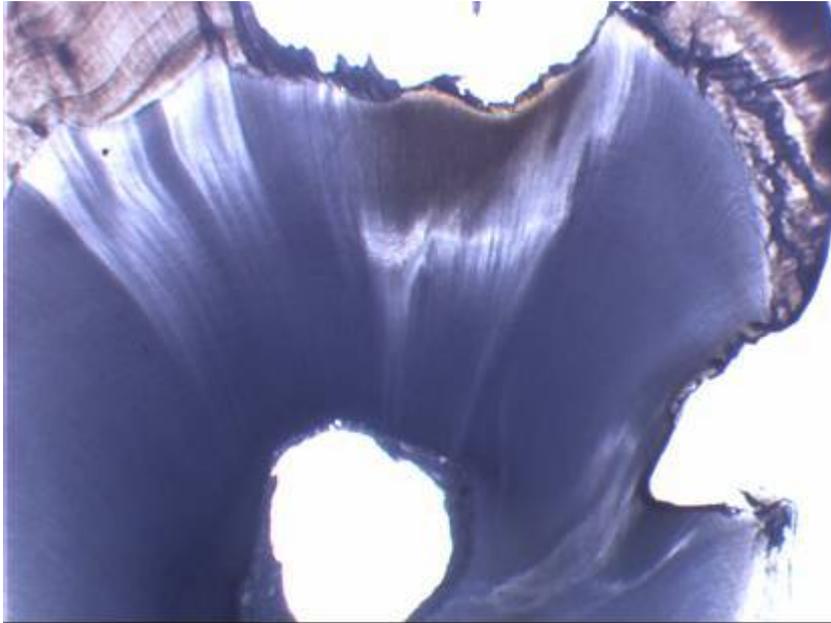


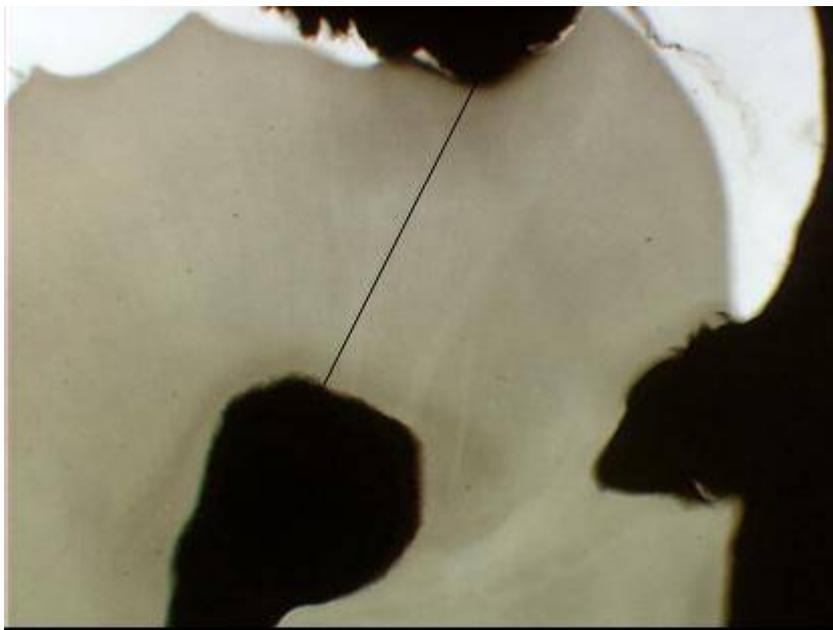
Abb. 21 Beispiel „Fluorogramme“ FITC und TR (x-Achse in μm)

Schnittpräparat mit chronischer Karies (4#)



In der Durchlichtaufnahme ist mit bloßem Auge der sich dunkel darstellende Läsionskörper mit angeschlossener Zone der Transluzenz gut zu erkennen. Das hell durchscheinende Areal im linken Bereich der Zahnkrone sowie die zweite Läsion rechts deuten auf weitere Sklerosen im Dentin hin. Der Zahnschmelz oberhalb der Läsion ist größtenteils verloren gegangen.

Abb. 22 Durchlichtaufnahme



In der mikroradiographischen Aufnahme sind die demineralisierten, röntgen-transluzenten Bereiche nur schwer zu erkennen. Die Auswertung über eine Graustufenanalyse entlang der eingezeichneten Messlinie ergibt dagegen ein deutliches Ergebnis.

Abb. 23 Mikroradiographie mit eingezeichneter Messlinie

5 Ergebnisse

Schnittpräparat mit chronischer Karies (4#)

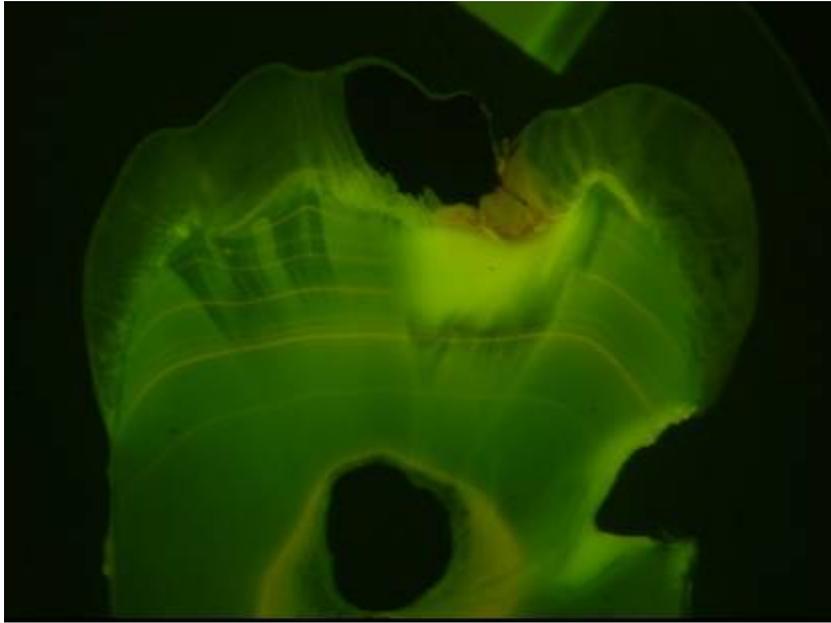


Abb. 24 FITC-Aufnahme

Im Gegensatz zur mikroradiographischen Aufnahme ist in beiden Fluoreszenzaufnahmen der stark fluoreszierende Läsionskörper gut zu erkennen. Als Ursache ist die Diffusion von Fluorochromen anzunehmen. Deutlich dagegen abgegrenzt zeigt sich die hier dunkel erscheinende Zone der Transluzenz. Vermutlich durch die mit der Sklerose veränderten optischen Eigenschaften, und der damit einhergehenden verringerten Lichtemission zur Kamera hin, ist die auch gegenüber gesundem Dentin erniedrigte Grundfluoreszenz dieses Bereiches zu erklären. Sklerose ist auch bei dem dunklen Areal oben links als Ursache zu vermuten. Der Auslöser dieser ist jedoch auf dem Bild nicht zu erkennen.

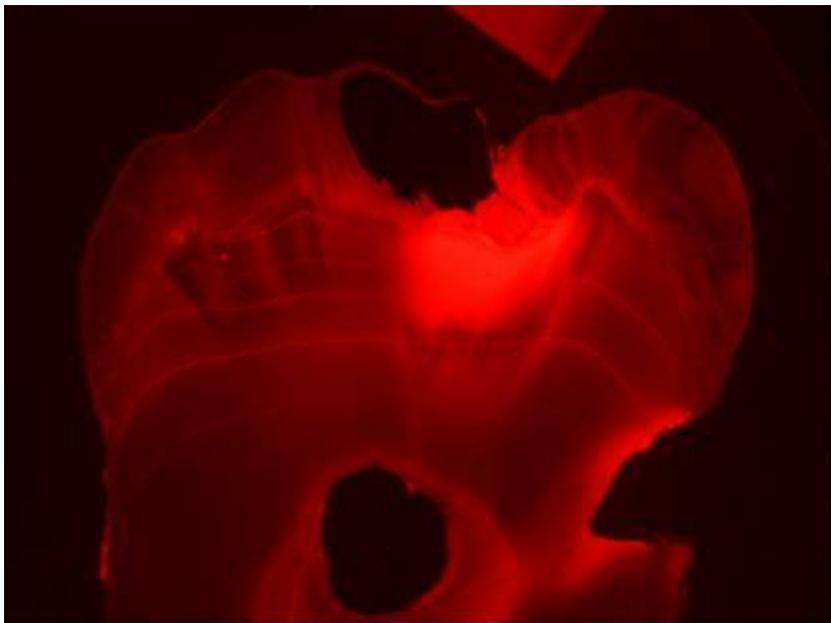
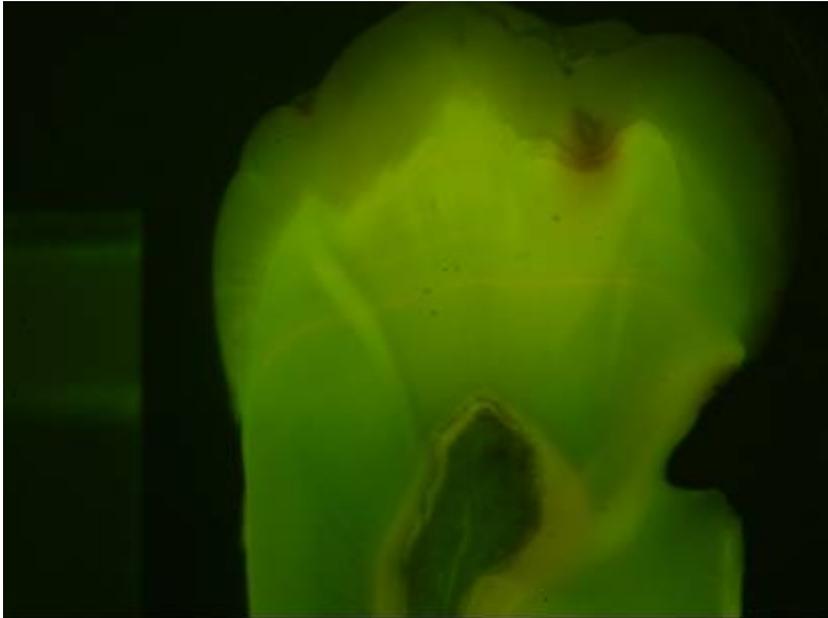


Abb. 25 TR-Aufnahme

Die Ursache der erhöhten Fluoreszenz im Bereich um die Pulpa ist unklar, lässt aber auf Rückstände von Pulpengewebe schließen. Bei der TR-Aufnahme ist im Zuge der stärkeren Fluoreszenz eine reduzierte Ortsauflösung zu beobachten. Als Nebenbefund sind durch Umwelteinflüsse fluoreszierende Wachstumslinien zu erkennen.

Blockpräparat mit chronischer Karies (4#)



Die Fluoreszenzaufnahmen der Blockpräparate zeigen, dass bedingt durch Überlagerungen, eine klare Abgrenzung der Läsion oder anderer Strukturen nur schwer möglich ist. Um eine Überbelichtung zu vermeiden, wurde bei den Blockpräparaten die Belichtungszeit deutlich reduziert. Wie sich dies bei den Schnittpräparaten bereits angedeutet hat, ist bei Verwendung des TR-Filters eine kürzere Belichtungszeit als bei Aufnahmen mit FITC-Filter nötig.

Abb. 26 FITC-Aufnahme (Blockpräparat)

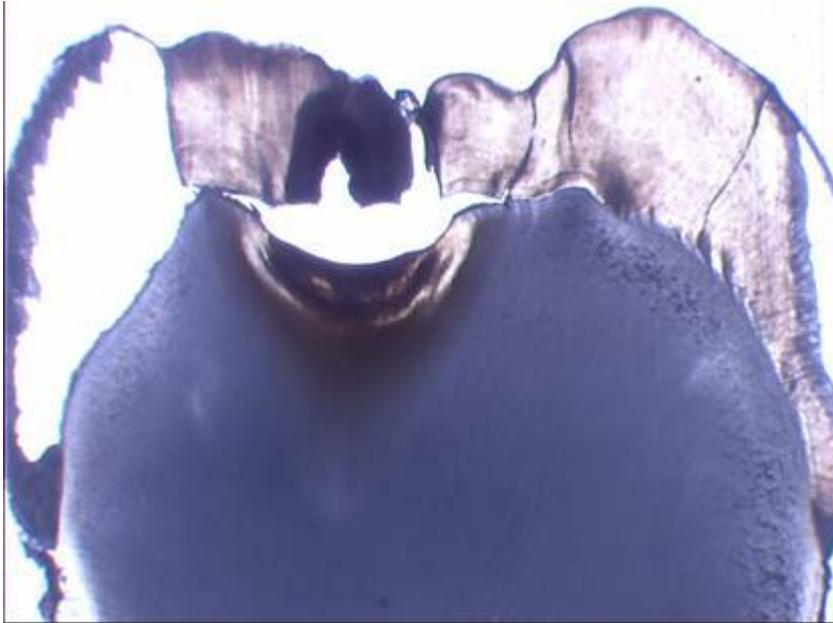


Deutlicher als bei den Schnittpräparaten ist die verminderte Fluoreszenz des Läsionskörpers im Bereich der Schmelz-Dentin-Grenze zu erkennen. Ob dies auf eine völlige Strukturauflösung im Sinne einer Zone der Nekrose, oder im anderen Extrem auf Remineralisationsvorgänge, zurückzuführen ist, ist nicht geklärt. Auch bei den Blockpräparaten ist eine erhöhte Fluoreszenz im Bereich der Pulpa zu erkennen, die vermutlich auf Reste von Pulpengewebe zurückzuführen ist.

Abb. 27 FITC-Aufnahme (Blockpräparat)

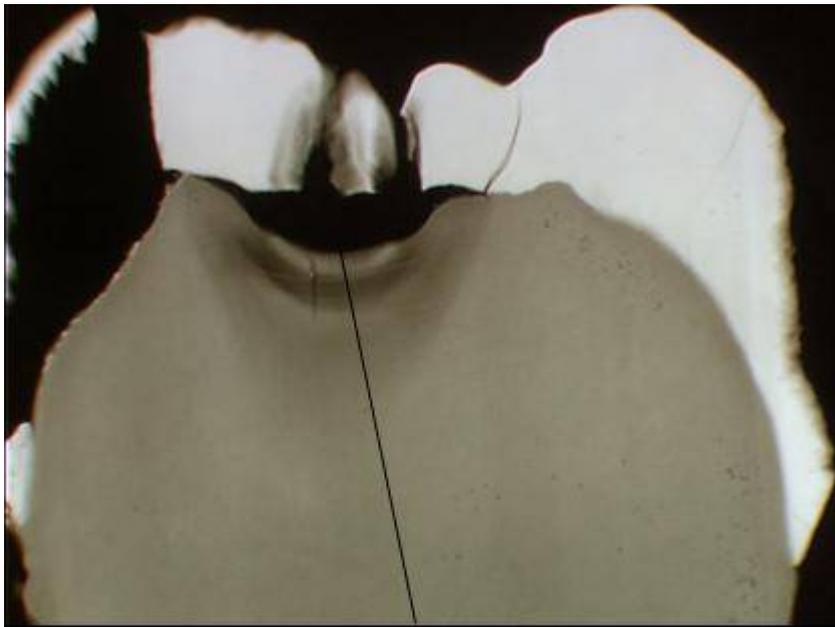
5 Ergebnisse

Schnittpräparat mit akuter Karies (18x)



Aufgrund der in der Durchlichtaufnahme nicht zu definierenden Zone der Transluzenz wurde diese Probe in die Gruppe der akuten Karies eingestuft. Dass diese als „akut“ definierte Läsion zumindest eine chronische Vorgeschichte hat, zeigt erst die Mikroradiographie. Eine deutlichere Abgrenzung der Läsion ist ebenfalls erst mit mikroradiographischen und Fluoreszenzaufnahmen möglich.

Abb. 28 Durchlichtaufnahme



Im Bereich des an der Schmelz-Dentin-Grenze gelegenen Startpunktes der Messlinie ist eine deutliche Remineralisationsschicht zu erkennen, an die sich direkt eine sehr stark demineralisierte Schicht anschließt. Dies bestätigte sich auch bei der Auswertung der Graustufen. Ebenfalls gut zu erkennen ist der Karieseinbruch durch die okklusalen Fissuren.

Abb. 29 Mikroradiographie mit eingezeichneter Messlinie

Schnittpräparat mit akuter Karies (18x)



Im Läsionszentrum an der Schmelz-Dentin-Grenze ist eine niedrigere Fluorochromkonzentration zu finden als in den peripheren Bereichen. Interessanterweise scheint dabei die in der Mikroradiographie gut zu unterscheidende remineralisierte Schicht der demineralisierten Schicht sehr ähnlich. Die Läsion insgesamt ist gut gegen das gesunde Dentin abgrenzbar.

Abb. 30 FITC-Aufnahme



Das oben angesprochene Phänomen, der reduzierten Fluoreszenz im Läsionszentrum an der Schmelz-Dentin-Grenze ist bei Verwendung des TR-Filters weniger ausgeprägt. Zudem kommt es bei dieser Aufnahme durch Überbelichtung zu einer reduzierten Ortsauflösung.

Abb. 31 TR-Aufnahme

5.5 Statistische Auswertung und Vergleich der Methoden

5.5.1 Korrelation der Messstrecken von Mikrohärtigkeit und transversaler Mikroradiographie

Um die Aussagekraft der weiteren Untersuchungsergebnisse der Studie zu überprüfen, bzw. diese durch ein gutes Ergebnis zu erhöhen, wurde mit dem Vergleich der zwei anerkannten Verfahren zur Kariesdiagnostik, der Mikrohärtemessung (HV) und der transversalen Mikroradiographie (MR), begonnen. Dabei wurden nicht lediglich die Kariesendpunkte verglichen, sondern jedem HV-Wert wurde der entsprechende MR-Wert für jeden einzelnen Messpunkt zugeordnet. Somit war eine Aussage zur Übereinstimmung des gesamten Kurvenverlaufs möglich. Ermittelt wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt.

Der durchschnittliche Korrelationskoeffizient r betrug 0,70. Alle Ergebnisse waren höchst signifikant. Bei drei der Proben war die Korrelation der beiden Untersuchungen nicht über die gesamte Länge der Messstrecke möglich. Diese sind in den genannten Werten nicht berücksichtigt (s. Tabelle 4).

Tabelle 4 Korrelation der Messspuren von HV - MR

Korrelation der Messspuren von HV - MR		
Probe	Korrelation HV - MR	
	r	
1#		*TMR-Platte beschädigt
3#	0,69	
4#	0,73	
5x	0,75	
8x	0,63	
9x	0,66	
10#	0,57	
11x		*Einbettkunststoff bei HV-Messung in Kavität eingedrungen
12#		*Einbettkunststoff bei HV-Messung in Kavität eingedrungen
13x	0,67	
14x	0,58	
16x	0,83	
18x	0,73	
19x	0,81	
20x	0,71	
21x	0,63	
22#	0,65	
23#	0,83	
24x	0,78	
25x	0,65	
27#	0,77	
Durchschnitt	0,70	

Für alle Ergebnisse gilt Sig. $\leq 0,001$ (höchst signifikant)

* Korrelation nicht auf gesamter Strecke möglich, da eine der Proben beschädigt wurde.

Nicht im Durchschnitt berücksichtigt.

5 Ergebnisse

5.5.2 Korrelation der Extrempunkte (FITC, TR, HV, MR)

Die für die Kariesdiagnostik relevanten Messpunkte und -werte wie mikroradiographische Opazitätsmaxima, Härtemaxima, Fluoreszenzminima, Beginn und Ende der transluzenten Zone oder anderer Dentinveränderungen wurden erfasst und bezüglich ihrer Lage miteinander verglichen. Ermittelt wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgesetzt.

Gesamtkorrelation aller Proben (s. Tabelle 5)

Alle der genannten Ergebnisse sind höchst signifikant.

Aus Abb. 32 wird ersichtlich, dass die Bestimmung des Kariesendpunktes mittels Mikrohärtemessung nach Vickers (HVmax) in weiten Teilen mit derjenigen aus der transversalen Mikroradiographie (MRmax) übereinstimmte. Nach Pearson betrug der Korrelationskoeffizient für die Lage der bestimmten Maxima aller untersuchten Proben $r = 0,80$.

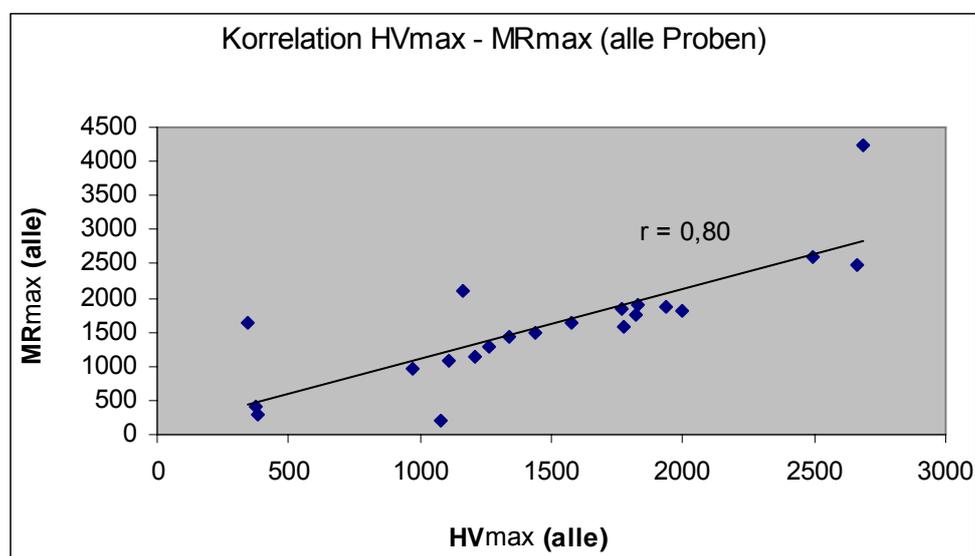


Abb. 32 Korrelation der Lage von HVmax und MRmax (alle Proben)

Die Korrelation der Lage von HVmax mit der Lage der Minima der beiden QLF-Messungen war mit $r = 0,85$ für FITC und TR noch etwas ausgeprägter (s. Abb. 33).

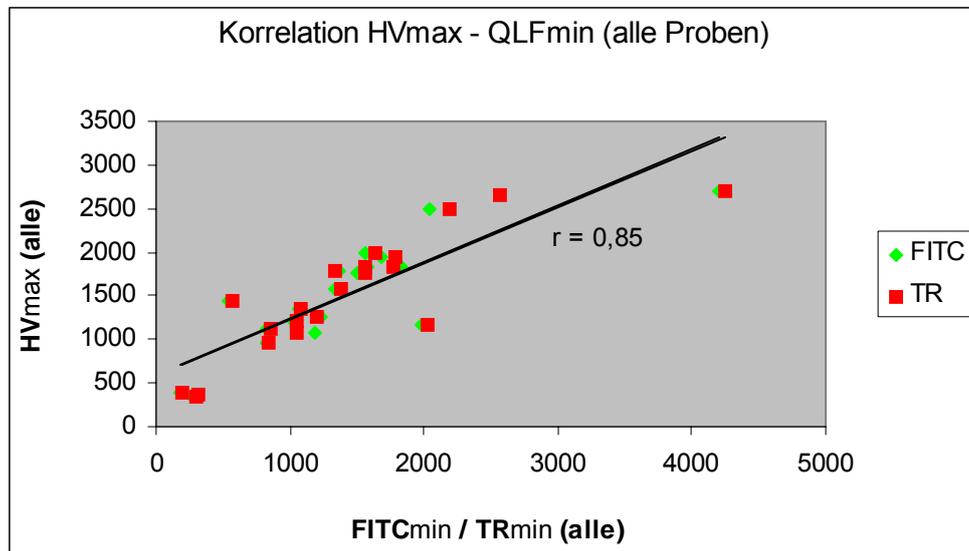


Abb. 33 Korrelation der Lage von HVmax und FITCmin / HVmax und TRmin (alle Proben)

Die Korrelationen nach Pearson von MRmax und FITCmin mit $r = 0,88$ und zwischen MRmax und TRmin mit $r = 0,90$ lagen noch höher (s. Abb. 34).

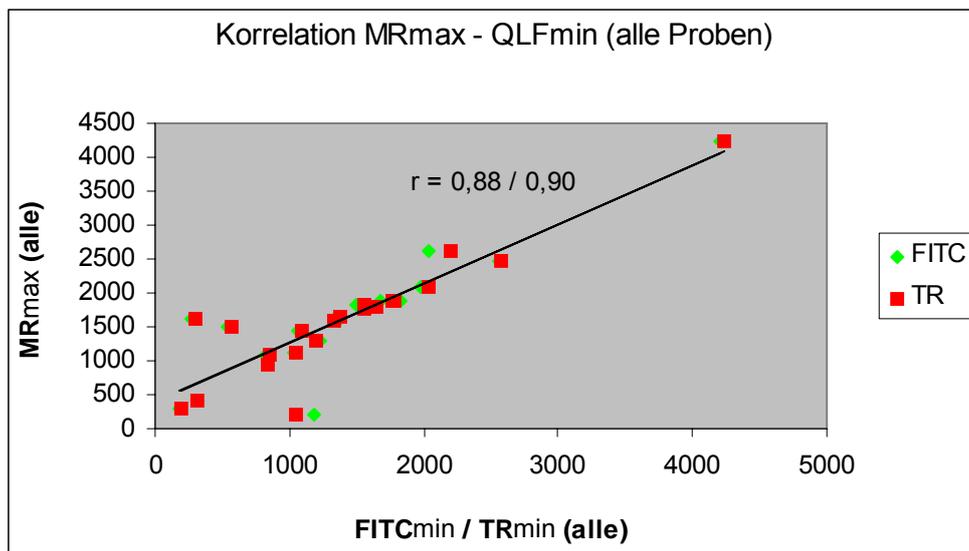


Abb. 34 Korrelation der Lage von MRmax und FITCmin / MRmax und TRmin (alle Proben)

5 Ergebnisse

Die höchste Korrelation nach Pearson wurde mit $r = 1$ (0,998) bei der Lage der beiden Fluoreszenzminima FITCmin und TRmin festgestellt (s. Abb. 35).

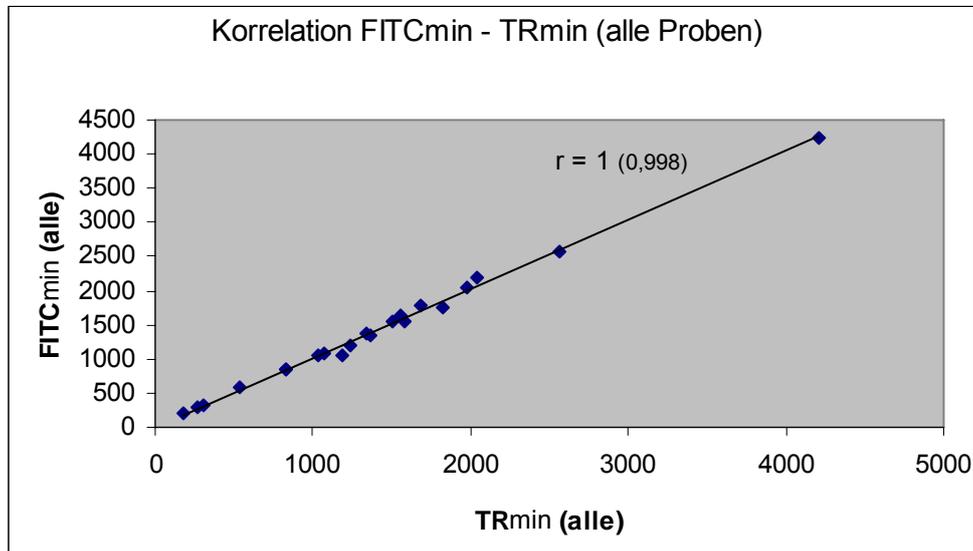


Abb. 35 Korrelation der Lage von FITCmin und TRmin (alle Proben)

Tabelle 5 Korrelation der Extrempunkte (alle Proben)

		FITCmin	TRmin	HVmax	MRmax
FITCmin	Pearson Correlation		(0,998)1	0,85	0,88
	Sig. (2-tailed)		≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 0,001
TRmin	Pearson Correlation	(0,998)1		0,85	0,90
	Sig. (2-tailed)	≤ 0,001		≤ 0,001	≤ 0,001
HVmax	Pearson Correlation	0,85	0,85		0,80
	Sig. (2-tailed)	≤ 0,001	≤ 0,001		≤ 0,001
MRmax	Pearson Correlation	0,88	0,90	0,80	
	Sig. (2-tailed)	≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 0,001	
	N	21	21	21	21

Sig. ≤ 0,001 Korrelation ist höchst signifikant (2-seitig).

Korrelation der Proben mit chronischer Karies (s. Tabelle 6)

Bei diesen Proben wurden zusätzlich zu den oben beschriebenen Korrelationen auch die Zusammenhänge der Extrempunkte mit der transluzenten Zone untersucht (s. Abb. 41). Wie aus Tabelle 6 ersichtlich wird war die Übereinstimmung der verschiedenen Diagnostikverfahren im Vergleich mit der Gesamtkorrelation meist noch höher. Alle genannten Ergebnisse sind wieder höchst signifikant.

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson zwischen HVmax und MRmax betrug hier $r = 0,98$ (s. Abb. 36). Die Übereinstimmung mit dem Beginn der Zone der Transluzenz (ZT-Beginn) betrug für HVmax $r = 0,88$ und für MRmax $r = 0,87$. Für das Ende der transluzenten Zone (ZT-Ende) betrug der Korrelationskoeffizient bei HVmax $r = 0,92$ und bei MRmax $r = 0,89$.

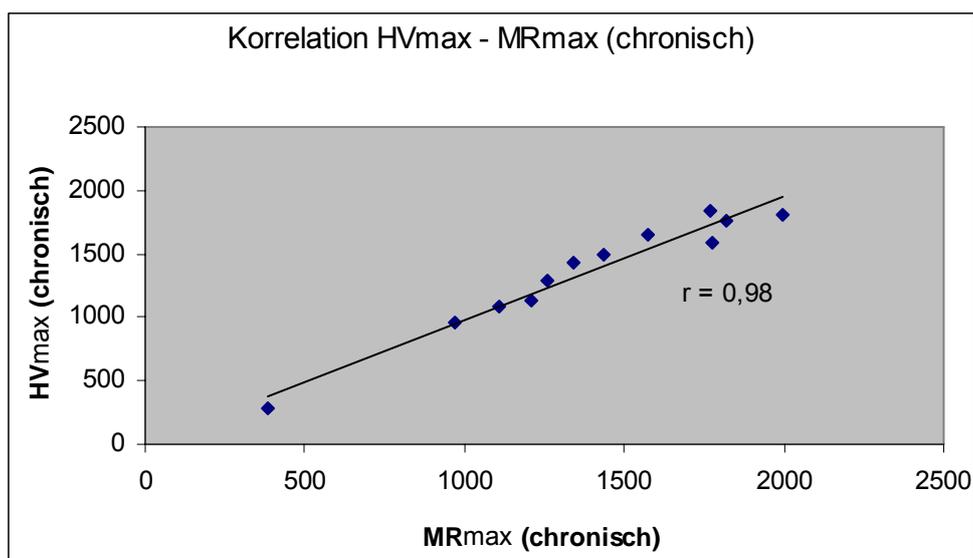


Abb. 36 Korrelation der Lage von HVmax und MRmax (chronische Karies)

5 Ergebnisse

Die Korrelation nach Pearson zwischen HVmax und der Lage der beiden QLF-Minima war mit $r = 0,88$ für FITCmin und $r = 0,89$ für TRmin wieder etwas ausgeprägter als bei der Gesamtkorrelation (s. Abb. 37).

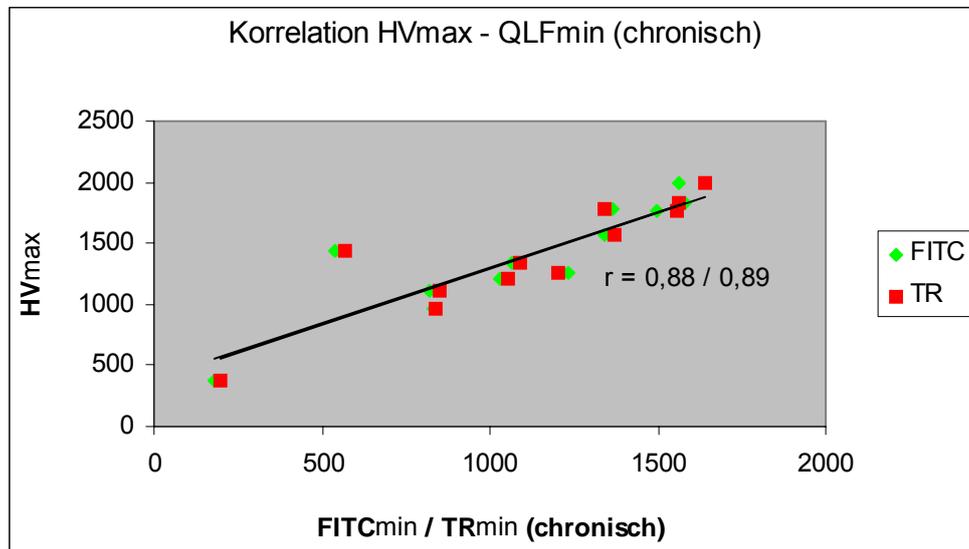


Abb. 37 Korrelation der Lage von HVmax und FITCmin / HVmax und TRmin (chronische Karies)
Die Korrelationen für MRmax und FITCmin lagen hier mit $r = 0,86$ ebenso wie die von MRmax und TRmin mit $r = 0,87$ geringfügig niedriger (s. Abb. 38).

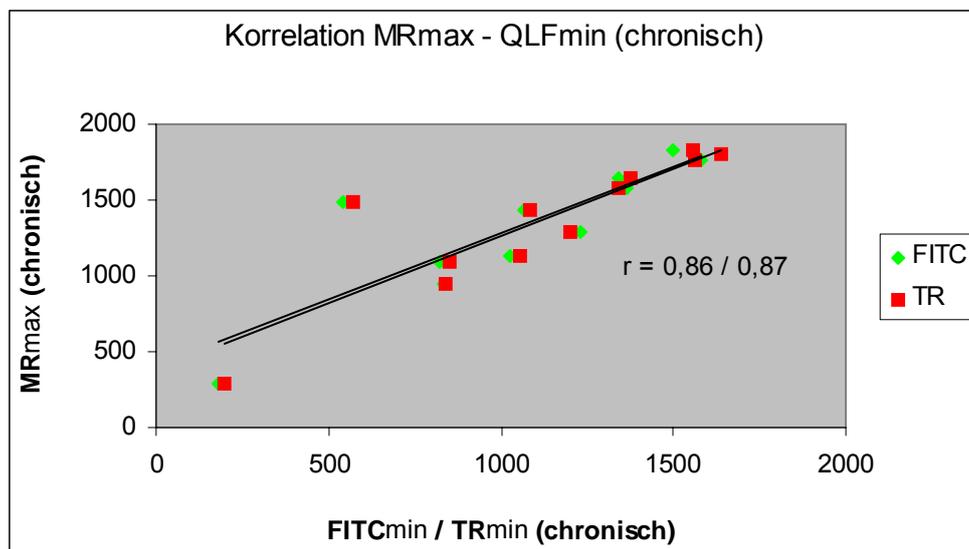


Abb. 38 Korrelation der Lage von MRmax und FITCmin / MRmax und TRmin (chronische Karies)

Die höchste Korrelation nach Pearson wurde mit $r = 1$ (0,997) zwischen den beiden Fluoreszenzmessungen FITCmin und TRmin festgestellt (s. Abb. 39). Die Übereinstimmung mit ZT-Beginn betrug für FITCmin $r = 0,99$ und für TRmin $r = 1$ (0,995). Am Ende der transluzenten Zone (ZT-Ende) betrug der Korrelationskoeffizient für FITCmin $r = 0,98$, bei TRmin $r = 0,98$ (s. Abb. 40). Die Korrelation der Extrempunkte von HV und MR mit den Begrenzungen der transluzenten Zone lagen deutlich niedriger (s. Tabelle 6)

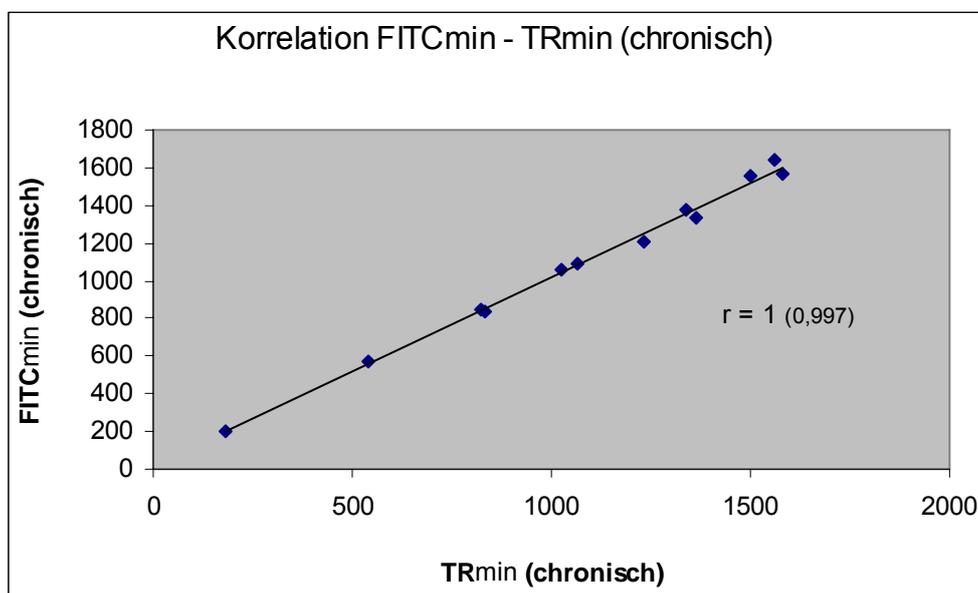


Abb. 39 Korrelation Lage von FITCmin und TRmin (chronische Karies)

5 Ergebnisse

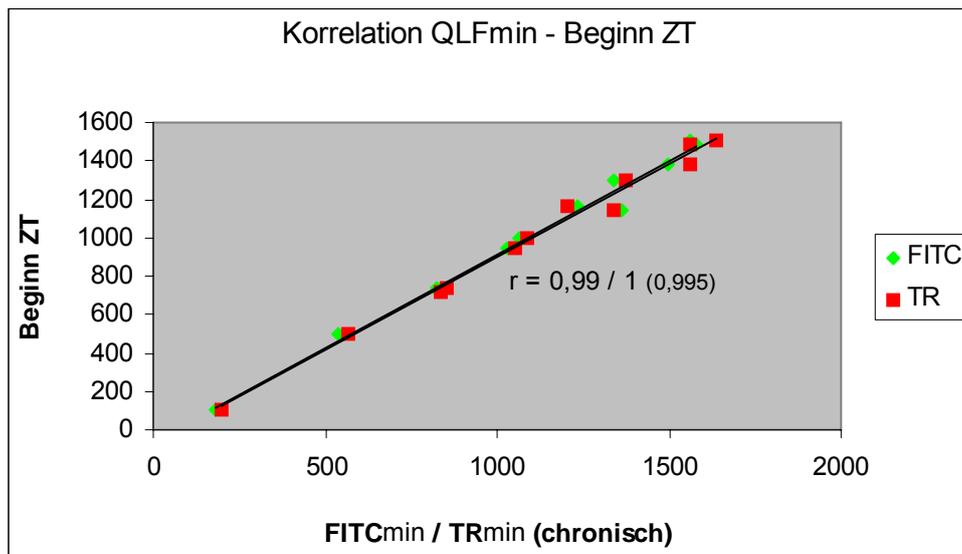


Abb. 40 Korrelation der Lage von FITCmin / TRmin und dem Beginn der ZT

Tabelle 6 Korrelation der Extrempunkte (Proben mit transluzenter Zone ZT)

		FITCmin	TRmin	HVmax	MRmax	ZT-Beginn	ZT-Ende
FITCmin	Pearson Correlation		(0,997)1	0,88	0,86	0,99	0,98
	Sig. (2-tailed)		≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 0,001
TRmin	Pearson Correlation	(0,997)1		0,89	0,87	(0,995)1	0,98
	Sig. (2-tailed)	≤ 0,001		≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 0,001
HVmax	Pearson Correlation	0,88	0,89		0,98	0,88	0,92
	Sig. (2-tailed)	≤ 0,001	≤ 0,001		≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 0,001
MRmax	Pearson Correlation	0,86	0,87	0,98		0,87	0,89
	Sig. (2-tailed)	≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 0,001		≤ 0,001	≤ 0,001
ZT-BEGINN	Pearson Correlation	0,99	(0,995)1	0,88	0,87		0,97
	Sig. (2-tailed)	≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 0,001		≤ 0,001
ZT-ENDE	Pearson Correlation	0,98	0,98	0,92	0,89	0,97	
	Sig. (2-tailed)	≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 0,001	
	N	12	12	12	12	12	12

Sig. ≤ 0,001 Korrelation ist höchst signifikant (2-seitig).

Korrelation der Proben mit akuter Karies (s. Tabelle 7)

Bei diesen Proben wurde der Messpunkt im Dentin in die Korrelation mit einbezogen, ab dem wieder unverändertes Dentin (unveränd.) zu finden war. Wie aus Tabelle 7 ersichtlich wird war die Übereinstimmung der verschiedenen Diagnostikverfahren im Vergleich zu den vorangegangenen Korrelationen, mit Ausnahme der Härtemessungen, sehr hoch. Insbesondere bei diesen, aber auch insgesamt ging die Signifikanz der Ergebnisse stark zurück.

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson zwischen HV und MR betrug $r = 0,83$, allerdings war das Ergebnis, wie auch die restlichen HV Korrelationen, nicht signifikant. Die Übereinstimmung mit dem Beginn des unveränderten Dentins (unveränd.) betrug für HV $r = 0,79$. Für die QLF-Messungen FITC und TR waren die Werte $r = 0,72$ und $r = 0,76$.

Die Korrelation nach Pearson zwischen MR und den beiden QLF-Messungen war mit $r = 0,93$ für FITC und $r = 0,96$ für TR sehr hoch. Die Übereinstimmung mit dem Beginn des unveränderten Dentins (unveränd.) betrug für MR $r = 0,97$.

Die Korrelationen nach Pearson für TR und FITC lag mit $r = 1 (0,996)$ wieder sehr hoch. Auch die Übereinstimmungen mit dem Beginn des unveränderten Dentins (unveränd.) waren mit $r = 1 (0,998)$ für FITC und $r = 1 (0,998)$ für TR sehr gut.

Die Signifikanz der Ergebnisse sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

5 Ergebnisse

Tabelle 7 Korrelation der Extrempunkte (Proben mit kariöser Veränderung ohne transluzente Zone)

		FITCmin	TRmin	HVmax	MRmax	Unveränd.
FITCmin	Pearson Correlation		(0,996)1	0,72	0,93	(0,998)1
	Sig. (2-tailed)		≤ 0,001	0,173	0,024	0,002
TRmin	Pearson Correlation	(0,996)1		0,76	0,96	(0,998)1
	Sig. (2-tailed)	≤ 0,001		0,138	0,011	≤ 0,001
HVmax	Pearson Correlation	0,72	0,76		0,83	0,79
	Sig. (2-tailed)	0,173	0,138		0,084	0,114
MRmax	Pearson Correlation	0,93	0,96	0,83		0,97
	Sig. (2-tailed)	0,024	0,011	0,084		0,005
UNVERÄND. ab hier unverän- dertes Dentin	Pearson Correlation	(0,998)1	(0,998)1	0,79	0,97	
	Sig. (2-tailed)	0,002	≤ 0,001	0,114	0,005	
	N	5	5	5	5	5

Sig. ≤ 0,001 Korrelation ist höchst signifikant (2-seitig).

Sig. ≤ 0,01 Korrelation ist hoch signifikant (2-seitig).

Sig. ≤ 0,05 Korrelation ist signifikant (2-seitig).

rot = nicht signifikant

5.5.3 Lage der Extrempunkte

Vergleich mit histologischen Strukturveränderungen

Im Vergleich mit den histologischen Strukturveränderungen des Dentins lag das Härtemaximum (HVmax-kariös) durchschnittlich 143 µm nach dem Ende der Zone der Transluzenz (ZT) (s. Abb. 41) bzw. wenn diese nicht feststellbar war 575 µm nach dem Ende des histologisch veränderten Dentins in Richtung der Pulpa. Für die Proben ohne ZT wurde in n = 2 von n = 5 Fällen ein Härtemaximum noch in histologisch verändertem Dentin festgestellt (s. Tabelle 8).

Im Vergleich mit den histologischen Strukturveränderungen des Dentins war die höchste Röntgenopazität (MRmax) durchschnittlich 135 µm hinter dem Ende der transluzenten Zone (ZT) (s. Abb. 41) in Richtung der Pulpa zu finden. Lediglich bei einer von n = 12 Proben lag dieser Wert noch vor dem Ende der ZT. Wenn diese nicht feststellbar war, lag das Maximum durchschnittlich 221 µm entfernt vom Ende der histologischen Veränderungen. In n = 2 von n = 5 Fällen war dieser Punkt noch in verändertem Dentin zu finden (s. Tabelle 8).

Im Vergleich mit den histologischen Strukturveränderungen des Dentins lag das Fluoreszenzminimum bei Verwendung des FITC-Filters (FITCmin) durchschnittlich $89\ \mu\text{m}$ nach Beginn der Zone der Transluzenz (ZT) (s. Abb. 41) bzw. wenn diese nicht feststellbar war durchschnittlich $168\ \mu\text{m}$ vom Beginn des histologisch unveränderten Dentins entfernt. Für den TR-Filter (TRmin) betragen diese Werte $108\ \mu\text{m}$ bzw. $71\ \mu\text{m}$. Bei den Proben ohne ZT lag in 4 von $n = 5$ Fällen das Fluoreszenzminimum noch in histologisch verändertem Dentin (s. Tabelle 8).

Lage der Extrempunkte untereinander (s. Tabelle 9)

Die Minima der beiden QLF-Messungen lagen bei einem durchschnittlichen Abstand von $46\ \mu\text{m}$ immer sehr dicht zusammen. Die größte Diskrepanz war bei den Proben mit akuter Karies zu finden. In ca. dreiviertel der Fälle (76,2 %) war TRmin näher an der Pulpa lokalisiert als FITCmin.

Ebenso lagen auch die Maxima der beiden anderen Messverfahren HV und MR relativ nah zusammen. Ihr durchschnittlicher Abstand betrug $289\ \mu\text{m}$, wobei dieser bei den Proben mit chronischer Karies ($82\ \mu\text{m}$) sehr viel geringer war als bei denen mit akuter Karies ($705\ \mu\text{m}$). Dabei gab es keine Hinweise darauf, dass eines der Maxima grundsätzlich näher an der Pulpa lokalisiert wäre.

Auffällig war dagegen, dass diese beiden Maxima von HV und MR näher an der Pulpa lagen als die Minima der QLF-Untersuchungen (90 %). Besonders deutlich war dieser Trend bei den Proben mit transluzenter Zone zu erkennen (100 %). Durchschnittlich lag das Fluoreszenzminimum der FITC-Untersuchung $333\ \mu\text{m}$ vor dem Härtemaximum und $321\ \mu\text{m}$ vor dem Opazitätsmaximum der Mikroradiographie. Für TRmin betragen diese Werte $312\ \mu\text{m}$ bzw. $288\ \mu\text{m}$.

5 Ergebnisse

Die genaue Aufschlüsselung der Werte ist Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 8 Relation zu histologischen Veränderungen

Räumliche Beziehung zw. FITC-TR-HV-MR-Messwerten und histologischen Veränderungen

Zone der Transluzenz (ZT) zu erkennen (chronische Karies)

Präparat	FITCmin	TRmin	HVmax-kariös	MRmax
	nach Beginn ZT in µm		nach Ende ZT in µm	
1#	113	119	40	20
4#	56	136	216	18
9x	37	67	703	755
11x	63	36	21	48
12#	119	179	52	119
13x	71	92	56	148
16x	94	76	153	88
19x	224	200	63	-129
21x	46	80	74	147
23#	74	91	125	34
24x	89	117	123	103
25#	79	107	96	12
Durchschnitt°	89	108	(93)143	(74)135

Histologische Veränderung ohne ZT (akute Karies)

Präparat	FITCmin	TRmin	HVmax-kariös	MRmax
	vor Ende veränd. D.* in µm		nach Ende veränd. D.* in µm	
3#	274	114	181	295
5x	183	82	70	13
10x	-254	-114	152	-715
18x	65	10	-883	49
22#	66	33	-1587	-33
Durchschnitt°	(147)168	(60)71	(134)575	(135)221

°Berechnet wurde die durchschnittliche Entfernung ohne Berücksichtigung von Vorzeichen

*Histologisch verändertes Dentin

Werte die auffällig von der Norm abweichen sind rot markiert! (Durchschnitt ohne diese Werte in Klammern)

Tabelle 9 Relation der Messwerte untereinander

Räumliche Beziehung zwischen FITCmin-TRmin-HVmax-MRmaxZone der Transluzenz (ZT) zu erkennen (chronische Karies)

Präparat	TR-FITC	HV-FITC	HV-TR	MR-FITC	MR-TR	HV-MR
	in µm	in µm	in µm	in µm	in µm	in µm
1#	6	139	133	119	113	20
4#	80	439	359	241	161	198
9x	30	896	866	948	918	-52
11x	-27	28	55	55	82	-27
12#	60	269	209	336	276	-67
13x	21	275	254	367	346	-92
16x	-18	242	260	177	195	65
19x	-24	411	434	219	242	192
21x	34	234	200	307	273	-73
23#	17	199	182	108	91	91
24x	28	288	260	268	240	20
25#	28	185	157	101	73	84
Durchschnitt°	31	(246)300	(228)281	(209)270	(190)251	82

Histologische Veränderung ohne ZT (akute Karies)

Präparat	TR-FITC	HV-FITC	HV-TR	MR-FITC	MR-TR	HV-MR
	in µm	in µm	in µm	in µm	in µm	in µm
3#	161	456	295	569	409	-114
5x	101	253	152	196	95	57
10x	-140	-102	38	-969	-829	867
18x	55	-818	-873	114	59	-932
22#	33	-1521	-1554	33	0	-1554
Durchschnitt°	98	630	582	376	278	705

5 Ergebnisse

Tabelle 9

Histologisch nicht beurteilbare Proben

Präparat	TR-FITC	HV-FITC	HV-TR	MR-FITC	MR-TR	HV-MR
	in µm	in µm	in µm	in µm	in µm	in µm
8x	26	77	51	1361	1335	-1284
14x	7	100	93	-86	-93	186
20x	-65	0	65	58	123	-58
27#	5	68	63	109	104	-41
Durchschnitt°	26	61	68	404	414	392

Ges. Durchschnitt°	46	333	312	321	288	289
--------------------	----	-----	-----	-----	-----	-----

°Berechnet wurde die durchschnittliche Entfernung ohne Berücksichtigung von Vorzeichen

Werte die auffällig von der Norm abweichen sind rot markiert! (Durchschnitt ohne diese Werte in Klammern)

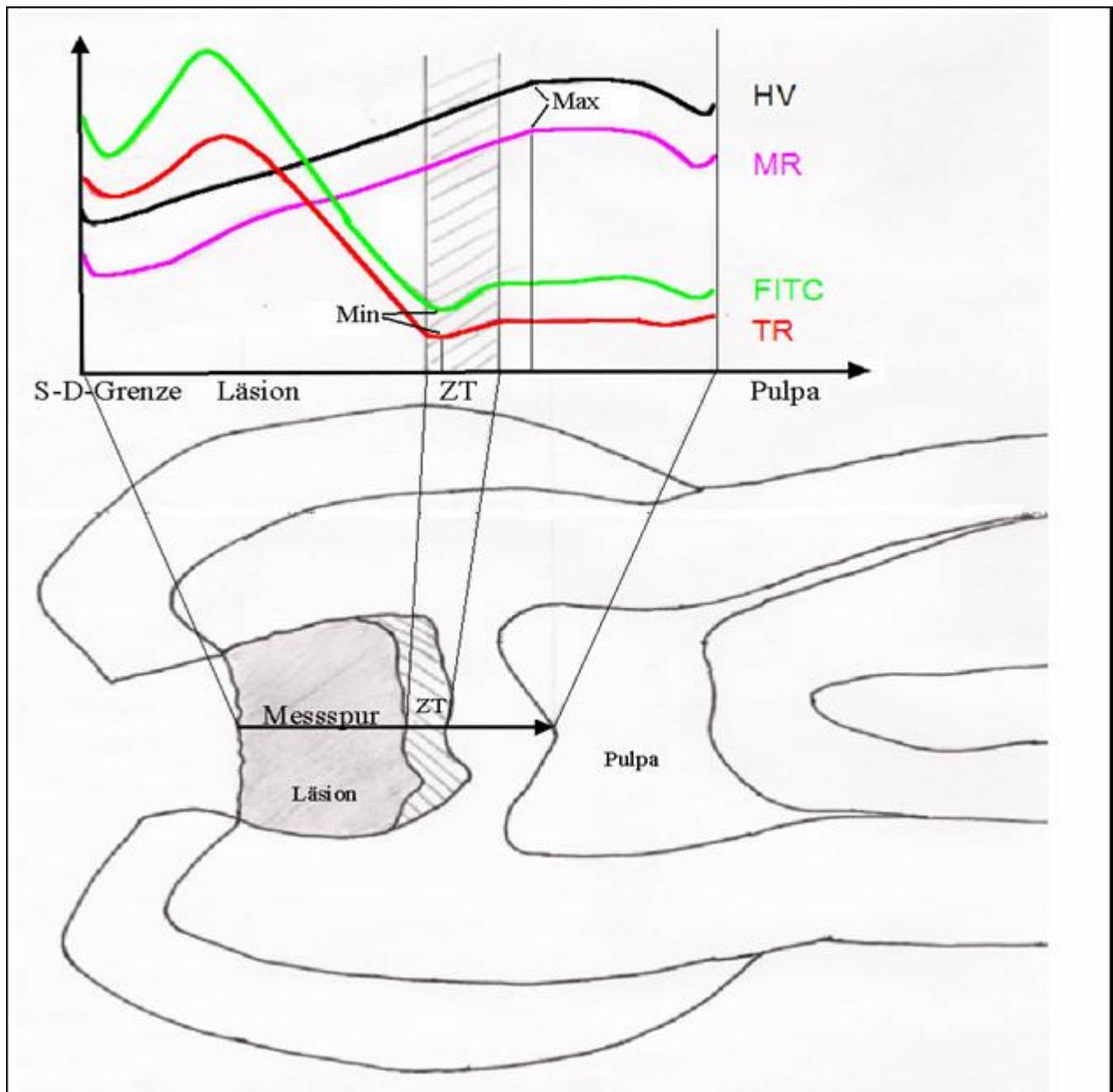


Abb. 41 Schematische Darstellung der Messergebnisse

Die Messung erfolgte für jede der Untersuchungsmethoden von der Schmelz-Dentin-Grenze (S-D-Grenze) bis zur Pulpa durch das Zentrum der Läsion. Das Härtemaximum (HVmax) lag durchschnittlich 143 μm , das röntgenologische Opazitätsmaximum (MRmax) 135 μm , hinter der Zone der Transluzenz (ZT) in Richtung der Pulpa. Also außerhalb der transluzenten Zone. Die ungefähre Lage der beiden Punkte ist hier mit Max gekennzeichnet. Das Fluoreszenzminimum der QLF-Untersuchung lag bei Verwendung des FITC-Filters (FITCmin) durchschnittlich 89 μm , bei Verwendung des TR-Filters 108 μm , nach dem Beginn der ZT. Also innerhalb der transluzenten Zone. Die ungefähre Lage dieser beiden Punkte ist mit Min gekennzeichnet.

6 Diskussion

6.1 Material und Methode

Anfertigung der Proben

Bei dieser Untersuchung wurden kariöse, extrahierte, menschliche Zähne der zweiten Dentition verwendet. Es wurde keine Unterscheidung bezüglich Zahnart, Lokalisation (Quadrant), Alter und Geschlecht der Patienten vorgenommen. Die Zähne wurden nach der Extraktion eine Woche in 0,8 %ger Natriumazidlösung gelagert, um die Desinfektion zu gewährleisten. Diese Art der Desinfektion wird beispielsweise auch vom Hersteller von Carisolv™ für In-vitro-Untersuchungen empfohlen. Die Lagerung der fertig eingebetteten Proben erfolgte dann in einem mit physiologischer Kochsalzlösung befülltem Hygrophor. Eine Lagerung direkt in Ringer- oder Kochsalzlösung war aufgrund der fragilen Proben, die nur temporär mit den Objektträgern verbunden waren, nicht möglich. Dabei ist der Einfluss des Lager- und Desinfektionsmediums auf die Untersuchungen allgemein als gering einzuschätzen. Dies wird auch durch entsprechende Versuche von Rautiola und Craig (1961) bei Mikrohärtmessungen bestätigt.

Die Einbettung der Zähne erfolgte mit Methacrylatkunststoff ohne Infiltration der Proben, wie dies beispielsweise auch von Donath (1988) für Proben, die nicht fixiert werden sollen, beschrieben wird. Die weitere Verarbeitung der Proben erfolgte allerdings nicht nach der von Donath und Breuner, entwickelten Trenn-Dünnschliff-Technik, da bei dieser ein Aufkleben der Präparate auf den Objektträgern nötig ist. Genau dies sollte jedoch sowohl für die Fluoreszenzmessung als auch bei der Mikroradiographie vermieden werden. In Vorversuchen konnte zwar eine Eigenfluoreszenz der Objektträger ausgeschlossen wer-

den, jedoch nicht eine Veränderung der optischen Eigenschaften der Probe selbst, beispielsweise durch eine Infiltration des Klebers in kariöses Dentin. Zudem wurde in eben diesen Vorversuchen eine Röntgenopazität der Objektträger nachgewiesen, was die reversible Verbindung mit diesen erforderte. Dementsprechend wurden die Block- und zugehörigen Schnittpräparate in einem Arbeitsgang mittels Inlocksäge gefertigt, und die verschiedenen Untersuchungen somit an den gegenüberliegenden Schnittflächen durchgeführt. Bei dem Schneiden der Proben erst nach der Mikrohärtemessung hätten zwar, wie bei der Dünnschlifftechnik nach Donath und Breuner (1982), die nachfolgenden Untersuchungen an der identischen Schnittseite der Proben stattfinden können, aber leider war die Herstellung eines planparalleles Schnittpräparates der Dicke 150 μm von der Oberfläche des entsprechenden Blockpräparates ohne festen Verbund von Probe und Objektträger technisch nicht umsetzbar. Somit ist der Schwachpunkt dieser Methode in der minimalen Ungenauigkeit bzgl. der Korrelation der beiden gegenüberliegenden Schnittflächen von Block- und Dünnschliffpräparat, bzw. Härtmessung und den anderen Untersuchungsverfahren zu sehen. Diese Abweichungen sind durch die Stärke des verwendeten Sägeblattes zu erklären und betragen entsprechend dessen Dicke ca. 280 μm . Minimiert werden konnte diese Abweichung durch das Legen der Schnittführung exakt durch das Zentrum der Läsion. Ähnliche Probleme werden sowohl von Fusayama et al. (1966) bei dem Vergleich von Härtmessungen mit histologischen Untersuchungen als auch von Featherstone et al. (1983) bei der Korrelation von Mikrohärt und Mikroradiographie geschildert. Dabei wird allerdings mit 180 μm nur von Fusayama et al. überhaupt der Stärkeverlust der Präparate angegeben.

6 Diskussion

Festzuhalten bleibt, dass eben dieses Vorgehen es erst ermöglichte Mikrohärtmessung, Lichtmikroskopie, Mikroradiografie und QLF-Messung bei der Untersuchung von ein und der selben Kavität verlässlich miteinander zu vergleichen. Die Anzahl der in der Untersuchung verwendeten Proben von $n = 21$ liegt über der der meisten vergleichbaren Untersuchungen zur quantitativen licht- oder laserinduzierten Fluoreszenz (Van der Veen und ten Bosch 1996, Banerjee et al. 1998 u. 1999, Shigetani et al 2003).

Histologie

Die zur histologischen Untersuchung verwendeten Geräte und Methoden entsprachen durchweg dem heutigen Standart. Die Dicke der Schnittpräparate wurde in erster Linie nach den Anforderungen der Mikroradiographie gewählt. Ein Abfärben der Probe, um die relevanten Strukturen identifizieren zu können, war nicht nötig.

Mikrohärtmessung

Die Messeindrücke wurden durch Belasten des Eindringkörpers, einer Diamantpyramide nach Vickers, mit 500 mN für 20 Sekunden erzeugt. Der Abstand der Messpunkte wurde unabhängig von der Länge der Messstrecke auf 25 μm festgelegt. Somit fand eine enge Orientierung an den Versuchsbedingungen von Fuyayama et al. (1966), Ogawa et al. (1983) sowie Featherstone et al. (1983) statt, die auf diesem Gebiet die ersten Ergebnisse erzielten. Sie ermittelten die Härte nach Knoop mit einer Belastung von 50 Gramm für 15 s. Der Abstand der Messpunkte betrug bei den beiden erst genannten Untersuchungen 50 μm , was ihnen ein entsprechend weniger engmaschiges Härteprofil lieferte. Featherstone et al. legten wie in dieser Untersuchung einen Messpunktabstand von 25 μm

fest, reduzierten aber im Randbereich wegen Bruchgefahr der Proben das Prüfungsgewicht auf 15 Gramm. Je nach Lage des Messpunktes veränderte Prüfkräfte werden mit 147 mN bis 980 mN, auch von Banerjee et al. (1999) bei der Härtemessung nach Knoop beschrieben. Diese Änderung von Prüfkräften innerhalb einer Messung wurde bei dieser Untersuchung allerdings als ebenso wenig sinnvoll erachtet wie der von Banerjee et al. verwendete Messpunktabstand von 500 μm .

Der hier ermittelte Universalhärtewert HU wurde mit entsprechender Software in den Vickershärtewert umgerechnet. In der Literatur findet meist, wie oben beschrieben, die Härtemessung nach Knoop ihre Anwendung. Ein entscheidender Vorteil einer der beiden Härtebestimmungsmethoden in der Zahnmedizin ist nicht auszumachen, da meist Veränderungen der Messwerte innerhalb eines Zahnes zu untersuchen sind. Eine bessere Vergleichbarkeit mit Proben anderen Ursprungs ermöglicht der Universalhärtewert. Zudem werden bei ihm sowohl die plastische als auch die elastische Deformation beim Prüfkörpereindruck berücksichtigt, was eine Änderung der Prüfkräfte innerhalb der Probe, wie beispielsweise von Banerjee et al. (1999) beschrieben, unnötig macht (TU-Ilmenau, 2004).

Transversale Mikroradiographie

Die Dicke der hier untersuchten Schnittpräparate betrug ca. 150 μm , und lag damit durchweg in dem von der Literatur als optimal bezeichneten Bereich für TMR-Untersuchungen von 80 μm - 150 μm , bzw. bei Dentinuntersuchungen bis 200 μm (Angmar et al., 1963, Featherstone et al. 1983, de Josselin de Jong , 1986, Inspektor, 2004). In vielen Untersuchungen, wie auch den oben genannten, kommen dann Radiographie-Systeme zum Einsatz die einen mehr oder we-

6 Diskussion

niger geschlossenen Kreislauf von der Strahlenquelle bis zur errechneten Läsionstiefe und Mineralgehalt darstellen. Dabei ist zur Kalibrierung der Aufnahmen eine Aluminiumeichtreppe, die auf jeder Radiographie mit abgebildet ist, nötig. Das Ende der Läsion wird dann beispielsweise von dem von Inspektor (NL, 2004) angebotenen Gerät an dem Punkt definiert an dem ein Mineralgehalt von 95 % des gesunden Dentins erreicht wird. (Arends und Ten Bosch, 1992, de Josselin de Jong et al., 1987, Inspektor, 2004, Universität Giessen, 2004). Für die hier durchgeführte Untersuchung stand leider keine solche Mikroradiographieeinheit mit angeschlossenen Auswertungsprogramm zur Verfügung. Somit wurden nur die Daten erhoben die wirklich benötigt wurden, nämlich die Läsionstiefe bzw. der Punkt, an dem nach einer Läsion der maximale Mineralgehalt (100 %) wieder erreicht wird. Selbstverständlich wurde trotzdem eine Eichtreppe verwendet, um eine spätere Kalibrierung der Bilder für weitere Untersuchungen zu ermöglichen. Das in dieser Studie zur Erstellung der Mikroradiographien verwendete Faxitron® - Röntgengerät erwies sich als dafür bestens geeignet und wird auch in der aktuellen Literatur häufig beschrieben (Buhl, M., 2001, Jahn, F., 2001, Wiltfang et al., 2003, Schlegel et al., 2004).

Die Mineralgehaltbestimmung mit wesentlich größerem Aufwand mit anderen Instrumenten wie beispielsweise dem ESCA (electron spectroscopy for chemical analysis), dem BSE-SEM (digital backscattered scanning electron microscopy) oder dem EPMA (electron probe x-ray microanalyser) werden von Van der Veen und ten Bosch (1996), Banerjee et al. (1998) und Shigetani et al. (2003) genannt.

Quantitative lichtinduzierte Fluoreszenz

Die Dicke der untersuchten Schnittpräparate betrug wie oben beschrieben ca. 150 μm . Des Weiteren wurden auch die Blockpräparate, also in der Mitte durch die Läsion halbierte Zähne, untersucht. Dabei wurden zwei verschiedene Filtersysteme (FITC - Zeiss Filter-Set 09 und Texas-Red – Zeiss Filter-Set 00) verwendet. Ersterer ermöglichte eine Anregung zwischen 450 nm – 490 nm, die Emission lag oberhalb von 515 nm. Bei dem zweiten Filter lag die Anregung zwischen 530 nm – 585 nm, die Emission oberhalb von 615 nm (s. Abb. 5 und Abb. 6). Damit waren sowohl Bereiche aus den in der Literatur beschriebenen oberen und unteren Untersuchungsspektren für Dentinkaries abgedeckt (s. Tabelle 2). Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampfampe. Ein ähnliches Vorgehen mit verschiedenen Filtersystemen und der Untersuchung von Schnitt- sowie Blockpräparaten wird nur von Shigetani et al. (2003) beschrieben. Sie verwendeten ebenfalls verschiedene Filtersysteme (UV: Ex 380-420 nm / Em 450 nm; FITC: Ex 465-495 nm / Em 515-555 nm; Cy5: Ex 590-650 nm / Em 663-735 nm) für die Fluoreszenzuntersuchung von Schnitt- und Blockpräparaten. Allerdings untersuchten sie lediglich 9 Proben von denen 4 keine Dentinkaries aufwiesen. Die Dicke der Proben betrug 50 μm . Sie verwendeten einen He-Ne-Laser als Lichtquelle. Ein weiteres Team, das ebenfalls Fluoreszenzuntersuchungen an Schnittpräparaten durchführte sind Van der Veen und ten Bosch (1996). Die Dicke ihrer nur 6 Präparate mit in vitro generierter Karies betrug 130 μm . Sie verwendeten einen Argonlaser als Lichtquelle, die Anregungswellenlänge (Ex) betrug 515 nm, die gemessene Emissionslichtwellenlänge (Em) 529 nm. Alle anderen Untersucher arbeiteten nur mit Blockpräparaten (Banerjee et al. 1998 u. 1999) oder untersuchten die Kavität während der Exkavation auf

6 Diskussion

Fluoreszenz (Lennon et al. 2002 u. 2003). Dabei kamen Argonlaser (Ex 488 nm / Em >515 nm) bzw. Xenondampflampen (Ex 370-429 nm / Em >530 nm) zum Einsatz. Die Probenzahl bei den Untersuchungen von Banerjee et al. war mit 12 zwar höher als bei den vorher genannten Untersuchungen, ist aber doch immer noch als äußerst gering einzuschätzen. Lennon et al. hingegen untersuchte 40 Proben. Dabei beschränkte sich seine Auswertung allerdings auf eine Karies Ja-Nein-Entscheidung. Um genauere Aussagen treffen zu können erfolgte in der hier besprochenen Untersuchung die Auswertung der Fluoreszenzintensität über die Bestimmung der Grauwerte. Dies wird in ähnlicher Weise auch von auch Hafstrom-Bjorkman et al. (1992) und Banerjee et al. (1998 u. 1999) beschrieben. Letztere legten mittels Skalpell ein Raster auf der Probe an, um Referenzpunkte für eine exakte Überlagerung der digitalisierten Bilder der verschiedenen Untersuchungsverfahren zu haben. Ob es dann sinnvoll ist mit Messpunktabständen von 500 µm zu arbeiten ist fraglich. Ein solches Vorgehen ist allerdings nur bei Blockpräparaten möglich. In dieser Untersuchung erfolgte die Korrelation der Bilder dementsprechend per Hand.

6.2 Ergebnisse

6.2.1 Histologie

Bei der histologischen Untersuchung im Durchlicht- bzw. Auflichtmikroskop konnten alle in der gängigen Literatur beschriebenen Strukturen gesunden als auch kariösen Dentins erkannt werden. Eine schwach verfärbte, subtransparente Zone ließ sich nicht so exakt abgrenzen wie beispielsweise von Ogawa et al. (1983) beschrieben. Deshalb wurden in dieser Untersuchung nur histologische

Referenzpunkte, wie die Zone der Transparenz oder eindeutig unverändertes Dentin, die klar zu definieren sind, in die Auswertung mit einbezogen.

6.2.2 Mikrohärte

Die erstellten Härteprofile von kariösem und unverändertem Dentin entsprachen in weiten Teilen dem zu erwartenden, und auch von Fusayama et al. (1966) sowie Ogawa et al. (1983), beschriebenen Verlauf. Lediglich bei Härtemessungen in gesundem Dentin sprechen die genannten Autoren eher von einem kontinuierlich abfallenden Härteprofil als dem in dieser Untersuchung gezeigten Plateau. Dabei lag der Punkt der größten Härte mit 591 μm hier etwas weiter entfernt von der Schmelz-Dentin-Grenze als von Craig et al. (1959), Fusayama et al. (1966) und Meredith et al. (1996) mit 300 μm – 450 μm beschrieben. Die nur von Craig et al. angeführte extrem niedrige Härte von 15 KHN direkt an der Schmelz-Dentin-Grenze konnte nicht nachvollzogen werden. Die niedrigere erreichte Maximalhärte in Proben mit akuten Läsionen gegenüber solchen mit chronischen Läsionen wurde ebenso bestätigt, wie der Übergang von histologisch verändertem zu unverändertem Dentin als Ort der größten Härte. Ob dafür nun wie von einigen Autoren beschrieben die Definition einer subtransparenten Zone nötig oder möglich ist sei dahingestellt, zumal dies nach den hier vorliegenden Ergebnissen wohl auch für akute Läsionen ohne transparente Zone zutrifft. (Fusayama et al., 1966, Ogawa et al., 1983, Banerjee et al., 1999). Lediglich bei drei der hier untersuchten Proben lag der maximale Härtewert weiter hinter dem genannten Bereich, was vermutlich auf eine Diskrepanz zwischen Block- und Schnittpräparat zurückzuführen ist. Damit liegen allerdings für die Proben mit akuter Karies zu wenige Daten vor, um hier von einem gesichertem

6 Diskussion

Ergebnis zu sprechen. Der durchschnittliche Abstand der maximalen Härte vom Ende der Zone der Transparenz betrug 143 μm bzw. ohne Berücksichtigung der fraglichen Probe 93 μm . Bei akuten kariösen Veränderungen lagen die Werte 575 μm oder eben ohne die fraglichen Proben nur 134 μm hinter dem veränderten Dentin (s. Tabelle 8). Dementsprechend sind auch die Korrelationen von Beginn und Ende der Zone der Transluzenz mit den Härtemaxima bei einem Koeffizienten von $r = 0,88$ bzw. $0,92$ sehr überzeugend. Für die Proben mit akuter Karies ist der Korrelationskoeffizient mit $r = 0,79$ nur wenig schlechter, aber nicht signifikant.

6.2.3 Mikroradiographie

Die erstellten Mikroradiogramme zeigten ebenfalls einen charakteristischen Verlauf, der dem der Härteprofile in weiten Teilen entsprach. Da im ersten Schritt nicht lediglich die Kariesendpunkte verglichen wurden, sondern jedem HV-Wert der entsprechende MR-Wert für jeden einzelnen Messpunkt zugeordnet wurde, war eine Aussage zur Übereinstimmung des gesamten Kurvenverlaufs möglich. Dieses Vorgehen ist in der Literatur so nicht zu finden, erhöht jedoch die Aussagekraft des Vergleiches der zwei Methoden beträchtlich. Bei dem angegebenen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,70$ ist zu beachten, dass hier eben auch die Messungen der Proben berücksichtigt sind, bei denen, wie oben beschrieben, Diskrepanzen in der Schnittebene zwischen den Schnitt- und Blockpräparaten aufgetreten sind. In Anbetracht der geschilderten Problematik ist dieser Wert durchaus zufriedenstellend. Zudem liegen die Werte für die Korrelation zwischen Härte- und Opazitätsmaxima mit $r = 0,80$ für alle Proben und $0,98$ bzw. $0,83$ für Proben mit chronischer bzw. akuter Karies noch deutlich hö-

her. Auch die Übereinstimmung von Beginn und Ende der Zone der Transluzenz mit den Opazitätsmaxima ist bei einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,87$ bzw. $0,89$ sehr überzeugend. Für die Proben mit akuter Karies ist der Korrelationskoeffizient (zwischen MR und Beginn unverändertes Dentin) mit $r = 0,97$ sogar noch höher. Allerdings lässt die geringe Anzahl der Proben mit akuter Karies von $n = 5$ hier nur eine Richtung erkennen, und stellt kein gesichertes Ergebnis dar.

Die bekannteste und bei Vergleichen von Mikrohärtigkeit und Mikroradiographie stets als Referenz angegebene Untersuchung ist die von Featherstone et al. (1983). Sie kamen bei ihren Versuchen auf einen sehr hohen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,916$. Zu beachten ist dabei allerdings, dass sie nur sieben, zu dem künstlich geschaffene, Läsionen an jeweils nur 12 Messpunkten, für Schmelz und Dentin zusammen, untersuchten. Dementsprechend ist dieses an wenigen ausgewählten Proben mit wenigen Messpunkten erzielte Ergebnis am ehesten mit dem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,98$ der zwölf Proben mit chronischer Karies aus dieser Untersuchung zu vergleichen. Damit sind die Ergebnisse sehr ähnlich.

6.2.4 QLF

Mit Hilfe der Fluorogramme wie sie in dieser Studie erstellt wurden ist die Fluoreszenz der verschiedenen Bereiche einer Läsion gerade im Vergleich mit herkömmlichen Untersuchungsmethoden sehr gut darstellbar. Dennoch sind ähnliche grafische Darstellungen in bisherigen Untersuchungen in dieser Form nicht zu finden. Überhaupt sind genaue Angaben oder Korrelationen zwischen Dentinfluoreszenzmessung und anderen Methoden zur Kariesdiagnostik kaum auf-

6 Diskussion

geführt. So beschreiben beispielsweise van der Veen und ten Bosch (1996) die Zusammenhänge zwischen Fluoreszenz und transversaler Mikroradiographie lediglich damit, dass die Fluoreszenzmessungskurve und die Dentindemineralisationskurve gleiches Verhalten zeigen würden und somit die Fluoreszenz mit dem Mineralverlust in Beziehung stehe. Genauere Aussagen sind bei einer Probenzahl von $n = 6$ allerdings auch nur schwer zu treffen. Banerjee et al. (1998) verglichen ebenfalls die Autofluoreszenz (AF) mit dem dabei im BSE-SEM (digital backscattered scanning electron microscopy) bestimmten Mineralgehalt. Auch hier ist die getroffene Aussage ohne Angabe von konkreten Werten. Sie geben lediglich an, dass die AF-Intensität mit dem Grad der Demineralisation korreliert, wenn auch die fluoreszierende Zone nicht exakt mit der im BSE-SEM bestimmten Zone übereinstimmen würde. Ähnlich vage bleiben sie dann auch bei den Ergebnissen ihrer Untersuchung 1999 zum Zusammenhang zwischen histologischen Veränderungen, Härte und AF: „Die AF korreliert deutlich mit erweichtem braunem Dentin und endet oberhalb der transluzenten Zone im hellbraun verfärbten, noch leicht erweichten Dentin.“ Die Ergebnisse der, wie oben bereits beschrieben, dieser Untersuchung sehr ähnlichen Studie von Shigetani et al. (2003) stellen sich noch dürftiger dar: „Es konnte eine Korrelation zwischen der AF im Cy5-Feld und Kalzium- sowie Phosphatgehalt festgestellt werden.“ Für die beiden anderen Filtersysteme (s.o.) sowie die Tiefenbestimmung der Läsionen in Blockpräparaten waren die Ergebnisse noch weniger aussagekräftig. Lediglich bei den Studien von Lennon et al. (2002 u. 2003) sind konkretere Ergebnisse zu finden. Allerdings weicht ihre Versuchsanordnung von der hier beschriebenen doch beträchtlich ab. Sie untersuchte die Bakterienrückstände in Kavitäten nach Exkavation unter Fluoreszenzkontrolle und verglich die Ergeb-

nisse mit der Anwendung anderer Diagnosemethoden bei der Exkavation wie zum Beispiel visueller und taktiler Kontrolle sowie Caries Detector®. Hier zeigte sich für die AF die höchste Sensitivität (0,94), Spezifität (0,83) sowie die höchste Anzahl richtiger Aussagen insgesamt (88 %) (s. auch 2.3.4).

In der hier durchgeführten Studie betrug der Korrelationskoeffizient aller Proben zwischen Autofluoreszenz (FITC u. TR) und Mikrohärtete $r = 0,85$. Betrachtet man nur die Proben mit chronischer Karies, wie es von fast allen genannten Autoren getan wird, so erhöht sich der Koeffizient r auf 0,88 für den FITC-Filter und 0,89 für den TR-Filter. Ebenso gut sind diese Werte beim Vergleich der AF mit der transversalen Mikroradiographie: Für die gesamten Proben beträgt der Wert 0,88 bzw. 0,90 (FITC / TR) und entsprechend nur für die Proben mit chronischer Läsion 0,86 bzw. 0,87. Hier liegen die Werte für akute Läsionen mit 0,93 und 0,98 sogar nochmals höher. Bei der Härtemessung sind diese Zahlen für akute Läsionen mit 0,72 und 0,76 sowohl niedriger als auch nicht signifikant, was vermutlich mit oben beschriebenen Abweichungen bei der Schnittebene dreier Präparate zwischen Block- und Schnittpräparat zu erklären ist. Besonders hervorgehoben werden müssen an dieser Stelle noch die extrem hohen Korrelationskoeffizienten zwischen AF-Minima und den histologisch markanten Punkten wie Beginn und Ende der transluzenten Zone (ZT), bzw. dem Beginn von unverändertem Dentin in akuten Läsion, die in jeder Kategorie einen Wert von über 0,98 erreichten. Dabei endete im Gegensatz zu den von Banerjee et al. (1999) geschilderten Ergebnissen die Fluoreszenz nicht schon im weichen braunen Dentin oberhalb der transluzenten Zone, sondern es war ein Fluoreszenzminimum wenige Mikrometer nach deren Beginn zu finden. Dabei ist es durchaus denkbar, dass das reale Fluoreszenzminimum direkt mit dem Beginn der ZT zu-

6 Diskussion

sammenfällt, und es durch die lange Belichtungszeit von 30 Sekunden zu einer Überstrahlung des Fluoreszenzminimums und damit zu einer minimalen Verschiebung in Richtung der transluzenten Zone gekommen ist. Bei der Digitalfotografie spricht man in diesem Zusammenhang auch vom sogenannten Dunkelstromphänomen. Was genau zur Ausprägung der Fluoreszenzminima führt ist nicht definitiv geklärt. Vermutlich ist dies auf die zum gesunden Dentin hin abnehmenden Fluorochromeinlagerungen und bei den chronischen Läsionen auf die gegenüber gesundem Dentin veränderten optischen Eigenschaften der transluzenten Zone zurückzuführen. Dies würde den erneuten Anstieg der Fluoreszenz in Richtung der Pulpa bei chronischen Läsionen erklären, jedoch nicht den, wenn auch geringeren, Fluoreszenzanstieg bei akuten Läsionen ohne Zone der Transluzenz. Eine Erklärung dieses Phänomens würde eine histologisch nicht klar abgrenzbare, aber dennoch vorhandene „Minizone“ der Transluzenz liefern. Die fast hundertprozentige Korrelation zwischen den beiden Filtersystemen bei der Fluoreszenzmessung deutet darauf hin, dass ein sehr weites Spektrum sowohl bei Anregungs- als auch bei Emissionswellenlänge nutzbar ist. Der subjektive Eindruck bei der Betrachtung der Fluoreszenzbilder ist der, dass die Bildschärfe bei Verwendung des Texas Red Filters etwas höher ist. Zudem sind hier Aufnahmen mit geringeren Belichtungszeiten möglich.

Möchte man nun diese sehr guten Untersuchungsergebnisse mit konkreten Werten aus der Literatur vergleichen, muss auf Fluoreszenzuntersuchungen im Schmelz zurückgegriffen werden. Dabei ist zu bedenken, dass im Schmelz die Härtemessungen kaum möglich sind und deshalb nur der Vergleich mit der hier auch angewendeten transversalen Mikroradiographie gesucht wird. Im Bereich von Glattflächen werden dabei Korrelationen von $r = 0,62$ (Ando et al. 2001) bis

$r = 0,81$ (Lagerweij et al. 1999) gefunden. Dementsprechend kann man mit den hier erreichten Ergebnissen sehr zufrieden sein.

6.3 Verbesserungsvorschläge für zukünftige Untersuchungen

Ein Ansatzpunkt für Verbesserungen bei weiteren Studien in dieser Richtung muss sicher die, wenn auch geringe, Diskrepanz zwischen den Block- und Schnittpräparaten sein. Allerdings ist hier eine Lösung schwer zu finden. Selbst mit anderen als den zur Verfügung gestandenen Geräten dürfte es kaum möglich sein die Proben dabei nicht in der einen oder anderen Weise zu verändern, wie beispielsweise durch das Eindringen von Kleber oder Kunststoff in die Poren der Zahnhartsubstanz. Ob dabei mit Sicherheit eine Beeinflussung der verschiedenen Messverfahren ausgeschlossen werden kann, muss in weiteren Studien noch geklärt werden. Eine Erleichterung der Koordination der Messstrecken bei den unterschiedlichen Untersuchungsverfahren ist durch als Referenzpunkte fungierende Markierungen auf den Proben denkbar, wie dies bereits für Blockpräparate von Banerjee et al. (1999) schon gezeigt wurde.

Eine interessante Weiterentwicklung der hier dargestellten Untersuchung wäre sicher durch das stärkere Miteinbeziehen mikrobiologischer Aspekte in die Studie zu erreichen. Möglich wären dabei ähnliche Färbetechniken, wie sie beispielsweise von Lennon et al. (2002 u. 2003) beschrieben wurden. So könnte durch Anfärbung der Schnittpräparate überprüft werden, ob das Fluoreszenzminimum auch zugleich den Endpunkt der bakteriellen Invasion darstellt. Damit bliebe dann nur noch zu zeigen, dass dies auch den Kariesendpunkt, bzw. äußersten möglichen Punkt für Remineralisationsvorgänge, darstellt.

7 Schlussfolgerung

7 Schlussfolgerung

Die quantitative lichtinduzierte Fluoreszenz an Zahnschnitten hat ein definiertes Minimum, das in enger Verbindung zu den Grenzen der kariösen Läsion steht. Zudem ist die Korrelation mit herkömmlichen Verfahren zur histologischen Kariesdiagnostik in einem sehr hohen Maß gegeben. Dabei spricht gerade die Lage des Fluoreszenzminimums direkt an der transluzenten Zone aber auch die Beziehung zu histologischen Veränderungen in akuten Läsionen dafür, dass die Fluoreszenz einen Marker für kariöses, zu entfernendes Dentin darstellt.

Da für die in toto Betrachtung von kariösen Läsionen, wie schon an den Blockpräparaten gezeigt, wesentlich geringere Belichtungszeiten nötig sind als für Schnittpräparate, scheint ein zukünftiger Einsatz in der Praxis durchaus möglich. Ob das Fluoreszenzminimum dann tatsächlich auch dem Kariesendpunkt entspricht, muss noch überprüft werden.

8 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden In-vitro-Untersuchung war es, die quantitative lichtinduzierte Fluoreszenz bei der Diagnostik von Dentinkaries mit konventionellen Verfahren, wie Histologie, Mikrohärtemessung und transversaler Mikroradiographie, zu vergleichen. Dazu wurden 21 kariöse, extrahierte, menschliche Zähne der zweiten Dentition ausgewählt, die eine Dentinkaries aufwiesen. Anschließend wurden die Zähne in Methacrylatkunststoff eingebettet und im Zentrum der Läsion mittels Inlochsäge zwei Schnittpräparate der Dicke 150 µm entnommen. Somit entstanden zwei Zahnhälften mit den zugehörigen Schnittpräparaten. Eines der Paare wurde verworfen, an dem anderen wurden Mikroradiographie, Histologie und Fluoreszenzuntersuchung am Schnittpräparat und Mikrohärtemessung am Blockpräparat durchgeführt. Die Messeindrücke wurden dabei durch Belasten des Eindringkörpers, einer Diamantpyramide nach Vickers, mit 500 mN für 20 Sekunden in 25 µm Abstand erzeugt. Die mikroradiographischen Aufnahmen wurden mittels Faxitron® - Röntgengerät mit einer Röhrenspannung von 20 kV für 70 min bei 2 mA angefertigt. Bei histologischer und Fluoreszenzuntersuchung wurde ein Stereomikroskop verwendet. Dabei kamen zwei verschiedene Filtersysteme (FITC - Zeiss Filter-Set 09 und Texas-Red – Zeiss Filter-Set 00) zum Einsatz. Ersterer ermöglichte eine Anregung zwischen 450 nm – 490 nm, die Emission lag oberhalb von 515 nm. Bei dem zweiten Filter lag die Anregung zwischen 530 nm – 585 nm, die Emission oberhalb von 615 nm. Als Lichtquelle für die Fluoreszenzuntersuchungen diente eine Quecksilberdampfampe.

8 Zusammenfassung

Bei der Auswertung diente der Verlauf der Messspur aus der Mikrohärtemesung als Vorlage für die Grauwertmessungen der digitalisierten Bilder der Mikroradiographien und Fluoreszenzuntersuchungen.

Die quantitative lichtinduzierte Fluoreszenz zeigte hier ein definiertes Minimum, das in enger Verbindung zu den Grenzen der kariösen Läsion steht. Mit durchschnittlich 89 μm für den FITC-Filter bzw. 108 μm für den TR-Filter war es dabei knapp innerhalb der transluzenten Zone an der Grenze zur Läsion zu finden. Der Korrelationskoeffizient betrug dafür mit beiden Filtersystemen über 0,99. Auch die Korrelation mit den anderen beiden Verfahren zur Kariesdiagnostik war in einem sehr hohen Maß gegeben. Der Korrelationskoeffizient zwischen den Fluoreszenzminima der zwei Filtersysteme und den Härtemaxima betrug $r = 0,85$. Für die Korrelation mit den Opazitätsmaxima der Mikroradiographien betrug dieser Wert 0,88 für den FITC- und 0,90 für den TR-Filter. Dabei waren die Werte für Proben mit chronischer Karies meist etwas höher als die Werte für Proben mit akuter Karies.

Die hier gezeigte hohe Korrelation mit den herkömmlichen Verfahren zur Kariesdiagnostik und auch die Lage des Fluoreszenzminimums im Bezug auf die histologischen Veränderungen deuten darauf hin, dass die Fluoreszenz einen echten Marker für kariöses zu entfernendes Dentin darstellen könnte. Dies zu zeigen muss die Aufgabe weiterer Studien sein.

9 Literaturverzeichnis

Alfano, R. R. and Yao, S. S.: Human teeth with and without dental caries studied by visible luminescent spectroscopy. *J Dent Res* Vol. 60 No. 2: 120-122 (1981)

Al Khateeb, S., Exterkate, R., Angmar-Mansson, B., Ten Cate, B.: Effect of acid-etching on remineralization of enamel white spot lesions. *Acta Odontol. Scand.* 58, 31-36 (2000)

Al-Khateeb, S., Forsberg, C., de Josselin de Jong, E. and Angmar-Månsson, B.: A longitudinal laser fluorescence study of white spot lesions in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 113: 595-602 (1998)

Al-Khateeb, S., ten Cate, J., Angmar-Månsson, B., de Josselin de Jong, E., Sundström, G., Exterkate, R., Oliveby, A.: Quantification of formation and remineralization of artificial enamel lesions with a new portable fluorescence device. *Adv Dent Res.* 11: 502-506 (1997a)

Al-Khateeb, S., Oliveby, A., de Josselin de Jong, E., Angmar-Mansson, B. : Laserfluorescence quantification of remineralization in situ of incipient enamel lesions : influence of fluoride supplements. *Caries Res* 31: 132-140 (1997b)

Anderson, M., Charbeneau, G.: A comparison of digital and optical criteria for detecting carious dentin. *J Prost Dent* 53: 643-646 (1985)

Ando, M., Hall, A., Eckert, G., Schemehorn, B., Analoui, M. Stookey, G.: Relative ability of laser fluorescence techniques to quantitate early mineral loss in vitro. *Caries Res.* 31: 125-131 (1997)

Ando, M., van Der Veen, M., Schemehorn, B., Stookey, G.: Comparative study to quantify demineralized enamel in deciduous and permanent teeth using laser- and light-induced fluorescence techniques. *Caries Res.* 35: 464-470 (2001)

Angmar, B., Carlström, D., Glas, J.: Studies on the ultrastructure of dental enamel. IV The mineralisation of normal human enamel. *J Ultrastruct Res* 8: 12-23 (1963)

9 Literaturverzeichnis

Angmar-Mansson, B., Al-Khateeb, S., Tranaeus, S.: Current research with quantitative light fluorescence. 4th Annual Indiana Conference May 19-22, Indianapolis, Indiana, USA. (1999)

Arends, J., Ten Bosch, J.: Demineralization and remineralization evaluation techniques. J Dent Res 71 (Spec Iss): 924-928 (1992)

Banerjee, A., Kidd, E., Watson, T.: In vitro evaluation of five alternative methods of carious dentine excavation. Caries Res. 34, 144-150 (2000)

Banerjee, A., Sherriff, M., Kidd, E., Watson, T.: A confocal microscopic study relating the autofluorescence of carious dentine to its microhardness. Br. Dent J 187, 206-210 (1999)

Banerjee, A. und Boyde, A.: Autofluorescence and mineral content of carious dentine: Scanning optical and backscattered electron microscopic studies. Caries Res. 32, 219-226 (1998)

Benedict H.: The fluorescence of teeth as another method of attack on the problem of dental caries. J Dent Res 9: 274-275 (1929)

Buhl, M.: Histologische Studie zum zeitlichen Heilungsverlauf der subtrochären Mehrfraktur des Schaffermurs mit Hilfe der polychromen Sequenzmarkierung. Universitätsmedizin Marburg

URL: [www.http://archiv.ub.uni.marburg.de/diss/z2001/0127/pdf/dmb/pdf](http://archiv.ub.uni.marburg.de/diss/z2001/0127/pdf/dmb/pdf)
(Stand 4/2004)

Charité – Universitätsmedizin Berlin

URL: www.fu-berlin.de/zahnerhaltung/qlf.html (Stand: 4/2004)

Côrtés, D., Ekstrand, K., Elias-Boneta, A., Ellwood, R.: An in vitro comparison of ability of fibre-optic transillumination, visual inspection and radiographs to detect occlusal caries and evaluate lesion depth. Car Res 34: 443-447 (1999)

Craig, R., Gehring, P., Peyton, F.: Relation of structure to the microhardness of human dentin. J Dent Res 38: 624-630 (1959)

De Josselin de Jong, E., Sundström, F., Westerling, H., Tranaeus, S., ten Bosch, J., Angmar-Månsson, B.: A new method for in vivo quantification of changes in initial enamel caries with laser fluorescence. *Caries Res* 29: 2-7 (1995)

De Josselin de Jong, E., Sundström, F., Emami, Z., Angmar-Månsson, B.: Quantification of mineral loss in initial caries lesions on natural enamel surfaces with laser fluorescence. *Caries Res* 26: 266 (1992)

De Josselin de Jong, E., Van der Linden, A.H.I.M., Ten Bosch, J.: Longitudinal microradiography; a non – destructive automated quantitative method to follow mineral changes in mineralised tissue slices. *Phys Med Biol* 32: 1209-1220 (1987)

De Josselin de Jong, E.: Comparison of methods in caries research. Thesis University of Groningen, The Netherlands. (1986)

Deery, C., Ferrier, S., Longbottom, C., Nugent, Z.: Effect of diagnostic criteria and validation systems on the interpretation of caries diagnostic results. *Caries Res*: 322 (2000)

Demtröder, W.: Laserspektroskopie: Grundlagen und Techniken. Springer Verlag (2000)

Donath, K.: Die Trenn-Dünnschliff-Technik. Exakt-Kulzer-Druckschrift, Nordestedt. (1988)

Eggertsson, H., Analoui, M., van der Veen, M., Gonzalez-Cabezas, C., Eckert, G., Stookey, G.: Detection of early interproximal caries in vitro using laser fluorescence, dye-enhanced laser fluorescence and direct visual examination. *Caries Res*. 33: 227-233 (1999)

Emami, Z., Al Khateeb, S., de Josselin,de Jong, E., Sundstrom, F., Trollsas, K., Angmar-Mansson, B.: Mineral loss in incipient caries lesions quantified with laser fluorescence and longitudinal microradiography. A methodologic study. *Acta Odontol. Scand.* 54, 8-13. (1996)

9 Literaturverzeichnis

Einwag, J. und Pieper, K.: Kinderzahnheilkunde. Urban und Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore (1997)

Featherstone, J.: Caries detection and prevention with laser energy. Dent Clin North Am 44: 955-969 (2000)

Featherstone, J., Ten Cate, J., Shariati, M., Arends, J.: Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. Caries Res 17: 385-391 (1983)

Ferreira Zandoná, A., Isaacs, R., van der Veen, M. and Stookey, G.: Indiana pilot clinical study of quantitative light fluorescence. Early Detection of Dental Caries II: Proceedings of the 4th Annual Indiana Conference GK, S (ed.). Indianapolis, IN, USA, Indiana University School of Dentistry. 219-230 (2000)

Ferreira Zandona, A., Analoui, M., Beiswanger, B., Isaacs, R., Kafrawy, A., Eckert, G., Stookey, G.: An in vitro comparison between laser fluorescence and visual examination for detection of demineralization in occlusal pits and fissures. Caries Res. 32: 210-8 (1998a)

Ferreira Zandona, A., Analoui, M., Schemehorn, B., Eckert, G., Stookey, G.: Laser fluorescence detection of demineralization in artificial occlusal fissures. Caries Res. 32: 31-40 (1998b)

Foreman, P. C. : The excitation and emission spectra of fluorescent components of human dentine. Archs oral Biol. Vol. 25: 641-647 (1980)

Fusayama, T., Okuse, K., Hosoda, H.: Relationship between hardness, discoloration and microbial invasion in carious dentin. J Dent Res 45: 1033-1046 (1966)

Fusayama, T., Terashima, S.: Differentiation of two layers of carious dentine by staining. Bull Tokyo Med Dent Univ 19: 83-92 (1972)

- Hafstrom-Bjorkman, U., Sundstrom, F., de Josselin, de Jong, E., Oliveby, A., Angmar-Mansson, B.: Comparison of laser fluorescence and longitudinal micro-radiography for quantitative assessment of in vitro enamel caries. *Caries Res.* 26, 241-247 (1992)
- Hall, A., DeSchepper, E., Ando, M. and Stookey, G.: In vitro studies of laser fluorescence for detection and quantification of mineral loss from dental caries. *Adv Dent Res.* 11: 507-14 (1997)
- Hellwig, E., Klimek, J. & Attin, T.: Einführung in die Zahnerhaltung, Urban & Fischer, München-Jena (1999)
- Helmut Fischer GmbH: Fischerscope® H100C Zukunftsweisende Technologie in der Mikrohärtbestimmung. (2001)
- Hibst, R.: Laser: Aktueller Stand und neue Entwicklungen. *Zm - Zahnärztliche Mitteilungen* 10: 54-63 (2001)
- Hibst, R., Paulus, R.: Caries detection by red excited fluorescence investigations on fluorophores. *Caries Res.* 33: 255 (1999)
- Hintze, H., Wenzel, A., Danielsen, B., Nyvad, B.: Reliability of visual examination, fibre-optic transillumination and bitewing radiography, and reproducibility of direct visual examination following tooth separation for the identification of cavitated carious lesions in contacting approximal surfaces. *Car Res* 32: 204-209 (1998)
- Higham, S., Edgar, W., Hall, A. and Pretty, I.: Inter- and intra-examiner reliability of QLF analyses of in vitro lesions. *Caries Res.* 35: 269-270 (2001)
- Hoerman, K.: Spectral characteristics of tetracycline-induced luminescence in rat teeth and bones. *J Dent Res* 54 Spec No B: B 131-136 (1975)
- Hoerman, K. und Mancewicz, S.: Fluorometric demonstration of tryptophan in dentin and bone protein. *J Dent Res* 43 No 2: 276-280 (1964)

9 Literaturverzeichnis

Inspektor Research Systems

URL: www.inspektor.nl/dental/main.htm (Stand: 4/2004)

IWT-Bremen: Mikrohärte

URL: www.iwt-bremen.de/wt/wt/vorlesungen/dl/wtwing1.pdf

(Stand: 4/2004)

Jahn, F.: Hochauflösende Magnetresonanztomographie der hyalinen Wirbelkörperplatte und angrenzender Strukturen: Pathoanatomische und histopathologische Korrelation. Universitätsmedizin München.

[www.http//edoc.ub.uni-muenchen.de/archive/00001388/01/jahn_felix.pdf](http://www.edoc.ub.uni-muenchen.de/archive/00001388/01/jahn_felix.pdf)

(Stand 4/2004)

Keyes, P.: Recent advances in dental caries research. Bacteriological findings and biological implications. Int Dent J 12: 443-448 (1962)

Kielbassa A., Attin T., Hellwig E.: Der Einsatz des Kariesdetektors als diagnostisches Hilfsmittel bei der Therapie der caries profunda. Endodontie 3: 207-215 (1994)

König, K., Teschke, M., Sigusch, B., Glockmann, E., Eick, S. und Pfister, W.: Red light kills bacteria via photodynamic action. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 46: 1297-1303 (2000)

König, K., Flemming, G. and Hibst, R.: Laser induced autofluorescence spectroscopy of dental caries. Cell Mol Biol (noisy-le grand). 44: 1293-1300 (1998)

König, K., Hibst, R., Meyer, H., Flemming, G und Schneckenburger, H.: Laser-induced autofluorescence of carious regions of human teeth and caries-involved bacteria. SPIE. 2080: 170-180 (1993a)

König, K., Hibst, R., Meyer, H., Flemming, G und Schneckenburger, H.: Laser-induced autofluorescence of carious. SPIE. 1880: 125-131 (1993b)

König, K.: Karies und Kariesprophylaxe. 2. Auflage, W. Goldmannverlag, München (1971)

- Kohler, B., Andreen, I., Fonsson, B.: The earlier the colonization by muans streptococci, the higher the caries prevalence at 4 years of age. *Oral Microbiol Immunol* 3: 14-17 (1988)
- Kvaal, S. and Solheim, T.: Fluorescence from dentin and cementum in human mandibular second premolars and its relation to age. *Scand J Dent Res.* 97 : 131-138 (1989)
- Laurila, U., Mancewicz, S.: Isolation and partila fractioning of fluorescent material from human teeth. *J D Res.* Vol. 39 No. 4: 714 (1960)
- Lagerweij, M., van der Veen, M., Ando, M., Lukantsova, L., Stookey, G.: The Validity and Repeatability of Three Light-Induced Fluorescence Systems: An in vitro Study. *Caries Res.* 33, 220-226 (1999)
- Lehmann, K., Hellwig, E.: Einführung in die restaurative Zahnheilkunde. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore (1998)
- Lennon, A.: Fluorecence-Aided Caries Excavation (FACE) Compared to Conventional Method. *Operative Dentistry.* 28-4: 341-345. (2003)
- Lennon, A., Buchella, W., Switalski, L., Stookey, G. : Residual Caries Detection Using Visible Fluorescence. *Caries Res* 36: 315-319 (2002)
- Linde, A.: The extracellular matrix of the dental pulp and dentine. *J Dent Res* 64 (Special Issues): 523-529 (1985)
- Löffler, G.: Funktionelle Biochemie. Springer Verlag Berlin: 459-465 (1994)
- Lussi, A., Megert, B., Longbottom, C., Reich, E., Francescut, P.: Clinical performances of a laser fluorescence device for detection of occlusal caries lesions. *Eur J Oral Sci* 109: 14-19 (2001)
- Lussi A.: Laserinduzirte Fluoreszenz zur Erkennung der Okklusalkaries. *Acta Med Dent Helv* 5: 15-19 (2000)

9 Literaturverzeichnis

Lussi, A., Imwinkelried, S., Pitts, N., Longbottom, C., Reich, E.: Performance and reproducibility of a laser fluorescence System for detection of occlusal caries in vitro. *Car Res* 33: 261-266 (1999)

Lussi, A. und Hotz, P.: Die Approximal- und Glattflächenkaries. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, Vol. 105: 11 14438-1443 (1995)

Matsumoto, H., Kitamura, S., Araki, T.: Applications of fluorescence microscopy to studies of dental hard tissue. *Frontiers Med. Biol. Engng*, Vol. 10, No. 4, pp. 269-284 (2001)

Meredith, N., Sherriff, M., Setchel, D., Swanson, S.: Measurement of the microhardness and Young's Modulus of human enamel and dentin using an indentation technique. *Archs Oral Biol* 41: 539-545 (1996)

Milton, R., Wirthlin, J.: Acid-reacting stains, softening, and bacterial invasion in human carious dentin. *J Dent Res* 49: 42-46 (1970)

Mittermayer, C.: *Oralpathologie für Studenten und Ärzte*. Schattauer, Stuttgart-New York: 179-193 (1984)

Mjör, I.: *Reactionpatterns of dentine*. IRL Press Ltd (Oxford): 27-31 (1987)

Ogawa, K., Yamashita, T., Ichijo, T., Fusayama, T.: The ultrastructure and hardness of the transparent layer of human carious dentin. *J Dent Res* 62: 7-10 (1983)

Ogushi, K., Fusayama, T.: Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin. *J Dent Res* 54: 1019-1026 (1975)

Opdyke, D.: The histochemistry of dental decay. *Arch oral Biol* 7: 207-219 (1962)

Peers, A., Hill, F., Mitropoulos, C., Holloway, P.: Validity and reproducibility of clinical examination, fibre-optic transillumination and bitewing radiographics for diagnosis of small approximal lesions: An invitro study. *Caries Res* 27(4): 307-311 (1993)

- Pekanov-Schröder, A.: Schlauer als das Auge. Dental Magazin 1/2003: 24-34 (2003)
- Pitts, N.B., Fyffe, H.E., Nugent, Z., Deery, CD., Ricketts, J.N., (Dun-dee/Edinburgh): Histological validation of caries diagnosis - intra and inter assessor variation and its implications. Caries Res 35: 265-316 (2001)
- Pretty, I., Hall, A., Smith, P., Edgar, W. and Higham, S.: The intra- and inter-examiner reliability of quantitative light-induced fluorescence (QLF) analyses. Br Dent J. 193: 105-9 (2002)
- Rautiola, C. und Craig, R.: The microhardness of cementum and underlying dentine of normal teeth to periodal disease. J Periodont 32: 113-123 (1961)
- Reich, E.: Neue Instrumente zur Kariesdiagnose. Zm – Zahnärztliche Mitteilungen 23: 44-54 (2000)
- Sailer, R., Paulus, R., Hibst, R.: Analysis of carious lesions and subgingival calculi by fluorescence spectroscopy. Car Res 35: 267 (2001)
- Sato, Y., Fusayama, T.: Removal of dentin by Fuchsin staining. J Dent Res 55: 678-683 (1976)
- Sauerwein, E.: Kariologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart. (1974)
- Schade, K.: Lichtmikroskopie: Technologie und Anwendung. Verlag moderne Industrie AG (1993)
- Schlegel, K., Falk, S., Wiltfang, J.: Der Einsatz eines resorbierbaren Knochenersatzmaterials (Colloss®) zur knöchernen Defektfüllung – eine tierexperimentelle Studie. DFZ 3: 39-43 (2004)
- Schröder, H.: Orale Strukturbiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart: 37-84 (1992)

9 Literaturverzeichnis

Schröder, H.: Pathobiologie oraler Strukturen. Karger Verlag Basel (1997)

Schumacher, G.-H.: Anatomie für Zahnmediziner. Hüthig Verlag Heidelberg: 294-317 (1997)

Shigetani, Y., Okamoto, A. Abu-Bakr, N., Tanabe, K., Kondo, S. and Iwaku, M.: Caries Diagnosis using a Laser Fluorescence System – Observation of Autofluorescence of Dental Caries. Dental Materials Journal 22 (1): 56-65 (2003)

Sheehy, E., Brailsford, S., Kidd, E., Beighton, D., Zoitopoulos, L.: Comparison between visual examination and a laser fluorescence system for in vivo diagnosis of occlusal caries. Car Res 35: 421-426 (2001)

Shi, X., Tranaeus, S. and Angmar-Månsson, B.: Comparison of QLF and DIAGNOdent for quantification of smooth surface caries. Caries Res. 35: 21-6 (2001)

Shi, X., Welander, U., Angmar-Mansson, B.: Occlusal caries detection with KaVo DIAGNOdent and radiography: an in vitro comparison. Caries Res. 34, 151-158. (2000)

Silverstone, L.: Structure of carious enamel including the early lesion. Oral sciences reviews 3: 100-160 (1973)

Sognaes, R., Wislocki, G.: Histochemical observations on enamel and dentin undergoing carious destruction. Oral Surg 3: 1283-1295 (1950)

Spitzer, D. and Bosch, J.: The total luminescence of bovine and human dental enamel. Calcif Tissue Res: 201-208 (1976)

Stokey, G., Jackson, R., Fereirra Zandona, A., Analoui, M.: Dental caries diagnosis. Dental Clinics of North America Volume 43, Number 4 (1999)

Straetemans, M., Van Lovren, C., De Soet, J., De Graaff, J., Ten Cate, J.: Colonization with mutans streptococci and lactobacilli and the caries experience of children after age of five. J Dent Res 7 : 1851-1855 (1998)

Tam, L., McComb, D.: Diagnosis of occlusal caries: Part I. Conventional Methods. *J Can Dent Assoc* 67 (8) : 454-457 (2001a)

Tam, L., McComb, D.: Diagnosis of occlusal caries: Part II. Recent diagnostic technologies. *J Can Dent Assoc* 67 (8) : 459-463 (2001b)

Ten Bosch, J.: Summary of research on quantitative light-induced fluorescence. Early Detection of Dental Caries II: Proceedings of the 4th Annual Indiana Conference, Stookey G. (ed.). Indianapolis, IN, USA, Indiana University School of Dentistry. 261-277 (2000)

Ten Cate, J., Lagerweij, M., Wefel, J., Angmar-Månsson, B., Hall, A., Ferreira Zandoná, A., Stookey, G. and Faller, R.: In vitro validation studies of quantitative light-induced fluorescence. Early Detection of Dental Caries II: Proceedings of the 4th Annual Indiana Conference GK, S (ed.). Indianapolis, IN, USA, Indiana University School of Dentistry. 231-250 (2000)

Terashima S., Watanabe M., Kurosaki N., Kono A.: Hardness of dentine remaining after clinical excavation of soft dentine. *Jpn J Conserv Dent* 11: 115ff. (1969)

Thewlis, J.: The structure of teeth as shown by x-ray examination. *Med Res Coun Sp Rep Ser London* 238: 5-28 (1940)

Thylstrup, A. und Fejerskov, O.: Textbook of clinical cariology. Copenhagen, Munksgaard (1999)

Tranaeus, S., Shi, X., Lindgren, L., Trollsas, K., Angmar-Mansson, B. In vivo repeatability and reproducibility of the quantitative light-induced fluorescence method. *Caries Res.* 36, 3-9 (2002)

Tranaeus, S.: Clinical application of QLF and DIAGNOdent – two new methods for quantification of dental caries. Department of Cariology and Endodontology. Institute of Odontology. Karolinska Institutet. (2002b)

9 Literaturverzeichnis

Tranaeus, S., Heinrich-Weltzien, R., Kühnisch, J., Stösser, L., Angmar-Månsson, B.: Potential Applications and Limitations of Quantitative Light-induced Fluorescence in Dentistry. *Med. Laser Appl.* 16: 195-204 (2001)

Tranaeus, S., Al-Khateeb, S., Björkman, S., Twetman, S. and Angmar-Månsson, B.: Application of quantitative light-induced fluorescence to monitor incipient lesions in caries-active children. A comparative study of remineralisation by fluoride varnish and professional cleaning. *Eur J Oral Sci.* 109: 71-75 (2001b)

Tranaeus, S., Shi, X., Lindgren, L., Trollsas, K., Angmar-Mansson, B. In vivo quantification of natural incipient caries lesions using the the quantitative light-induced fluorescence method. A reproducibility study. Featherstone J., Rechman, P., Fried, D. (eds): *Assesment of Oral Health Monogr Oral Sci.* Basel, Karger vol 17: 144-162 (2000)

Tranaeus, S., Al-Khateeb, S., Björkman, S., Twetman, S. and Angmar-Månsson, B.: Comparison of fluoride varnish and professional tooth-cleaning on caries active children using the quantitative light-induced fluorescence method – a six months pilot study. *Caries Res* 33 (1999)

TU-Ilmenau: Mikrohärtemessung

URL: www.werkstoff.tu-ilmeneau.de/Ausbildung/m_hart98/m_hart98.html

(Stand: 4/2004)

Universitätsklinikum Giessen: Poliklinik für Zahnerhaltungskunde und Präventive Zahnheilkunde / Mikroradiographie

URL: www.uniklinikum-giessen.de/erhaltung/mikroradiographie.html

(Stand 4/2004)

Van der Veen, M. und ten Bosch, J.: The influence of Mineral Loss on the Auto-Fluorescent Behaviour of in vitro Demineralised Dentine. *Caries Res.* 30: 93-99 (1996)

Verdonschot, E., Angmar-Månsson, B., ten Bosch, J., Deery, C., Huysmans, M., Pitts, N. and Waller, E.: Developments in caries diagnosis and their relationship to treatment decisions and quality of care. ORCA Saturday Afternoon Symposium 1997. *Caries Res.* 33: 32-40 (1999)

Wei, J.: Untersuchung von Verfahren zur Auswertung der zweidimensionalen Fluoreszenzspektren. Verlag für Wissenschaft und Forschung – Berlin (1998)

Wenzel, A., Verdonschot, E., Truin, G., König, K.: Accuracy of visual inspection, fiber-optic transillumination, and various radiographic images modalities for the detection of occlusal caries in extracted non cavities teeth. J Dent Res 71: 1934-1937 (1992)

Wiltfang, J., Schlegel, K.: Einfluss von platelet rich plasma (PRP) auf die Knochenregeneration. DFZ 11: 47-51 (2003)

Zander, M.: Fluorimetri. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, (1981)

10 Anhang

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	li.: Prüfung der Universalhärte re.: Prüfung der Vickershärte (TU-Ilmenau, 2004)	42
Abb. 2	Ausrichtung der Messspuren (Schema)	43
Abb. 3	Schematische Darstellung der mikroradiographischen Methode	45
Abb. 4	Aufbau Auflichtfluoreszenzmikroskop	49
Abb. 5	Filterspektrum FITC-Filter (Originalgrafik Carl Zeiss, Oberkochen, D)	50
Abb. 6	Filterspektrum Texas-Red-Filter (Originalgrafik Carl Zeiss, Oberkochen, D)	50
Abb. 7	Zahn kariös	53
Abb. 8	Zahn geätzt	53
Abb. 9	Zahn eingebettet	53
Abb. 10	Vorbereitung für Inlochsäge	53
Abb. 11	Inlochsäge (1)	53
Abb. 12	Inlochsäge (2)	53
Abb. 13	Block- und Schnittpräparate	54
Abb. 14	Hygrophor	54
Abb. 15	Fischerscope® H100C XYp	54
Abb. 16	Faxitron®-Röntgengerät	54
Abb. 17	Röntgenplatte mit Präparaten u. Eichterpe	54
Abb. 18	Stereomikroskop Stemi SV 11	54
Abb. 19	Beispiel Härteprofil nach Vickers (kariös) (x-Achse in μm)	56
Abb. 20	Beispiel Mikroradiogramm (x-Achse in μm)	60
Abb. 21	Beispiel „Fluorogramme“ FITC und TR (x-Achse in μm)	62
Abb. 22	Durchlichtaufnahme	63
Abb. 23	Mikroradiographie mit eingezeichneter Messlinie	63
Abb. 24	FITC-Aufnahme	64
Abb. 25	TR-Aufnahme	64
Abb. 26	FITC-Aufnahme (Blockpräparat)	65
Abb. 27	FITC-Aufnahme (Blockpräparat)	65
Abb. 28	Durchlichtaufnahme	66
Abb. 29	Mikroradiographie mit eingezeichneter Messlinie	66
Abb. 30	FITC-Aufnahme	67
Abb. 31	TR-Aufnahme	67
Abb. 32	Korrelation der Lage von HVmax und MRmax (alle Proben)	70
Abb. 33	Korrelation d. Lage von HVmax und FITCmin / HVmax und TRmin (alle Proben)	71
Abb. 34	Korrelation d. Lage von MRmax und FITCmin / MRmax und TRmin (alle Proben)	71
Abb. 35	Korrelation der Lage von FITCmin und TRmin (alle Proben)	72
Abb. 36	Korrelation der Lage von HVmax und MRmax (chronische Karies)	73
Abb. 37	Korrelation der Lage von HVmax und FITCmin / HVmax und TRmin (chronische Karies)	74
Abb. 38	Korrelation der Lage von MRmax und FITCmin / MRmax und TRmin (chronische Karies)	74

Abb. 39	Korrelation Lage von FITCmin und TRmin (chronische Karies)	75
Abb. 40	Korrelation der Lage von FITCmin / TRmin und dem Beginn der ZT	76
Abb. 41	Schematische Darstellung der Messergebnisse	83

10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Grundfluoreszenz von Dentin	27
Tabelle 2	Erhöhte Fluoreszenz kariöses Dentin	28
Tabelle 3	Maxima und Minima der Vickershärte	59
Tabelle 4	Korrelation der Messspuren von HV - MR	69
Tabelle 5	Korrelation der Extrempunkte (alle Proben)	72
Tabelle 6	Korrelation der Extrempunkte (Proben mit transluzenter Zone ZT)	76
Tabelle 7	Korrelation der Extrempunkte (Proben mit kariöser Veränderung ohne transluzente Zone).....	78
Tabelle 8	Relation zu histologischen Veränderungen	80
Tabelle 9	Relation der Messwerte untereinander	81
Tabelle 10	Materialliste	116
Tabelle 11	Geräteliste	117
Tabelle 12	Probenbenennung.....	118
Tabelle 13	Schnittdicken	119
Tabelle 14	Messwerte	120
Tabelle 15	Messwerte	121

10 Anhang

10.3 Verwendete Geräte und Materialien

Tabelle 10 Materialliste

Material	Hersteller
Gluma Etch 20 Gel	Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, D
Addisil® Rose	Siladent-Technik GmbH, Goslar, D
Technovit 4004	Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, D
Cyanolit 201	3M Deutschland GmbH, Neuss, D
Tesa©	Beiersdorf, Hamburg, D
Objektträgern	Exakt Apparatebau, Norderstedt, D
DP-Diamantspray P, Nr 40600137 SPRON, 1µm.	STRUERS GmbH, Rodovre, Dänemark
Polishing discs,	LECO Corporation, St. Joseph, Michigan, USA
Kerr Point 4 (Lichthärtender Methacrylat-kunststoff)	Kerr Corporation, U.S.A.
Röntgenfilmplatten	Millimask HD, Agfa, Köln, D
Entwicklerlösung (G 282C)	Agfa, Köln, D
Fixierlösung (G 333C)	Agfa, Köln, D
Kompositeichkörper (Tetric® 210 A3)	Ivoclar Vivadent AG, Ellwangen, D
FITC - Zeiss Filter-Set 09	Carl Zeiss, Oberkochen, D
Texas-Red – Zeiss Filter-Set 00	Carl Zeiss, Oberkochen, D

Alle Angaben in der Reihenfolge des Auftretens im Text

Tabelle 11 Geräteliste

Gerät	Hersteller
Inlochsäge Leica SP 1600	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, D
Mikrometerschraube mit Digitalanzeige, 0 - 35 mm; 0,001 mm	Fa. Mitutoyo, Japan
Automatisches Schleif und Poliergerät DAP-7	STRUERS GmbH, Rodovre, Dänemark
Fischerscope® H100C XYp	Helmut Fischer GmbH & Co. KG, Sindelfingen, D
Stereomikroskop, Stemi SV 11	Carl Zeiss, Oberkochen, D
Digitale Spiegelreflexkamera Fuji Fine Pix S1 Pro	Fuji Photo Film Europe GmbH, Düsseldorf, D
Faxitron®-Röntgengerät Modell 43855A	Hewlett-Packard Company, McMinnville Division, Oregon, U.S.A.
Trockenschrank	Köttermann GmbH & Co KG, Hannover, D
Durchlichtmikroskop Zeiss Axiphot	Carl Zeiss, Oberkochen, D
Digitalkamera (Sony 3CCD Color Video Camera)	Sony Deutschland GmbH, Köln, D

Alle Angaben in der Reihenfolge des Auftretens im Text

10 Anhang

10.4 Rohdaten

10.4.1 Benennung der Proben

Tabelle 12 Probenbenennung

Benennung	Bedeutung	optische Vergrößerung	Mikroskop + Kamera
Proben:			
x	oberer Schnitt	1,5	a
x block	oberer Anteil des Blockes	1,5	"
#	unterer Schnitt	1,5	"
# block	unterer Anteil des Blockes	1,5	"
a	Auflichtaufnahme	1,5	"
d	Durchlichtaufnahme Zahnklinik	1,5	"
D	Durchlichtaufnahme Anatomie	5,8	b
f	QLF mit FITC-Filter	1,5	a
r	QLF mit Texas Red-Filter	1,5	"
m / pcx-Dateien	Mikroradiographien	5,8	b
ZW	20-fache Vergrößerung	20	"
35	35-fache Vergrößerung	35	"
Foto	Dokum. d. Mikrohärtmessung	1,5	a
Foto Linie	Messlinie eingezeichnet		
...-inv.	Tabelle ist gespiegelt worden, da HV-Messung von Pulpa aus erfolgt ist. Somit alle Werte von der Schmelz-Dentin-Grenze ausgehend		
Auswertung:			
HV	Vickershärte		
T.Red	Texas-Red – Zeiss Filter-Set 00		
FITC	FITC - Zeiss Filter-Set 09		
M.R.	(Transversale) Mikroradiographie		
Plot....	Grauwertmessung mit ImageJ, immer von Karies zu Pulpa(entsprechend HV)		
Plot....f,r,mj	FITC, T.Red, Mikror.als jpeg		
f,r,mj/1000	In ImageJ errechneter Grauwert durch 1000 dividiert(Angleichung an HV-Werte für Grafik)		
v1	x-Werte für f/1000		
v4	x-Werte für r/1000		
v8	x-Werte für mj/1000		
v12	x-Werte für HV		

a = Stereomikroskop, Stemi SV 11 + Fuji F1 Pro (Fine Pix S1 Pro)

b = Durchlichtmikroskop Zeiss Axiphot + Sony 3CCD Color Video Camera

10.4.2 Tabelle Schnittdicken

Tabelle 13 Schnittdicken

Probe	Dicke in mm		Probe	Dicke in mm
1#	0,09		14#	0,09
1x	0,12		14x	0,15
2#	0,09		15#	0,09
2x	0,13		15x	0,15
3#	0,08		16#	0,09
3x	0,14		16x	0,15
4#	0,16		17#	0,15
4x	0,10		17x	0,18
5#	0,09		18#	0,21
5x	0,15		18x	0,15
6#	0,11		19#	0,16
6x	0,14		19x	0,15
7#	0,15		20#	0,14
7x	0,15		20x	0,14
8#	-----		21#	0,15
8x	0,16		21x	0,14
9#	0,12		22#	0,15
9x	0,15		22x	0,13
10#	0,07		23#	0,14
10x	0,15		23x	0,14
11#	0,13		24#	0,14
11x	0,15		24x	0,13
12#	0,13		25#	0,11
12x	0,13		25x	0,13
13#	0,15		27#	0,13
13x	0,14		27x	0,14

Die in der Untersuchung verwendeten Schnitte sind grau unterlegt

10 Anhang

10.4.3 Tabellarische Darstellung der Messergebnisse

Tabelle 14 Messwerte

Entfernung relevanter Messwerte (FITC, TR, ZT) von der S-D-Grenze*

Zone der Transluzenz (ZT) zu erkennen (chronische Karies)

Präparat	FITCmin-Wert	FITCmin bei:	TRmin-Wert	TRmin bei:	Beginn ZT	Ende ZT
	in µm		in µm		in µm	in µm
1#	51,2	833	45,4	839	720	932
4#	69,3	1560	41,0	1640	1504	1783
9x	53,0	540	25,4	570	503	733
11x	39,8	1231	20,6	1204	1168	1238
12#	22,1	1499	14,4	1559	1380	1716
13x	39,7	1066	29,0	1087	995	1285
16x	59,0	1581	25,9	1563	1487	1670
19x	47,2	1363	23,9	1339	1139	1711
21x	40,9	1340	22,9	1374	1294	1500
23#	24,9	182	13,9	199	108	256
24x	29,3	823	18,8	851	734	988
25#	37,2	1027	17,8	1055	948	1116
Durchschnitt°	42,8		24,9			

Histologische Veränderung ohne ZT (akute Karies)

Präparat	FITCmin-Wert	FITCmin bei:	TRmin-Wert	TRmin bei:	unverändertes Dentin ab:
	in µm		in µm		in µm
3#	25,6	2037	15,0	2197	2311
5x	55,3	1683	26,9	1784	1866
10x	24,1	1184	14,4	1044	930
18x	41,6	1979	15,8	2034	2044
22#	41,7	4210	19,3	4243	4276
Durchschnitt°	37,7		18,3		

Tabelle 14

Histologisch nicht beurteilbare Proben

Präparat	FITCmin-Wert	FITCmin bei:	TRmin-Wert	TRmin bei:
		in µm		in µm
8x	69,3	268	39,5	294
14x	51,8	2561	27,8	2568
20x	35,8	1830	20,8	1765
27#	70,9	308	28,1	313
Durchschnitt°	57,0		29,1	

Ges.Durchschnitt°	44,3		24,1	
-------------------	------	--	------	--

*Schmelz-Dentin-Grenze

°Berechnet wurde die durchschnittliche Entfernung ohne Berücksichtigung von Vorzeichen

Werte die auffällig von der Norm abweichen sind rot markiert!

Tabelle 15 Messwerte

Entfernung relevanter Messwerte (HV, MR, ZT) von der S-D-Grenze***Zone der Transluzenz (ZT) zu erkennen (chronische Karies)**

Präparat	HVmax-kariös	HVmax bei:	MRmax-Wert	MRmax bei:	Beginn ZT	Ende ZT
		in µm		in µm	in µm	in µm
1#	64,0	972	154,1	952	720	932
4#	88,7	1999	161,0	1801	1504	1783
9x	73,7	1436	148,1	1488	503	733
11x	68,1	1259	107,3	1286	1168	1238
12#	77,4	1768	130,2	1835	1380	1716
13x	77,8	1341	184,0	1433	995	1285
16x	83,8	1823	138,9	1758	1487	1670
19x	77,2	1774	119,2	1582	1139	1711
21x	89,0	1574	137,0	1647	1294	1500
23#	84,2	381	141,3	290	108	256
24x	92,6	1111	236,0	1091	734	988
25#	75,7	1212	125,3	1128	948	1116
Durchschnitt°	79,4		148,5			

10 Anhang

Tabelle 15

Histologische Veränderung ohne ZT (akute Karies)

Präparat	HVmax-kariös	HVmax bei:	MRmax-Wert	MRmax bei:	unverändertes Dentin ab:
		in µm		in µm	
3#	66,3	2493	134,8	2606	2311
5x	83,7	1936	126,0	1879	1866
10x	69,2	1082	123,4	215	930
18x	74,0	1161	93,9	2093	2044
22#	87,5	2689	214,8	4243	4276
Durchschnitt°	76,1		138,6		

Histologisch nicht beurteilbare Proben

Präparat	HVmax-kariös	HVmax bei:	MRmax-Wert	MRmax bei:
		in µm		in µm
8x	67,0	345	137,8	1629
14x	70,7	2661	187,9	2475
20x	81,5	1830	133	1888
27#	89,4	376	118,8	417
Durchschnitt°	77,2		144,4	

Ges.Durchschnitt°	78,2		145,4	
-------------------	------	--	-------	--

*Schmelz-Dentin-Grenze

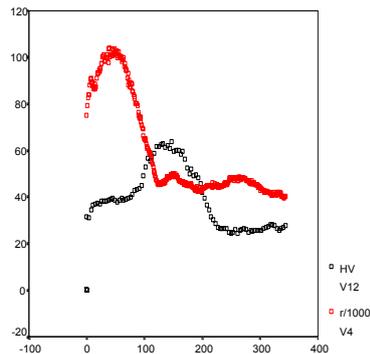
°Berechnet wurde die durchschnittliche Entfernung ohne Berücksichtigung von Vorzeichen

Werte die auffällig von der Norm abweichen sind rot markiert!

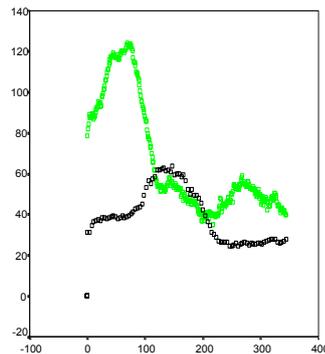
10.4.4 Graphische Darstellung der Messergebnisse

Graphische Darstellung (SPSS) der mit ImageJ errechneten Grauwerte bei QLF (T.Red- u. FITC-Filter) und mikroradiographischer (M.R.) Kariesdiagnostik im Vergleich mit der Vickershärte (HV).

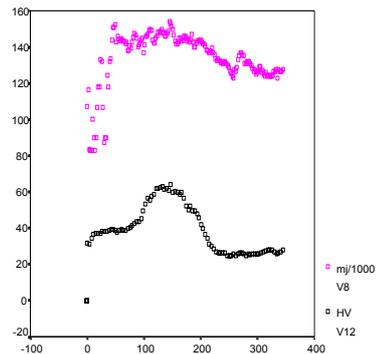
1# HV-T.Red



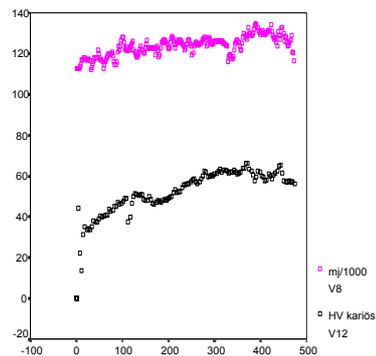
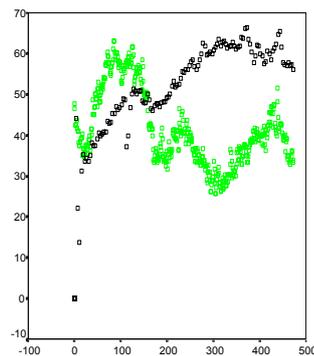
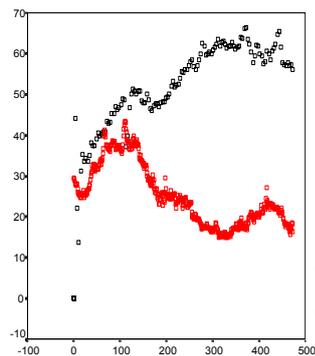
HV-FITC



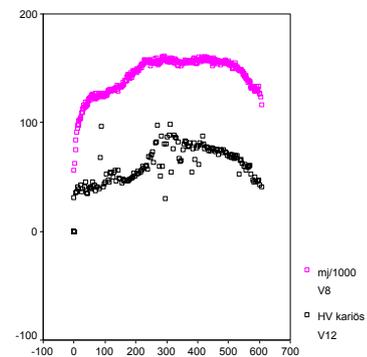
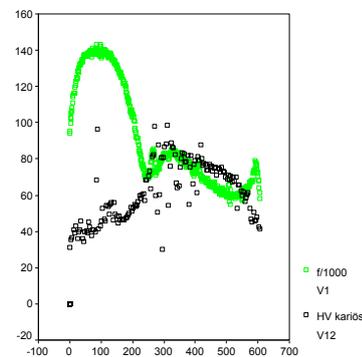
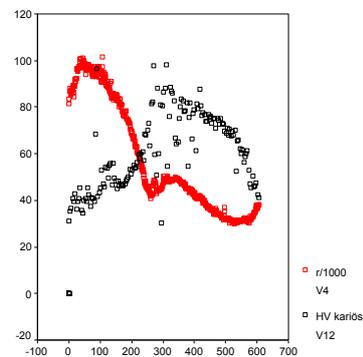
HV-M.R.



3#

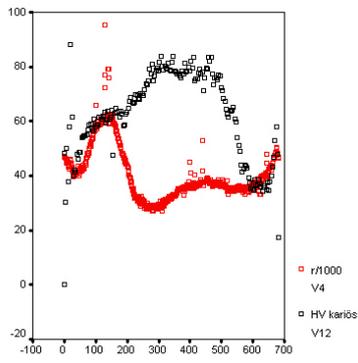


4#

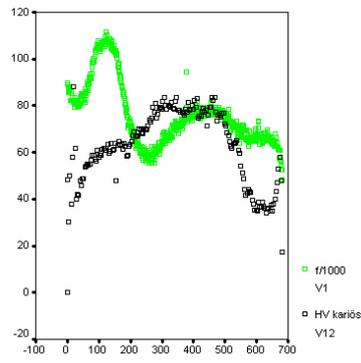


10 Anhang

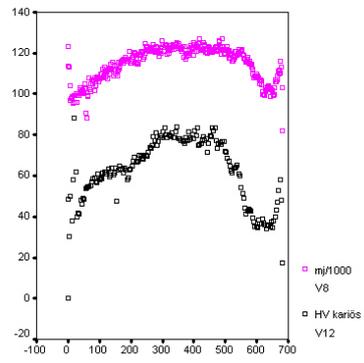
5x HV-T.Red



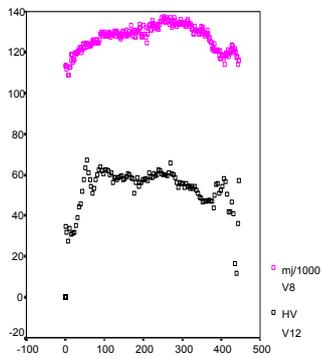
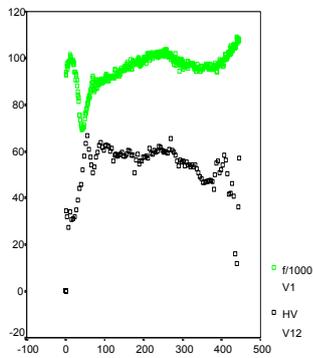
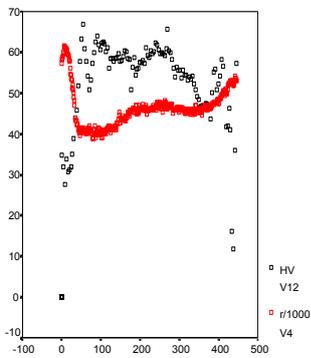
HV-FITC



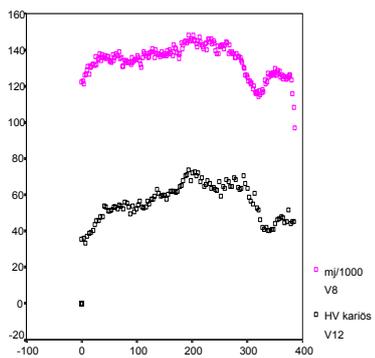
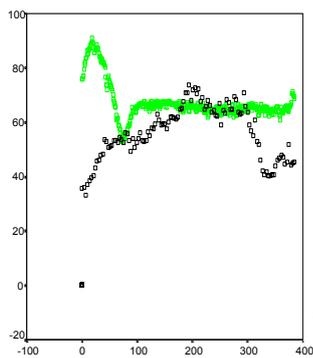
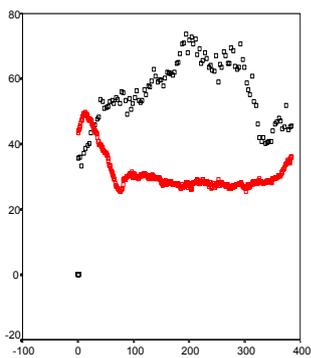
HV-M.R.



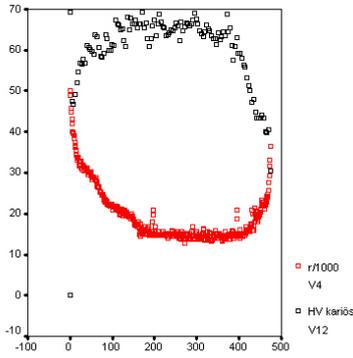
8x



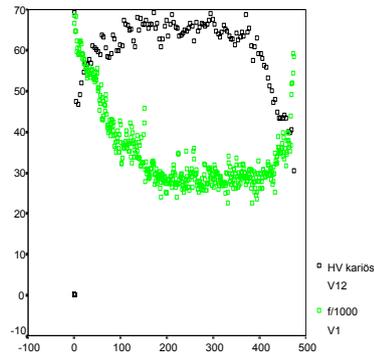
9x



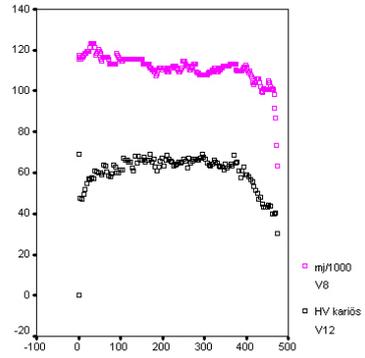
10# HV-T.Red



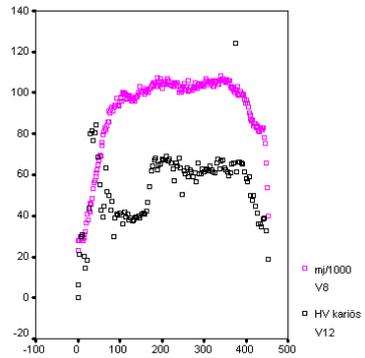
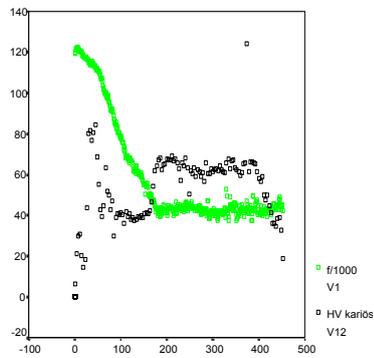
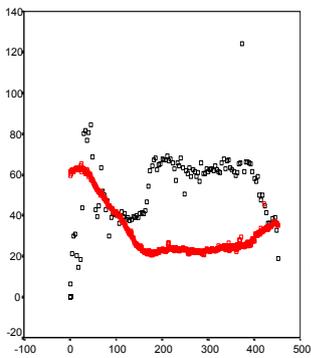
HV-FITC



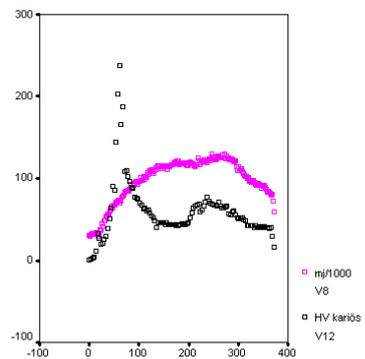
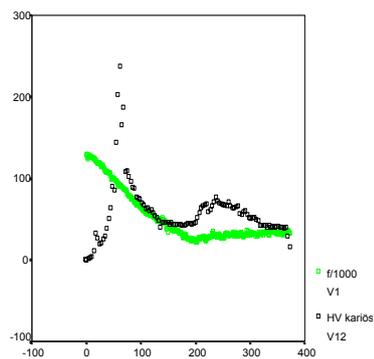
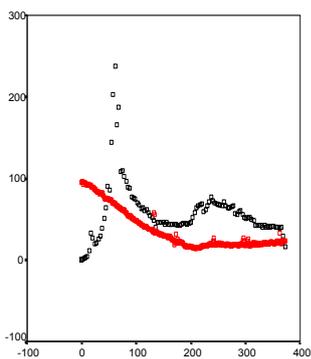
HV-M.R.



11x

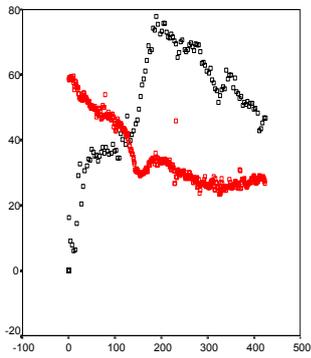


12#

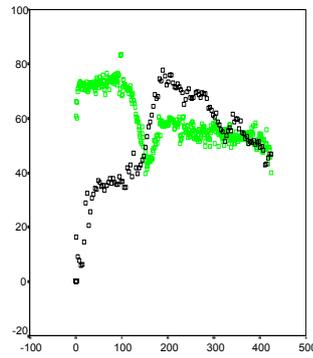


10 Anhang

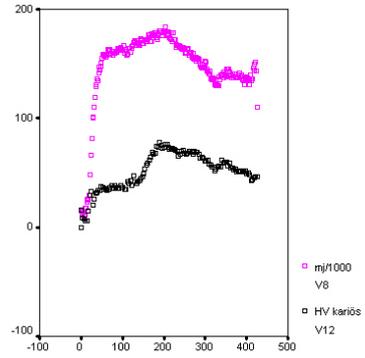
13x HV-T.Red



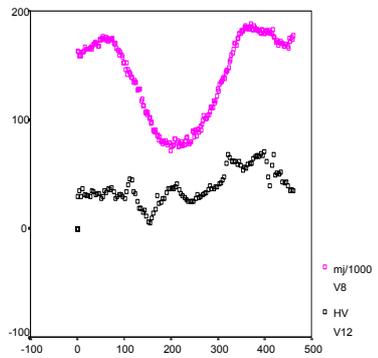
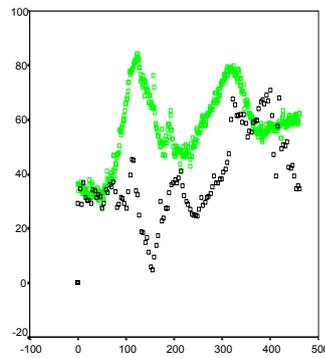
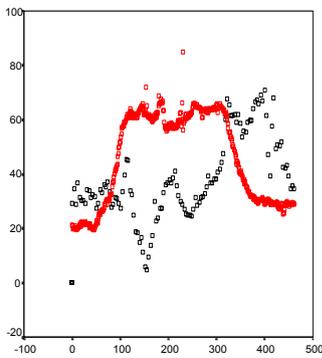
HV-FITC



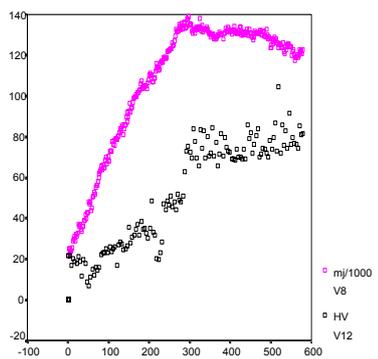
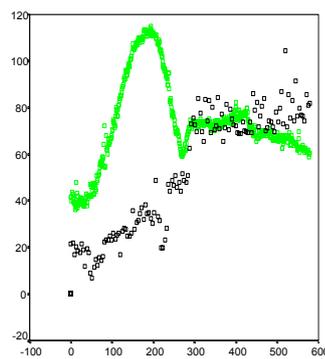
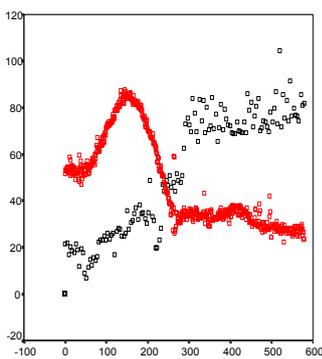
HV-M.R.



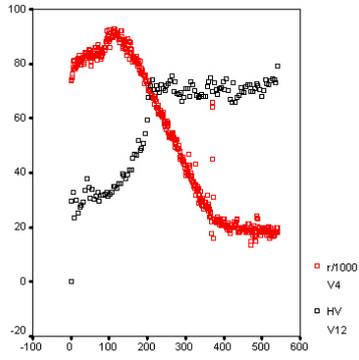
14x



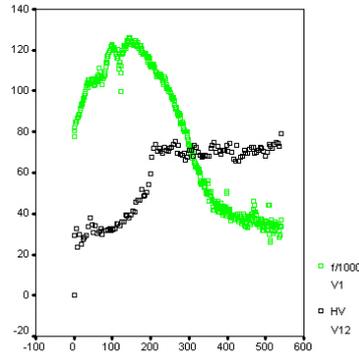
16x



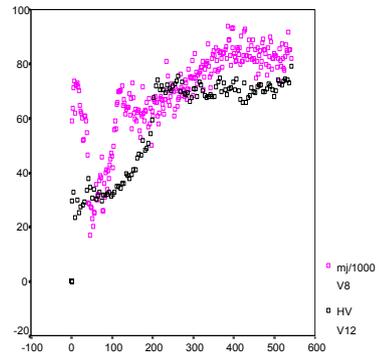
18x HV-T.Red



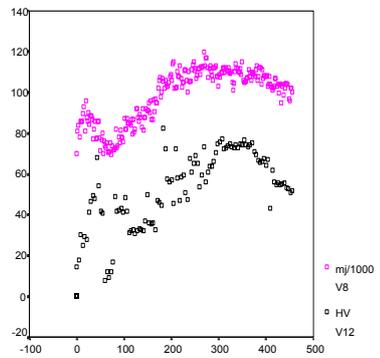
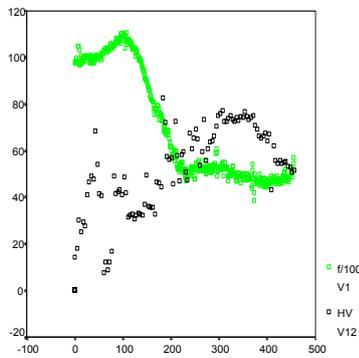
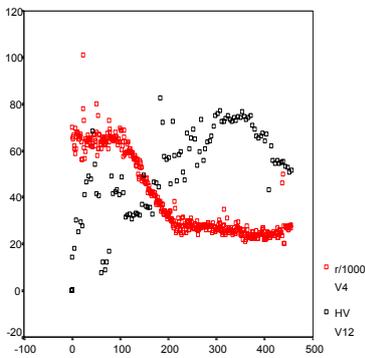
HV-FITC



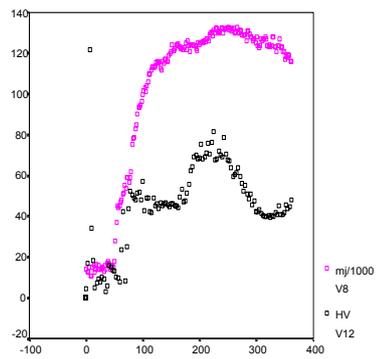
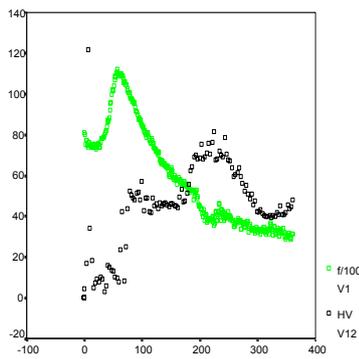
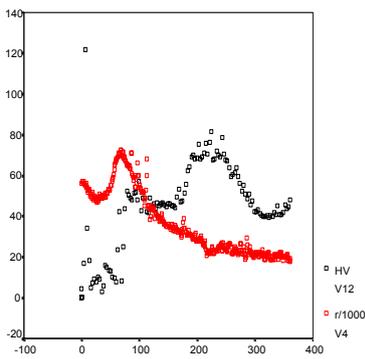
HV-M.R.



19x

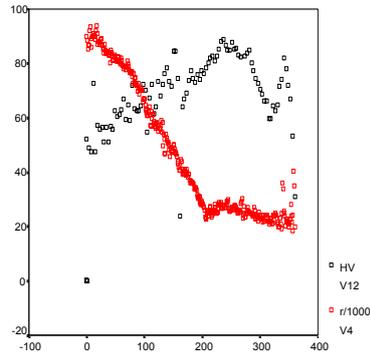


20x

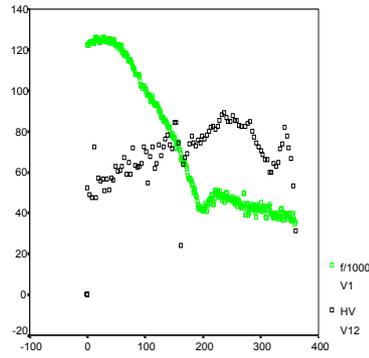


10 Anhang

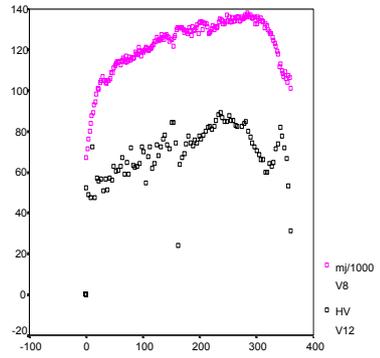
21x HV-T.Red



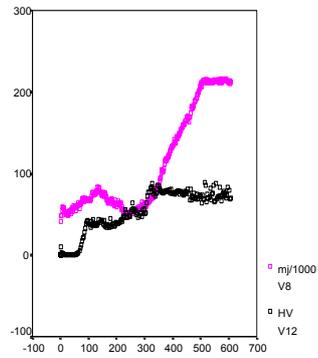
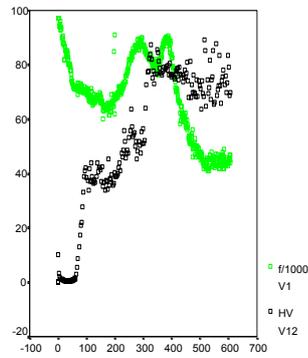
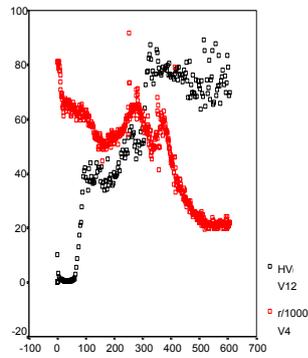
HV-FITC



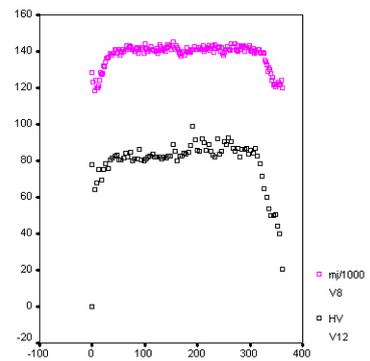
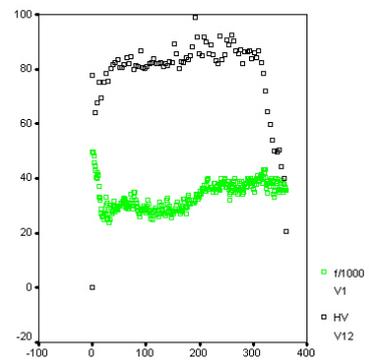
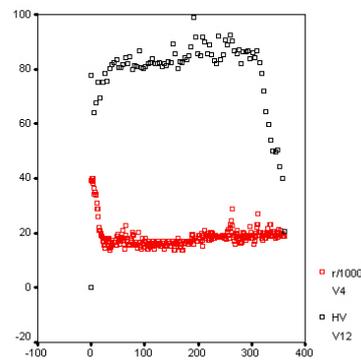
HV-M.R.



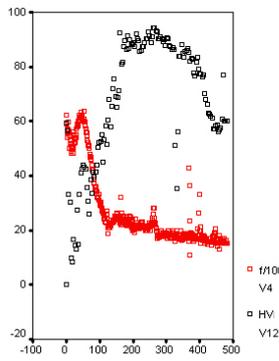
22#



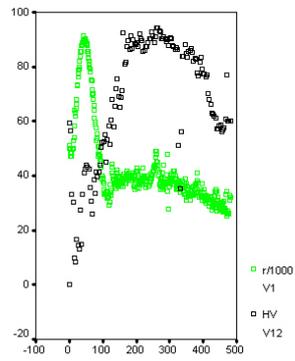
23#



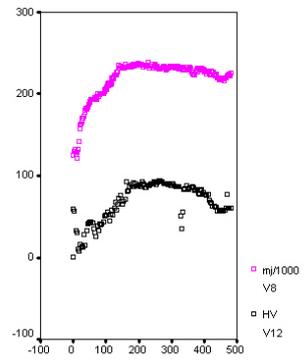
24x HV-T.Red



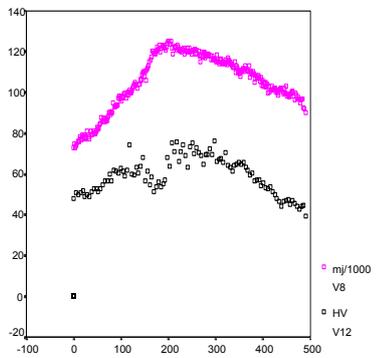
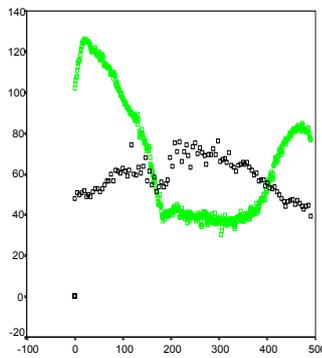
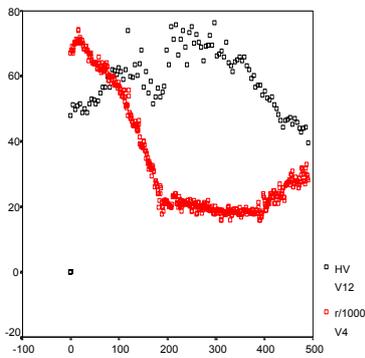
HV-FITC



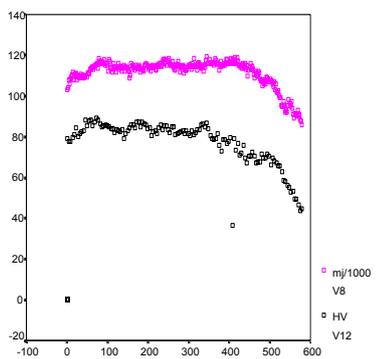
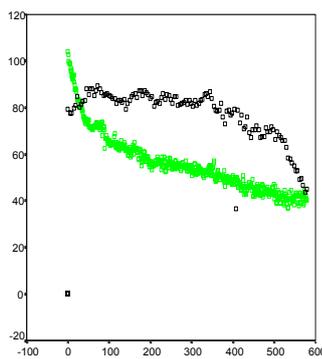
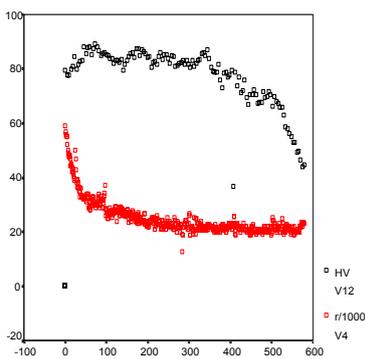
HV-M.R.



25#



27#



11 Danksagung

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K.-H. Kunzelmann für die Überlassung dieses interessanten und vielseitigen Themas, dessen Bearbeitung mir viel Freude bereitet hat, und für die intensive Unterstützung bei der Lösung verschiedener wissenschaftlicher Probleme.

Herrn Prof. Dr. R. Hickel danke ich dafür, dass er mir ermöglichte, diese Untersuchung an der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie durchzuführen. Herzlichen Dank an Frau Dipl.-Ing. N. Ilie für die immer vorhandene Hilfsbereitschaft sowie die Unterstützung bei wissenschaftlichen Fragen und technischen Schwierigkeiten.

Herrn Obermeier danke ich für die Lösung Computertechnischer Probleme sowie das Verleihen diverser Kameras.

Bei Herrn Dr. G. Hamm bedanke ich mich für die Hilfe bei der statistischen Auswertungen meiner Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. Benner möchte ich für die Ermöglichung der Untersuchungen mit dem Faxitron-Röntgengerät in der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München danken. Ebenfalls erwähnen möchte ich an dieser Stelle die Unterstützung durch Herrn Dr. Milz und insbesondere Frau Lippelt, die mir stets freundlich mit Rat und Tat zur Seite standen.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne die dieses Studium nicht ohne weiteres möglich gewesen wäre.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Vor- und Zuname: Florian Müller-Stahl

Geburtstag/-ort: 23.01.1978 / München

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Eltern: Andreas Müller-Stahl, Project Quality Manager
Erika Müller-Stahl, Ind.-Kauffrau

Ausbildung:

Schulbildung: 09/84 - 07/88 Grundschule Süd in Puchheim
09/88 - 07/97 Gymnasium in Puchheim
Schulabschluss: Abitur (Note 1,7)

Zivildienst: 07/97 - 12/97 Klinik Dr. Wolfart, Gräfelfing,
Stationsdienst
01/98 - 08/98 Klinik Dr. Wolfart, Gräfelfing,
Springertätigkeit im OP für endoskopische
Bauchchirurgie

Studium: 10/98 Studienbeginn an der LMU München
Studiengang: Zahnmedizin
10/99 naturwissenschaftliche zahnärztliche
Vorprüfung (Note 1)
04/01 zahnärztliche Vorprüfung (Note 2)
01/04 Staatsexamen Zahnmedizin (Note 2) und
Erhalt der Approbation

Fremdsprachen: Englisch, Französisch

Seit März 2004 als Vorbereitungsassistent in freier Praxis in München und Alt-
ötting tätig.