

**Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. R. Hickel

**Untersuchungen zur In situ-Plaquanlagerung an
Füllungswerkstoffen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Indra Nyamaa

aus

Ulan-Bator, Mongolei

2005

**Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. K.-H. Kunzelmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. I. Rudzki-Janson

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2005

INHALTVERZEICHNIS

1	Einleitung	6
	Geschichte, Entwicklung dentaler Füllungswerkstoffe	7
2	Literaturübersicht	11
2.1	Plaque	11
2.1.1	Struktur der Plaque	12
2.1.2	Wachstum der Plaque	13
2.1.3	Zeitliche Ablauf der Plaquebildung	13
2.1.4	Mikrobakterielle Zusammensetzung der Plaque	14
2.2	Stadien der Plaqueentwicklung	16
2.2.1	Die Bedeutung des Pellikels für die bakterielle Adhärenz	23
2.2.2	Karies	25
2.3	Untersuchungen zur Plaqueanlagerung	27
2.3.1	Grundprinzipien plaquehemmender Füllungswerkstoffe	27
2.3.2	Freisetzung von aktiven Bestandteilen	27
2.3.3	Gebundene antikariogene Bestandteile	29
2.3.4	Oberflächenenergetische Effekte	29
2.4	Methoden zur Untersuchungen in vivo gebildeter Plaque	31
3	Fragestellungen	35
4	Material und Methode	36
4.1	Testmaterialien	36
4.1.1	Das Schienendesign	39
4.1.2	Herstellung der Testkörper	40

4.1.3 Oberflächenbearbeitung	41
4.2 Parameter der Plaqueuntersuchungen	41
4.3 Plaquequantifizierung mit dem Corpus Programm	42
4.4 Plaquequantifizierung mit Image J Programm	43
4.5 Plaquequantifizierung mit Fluoreszenzfärbung	44
4.6 Plaqueentfernung	46
5 Ergebnisse	47
5.1 Vorversuch	47
5.2 Experimentelle Materialien	50
5.3 Kommerzielle Materialien	61
5.4 Fluoreszenz	69
6 Diskussion	72
6.1 Material und Methode	72
6.1.1 Einfluss der Positionen	75
6.1.2 Einfluss der Prüfarealen mit oder ohne Rand	75
6.1.3 Fluoreszenzfärbung	76
6.2 Ergebnisse	77
6.2.1 Experimentelle Materialien	77
6.2.2 Kommerzielle Materialien	79
6.2.3 Vergleich der experimentellen und kommerziellen Materialien	81
6.3 Fluoreszenzstudie	82
7 Schlussfolgerungen	84
8 Zusammenfassung	85
9 Literaturverzeichnis	88
10 Danksagung	99

1 Einleitung

Die aus der Plaqueanlagerung an die Zahnhartsubstanz und an die dentalen Werkstoffe resultierende Sekundärkaries ist heute eine häufige Ursache für den vorzeitigen Austausch von Füllungen (Friedl et al. 1995). Ein zahnärztlicher Werkstoff, der dieses Phänomen minimiert oder verhindert, wäre daher für die Gesunderhaltung des stomatognathen Systems und die daraus resultierende Kostendämpfung im Gesundheitswesen von entscheidender Bedeutung. Für die umfassende Beurteilung und Einführung eines neuen Füllungsmaterials, des Werkstoffes, ist eine Reihe von Untersuchungen unbedingt erforderlich. Dazu zählen Zytotoxizitäts- und Mutagenitätstests, werkstoffkundliche Grundlagenuntersuchungen, Tests zur quantitativen Bestimmung der Plaqueanlagerung *in vitro* und schließlich eine klinische Langzeitstudie. In den Publikationen der letzten zwei Jahrzehnte fehlen Versuchsansätze mit dem Ziel der Entwicklung eines funktionstüchtigen, plaqueabweisenden Dentalwerkstoffes für definitive Füllungen, was wohl letztendlich auch der Grund dafür ist, dass es nie zur Marktreife eines derartigen Werkstoffes kam.

Ziel des vorliegenden Forschungsprojektes war es, Plaqueabweisende, die Adhäsion von Bakterien hemmende Werkstoffe durch Zugabe von Polyalkenoat-Partikeln zu einem klassischen zahnärztlichen Komposit-Kunststoff zu entwickeln. Aufgabe meiner Dissertation ist die Bewertung der Plaqueanlagerung an verschiedenen experimentellen und kommerziellen Testwerkstoffen *in situ* und die Auswertung der Plaqueablösung durch Mundhygienemaßnahmen. Bestimmt wurde auch der Anteil an toten und lebendigen Bakterien mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes.

Aufgabe des Industriepartners (3M-ESPE) war es, Versuchswerkstoffe mit und ohne Zusatz verschiedener Polyalkenoatsalze herzustellen und ihre bakterien-

abweichende Wirkung zu untersuchen. Die unterschiedlichen Neutralisationsgrade der Polyalkenoatsalze bewirken unterschiedliche negative Oberflächenpotentiale. Durch Quirynen wurde eine Theorie entwickelt, dass durch die negativen Oberflächenpotentiale die Anlagerung von Bakterien in zahnärztlichen Werkstoffen verhindert werden kann.

Außer den experimentellen Materialien wurden auch kommerzielle Materialien als Vergleichsgruppe verwendet. In beiden Gruppen wurde Empress Keramik als Referenzmaterial benutzt. Die Versuche zur Plaqueanlagerung wurden an einer Gruppe von Studenten der Universität München (Zahnerhaltung und Parodontologie) durchgeführt. Die Plaquemenge wurde planimetrisch bestimmt.

Geschichte, Entwicklung dentaler Füllungswerkstoffe

Es gibt die Beobachtung, dass die Patienten, die den behandelnden Zahnarzt häufiger wechseln, mehr Restaurationen haben als Patienten, die seltener zum Zahnarzt gehen bzw. der selben Zahnarzt konsultieren (Sheiham et al. 1985). Dies wird darauf zurückgeführt, dass Füllungen unter der Annahme ersetzt werden, es läge Sekundärkaries vor, wobei die Indikation zur Erneuerung häufiger gestellt wird, wenn es sich um eine alio loco angefertigte Restauration handelt (Friedl 1995, Mjor 1992, Wilson 1997). Beim Austausch einer Füllung vergrößert sich die Ausdehnung der Restauration (Brantley et al. 1995). Größere Restaurationen wiederum haben im Vergleich zu kleineren Füllungen eine reduzierte Lebensdauer (Brantley et al. 1995). Die Rand-Karies beginnt häufig an einer natürlichen Schwachstelle des menschlichen Gebisses, den Approximalräumen. Der unzureichende Zugang dieser Bereiche für die Politur von Füllungsbereichen, sowie die schwierige Reinigung bei der täglichen Mundhygiene führen zu einer

vermehrten Anlagerung von Plaque und begünstigen das mikrobielle Wachstum, welches die Grundlage für die Kariogenese bildet.

In den vergangenen 50 Jahren wurde eine ganze Reihe verschiedenartiger Komposite als Restaurationsmaterial entwickelt.

Im Jahre 1935 wurde der polymerisierte Methacrylsäuremethylester in die Zahnheilkunde als Prothesenmaterial, danach als zahnfarbener Verblendkunststoff für Kronen- und Brückengerüste eingeführt. Es folgten rasch Versuche, das gleiche Pulver für die Füllungstherapie zu nutzen.

Im Jahre 1941 wurden erste Erfahrung mit selbsthärtenden Acrylat-Kunststoffen zum Füllen von Kavitäten berichtet.

Im Jahre 1956 prüfte Bowen handelsübliche Epoxidharze, insbesondere den Diglycidylester des Bisphenol-A. Die hohe Empfindlichkeit der Epoxidharze gegenüber Feuchtigkeit sowie deren vergleichsweise Langandauernde Härungszeit ließen es nur zu, im Labor Einlagefüllungen zu erstellen. Bowen benutzte eine Mischung aus Bisphenol-A-Diglycidylester mit Silikatpulver, die durch Erwärmung härtete. 1962 wurde erstmals das bekannteste Bisphenol-A-Derivat (Bis-GMA) in Dentalmaterialien beschrieben, das auch Bowen-Monomer genannt wird. Er war auch der erste, der oberflächenmodifizierte Glasfüller zur Verstärkung von Kunststoffen einsetzte und somit der ersten Komposite nach aktuellem Verständnis beschrieb.

In der Ära der bahnbrechenden Arbeiten von Bowen wurden lediglich Pulver/Flüssigkeits-Produkte auf PMMA/MMA-Basis angewendet. Die von Bowen beschriebenen Komposite-Materialien wiesen aufgrund der für heutige Verhältnisse grobkörnigen Füllstoffe nur eine unzureichende Polierbarkeit auf. Durch den Einsatz von Mikrofüllern war ab 1968 dann auch die Hochglanzpolitur von gefüllten Systemen möglich und damit auch eine Anwendung im ästhetisch anspruchsvollen zahnärztlichen Umfeld.

Neben der Autopolymerisation etablierte sich ab 1971 die Härtung von Kunststoffen mittels elektromagnetischer Strahlung. Zunächst war die Strahlungshärtung konzipiert, einen Versiegelungskunststoff mittels ultravioletten Lichts zu polymerisieren (Buonocore 1970).

Weitere entscheidende Entwicklungssprünge gab es durch die Einführung der Lichthärtung-zunächst mit UV-Licht wobei hier aufgrund der stark eingeschränkten Polymerisationstiefe nie der Durchbruch erfolgte. Ab 1977 wurden die ersten mit sichtbarem Licht polymerisierenden Dentalwerkstoffe eingeführt.

Die Tabelle 1 bietet eine Übersicht über typischen historischen Vertreter der unterschiedlichen Werkstoffklassen.

Autopolymerisate:	SR Ivocron PE (Ivoclar)	1970	Pulver/Flüssigkeit
Heißpolimerisate:	Biodent K+B Paste (DeTrey)	1979	Pulver/Flüssigkeit
	Biodent K+B Paste (DeTrey)	1990	Paste
	SR Chromasit (Ivoclar)	1992	Paste
Lichtpolymerisate:	Dentacolor (Kulzer)	1982	Paste
	Visio Gem (ESPE)	1983	Paste

Tab.1 Typische historische Vertreter unterschiedlicher Werkstoffklassen

Nach Produkten auf MMA- und Bis-GMA-Basis, die zunächst auto- und heißpolymerisierend waren, kamen ab 1982 die ersten lichthärtenden Mikrofüllerkompositen für die zahntechnische Verblendtechnik auf den Markt. Diese zeichneten sich gegenüber MMA-Produkten durch die deutlich erhöhte Abrasions- und Farbstabilität, sowie verbesserte Werkstoffeigenschaften aus.

Gegenüber heißhärtenden Materialien ermöglichen die modernen lichthärtenden Verblendwerkstoffe eine einfachere und effizientere Verarbeitung. Durch den mikrofeinen Füllstoff mit Primärteilchen im Bereich $<0.05\mu\text{m}$, üblicherweise in Form von Splitterpolymerisat oder Agglomeraten, ist die erforderliche Hochglanzpolitur möglich.

Als direkte Kompositefüllungsmaterialien werden bereits seit geraumer Zeit sogenannte Hybrid-Komposite eingesetzt, die neben „Mikrofüllern“ auch „Makrofüller“ enthalten, letztere in der Regel mit Teilchendurchmessern $<10\mu\text{m}$. Aufgrund der im Vergleich zu reinen Mikrofüllerkompositen günstigeren rheologischen Eigenschaften (Fließverhalten) waren hierdurch erhöhte Füllstoffgehalte und somit nochmals verbesserte Werkstoffeigenschaften bei nur geringeren Abstrichen bezüglich der Oberflächenqualität realisierbar.

Für die Verblendtechnik und Frontzahnfüllungen war diese Hybrid-Komposite allerdings mangels Hochglanzpolierbarkeit nicht geeignet. Erst in jüngster Zeit ist es durch optimierte Mahlverfahren gelungen, auch „Makrofüller“ mit mittleren Teilchengrößen von ca. $0.5-0.6\mu\text{m}$ herzustellen. Die daraus gewonnenen Komposite werden in der deutschsprachigen Literatur am besten als Feinstpartikel-Hybride bzw. Feinstpartikel-Komposite bezeichnet. Unabhängig von firmen-spezifischen Marketingbezeichnung sind alle Verblendwerkstoffe der neuen Generation solche Feinstpartikel-Komposite.

2 Literaturübersicht

2.1 Plaque

Schon 1683 beschrieb *Anthony Van Leeuwenhoek* (zit. Nach Dobell 1960) einen weißlichen Belag zwischen seinen Zähnen, der trotz gründlicher Mundhygiene immer wieder auftrat. Bei der Betrachtung dieses Belages unter den damals zur Verfügung stehenden Vergrößerungsgläsern kam er zu dem Schluss, dass dieser Belag von „lebenden Tierchen in unvorstellbar großer Menge gebildet wurde“. Sein Bericht, den er mit Zeichnungen der „Tierchen“ versah, wies somit als einer der ersten auf die Existenz von Bakterien in der Mundhöhle hin, ohne sie als solche zu bezeichnen (Diss. Kistler 1999).

Nachdem Robert Koch 1881 die Bakteriologie durch die Einführung von Färbemethoden und Nährbodentechnik revolutionierte, konnte auch über die Mikroflora der Mundhöhle wissenschaftliche Aussagen getroffen werden. So fand der Zahnarzt *Miller* (1853-1907) heraus, dass der Zahnbelag von einer Vielzahl von Bakterienarten durchsetzt ist (Miller 1973). Dieser fand jedoch keinen Einzelerreger, der für die Erkrankung des Zahnfleisches verantwortlich war, eine Entdeckung, die noch heute Gültigkeit hat.

Plaque ist definiert als weicher, variabel dicker, weiß bis gelblicher, sub- und supra-gingivaler Biofilm, der sich mit einem Wasserstrahl nicht entfernen lässt. Plaque ist das Produkt bakterieller Kolonisation und Proliferation und ist deshalb histologisch strukturiert. Plaque besteht zu 80-90% aus Wasser. Bakterien machen 70% des Trockengewichtes aus, der Rest ist eine Matrix aus Polysacchariden und Proteinen aus der Mundflüssigkeit. Extrazelluläre Polymere aus Glucose (Glucan mit vorwiegend 1.6- α -Bindungen) werden durch bakterielle Enzyme (Glycosil- resp. Fructosyltransferasen) aus zuckerhaltigen Nahrungsmitteln gewonnen (Marsh

1995). Einige dieser Polymere sind wasserunlöslich und bilden einen wesentlichen Teil der Plauearchitektur.

2.1.1 Struktur der Plaque

Die Zähne bieten den Bakterien im menschlichen Körper einen einzigartigen Standort. Während auf den Schleimhäuten durch die kontinuierliche Absonderung der obersten Zellschichten Bakterien laufend dezimiert werden, können sich auf Zahnoberflächen große Massen von Bakterien und deren Stoffwechselprodukten ansammeln. Plaque akkumuliert sich vor allem in Mikroretentionsstellen des Schmelzes wie Einsenkungen der Perykymatien und Haarrissen in der Schmelzoberfläche (*Glattflächenplaque*), in Fissuren der Okklusionsflächen von Prämolaren und Molaren (*Fissurenplaque*) und am Gingivarand (*marginale, supra- und subgingival auftretende Plaque*). Subgingivale Plaque ist charakterisiert durch eine relativ dünne Schicht adhärenter, senkrecht zur Zahnoberfläche angeordneter grampositiven, gramnegativen Stäbchen und Filamente. Dazwischen finden sich häufig grampositiven und gramnegativen Kokken (Marsh 1995). Die Fissurenplaque ist strukturell wenig organisiert und enthält initial neben Nahrungsrückständen vor allem grampositiven Kokken, meist Streptokokken, kurze Stäbchen und Hefezellen (Theilade 1974). Mit der Ausnahme von *Veillonella* spp. finden sich in Fissuren sehr selten obligat anaerobe Bakterien (Theilade 1982). Bei den heutigen Eßgewohnheiten und einer ungenügenden Mundhygiene können bis zu 100 µm, in Approximalräumen sogar bis zu 1 mm dicke geschlossene Zellrasen mit 10^8 Bakterien pro mg Nassgewicht entstehen. Die bakterielle Zusammensetzung und die Struktur der Plaque variieren je nach Alter und Lokalisation.

2.1.2 Wachstum der Plaque

Auf den gereinigten Zahnoberflächen bildet sich innerhalb in wenigen Minuten ein azellulärer Film (Pellikel). Innerhalb von 2 Stunden nach Zahnreinigung überzieht ein Biofilm-Pellikel an die Zahnoberflächen. Das Pellikel ist im Allgemeinen weniger als 1 µm dicke, azelluläre Schicht, die sich aus Speichelbestandteilen, Sulcusfluid und Bakterienprodukten zusammensetzt und weitgehend bakterienfrei ist (De Jong 1984, Gibbons 1989, Lie 1979). Glykoproteine, Phosphorproteinen und Lipiden aus Speichel und der Sulkussflüssigkeit bilden die Hauptbestandteile des Pellikels. Die frühe Plaqueflora besteht meistens aus Streptokokken (bzw. *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* biovar). In geringer Menge findet *Streptococcus salivarius* in der Plaqueflora. Diese Bakterien weisen auf die Selektivität bei der beginnenden Plaquebildung hin. Ob nur diese Selektivitäten tatsächlich für die spätere Plaquekolonisation verantwortlich ist, ist bis jetzt noch nicht bewiesen (De Jong 1984, Gibbons 1989, Lie 1979). In der früheren Phasen der Plaquebildung befinden sich weniger lebendige Bakterien als in einer späteren Phasen nach 24 h (Weiger et al. 1997). Die Bakterienkolonisation wird durch elektrostatische Anziehung zwischen Calcium-Ionen und Phosphatgruppen am Zahnschmelz bzw. entgegengesetzten Ladungen auf den Speichel makromolekülen initiiert (Lie 1979). Alle Strukturen in der Mundhöhle werden vom Pellikel bedeckt, auch Schleimhäute und zahnärztliche Restaurationen (De Jong 1984, Lehmann 1991).

2.1.3 Zeitlicher Ablauf der Plaquebildung

Nach der Zahnreinigung werden diese innerhalb kürzester Zeit wieder vom Pellikel überzogen. Neben dem Pellikel in ersten 4 Stunden findet man nur geringe Mengen

Kokken. Erst nach 4 h lässt sich eine steigende Zahl von Mikroorganismen feststellen (Brecx et al. 1983, Bussher et al. 1991, Müller et al. 1988, Rammelsberg et al. 1993, Sokransky et al. 1977). Zuerst im Bereich des Gingivalsaums bildet sich die Plaque auf den Zähnen und breitet sich von dort ausgehend auf die Zahnflächen, auf die Gingiva und nach subgingival aus (Bergström 1985, Quirynen 1989). Mit der Wachstumsphase verändert sich auch Zusammensetzung des hauptsächlich aus Kokken bestehenden Bakterienrasens. Eine steigende Zahl an Stäbchen und Filamenten, später auch Spirocheten und Spirillen erscheint im weiteren Verlauf (Busscher 1991, Lie 1977, Theilade 1982). Durch ein weiteres Wachstum ändern sich auch die Sauerstoffbedingungen der Plaque. So kommen fakultativ anaerobe Mikroorganismen hinzu und nach 9 Tagen überwiegen anaerobe und fakultativ anaerobe Mikroorganismen (Ritz 1967).

Die so genannten Maiskolbenstrukturen können erst nach ca. 24 h gefunden werden. Die durchschnittliche Teilungsdauer der Bakterien innerhalb der ersten 24 h liegt bei 1-4 h, sie nimmt mit dem Altern der Plaque zu (Busscher 1991). Die Plaquemenge in der frühen Phase der ersten 4 Tage steigt nicht linear sondern exponentiell an (Quirynen 1989). Auch stellt man in den ersten 24 h ein relativ geringes Wachstum fest, welches in den Nachtperioden nochmals um ca. 50% abnimmt, da der Speichelfluss, welcher die Hauptsubstratquelle darstellt, in der Nacht zurückgeht. Voll ausgereifte supragingivale Plaque ist erst nach 48 h zu erwarten (Lie 1977).

2.1.4 Mikrobakterielle Zusammensetzung der Plaque

Die Gesamtheit der oralen Mikroorganismen beträgt mehr als 300 Arten (Listgarten 1987). Von diesen werden ungefähr 30 regelmäßig beobachtet und zählen zum Hauptanteil der kultivierbaren Stämme. Bestimmte Formen plaquebedingter,

parodontaler Veränderungen werden durch eine unspezifische Bakterienanhäufung verursacht. Die Menge der lokal akkumulierenden Bakterien ist dafür verantwortlich. Die Entwicklung der Zahnplaque auf einer gereinigten Zahnfläche erfolgt nach einem seit Jahren bekannten Muster (König 1987).

Die frühe Plaqueflora besteht aus oralen Streptokokken, besonders *Streptococcus mitis* biovar (Nyvad 1990). Streptokokken in beginnender Plaque befindet sich sowohl auf Schmelz, als auch auf Wurzeloberflächen. Dies gilt für kariesaktive und für kariesinaktive Personen (Nyvad 1990). *Streptococcus salivarius* findet man als einen, der häufigsten, im Speichel vorkommenden Mikroorganismen nur in geringer Menge in der Plaqueflora. Dies deutet erneuert auf die Selektivität bei der beginnenden Plaquebildung hin. Ob diese Selektionsmechanismen tatsächlich für die spätere Plaquezusammensetzung verantwortlich ist, ist noch nicht bewiesen (Macpherson 1991).

Etablierte Plaque besteht aus dick gepackten Bakterien (60-70%), die in eine amorphe Plaquematrix eingebettet sind. In diese Plaque findet man eine teilweise extrem unterschiedliche bakterielle Zusammensetzung (Bowden 1978). Unterschiedliche Plaquezusammensetzung nimmt erheblichen Einfluss auf den Metabolismus und die Diffusionsmöglichkeiten in der Plaque. Bei Personen ohne Karies findet man in Fissuren nach 7 Tagen erste grampositive Kokken und Stäbchen und nur wenige gramnegative Kokken (Theilade 19982).

Hauptquelle für die Bakterien sind Nährstoffe aus Speichel, z.B. Aminosäuren, Peptide, Proteine und Glykoproteine (Schiffner1997).

2.2 Stadien der Plaqueentwicklung

Die Literatur berichtet über zahlreiche Plaque-Modelle, die eine Betrachtung der Gesamtvorgänge aus der Sicht verschiedener wissenschaftlicher Fachdisziplinen beschreiben. Neben den publizierten biologischen, biochemischen und physiologischen Modellen, werden auch thermodynamisch-physikalische Modelle beschrieben, die als Grundlage der vorliegenden Studie herangezogen wurden (Quirynen et al. 1995, Busscher 1997).

Klassische Studien haben die Bakterienanlagerung in zwei Stufen unterteilt: Die zunächst reversible Anlagerung, die als willkürliche Anziehung von Mikroorganismen an Oberflächen betrachtet wird, gefolgt von einer irreversiblen, spezifische biologische Reaktion, voraussetzenden Adsorption, welche eine feste Adhäsion der Mikroorganismen auf der Oberfläche ermöglicht (Miller 1973).

Quirynen (1995) verweist zu recht darauf, dass bis heute keine einheitliche Theorie entwickelt wurde, die den fundamentalen Mechanismus der Zelladhäsion erklären kann. So stützt sich auch sein Modell lediglich auf Ansätze, die sich der Wahrheit annähern (Busscher et al. 1990, Van Loosdrecht et al. 1989, Krekeler et al. 1989)

Das Modell von Quirynen unterscheidet den Ablauf der Plaqueentwicklung in 4 Phasen:

1. Transport der Mikroorganismen zur Oberfläche
2. Initiale Adhäsion
3. Anlagerung an die Oberfläche
4. Kolonialisierung

Phase 1: Transport

Der Transport der Bakterienzelle zur Oberflächen entsteht zufällig durch die Braunsche Bewegung (ca. 40 $\mu\text{m/h}$) oder durch Konvektion im Flüssigkeitsstrom. Eine zielgerichtete, aktive Bewegung infolge von Chemotaxis unterstützt diesen Prozess.

Phase 2: Initiale Adhäsion

In diesem Stadium erfolgt die erste Interaktion zwischen einer Oberfläche und dem einzelnen Mikroorganismus. Diese Interaktionen sind zu schwach, um eine feste Verbindung zu gewährleisten. Wechselseitige Kräfte über eine Entfernung von 50 nm werden dabei als weitreichende Kräfte (long range forces) bezeichnet. Die Kräfte, die unter dieser Entfernung wirken, als nahe Kräfte (short range forces).

Long range forces:

Zu den weitreichenden Kräften zählen die Dipol-Induktion durch Van-der-Waals-Kräfte G_a (London-Dispersion, Debye-Interaktion, Keesom-Interaktion) sowie die elektrostatischen Kräften G_e .

Partikel mit elektrostatischen Ladungsschwerpunkten werden in einer Lösung diffus von entgegengesetzt geladenen Teilchen zu Doppel- oder Sternschichten umhüllt und damit elektrisch neutralisiert. Überlappen sich aber die Hüllen von entgegengesetzt geladenen Oberflächen, so wirken elektrostatische Anziehungskräfte. Die Energie dieser elektrischen Interaktion ergibt sich aus dem Zeta-Potential der Oberflächen, die miteinander in Wechselwirkung treten (Rutter und Vincent 1984). Die Distanz, in der diese Kräfte wirken können, ist abhängig von dem Dicken der Doppelschichten, der ionischen Ladung der Oberflächen sowie der

Ionenkonzentration der umgebenden Lösung. Die totale Energie der elektrischen Bindungskräfte (Gibbsche Energie) definiert sich als Summe von Van-der-Waals Kräften sowie elektrostatischen Kräften ($G_{\text{tot}}=G_a+G_e$), und kann als Funktion des Abstandes dargestellt werden (Abb.1). Bei den Energieminima von G_{tot} überschreiten die anziehenden Kräfte die abstoßenden und eine Adhäsion ist möglich. Erreichen die geladen Teilchen dabei den Bereich eines primären Maximums wird eine irreversible, im Bereich des sekundären Maximums lediglich eine reversible Adhäsion erzielt.

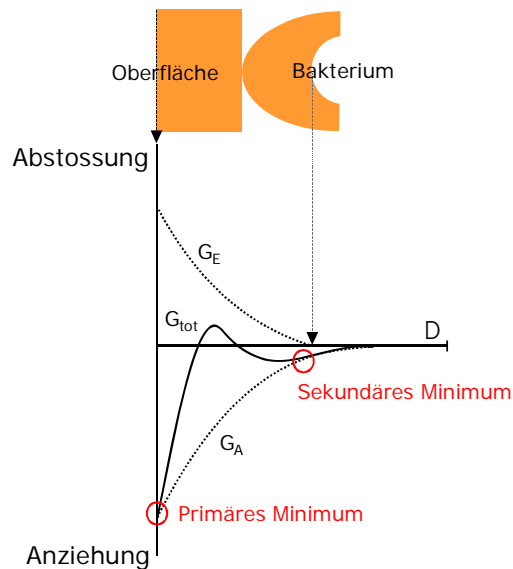


Abb.1 Model der totalen Energie elektrischer Bindungskräfte als Funktion des Abstandes (nach Quiryne und Bollen 1995)

In natura liegen Bakterien und Oberflächen vorwiegend negativ geladen vor. Bei einer mittleren Ionenkonzentration, wie sie z.B. im Speichel gegeben, wird das sekundäre Minimum im Abstand von 5-10 nm erreicht (Van Loosdrech und Zehnder 1990), in der sich Bakterien reversibel an eine Oberfläche anlagern

können. Die wirkenden Kräfte sind dabei jedoch relativ schwach, so dass bereits die Brownsche Eigenbewegung der Bakterien ausreicht, die Adhäsion wieder zu lösen. Das stabile, primäre Minimum erreichen Bakterien aufgrund ihrer Größe bei mittleren Ionenkonzentrationen nicht.

Short Range Forces

Erreicht ein Partikel das primäre Energieminimum (<2nm Abstand zur Oberfläche) werden eine Reihe von nahen Kräften wirksam (Wasserstoffbrücken, Ionen-Paar-Bindungen, sterische Interaktionen u.a). Diese dominieren in der Adhäsion und bestimmen die Stärke der Adhäsionskraft. Die Änderung der Gibbschen Energie G_{tot} aufgrund der Adhäsion der Bakterien wurde gemäß der Formel

$\Delta G_{\text{adh}} = Y_{\text{sb}} - Y_{\text{sl}} - Y_{\text{bl}}$ (Ablosom et al. 1983, Bellon-Fonaine et al. 1990) beschrieben, in der die freie Energie im Interface zwischen Bakterium und Festkörper (Y_{sb}), der freien Energie im Interface Festkörper-Flüssigkeit (Y_{sl}) und der freien Energie im Interface Bakterium-Flüssigkeit (Y_{bl}) entspricht. Nimmt ΔG_{adh} dabei negative Werte an, ist die Adhäsion thermodynamisch vorteilhaft und erfolgt spontan.

Zwar vermögen Bakterien selbst nur eine reversible Adhärenz im sekundären Energieminimum erreichen, so gelingt es ihnen dennoch die Distanz zur Oberfläche mit Hilfe von Fortsätzen (Fimbriae, Fibillen etc.) zu überbrücken, unter der Voraussetzung, dass die Energiebarriere dieses zulässt. Da die Radien dieser Fortsätze sehr viel kleiner als die Mikroorganismen selbst sind, verringern sich die vom Radius determinierten Abstoßungskräfte, während die anziehenden Van-der-Waals-Kräfte konstant bleiben. Auf diese Weise wird für diese Strukturen die Höhe der Energiebarriere gemindert und eine irreversible Adhärenz im primären Energieminimum ermöglicht (Quiryne und Bollen 1995)

Phase 3: Anlagerung an die Oberfläche

Im Anschluss an die initiale Adhäsion wird die Verbindung der Bakterien zur Oberfläche durch spezifische Bindungen (Ionen-Bindung, kovalente Bindungen, Wasserstoffbrücken u.a.), durch direkten Kontakt oder durch extrazelluläre Filamente (bis zu einer Länge von 10 nm) verstärkt. Diese Bindungen werden von extrazellulären Proteinen der Bakterienwand (Adhäsine) vermittelt, die an komplementären Strukturkomplexen (z.B. Pellikel-Mucopolysaccharide) ankoppeln, wobei spezies-spezifisch unterschiedliche Bindungen ausgebildet werden (Van Houte 1983, Gibbons 1980, 1984). Die rezeptorvermittelten Interaktionen von Bakterien zum Pellikel waren in der Vergangenheit Gegenstand intensiver Forschung und zahlreiche Bindungsmechanismen wurden mit Hilfe biochemischer Methoden identifiziert (Lie 1978, Hasty et al. 1992, Kolenbrander und London 1993, Scannapieco 1994, Hannig 1994, Banas et al. 2001). Darüber hinaus wurden Methoden beschrieben, mittels spektralanalytischer und gentechnischer Verfahren die Primärstrukturen einzelner Bakterienadhäsine zu entschlüsseln (Glushka et al. 1992, Ganeshkumar et al. 1991).

Häufig handelt es sich bei den bakteriellen Adhäsinen um Lectine, die an Polysaccharidrezeptoren ankoppeln, andere Adhäsine gehen Bindungen zu Proteinrezeptoren ein (Ellen 1985, Gibbons 1989). Eine wichtige Rolle spielen in diesem Zusammenhang die prolin-reichen Speichelproteine PRPs, die im Pellikel an die Zahnoberflächen adsorbiert sind (Gibbons und Hay 1988, Kolenbrander und London 1993). Durch die Adsorption erhalten diese Proteine eine Konformationsänderung, die sie von den ungebundenen Proteinen strukturell unterscheidet. Erst diese strukturelle Änderung ermöglicht einigen Bakterien-spezies (z.B. *A. vitiosus*) eine spezifische Bindung. Proteine, die als verborgene Rezeptoren zu bakteriellen Adhäsionen funktionieren können, sog. Kryptotypen,

liefern zudem eine mögliche Erklärung, für die hoch-spezifische Assoziation mancher Bakterienspezies für bestimmte Gewebetypen, speziell für die Zahnhartsubstanzen.

Phase 4: Die Kolonialisierung

Erst nachdem eine feste Verbindung von Mikroorganismen und einer Oberfläche geschaffen wurde, kann eine Besiedlung durch Wachstum und Zellteilung erfolgen. Nicht alle Bakterienarten konkurrieren dabei um primäre Bindungsstellen zur Oberfläche. Viele Spezies (late colonizers) nutzen die Ausbildung einer frühen oberflächlichen Koadhäsion (Kolenbrander und London 1992, 1993, Scannapieco 1994).

Bei den frühen Kolonisten handelt es sich überwiegend um Streptokokken, die 4 h nach einer Zahnreinigung 47 - 85% der kultivierbaren Zellen ausmachen. Nach 12 h beinhaltet die mikrobielle Flora bereits Actinomyceten, Capnocytophagen, Hämophile, Prevotellen, Propionobakterien und Veillonellen (Kohlenbrander und London 1993). Die Adhäsine der Koaggregation sind überwiegend Lectine, deren Bindungen durch die Zugabe einfacher Zucker-Moleküle (Galactose, Galactoside), kompetitiv reversibel sind (Kolenbrander und London 1992). Wegen der dominierenden Bedeutung der Lectine, wird bei der Koaggregation lediglich in lectinische und non-lectinische Adhäsine differenziert. Vor und während der Kolonialisierungsphase kommt den Bestandteilen des Speichels eine Vermittlerrolle zu. Zum einen liefert er Makromoleküle für die Ernährung der Mikroorganismen und fördert den Zusammenhalt der Kolonien durch Agglutinine (Scannapieco 1994). Andererseits beinhaltet Speichel auch eine Anzahl verschiedener lytischer Enzyme und Antikörper und behindert die Besiedlung nicht zuletzt auch mittels eines steten Flüssigkeitsstromes, der als Scherkraft auf die

Mikroorganismen einwirkt. Aufgrund empirischer Forschungen, wurde von Kolenbrander und London (1993) ein Modell der Kolonisierung entwickelt, dass ein Muster der koaggregativen Bindungsverhältnisse der bekanntesten oralen Mikroben-Spezies darstellt (Abb.2).

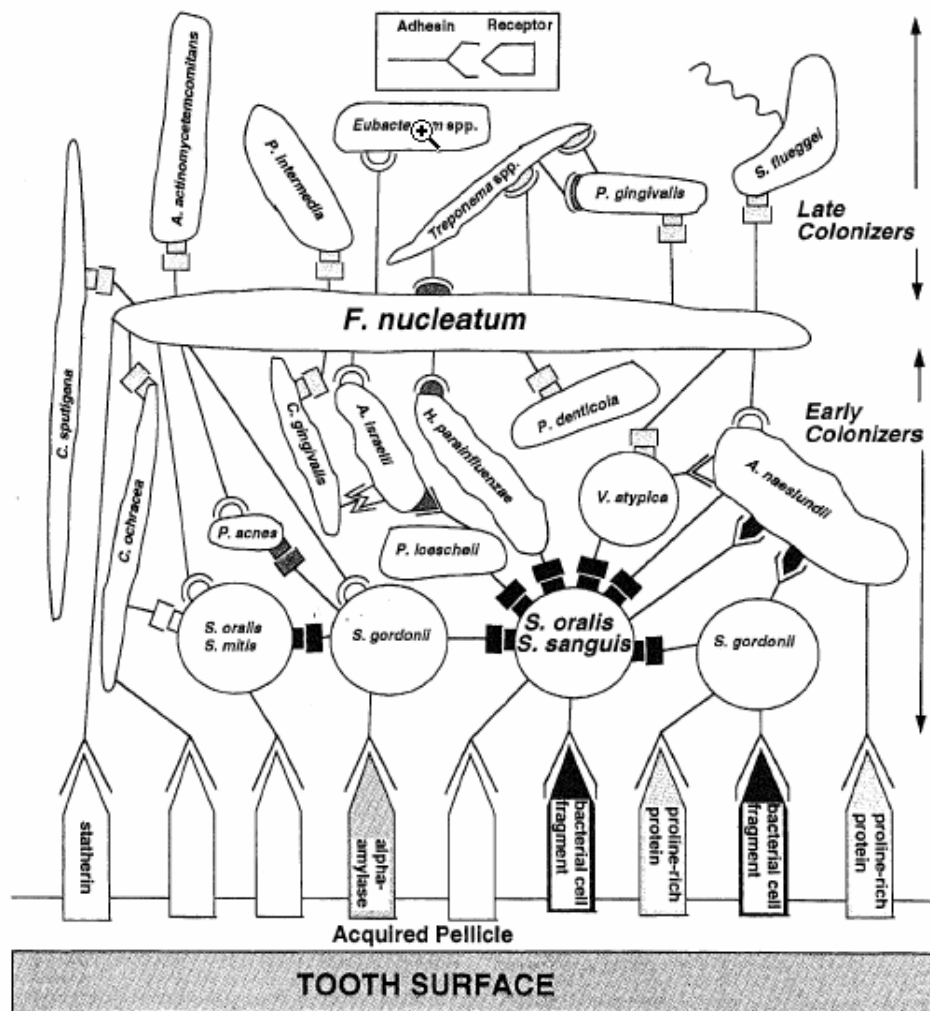


Abb.2 Schema der Kolonialisierung einer Zahnoberfläche (nach Kolenbrander und London 1993)

2.2.1 Die Bedeutung des Pellikels für die bakterielle Adhärenz

Proteine besitzen aufgrund ihrer polaren und apolaren Molekülgruppen ein stark amphiphatisches Verhalten, das es ihnen erlaubt an Grenzflächen konzentriert und adsorbiert zu werden. An der Grenzfläche zwischen Zahnoberfläche und Mundhöhle führt dieser Adsorptionsprozess zur Bildung des Pellikels, einer flächigen Konzentration von Speichelproteinen und –makromolekülen, welche die Zahnoberfläche als Biopolymerschicht überziehen.

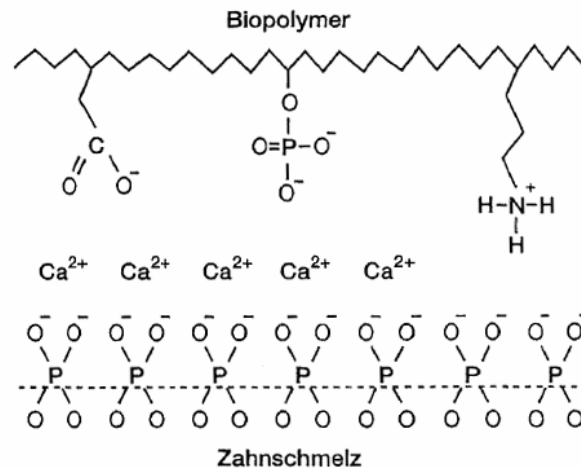


Abb.3 Adsorption des Biopolymeres an Zahnschmelz (Schema nach Hannig 1994)

Die Adsorption der Moleküle wird ermöglicht, da die Phosphatgruppen der Hydroxylapatitkristalle des Zahnschmelzes unter Mundbedingungen dissoziiert vorliegen und von divalenten Kalzium-Ionen umlagert werden. Carboxylat- und Phosphatgruppen des Biopolymers zeigen ebenfalls eine Affinität zu den oberflächenassoziierten Kalzium-Ionen, während die sauren, Prolin-reichen Proteine durch die Aminogruppen Affinität zu den dissoziierten Phosphatgruppen des Hydroxylapatits suchen (Abb.3). Neben den Ionenbindungen werden kovalente Bindungen, Ion-Dipol-Interaktionen, Dipol-Dipol-Interaktionen, Wasserstoffbrücken und hydrophile Wechselwirkungen als Bindungstypen benannt (Hannig 1994, Scannapieco 1994).

Die Zusammensetzung des Pellikels ist sowohl interindividuell verschieden, wie auch von der Lage der Oberfläche in der Mundhöhle und von der Reife des Pellikels abhängig (Hannig 1994, Scannapieco 1994). In Abhängigkeit dieser

Faktoren kann auch die Dicke und Ultrastruktur deutlich variieren (Hannig 1994, Amaechi et al. 1999).

Bei der Untersuchung der Pellikelzusammensetzung wurde lange Zeit das Augenmerk lediglich auf die Proteinbestandteile gelegt, während Bestandteile wie freie Aminosäuren, Lipide und Kohlehydrate kaum Erwähnung finden (Hannig 1994).

Die Zusammensetzung entscheidet jedoch maßgeblich über die Funktion des Pellikels. Zum einen erfüllt das Pellikel kariesprotektive Eigenschaften, in dem es vor Demineralisation durch Säure schützt. Hierfür ist besonders der Lipidanteil im Pellikel verantwortlich, der eine selektive Diffusionsbarriere für verschiedene Ionen und organische Säuren bildet. Die adsorbierten Proteine bilden zudem zusammen mit den Lipiden eine semipermeable Membran, die den Ionenfluß von Kalzium und Phosphat sowie die Diffusion saurer Noxen reduzieren (Hannig 1994).

Für die bakterielle Adhärenz ist das Pellikel von besonderer Bedeutung. Zum einen vermitteln die Pellikel-Proteine und -Makromoleküle die spezifische Bindung an die komplementären Bakterien-Adhäsine und schaffen damit die Grundlage für eine irreversible Adhärenz.

Zum anderen wirkt das Pellikel als Oberflächen-Surfactant, das die freie Oberflächenenergie erhöht. Die Erhöhung der Oberflächenenergie beginnt bereits 5 min nach der Benetzung und bleibt mindestens über 3 h konstant (Absolom et al. 1983, Henrik und Busscher 1984, De Jong et al. 1984). Zudem gleicht das Pellikel Unterschiede in der freien Oberflächenenergie zwischen verschiedenen Oberflächen aus. Im Vergleich zu unkontaminiertem Zahnschmelz erreicht dadurch die Adhäsionsenergie ΔG_{adh} für zahlreiche Bakterienarten negativere Werte, die eine Adhäsion begünstigen (Henrik und Busscher 1984, Weerkamp et al. 1985).

Die Tatsache, dass sich durch das Pellicel die freie Oberflächenenergie erhöht, stellt keinen Widerspruch zu den zwei thermodynamischen Hauptsätzen dar, da sich durch die Adsorption der Proteine die freie Energie im gesamten System erniedrigt (De Jong et al. 1984).

2.2.2 Karies

Als Karies bezeichnet man den Verlust von Zahnhartsubstanz, welche von potentiell pathogener Mikroorganismen und potentiell pathogener ökologischer Faktoren beeinflusst. Zu ökologischen Faktoren zählen der häufige Konsum niedermolekularer Kohlenhydrate, Zusammensetzung und Pufferkapazität des Speichels, chemische, histologische und anatomische Aufbau der Zahnhartsubstanzen. Noch dazu zählen zahlreiche andere Faktoren, wie Immunabwehr, bisher nicht bekannte genetische Faktoren und sozioökonomische Einflüsse.

Die im Jahre 1898 aufgestellte chemoparasitäre Theorie von Miller hat in modifizierter Form noch bis jetzt Gültigkeit (Schneider 1994). Die Karies kann entstehen, wenn die vier Grundvoraussetzungen: Mikroorganismen, Wirtsorganismus (das Ziel der Schädigung), Substrat (Kohlenhydrate als Nährstoffe) und der Faktor Zeit vorhanden sind. In einer gesunden Mundhöhle besteht normalerweise ein Gleichgewicht zw. Zahnoberfläche und oralen Flora im Speichel, externe und bakterielle Faktoren. Wird dieses Gleichgewicht gestört, kann Karies entstehen. Außerdem beeinflussen die Essgewohnheiten oder Verminderung des Speichelflusses das Geschehen. Der kritische Bereich für die Demineralisation von Zahnhartsubstanz liegt für den Zahnschmelz bei einem pH-Wert von 5.2-5.7, bei Wurzelzement und Wurzelentin bei 6.2-6.7.

So genannte kariogene Bakterien, Streptokokkenarten (z.B. *S.mutans*), Lactobacillen (*L. acidophilus*, *L. casei*) sowie einige Actinomyceten, die in der Plaque vorkommen, sind in der Lage, lytische Stoffwechselprodukte vor allem Lactat zu bilden und auch im sauren Milieu zu überleben (Säuretoleranz). Fällt der pH-Wert in der Plaque unter die Schwelle von pH 5.4 beginnt die minerallösende Wirkung. Der Abfall des pH-Wertes nach der Nahrungsaufnahme ist charakteristisch und wird in der Stephan-Kurve dargestellt. Der pH-Wert sinkt dabei innerhalb der ersten 5 Minuten nach der Nahrungsaufnahme stark ab, um anschließend wieder auf den Normalwert von ca. pH 7 anzusteigen (Diss. Kistler 1999).

Die Pufferwirkung des Speichels kann die Entkalkung vor dem kritischen pH-Wert verhindern und sorgt durch die darin gelösten Kalzium und Phosphationen für eine Remineralisation der Zahnhartsubstanzen. Ist der Säureangriff nicht auf kurze Zeit beschränkt, sondern wiederholt und länger andauernd, so ist diese Remineralisation nicht mehr ausreichend möglich. Es folgt die Entstehung von so genannten „white“- oder „brown-spots“ als noch reversiblen Kariesvorläufern. Ohne den Einsatz von intensiven Prophylaxemaßnahmen (z.B. Fluoridierung) bildet sich hieraus die irreversible Schmelzkaries. Im weiteren Verlauf entstehen die verschiedenen Stadien der Dentinkaries (Bose und Ott 1994, Laurisch 1989, Schneider 1994).

2.3 Untersuchungen zur Plaqueanlagerung

2.3.1 Grundprinzipien plaquehemmender Füllungswerkstoffe

Es gibt drei grundsätzlich unterschiedliche Möglichkeiten, plaque- und karieshemmende Effekte in Füllungswerkstoffe zu integrieren. Zum einen können dem Material Bestandteile zugesetzt werden, die während der Verweilzeit in der Mundhöhle freigesetzt werden, und zum anderen kann das Material so modifiziert werden, dass die karieshemmenden Bestandteile an den Füllungswerkstoff gebunden sind (Imazato 1994). Die dritte Möglichkeit bedingt eine Veränderung der Oberflächenenergie von Füllungsmaterialien in einen Bereich, in denen die initiale, elektrostatische Adhäsion von Bakterien deutlich erschwert wird (De Jong 1984, Weerkamp et al. 1985, 1988, Quirynen 1995).

2.3.2 Freisetzung von aktiven Bestandteilen

In Abhängigkeit von der Freisetzungskinetik unterscheidet Rawls (1991) Systeme, bei denen die Freisetzungsrates im Laufe der Zeit abnimmt, von Systemen, die eine konstante Freisetzungsrates aufweisen.

Abnehmende Freisetzungsrates

Die Freisetzung von karieshemmenden Substanzen kann entweder ohne Zersetzung des Trägermaterials durch Diffusion oder durch gleichzeitiges Auflösen der Trägersubstanz erfolgen.

Diffusion setzt voraus, dass z. B. Wasser aus der Mundumgebung in den Werkstoff diffundiert. Dieses eindiffundierte Wasser ermöglicht es, dass Bestandteile des Füllungsmaterials in Lösung gehen und anschließend entlang des Konzentra-

tionsgradienten nach außen diffundieren. Die Diffusionsgeschwindigkeit ist u. a. von dem Konzentrationsgradienten abhängig. Je höher das Konzentrationsgefälle ist, umso höher ist die Freisetzungsrage. Da sich der Konzentrationsgradient durch die Freisetzung verringert, kommt es im Laufe der Zeit zwangsläufig auch zu einer Verringerung der Freisetzungsrage.

Bei der Auflösung des wirksamen Bestandteiles nimmt meist ebenfalls die Freisetzungsrage ab. Auch hier ist es erforderlich, dass Wasser in den Werkstoff diffundiert. Das Wasser löst die wirksamen Bestandteile an der Oberfläche beginnend auf und die gelösten Bestandteile gelangen durch Diffusion in die Mundhöhle. Durch den Auflösungsvorgang nimmt die Oberfläche der meist partikulären Bestandteile ab bzw. kleine Partikel lösen sich ganz auf.

Konstante Freisetzungsrage

Durch hohe Konzentrationen bei geringer Diffusion der freizusetzenden Bestandteile kann man über lange Zeit hinweg eine konstante Freisetzungsrage erzielen. Der Werkstoff müsste aber entfernt bzw. ersetzt werden, bevor die Konzentrationen zu gering werden. Dies könnte z. B. bei Befestigungsmaterialien für Bracketts zu treffen, da die Bracketts nur eine begrenzte Zeit auf die Zahnoberfläche geklebt werden. Alternativ könnte eine Membran die Diffusionsgeschwindigkeit limitieren und so ebenfalls über lange Zeit eine konstante Freisetzung sicherstellen. Bisher sind klinisch überwiegend Werkstoffe im Einsatz, bei denen eine allmähliche Abnahme der Freisetzung der karieshemmenden Bestandteile beobachtet wird.

2.3.3 Gebundene antikariogene Bestandteile

Durch die Freisetzung antikariogener Substanzen kann es potentiell zu toxischen Nebeneffekten, Populationsverschiebungen der Mikroorganismen oder einer Beeinträchtigung der mechanischen Eigenschaften der Füllungswerkstoffe kommen. Außerdem limitiert die begrenzte Freisetzung die karieshemmende Wirkdauer (Imazato 1994). Aus diesem Grund wurden Monomere mit antibakteriellen Eigenschaften synthetisiert. Aufgrund der festen chemischen Bindung der antibakteriellen Bestandteile sollen die o. g. Nebenwirkungen umgangen werden.

Nach Peutzfeldt (1997) ist der bisher interessanteste Ansatz die Synthese des Monomers Methacryloyloxydodecylpyridinbromid. MDPB ist ein Syntheseprodukt aus dem antibakteriell wirkenden Dodecylpyridinbromid und einer Methacrylyl-Gruppe. MDPB reagiert als Copolymer mit konventionellen Dentalmonomeren und wird auf diese Weise kovalent in die Polymermatrix eingebunden. MDPB inhibiert das Wachstum von *Streptococcus mutans* ohne negative Auswirkungen auf die Polymerisation oder mechanischen Eigenschaften zu haben (Imazato 1994, 1995). Man nimmt an, dass MDPB primär die Adhäsion von Bakterien an der Füllungsoberfläche verhindert.

2.3.4 Oberflächenenergetische Effekte

Ein eleganter Ansatz zur Prävention der Plaquebildung und Sekundärkaries ist die Behinderung der initialen bakteriellen Adhäsion an Zahn- und Füllungsflächen (Gibbons 1984). Der zugrundeliegende thermodynamische Ansatz $\Delta G_{adh} = \gamma_{sb} - \gamma_{sl} - \gamma_{bl}$ (Absolom et al. 1983, Bellon-Fonaine et al. 1990) zeigt, dass eine bakterielle

Adhäsion thermodynamisch günstig ist, wenn die Adhäsionsenergie ΔG_{adh} negative Werte erreicht (Abb. 3).

Die Errechnung der Adhäsionsenergie zeigte, dass für die meisten Streptokokken-Stämme eine Adhäsion zu Oberflächen bei Werten über $\gamma_{\text{sl}} > 62 \text{ erg cm}^{-2}$ thermodynamisch günstig wird. Weiter wird aus den Ergebnissen abgeleitet, dass niedrige Werte von γ_{sl} die Adhäsion von Bakterien deutlich verringern könnten. In einem zuvor veröffentlichten theoretischen Beitrag zur gleichen Thematik (Hendrik et al. 1984) wird von der Forschergruppe errechnet, dass die Bildung von Plaque signifikant gehemmt werden könnte, wenn die freie Oberflächenenergie von Zahnschmelz dauerhaft unter Werte von 50 erg cm^{-2} abgesenkt werden könnte. Dieser Wert steht im Einklang mit Versuchen in vitro (Christersson 1989), die eine vergleichbare Grenze für eine günstige bakterielle Adhäsion mit kritischen Oberflächenspannungen von $35 - 50 \text{ mN/m}$ angeben.

Quiryne et al. 1990 stellten fest, dass die Zusammensetzung und die Menge der Plaque von der Oberflächenenergie und Oberflächenrauigkeit mitbestimmen wird. Mit der Rauigkeit des Materials nimmt auch die Plaqueakkumulation zu. Die rauen Stellen auf Zähnen und Restaurationsmaterial fördern die Entstehung von Plaqueinseln (Riethe 1984). Die Plaque lagert sich zuerst in Grübchen an und breitet sich später über die glatten Oberflächen aus (Listgarten 1987). Durch das schnellere Bakterienwachstum findet man bei rauen Oberflächen eine reifere Plaque, die entsprechend pathogener ist (Quiryne 1990).

Als Schlussfolgerung aus den Versuchen wird abgeleitet, dass eine zahnärztliche Behandlungsmaßnahme, die dauerhaft ein erhöhtes negatives Ladungspotential von Zahn- und Füllungsflächen ermöglicht, eine effektive Methode darstellen könnte, um die bakterielle Adhäsion und die Plaqueneubildung zu verringern.

2.4 Methoden zur Untersuchung in vivo gebildeter Plaque

Die Auswahl einer geeigneten Methode zur Plaqueuntersuchung orientiert sich an der Fragestellung. Dabei ist grundsätzlich zwischen quantitativen (Erfassung der Plaquedimension und Menge) und qualitativen Fragestellungen (Lokalisation, Aufbau, Ultrastruktur, Oberfläche der Plaque) zu differenzieren. Ein Überblick über wichtige Publikationen zu möglichen Untersuchungsverfahren in vivo ist in Tabelle 2 zusammengefasst (Seite 32).

Für beide Fragestellungen werden sowohl direkte Untersuchungsmethoden beschrieben, die in situ oris durchzuführen sind, sowie indirekte Verfahren, bei denen mit geeigneten Trägersystemen (z.B. Schienen) Plaque in der Mundhöhle auf gekennzeichneten Probenflächen heranwächst. Die Probenträger können anschließend entnommen werden und der eigentlichen Auswertungs-Methode zugeführt werden. Da die meisten bildgebenden Verfahren nur im Labor durchzuführen sind, liegt der Schwerpunkt bei den Untersuchungsmethoden auf den indirekten Verfahren.

Autor	Publikation	Probenträger	Material	Auswertungsmethode
Auschill T.M. et al. 2001	Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms	Intraorale Schiene	Humaner Schmelz	CLSM, Vital/Avital-Färbung
Zaura-Arite E. et al. 2001	Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm		Bovines Dentin	CLSM, Vitalfärbung der Bakterien
Hannig, M., Balz M. 2001	Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion	Herausnehmbare, intra-orale Schiene. Proben auf der Bukkalseite in Regio der ersten Molaren	Boviner Schmelz	TEM, Mikrohärtete
Zee K.Y. et al., 2000	An in vivo replica study of microbial colonization in "rapid" and "slow" dental plaque formers	Epoxyd-Replika nach Abformung mit dünnfließendem Silikon in Regio des rechten ersten oberen Incisivus	Nativer Schmelz	SEM
Sagel, PA et al. 2000	Objective Quantification of plaque using digital image analysis	Fluorescein-Färbung von Plaque intraoral. Digitale Fotografie unter Anregung mit langwelligem UV-Licht	Humaner Zahnschmelz	Digital-Kamera, computer-gestützte Planimetrie
Wood, S.R. et al. 2000	Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy	Zwei intraorale Schienen	Humaner Zahnschmelz	CLSM Anfärbung der Plaque mit Fluorescein
Hannig, M. 1999	Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period	Herausnehmbare, intra-orale Schiene. Proben auf der Bukkalseite	Boviner Schmelz	TEM, SEM

Autor	Publikation	Probenträger	Material	Auswertungsmethode
Yeganeh S. et al. 1999	Quantification of root surface plaque using a new 3-D laser scanning method	Replika. Abformung vor/nach Zahnreinigung	Natürliche Zähne	3D-Laser-scanning und Matching
Hannig, M. 1997	Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials in vivo	Herausnehmbare, intra-orale Schiene. Proben auf der Bukkalseite und Lingualseite	Amalgam, Titan, Kermik, GIZ, Komposite, Boviner Schmelz	TEM, SEM
Amaechi et al. 1999	Thickness of acquired salivary pellicle as a determinat of the sites of dental erosion	Proben werden mit orthodontischen Bondings auf orale und verstibuläre Flächen von Front- und Seitenzähne freiwilliger Probanden aufgebracht	Boviner Schmelz	CLSM Imunfluoreszenzfärbung
Cassellani, D., 1996	In vivo plaque formation on cast ceramic (Dicor) and conventional ceramic	Vestibulärer Probenträger aus Acrylat-Kunststoff	Dicor-Keramik, glasiert und unglasiert	Bakterienkultur, SEM
Leonhardt, A et al. 1995	Bacterial colonisation on titanium, hydroxyapatite, and amalgam surfaces in vivo	Metallguß-Schiene	Titan, Hydroxyl-Apatit, Amalgam	Blutagar
Siegrist, B.E. 1991	In vivo early human dental plaque formation on different supporting substances. A scanning electron microscopic and bacteriological study	Prothetische Brücken im Seitenzahnggebiet mit herausnehmbare Schiene als Probenträger	Schmelz, Dentin, Amalgam, Gold, Ag-Pd, CoCr, Ti-CoCr, Keramik	SEM

Autor	Publikation	Probenträger	Material	Auswertungsmethode
Nyvad, B., Fejerskov, O. 1987	Transmission electron microscopy of early microbial colonization of human enamel an root surfaces in vivo	Intraorale Acrylat-Schiene	Präeruptiver Schmelz, Wurzel-dentin	TEM, Lichtmikroskop
Nyvad, B., Fejerskov, O. 1987	Scanning electron microscopy of early microbial colonization of human enamel an root surfaces in vivo	Intraorale Acrylat-Schiene	Präeruptiver Schmelz, Wurzel-dentin	SEM
Quirynen, M. et al. 1985	The possibility of measuring plaque growth in vivo within 24 hours	Intraorale Plaque-anfärbung mit Relevator	Humaner Zahnschmelz	Planimetrie
Netuschil, L. 1983	Vitalfärbung von Plaque-Mikroorganismen mit Fluoresceindiacetat und Ethidiumbromid			Floureszenzmikroskop Färbung mit FDA
Lie, T. 1978	Ultrastructureal study of early plaque formation	Schiene in Oberkiefer. Proben in Regio des ersten Molar	Hydoxylapatit	TEM
Lie, T. 1977	Early dental plaque morphogenesis	Schiene in Oberkiefer. Proben in Regio des ersten Molar	Hydroxylapatit	SEM
Rekola, M., Scheinin A. 1977	Quantification of dental Plaque trouggh planimetric analysis	Anfärbung der Plaque mit Relevatoren. Digitalisierung von Fotografien	Humaner Zahnschmelz	Computer-gestützte Planimetrie

Tab.2 Überblick über verschiedene Studien und Untersuchungsansätze zur Bestimmung von Plaquequalität und Quantität

3 Fragestellungen

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, Plaqueabweisende, Bakterien hemmende Werkstoffe durch Zugabe von Polyalkenoat-Partikeln zu einem klassischen zahnärztlichen Komposit-Kunststoff zu entwickeln. Dazu wurde die Plaqueanlagerung an verschiedenen experimentellen und kommerziellen Materialien in situ durchgeführt und ausgewertet. Auch wurde die Ablösung von den Bakterien mit Hilfe der elektrischen Zahnbürste nach bestimmter Tragezeit bestimmt. In beiden Gruppen wurden Empress Keramik als Referenzmaterial verwendet.

Es wurden die Testproben hergestellt und in eine standardisierte, intraorale Schiene festgeklebt. Die Proben wurden von Probanden insgesamt 12 h von 8:00 bis 20:00 h getragen, gefärbt, fotografiert und gemessen.

Im Einzelnen sollten folgende Fragen untersucht werden:

- wie wirkt sich der Zusatz von Polyacrylaten auf die Plaqueanlagerung an experimentellen Materialien aus?
- gibt es einen Unterschied in der Plaqueanlagerung zwischen kommerziellen und experimentellen Materialien?

4 Material und Methode

4.1 Testmaterialien

Untersucht wurden 9 experimentelle Materialien der Firma 3M-ESPE (Tab. 3) und 8 verschiedene kommerzielle Materialien diverser Firmen (Tab. 4).

Name	Zusatz
Sinfony 2455	Aluminium-Polyacrylat-Salz 75%
Sinfony 2456	Calcium-Polyacrylat-Salz 100%
Sinfony 2457	Calcium-Polyacrylat-Salz 75%
Sinfony 2458	Calcium-Polyacrylat-Salz 90%
Sinfony 2446	kein Glasionomerzementzusatz
Verblendkunststoff Pastes # 98	Antiplaque=Glasionomerzementzusatz
Verblendkunststoff Pastes # 99	kein Glasionomerzementzusatz
Sinfony DA 3 # 018	Antiplaque=Glasionomerzementzusatz
Empress Keramik	Referenz

Tab.3 Experimentelle Materialien der Firma ESPE mit verschiedenen Neutralisationsgraden

Die Polyacrylsäure wurde durch nasschemische Umsetzung von Polyacrylsäure mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ oder Aluminium-*sek*-butylat hergestellt. Die Salze wurden getrocknet, anschließend auf einen mittleren Korngrössendurchmesser kleiner als 20 μm gemahlen und gesiebt. Die Neutralisationsgrade wurden indirekt über die Gehalte an Calcium und Aluminiumkationen durch Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt. Die Salze wurden mittels Infrarotspektroskopie und Korngrössenmessungen charakterisiert. Jeder Charge Sinfony mit verschiedenen Neutralisationsgraden wurden jeweils 2,9 Gew.-% der Polyacrylatsalze eingeknetet.

Die kommerziellen Materialien wurden so ausgewählt, dass sie sich anhand der Herstellerangaben in ihren Eigenschaften unterscheiden sollten. Es handelte sich

um Komposite, Ormocere, Glasionomere und Kompomere. Als Referenz diente auch hier Empress Keramik (Tab. 4).

Materialien	Hersteller	Werkstoff-Klasse
Pertac II	ESPE	Hydrophobe Matrix, Quarzfüller
Durafill	Heraeus Kulzer	Mikrogefülltes Komposit, Präpolymerisate
Tetric Ceram	Vivadent	Klassisches Hybridkomposit
Tetric Flow	Vivadent	Hybridkomposit mit niedriger Viskosität, chemische Zusammensetzung wie Tetric Ceram, Füllkörperanteil reduziert
Definite	Degussa	Ormocer
Dyract AP	Dentsply	Fluoridfreisetzung-hydrophile Matrix
Ketac Molar	ESPE	Glasionomerzement
Empress	Vivadent	Keramik

Tab.4 Kommerzielle Materialien

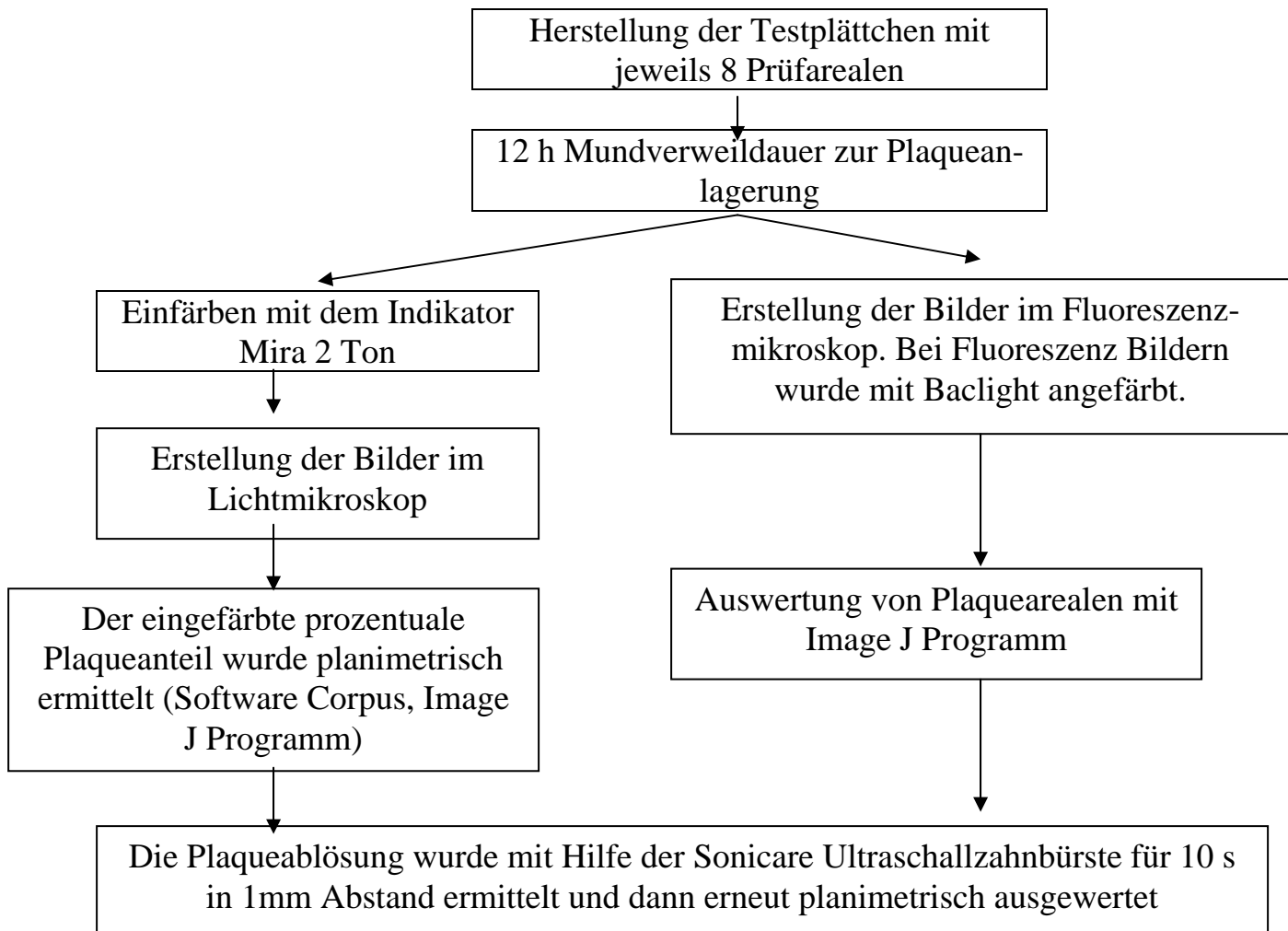
Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Materialien wurden weitere 6 Materialien im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Hier wurden 3 experimentelle Materialien auf Basis von Sinfony, die jedoch keine fluoreszierende Zusätze enthielten, untersucht. In den restlichen untersuchten Materialien war es nicht möglich Fluorszenzfärbung durchzuführen, weil die Matrix der Materialien fluoreszierenden Zusatz erhielt.

Als Vergleich dazu wurden weiterhin die Referenz Empress Keramik und das Komposit Dentacolor (Heraeus Kulzer), das viel Plaque anlagern soll, untersucht (Tab. 5).

Name	Zusatz
Sinfony	Anti plaque=Glasionomerezement
Dentacolor (Heraeus Kulzer)	Komposit
Empress Keramik	Keramik
2492	Calcium-Polyacrylat-Salz 75 %
2494	Calcium-Polyacrylat-Salz 90 %
2488	Calcium-Polyacrylat-Salz 60 %

Tab.5 Materialien für Fluoreszenzuntersuchungen

Der Ablauf der Versuchsführung ist in Tab. 6 in Form eines schematischen Ablaufplanes dargestellt.



Tab.6 Untersuchungsschema

4.1.1 Das Schienendesign

Zur Plaquequantifizierung mit Hilfe standardisierten Prüfkörpern, die in intraorale Schienen integriert werden, sind in der Literatur zahlreiche Versuchsdesigns beschrieben (Hannig 1999, Kistler 1999, Castellani 1996, Tryggve 1978, Quirynen 1985, Hahn 1992, Krämer 1989,1990, Simonos 1990, Siegrist 1991, Cyntia 1996, Krekeler 1984).

Die beschriebenen Schienen können nach Art der Herstellung in Tiefgezogene Minioplastschienen, Schienen aus Kalt- oder Heißpolymerisat sowie Modellguß-Schienen differenziert werden. Allen gemeinsam ist die individuelle oder teil-individualisierte Herstellung. Konfektionierte Schienen finden wegen mangelndem Tragekomfort keine Anwendung.

Nach sorgfältiger Abwägung von Herstellungsaufwand, Tragekomfort und Standardisierbarkeit wurde ein Schienendesign nach Hannig (1999) für die Versuche ausgewählt. Dabei handelt es sich um eine herausnehmbare intraorale Schiene mit vestibulärem Drahtbügel und bukkalen Probenräger für den Oberkiefer. Das ist in Abb. 4 dargestellt.

Die Prüfkörper werden dabei in einem standardisierten Plexiglas-Plättchen separat angefertigt und mit den bukkalen Schienenflügeln verklebt. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der Wiederverwendbarkeit der Schiene für mehrere Versuchsreihen. Hier kann das Probenräger-Plättchen einfach positioniert und ohne Beeinträchtigung der Schienenpassung leicht gewechselt werden. Zudem können die bukkalen Schienenauflagen, die lediglich der Retention dienen, zierlich dimensioniert werden, um einen maximalen Tragekomfort sicherzustellen.



Abb.4 Schienendesign

4.1.2 Herstellung der Testkörper

Als Probenträger wurden rechteckige PMMA – Schablonen der Maße (30 mm x 9 mm x 2 mm) mit jeweils 4 Bohrungen (Durchmesser von 6 mm) gewählt. Im Rahmen von Vorversuchen zur Parameterevaluierung wurde als Vergleich der Verblendwerkstoff Dentacolor (Heraeus Kulzer) eingesetzt.

Zur Prüfkörperherstellung wurden die lichthärtenden Kompositmaterialien in die standardisierten Schablonen überschüssig appliziert und zwischen zwei Glasplatten gepresst, um blasenfreie und homogene Proben sicherzustellen. Um eine Anheftung von Komposit an die Glasplatten zu verhindern, wird zuvor eine Klarsicht-Matritze (Frasaco) als Trennschicht auf die Proben aufgelegt. Die Aushärtung erfolgt nach Abnahme der Glasplatten durch Belichtung der oberen und unteren Probenflächen (Lichtintensität mind. 400 mW/cm², Elipar Trilight, ESPE (3809024 Seriennummer, Belichtungskontrolle Demetron 650 mW/cm²). Die Proben aus Empress Keramik wurden im zahntechnischen Labor hergestellt.

4.1.3 Oberflächenbearbeitung

Für nachfolgende Untersuchungen ist eine standardisierte Oberflächenbearbeitung der Testkörper unerlässlich. Dazu werden alle Testkörper mit Hilfe einer Schleifmaschine (Leco, Kirchheim) in absteigender Körnung bis 1200 Grit (FEPA) plan geschliffen und anschließend mit einer Flächenpoliermaschine (Abramin, Streuers) und Diamantschleifspray der Körnung 1µm (DP-Spray, Struers) poliert.

4.2 Parameter der Plaqueuntersuchungen

Zur Durchführung der in situ Studie konnten 10 Zahnmedizinstudenten /-innen im Alter von 24 - 39 Jahren als Probanden akquiriert werden.

Die Schienen wurden während des Tages 12 Stunden von 8:00 bis 20:00 h getragen. Dieser Zeitraum wurde in der Literatur als ausreichend bewertet (Kistler 1999, Tyggve 1978, Quirynen 1985, Hahn 1992) und in einer eigenen Vorstudie evaluiert. Während der Tragezeit sollte mit der Schiene in situ möglichst keine Nahrungsaufnahme erfolgen; der Genuss von Getränken auch zuckerhaltigen war hingegen erlaubt. Auch eine Zahnreinigung in diesem Zeitraum war untersagt. Während des Essens durften die Schienen herausgenommen und in Leitungswasser gelagert werden. Da aus Vorversuchen bekannt war, dass die mesio-distale Platzierung eines Testmaterials einen signifikanten Faktor für die Plaqueakkumulation darstellt, wurde systematisch jedes Material an den Position 1-4 variiert. Position 1 entsprach hierbei der Region der ersten Molaren, Position 4 der Region des zweiten Premolaren. Ebenfalls konnte in Vorversuchen ermittelt werden, dass die Platzierung im I oder II Quadranten keinen signifikanten Einfluss

auf die Plaqueanlagerung zeigte. Die untersuchten Materialien wurden gleichmäßig in allen Positionen rechts und links getestet.

Um alle Materialien gleich an allen Positionen rechts und links zu testen, mussten somit je Proband insgesamt vier Versuchsdurchgänge erfolgen.

4.3 Plaquequantifizierung mit dem Corpus Programm

Nach 12 h wurden die Schienen dem Mund entnommen und die Probenoberfläche mit einem Plaquerelevator (Mira 2 Ton, Hager & Werken, Duisburg) eingefärbt. Zur Plaquequantifizierung wurde eine planimetrische Auswertung der gefärbten Areale vorgenommen. Hierfür werden die Proben unter dem Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung digitalisiert (Zeiss Stemi SV 11, Oberkochen). Mit einer Bildbearbeitungssoftware (Corpus Programm, v. Dreusche) wurde für jede Probe anschließend die Plaqueanlagerung als prozentualer Flächenanteil der Probenoberfläche bestimmt.

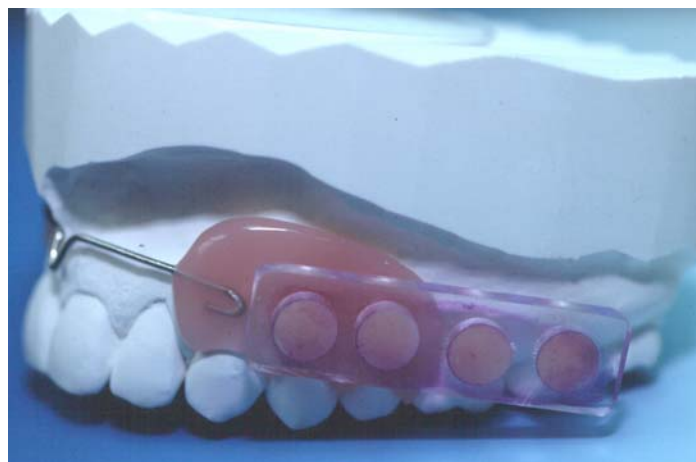


Abb.5 Plaqueanlagerung nach 12 h Tragezeit

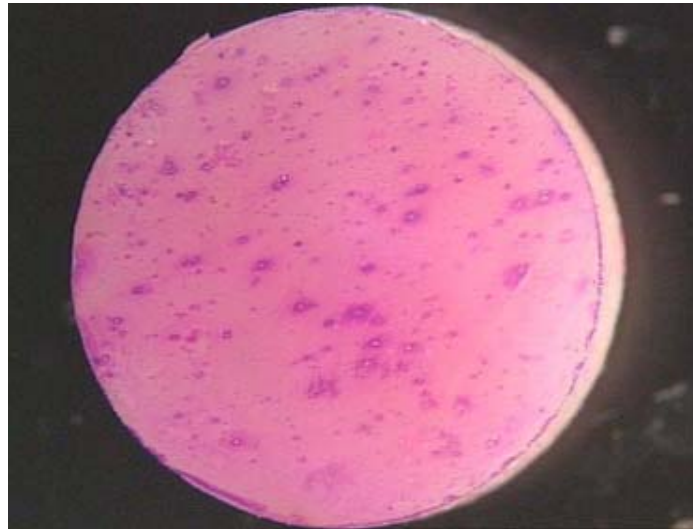


Abb.6 Plaqueanlagerung nach 12 h Tragezeit

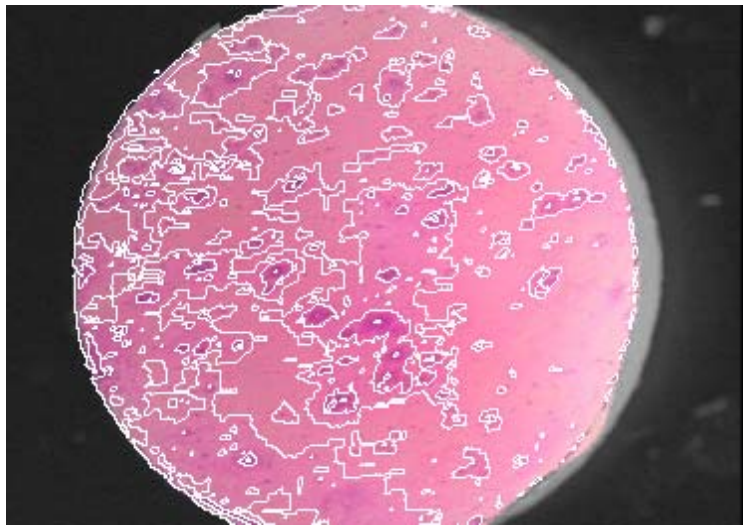


Abb. 7 Die prozentuelle Auswertung mit dem Corpus Programm mit Rand

4.4 Plaquequantifizierung mit Image J Programm

Zum Vergleich zu den Auswertungen mit dem Corpus Programm wurden auch Auswertungen mit dem Programm Image J durchgeführt. Wie bei den Auswertungen mit dem Corpus Programm wurden auch hier nach 12 h Tragezeit die Proben aus dem Mund entnommen und mit Mira 2 Ton (Hager & Werken,

Duisburg) angefärbt. Nach 10 s Wirkungszeit wurden die Proben mit Leitungswasser abgespült und anschließend getrocknet. Danach wurden die Proben unter dem Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung digitalisiert (Zeiss Stemi SV 11, Oberkochen). Mit Image J wurde die Plaqueanlagerung der Probenoberfläche prozentuell bestimmt (Abb.8).

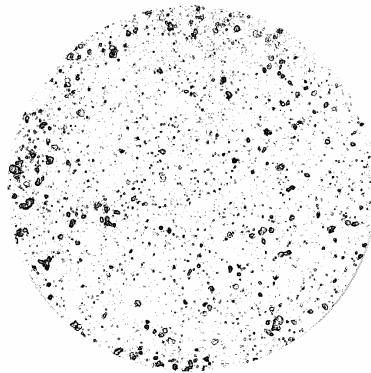


Abb.8 Die prozentuelle Auswertung mit dem Image J Programm

4.5 Plaquequantifizierung mit Fluoreszenzfärbung

Ausgangspunkt für die Untersuchung war eine Plauefärbung, welche bisher nur mit dem Farbstoff Mira 2 Ton durchgeführt wurde. Problem dieser Methode war, dass Mira 2 Ton lediglich eine unspezifische Proteinfärbung zuließ, bei der keine klare Aussage darüber genannt werden konnte, ob auch Matrix mit angefärbt wurde.

Ziel dieser neuen Untersuchung war daher, einen spezifischen Nachweis von Mikroorganismen ohne extrazelluläre Matrix zu leisten. Die Lösung dieses Problems sahen wir in der Fluoreszenzfärbung, mit der es nun möglich war, sowohl Bakterien zu identifizieren, als auch eine Differenzierung zwischen lebenden und toten Bakterien zu treffen. Frage bei dieser Methodik war jedoch, wie man den Fluoreszenzfarbstoff auf Oberflächen anwendet.

Entwicklung der Methode / Vorversuche

Die Herstellerfirma Molecular Probes hatte bisher keine Erfahrungen mit der Färbung auf Oberflächen, da ihr Farbstoff bisher nur in Suspension angewendet wurde. Hier wurde mit Hilfe von Vorversuchen mit Plaque auf planen Objektträgern eine Lösung gefunden, die auch gleichzeitig eine Definierung der benötigten Konzentration des Farbstoffes ermöglichte.

Zusätzlich zeigte sich bei den Vorversuchen, dass einige getestete Materialien eine Eigenfluoreszenz aufwiesen, die sich möglicherweise als störend herausstellen könnte. Hierauf wurden verschiedene Werkstoffe überprüft und selektiert. Schlussendlich wurde ein Vergleich mit den bisherigen Färbemethoden angestellt.

Material und Methode:

Als Farbstoff diente Live/Dead BacLight Viability Kit L-7012 rot bzw. der Firma Molecular Probes, Eugene, USA, pipettiert in Portionen von jeweils 3µm auf die einzelnen in den Schienen enthaltenen Proben.

Die Inkubationszeit belief sich auf 15 Minuten. Anschließend erfolgte das Abspülen unter klarem Leitungswasser, um Artefakte durch überschüssige Farbkristalle auszuschließen. Zur Auswertung diente das Fluoreszenzmikroskop STEMI SV 11 mit dem Filterset FITC: Ex 470 nm, Em 525 nm und Texas Red: 580 nm, BS 600 nm, Em >610 nm. Die Belichtungszeit betrug 2 bzw. 10 s. Um anschließend einen Vergleich zu den bisher durchgeführten Methoden ziehen zu können, wurden die Schienenproben zusätzlich mit Mira 2 Ton nach Standard behandelt.

4.6 Plaqueentfernung

Die Plaqueentfernbarkeit wurde mit Hilfe der elektrischen Zahnbürste Sonicare Ultraschall (Philips) bei 10 s Anwendungsdauer im Wasser im Abstand von 1mm geprüft. Anschließend wurde nach analoger Methode erneut der Flächenanteil der Restplaque planimetrisch bestimmt (Standford 1997).

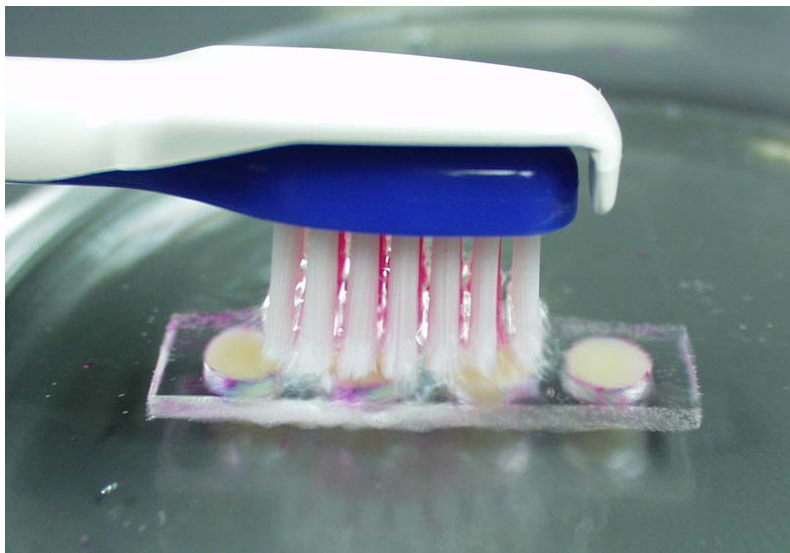


Abb.9 Plaqueentfernung mit Sonicare im Wasser in 1 mm Abstand

5 Ergebnisse

5.1 Vorversuch

Um die Methode zu entwickeln wurden Vorversuche mit Dentacolor (Heraeus Kulzer) und dem experimentellen Material Sinfony durchgeführt. In der Literatur wird angegeben, dass sich an dem Material Dentacolor mehr Plaque anlagert. Die Proben wurden für 2, 4, 8 und 12 h getragen und nach der jeweiligen Tragezeit wurden die Proben mit Mira 2 Ton eingefärbt, fotografiert und gemessen.

Aus den Abbildungen ist ersichtlich:

1. Es gibt keine statistisch signifikante Unterschiede zwischen linker und rechter Seite (Abb. 10)
2. Die Plaqueanlagerung nahm mit zunehmender Tragdauer zu (Abb. 11)
3. Aus der Tabelle kann man entnehmen, dass sich am Material Sinfony weniger Plaque anlagert als am Material Dentacolor (Abb. 12)
4. Die Plaqueanlagerung an den Proben, welche 12 h ohne Zwischenmessungen getragen wurden sind, ist größer (Abb. 13)

Um den Einfluss der Vermessung zu testen, wurde eine zweite Probengruppe 12 h ohne Zwischenmessungen getragen und danach gemessen. An den Proben, welche 12 h ohne Zwischenmessungen getragen wurden, sammelt sich mehr Plaque als die Proben, welche nach 2, 4, 8 und 12 h vermessen wurden. Die Unterschiede zwischen die beiden Messungen in Abb. 13 dargestellt. Für den Hauptversuch wurde entschieden, die Proben 12 h ohne Zwischenmessungen zu testen. Die Vorversuche wurden nur von 1 Person durchgeführt und je Gruppe 10x wiederholt.

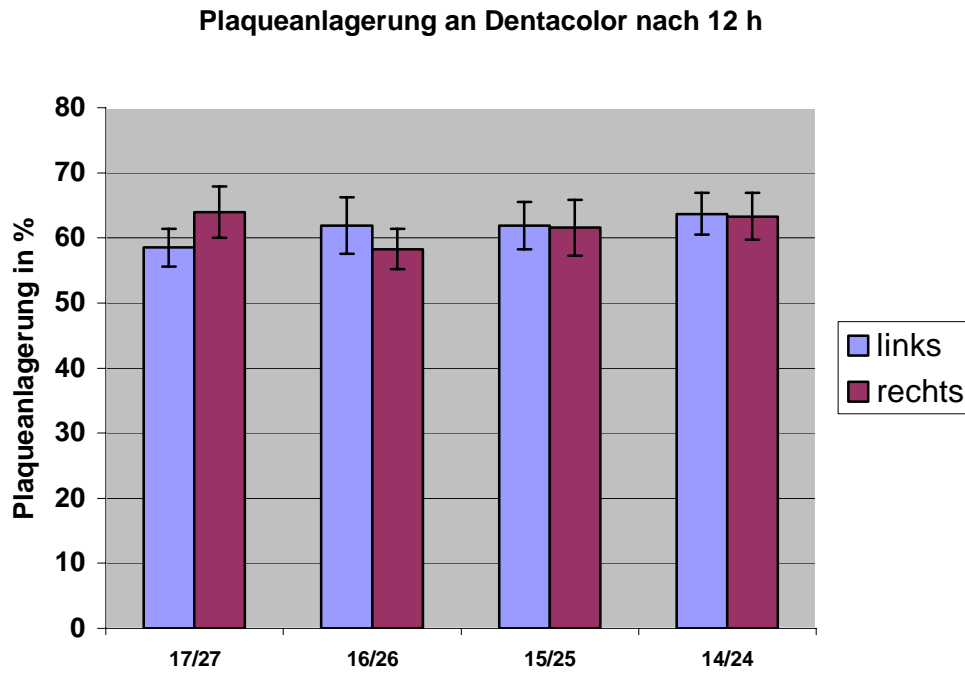


Abb.10 Vergleich der Plaqueeinlagerung an Dentacolor zwischen der rechten und der linken Seite

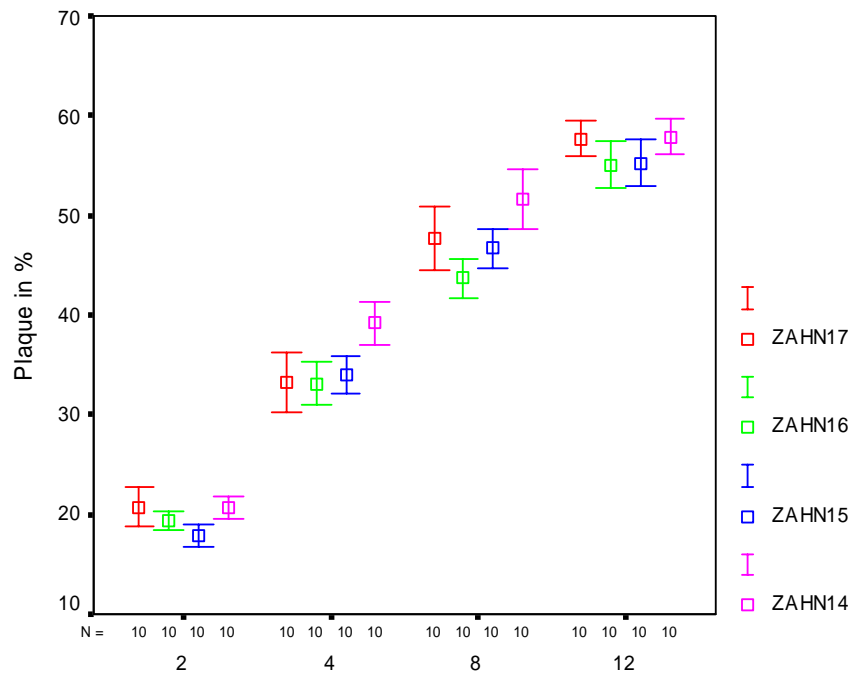


Abb.11 Plaqueeinlagerung an Dentacolor nach 2,4,8,12 h

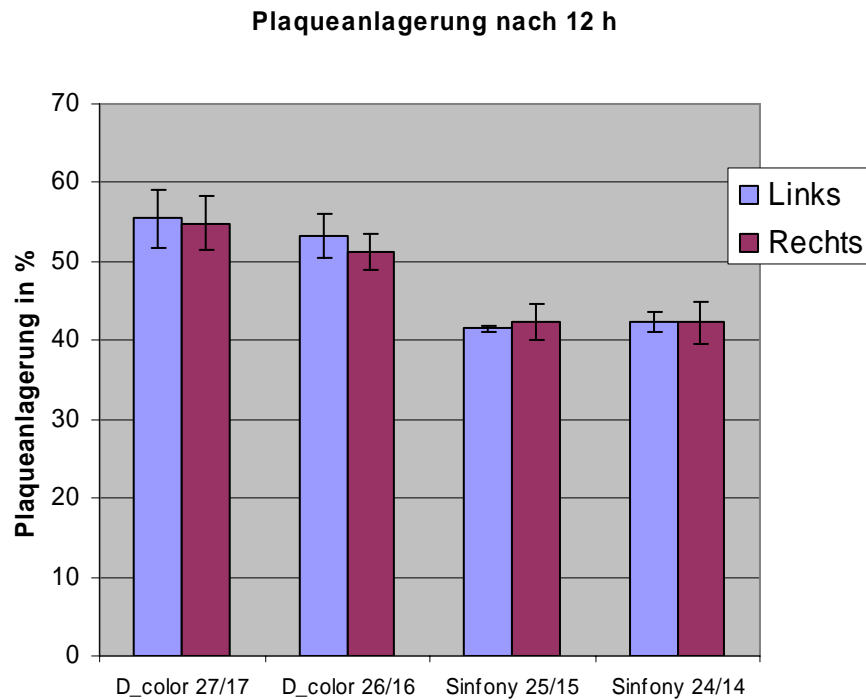


Abb.12 Plaqueeinlagerung nach 12 h in verschiedenen Positionen an das Material Dentacolor und Sinfony

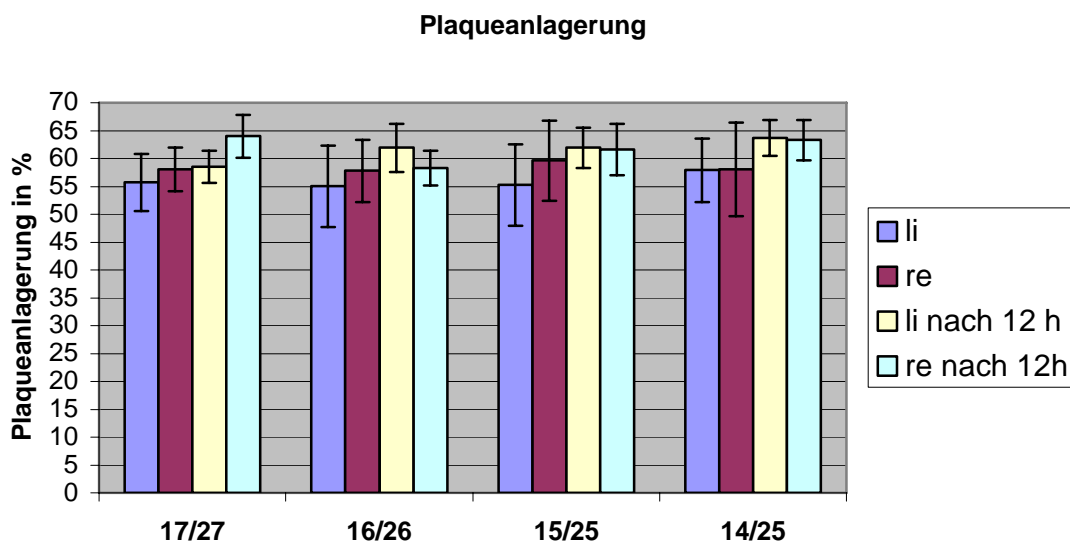


Abb.13 Vergleich der Plaqueeinlagerung an Dentacolor nach 12 h ohne Durchmessungen und mit Zwischenmessungen

5.2 Experimentelle Materialien

Die prozentuelle Auswertung der Plaqueanlagerung wurde mit Hilfe des Corpus Programms durchgeführt. Das Corpus Programm (für Computerunterstützte Berechnung von Plaque und Schmelz) wurde von Dreusche (1997) entwickelt, um bei der statistischen Auswertung und Bewertung von Zahnplaque zu helfen. Bei der Entwicklung wurde großer Wert darauf gelegt, dass alle handelsüblichen Färbemittel problemlos verarbeitet werden können. Außerdem ist das Programm in der Lage, bei der Detektion auf unterschiedliche Aufnahmebedingungen einzugehen. Um diese Vielfalt gewährleisten zu können, ist es nötig, dass der Benutzer an allen Stellen die volle Kontrolle über den Detektionsvorgang hat. Der für das gesamte Verfahren wichtigste Schritt ist das Erstellen des Bildmaterials. Auswahl, Qualität und Güte der Bilder haben einen wesentlichen Einfluss auf das Ergebnis der späteren Auswertung. Fehler, die hier gemacht werden, sind später nur schwer oder gar nicht zu beheben.

Die Besonderheit des Corpus Programms besteht in der Art der Bildverarbeitung. Alle Bilder werden vom RGB-Farbraum in den $L^*a^*b^*$ -Farbraum konvertiert. Die Segmentierung der abgefärbten Anteile erfolgt nach Maskierung und anschließender Elimination von Glanzpunkten auch einen adaptiven Snake-Algorithmus.

Die statistische Auswertung der Versuchsdaten wurde mit SPSS 10 für Windows durchgeführt. Um die Genauigkeit der Messmethoden zu testen wurden die experimentelle Materialien mit 3 verschiedenen Methoden ausgewertet und verglichen.

Zuerst wurde die gesamte Oberfläche von den Proben ausgewertet. Es konnte festgestellt werden, dass die Bakterien zuerst im Randspalt wachsen und von Randspalt besiedeln sie dann die Proben. Der Rand ist rau und deswegen wächst die Plaque stärker am Rand. Dadurch wurden auch die statistischen Ergebnisse

beeinflusst. Auch Quiryne und Bowlen 1995 untersuchten den Einfluss der Rauigkeiten auf die bakterielle Adhäsion und stellten fest, dass auf den rauen Oberflächen mehr Bakterien angesammelt werden und länger haften bleiben.

Um diesen Einfluss zu vermeiden, wurde der Spalt durch Definition einer konzentrisch verkleinerten „region of interest“ eliminiert und die Proben ohne Randanteil ausgewertet. Das kreisförmige, konzentrische Areal hatte einen Durchmesser von 5 mm ohne Rand statt 6 mm mit Rand. Ein Nachteil des Corpus Programms war, dass das Programm auch Poren und Oberflächendefekt der polierten Proben ausgewertet hat. Um diese Artefakten zu eliminieren, wurden die getesteten Proben auch mit dem Programm Image J ausgewertet.

Mit dem Image J Programm wurden die Bilder analog zum Corpus Programm vom RGB in dem L*a*b*-Farbraum konvertiert. Auch hier wurde anschließend segmentiert. Die Segmentierung erfolgte wie bei Corpus ausschließlich im L*-Kanal. Bei Image J wurde für die Segmentierung ein interaktives Schwellwert-Prozedure genutzt.

Die Tabelle 6 zeigt die Korrelationen zwischen den durchgeführten Messmethoden.

Korrelationen

		Corpus ohne Rand (Mira-2-Ton)	Corpus mit Rand (Mira-2-Ton)	Image J ohne Rand
Corpus ohne Rand (Mira-2-Ton)	Korrelation nach Pearson Signifikanz (2-seitig) N	1 919	.538(**) .000 748	.175(**) .000 919
Corpus ohne Rand (Mira-2-Ton)	Korrelation nach Pearson Signifikanz (2-seitig) N	.538(**) .000 748	1 748	.073(*) .046 754
Corpus ohne Rand (Mira-2-Ton)	Korrelation nach Pearson Signifikanz (2-seitig) N	.175(**) .000 919	.073(*) .046 754	1 927

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Tab.6 Die Korrelationen zwischen 3 Methoden

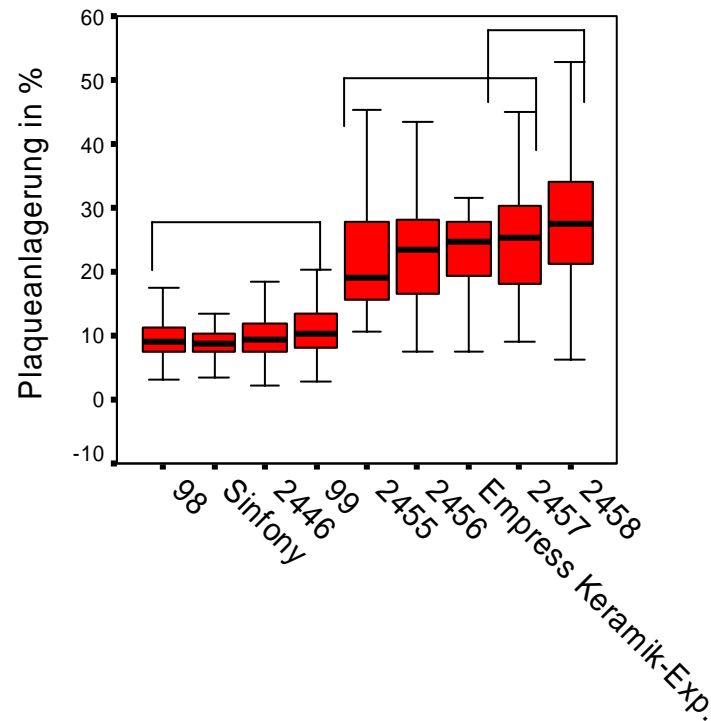


Abb.14 Plaqueanlagerung nach Auswertung mit dem Corpus Programm ohne Randanteil vor Ablösung

Im Ranking der Mittelwerte der Plaqueanlagerung nach 12 h, wobei die Proben mit dem Corpus Programm ohne Rand vor der Ablösung mit der Sonicare Zahnbürstmaschine ausgewertet wurden, hat das Material 2458 den höchsten Wert erreicht, während Material 98 eine um ein Drittel geringere Plaqueanlagerung aufgewiesen hat (Abb. 14). Eine einfaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung der Unterschiede zwischen den getesteten Materialien ergab mit Hilfe des Tukey-post-hoc-Testes ($\alpha = 0.05$) drei eindeutig zu trennende homogene Untergruppen. Dabei zeigt sich, dass die Materialien 2458 und 2457 die höchsten Mittelwerte der Plaqueanlagerung aufweisen und sich nicht signifikant voneinander unterscheiden. Eine weitere homogene Gruppe fasst die Materialien mit der niedrigsten

Plaquesanlagerung zusammen: 98, Sinfony, 2446 und 99. Die Materialien 2455, 2456, Empress Keramik und 2457 bilden eine homogene Untergruppe.

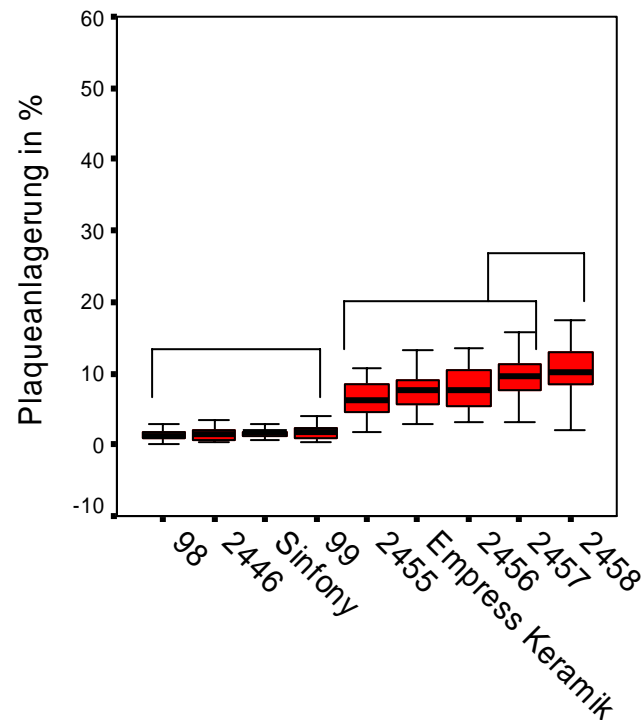


Abb.15 Plaquesanlagerung nach Auswertung mit dem Corpus Programm ohne Rand nach Ablösung

Im Ranking der Mittelwerte der Plaquesanlagerung nach Ablösung mit Sonicare Zahnbürstmaschine ausgewertet wurde, hat das Material 2458 den höchsten Wert erreicht (Abb. 15). Das Material 98 hatte um einen Drittel geringeren Wert. Eine einfaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung der Unterschiede zwischen den getesteten Materialien ergab mit Hilfe des Tukey-post-hoc-Testes ($\alpha = 0.05$) drei eindeutig zu trennende homogene Untergruppen. Dabei zeigt sich, dass die Materialien 2458 und 2457 die höchsten Mittelwerte der Plaquesanlagerung

aufweisen und sich nicht signifikant voneinander unterscheiden. Eine weitere homogene Gruppe fasst die Materialien mit der niedrigsten Plaqueanlagerung zusammen: 98, 2446, Sinfony und 99. Die Materialien 2455, Empress Keramik, 2456 und 2457 zeigen keine signifikanten Unterschiede zueinander.

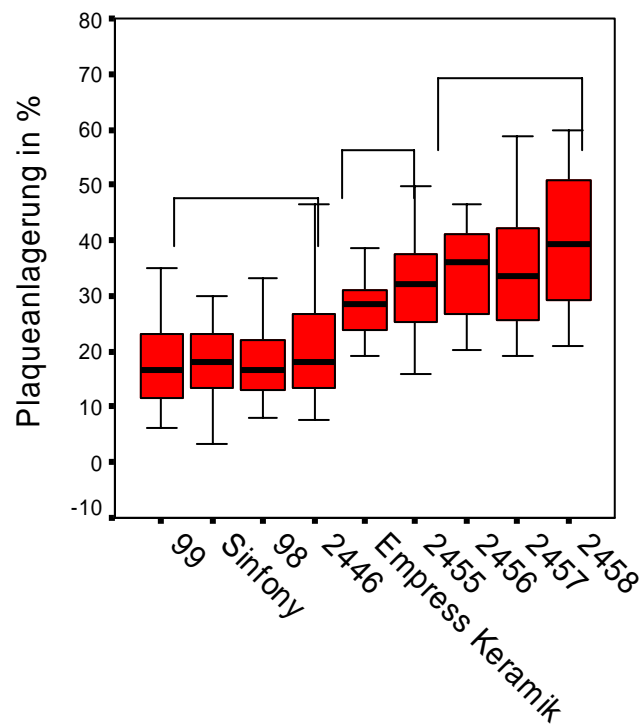


Abb.16 Plaqueanlagerung nach Auswertung mit dem Corpus Programm mit Rand vor Ablösung

Im Ranking der Mittelwerte der Plaqueanlagerung nach 12 h, wobei die Proben mit dem Corpus Programme mit dem Rand vor dem Sonicare Zahnbürstmaschine ausgewertet wurden, hat das Material 2458 den höchsten Wert erreicht, während das Material 99 einen um ein Drittel geringeren (Abb. 16). Eine einfaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung der Unterschiede zwischen den getesteten

Materialien ergab mit Hilfe des Tukey-post-hoc-Testes ($\alpha = 0.05$) drei eindeutig zu trennende homogene Untergruppen. Dabei zeigt sich, dass die Materialien 2456, 2457, 2458 die höchsten Mittelwerte der Plaqueanlagerung aufweisen und sich nicht signifikant voneinander unterscheiden. Eine weitere homogene Gruppe fasst die Materialien mit der niedrigsten Plaqueanlagerung zusammen: 99, Sinfony, 98 und 2446. Materialien Empress Keramik und 2455 zeigen keine signifikanten Unterschiede zueinander.

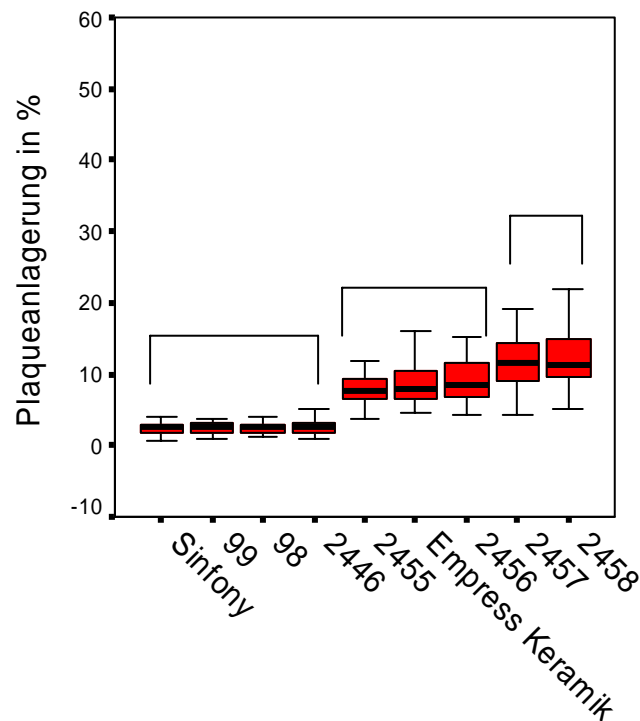


Abb.17 Plaqueanlagerung nach Auswertung mit dem Corpus Programm mit Rand nach Ablösung

Im Ranking der Mittelwerte der Plaqueanlagerung nach 12 h, wobei die Proben mit dem Corpus Programm mit Rand nach dem Ablösung mit Sonicare Zahnbürstmaschine ausgewertet wurden, hat das Material 2458 den höchsten Wert

erreicht, das Material Sinfony den niedrigsten (Abb. 17). Eine einfaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung der Unterschiede zwischen den getesteten Materialien ergab mit Hilfe des Tukey-post-hoc-Testes ($\alpha = 0.05$) drei eindeutig zu trennende homogene Untergruppen. Dabei zeigt sich, dass das Material 2458 und 2457 die höchsten Mittelwerte der Plaqueanlagerung aufweisen und sich nicht signifikant voneinander unterscheiden. Eine weitere homogene Gruppe fasst die Materialien mit der niedrigeren Plaqueanlagerung zusammen: Sinfony, 99, 98 und 2446. Materialien 2455, Empress Keramik, 2456 und 2457 zeigen keine signifikanten Unterschiede untereinander.

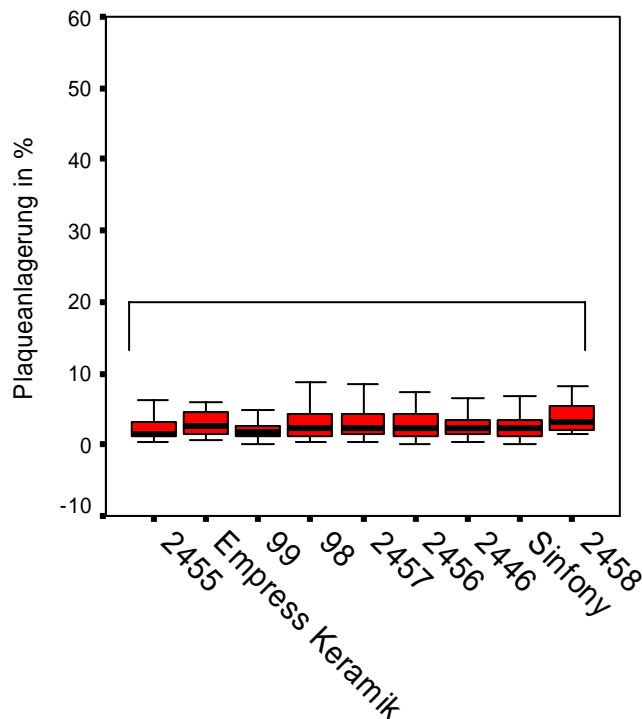


Abb.18 Plaqueanlagerung nach Auswertung mit dem Image J Programm ohne Rand, vor Ablösung

Im Ranking der Mittelwerte der Plaqueanlagerung nach 12 h, wobei die Proben mit dem Programm Image J ohne Rand vor der Ablösung mit der Sonicare Zahnbürstmaschine ausgewertet wurden, hat das Material 2458 den höchsten Wert erreicht, während Material 2455 eine um die Hälfte geringere Plaqueanlagerung hatte (Abb. 18). Eine einfaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung der Unterschiede zwischen den getesteten Materialien ergab mit Hilfe des Tukey-post-hoc-Testes ($\alpha = 0.05$) keine eindeutige zu trennenden homogenen Untergruppen.

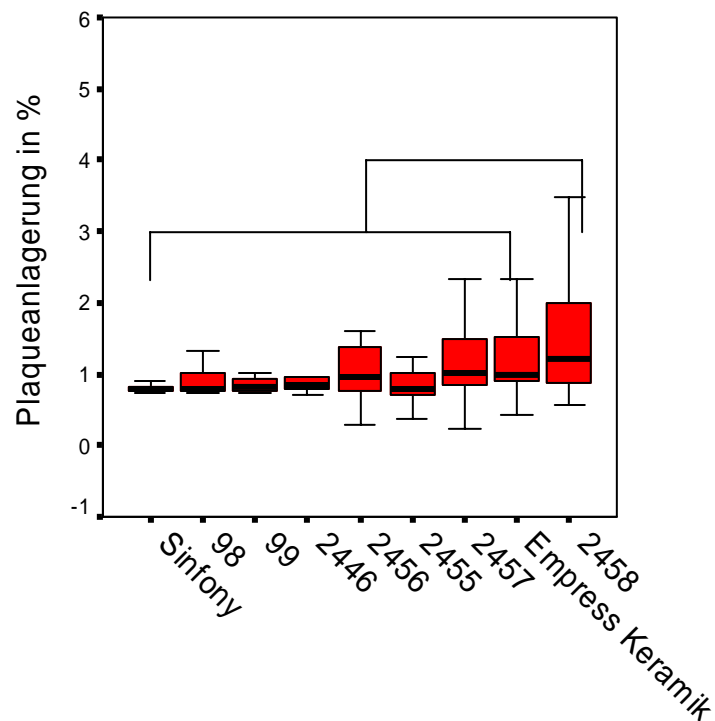


Abb.19 Plaqueanlagerung nach Auswertung mit dem Image J Programm ohne Rand, nach Ablösung

Im Ranking der Mittelwerte der Plaqueanlagerung nach 12 h, wobei die Proben mit dem Programm Image J ohne Rand nach dem Ablösung mit Sonicare Zahnbürstmaschine ausgewertet wurden, hat das Material 2458 den höchsten Wert

erreicht, während das Material Sinfony eine um ein Drittel geringere Plaqueanlagerung hatte (Abb. 19). Eine einfaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung der Unterschiede zwischen den getesteten Materialien ergab mit Hilfe des Tukey-post-hoc-Testes ($\alpha = 0.05$) zwei eindeutige zu trennenden homogenen Untergruppen. Eine homogene Gruppe fasst die Materialien mit der niedrigeren Plaqueanlagerung zusammen: Sinfony, 98, 99, 2446, 2456, 2455, 2457 und Empress Keramik. Materialien 2456, 2455, 2457, Empress Keramik und 2458 zeigen keine signifikanten Unterschiede untereinander und haben höhere Plaqueanlagerung. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der experimentellen Materialien sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Material	Anzahl der Proben	Corpus ohne Rand (Mira 2 Ton)	Corpus ohne Rand (Mira 2 Ton) nach Ablösung	Corpus mit Rand (Mira 2 Ton)	Corpus mit Rand (Mira 2 Ton) nach Ablösung	Image J ohne Rand	Image J ohne Rand nach Ablösung
2455	47	23.0(9.9)	6.9(4.4)	32.1(8.4)	7.9(2.1)	2.7(2.7)	1.2(1.1)
2456	45	23.9(9.8)	8.3(4.1)	34.1(8.1)	9.1(3.3)	3.7(3.9)	1.1(0.7)
2457	49	25.9(9.8)	10.0(4.1)	34.4(10.0)	12.3(4.8)	3.6(2.7)	1.2(0.8)
2458	46	28.3(9.9)	10.7(3.7)	40.0(12.6)	12.9(5.6)	3.9(2.5)	1.7(1.1)
98	80	9.7(3.7)	1.2(0.6)	18.7(7.2)	2.5(1.0)	3.3(3.7)	0.9(0.1)
99	80	11.2(4.9)	1.7(1.0)	17.7(7.2)	2.4(1.0)	3.2(4.5)	0.9(0.2)
2446	77	11.6(6.2)	1.5(6.2)	20.2(8.7)	2.7(1.1)	3.7(4.3)	1.0(0.5)
Sinfony	78	10.0(5.3)	1.6(0.6)	18.4(6.8)	2.4(0.7)	3.9(6.0)	0.9(0.3)
Empress Keramik-Exp.	44	24.1(7.4)	7.8(2.8)	28.2(4.9)	8.8(3.2)	3.1(2.2)	1.2(0.5)

Tab.8 Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern) von experimentellen Materialien

5.3 Kommerzielle Materialien

Die kommerziellen Materialien wurden genauso wie die experimentellen Materialien ausgewertet. Als Referenz diente erneut Empress Keramik. Bei den kommerziellen Materialien sind die geringeren Differenzen zwischen den einzelnen Mittelwerten und Standardabweichungen auffällig (Tab. 9). Die Auswertung mit 3 verschiedenen Messmethoden zeigt, dass die Proben, die mit „Corpus mit Rand“ ausgewertet wurden, mehr Bakterien anlagerten als die anderen Proben.

Material	Anzahl der Proben	Corpus ohne Rand (Mira 2 Ton)	Corpus ohne Rand (Mira 2 Ton) nach Ablösung	Corpus mit Rand (Mira 2 Ton)	Corpus mit Rand (Mira 2 Ton) nach Ablösung	Image J ohne Rand	Image J ohne Rand nach Ablösung
Definite	43	14.9(5.4)	3.8(2.4)	29.4(6.4)	10.1(3.6)	3.0(2.1)	0.9(0.5)
Durafil	48	14.4(4.6)	3.9(2.1)	27.3(7.0)	10.3(3.8)	2.7(1.9)	1.0(0.5)
Dyract	47	14.7(5.2)	3.7(1.9)	30.2(6.6)	11.1(2.9)	3.5(2.7)	0.9(0.4)
Empress Keramik	49	15.3(6.8)	4.4(2.4)	30.5(6.6)	12.1(3.8)	3.8(3.4)	1.0(0.4)
Ketac Molar	44	22.5(10.1)	8.6(6.2)	33.3(7.6)	15.3(5.2)	5.6(4.7)	2.7(3.7)
PERTAC II	47	15.1(6.1)	4.0(2.8)	27.3(9.3)	9.9(3.1)	3.6(3.0)	1.0(1.1)
Tetric Ceram	47	16.6(8.9)	4.0(2.5)	26.8(5.7)	9.9(2.6)	4.2(4.8)	0.9(0.3)
Tetric Flow	48	15.4(8.8)	3.5(1.9)	26.1(7.2)	9.5(3.0)	3.8(2.2)	1.0(0.9)

Tab.9 Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern) von kommerziellen Materialien. Anzahl der Proben war für jedes Material gleich

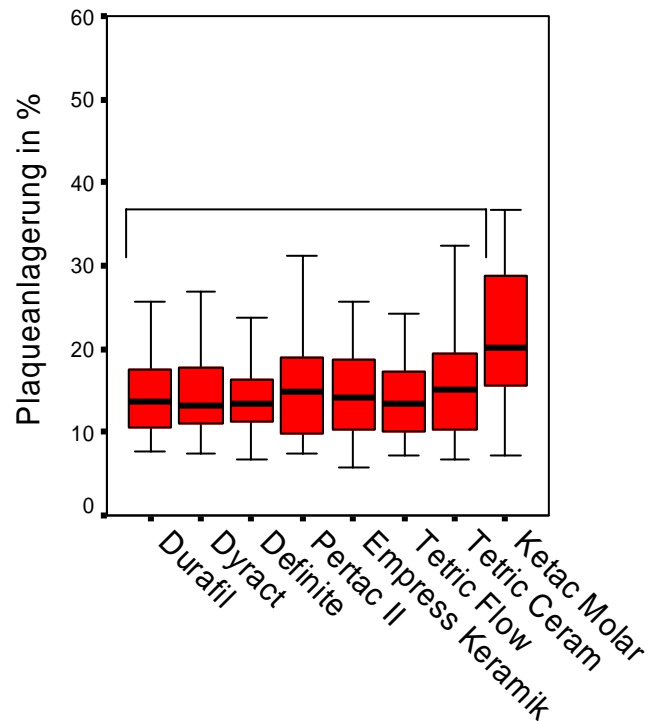


Abb.20 Plaqueanlagerung nach Auswertung mit dem Corpus Programm ohne Rand vor Ablösung

Im Ranking der Mittelwerte der Plaqueanlagerung nach 12 h, wobei die Proben mit Programm Corpus ohne Rand vor der Ablösung mit der Sonicare Zahnbürstmaschine ausgewertet wurden, hat das Material Ketac Molar den höchsten Wert erreicht, während das Material Durafill eine um die Hälfte geringere Plaqueanlagerung hatte (Abb.20). Eine einfaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung der Unterschiede zwischen den getesteten Materialien ergab mit Hilfe des Tukey-post-hoc-Testes ($\alpha = 0.05$) zwei eindeutig zu trennende homogene Untergruppen. Dabei zeigt sich, dass das Material Ketac Molar den höchsten Mittelwert der Plaqueanlagerung aufweist. Eine homogene Gruppe fasst die Materialien mit der niedrigeren Plaqueanlagerung zusammen: Durafill, Dyract, Definite, Pertac II, Empress Keramik, Tetric Flow und Tetric Ceram.

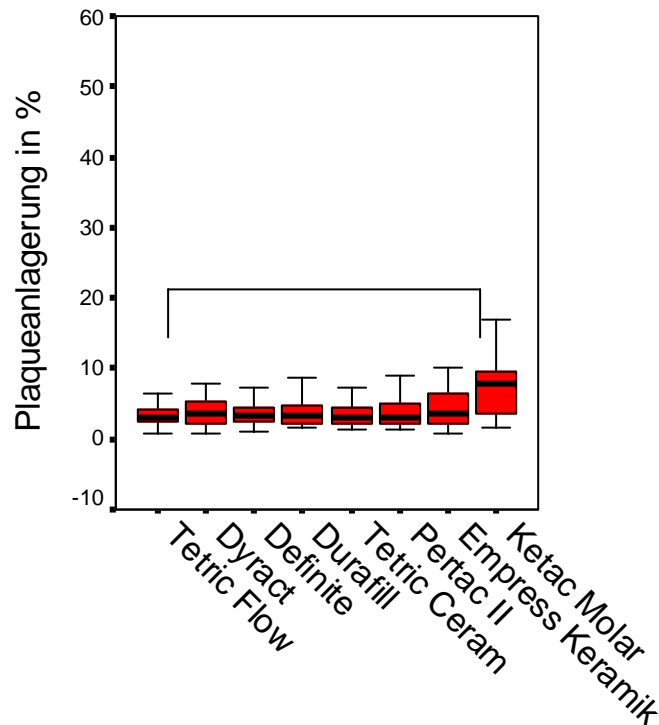


Abb.21 Plaqueanlagerung nach Auswertung mit dem Corpus Programm ohne Rand nach Ablösung

Im Ranking der Mittelwerte der Plaqueanlagerung nach 12 h, wobei die Proben mit Corpus Programm ohne Rand nach der Ablösung mit der Sonicare Zahnbürstmaschine ausgewertet wurden, hat das Material Ketac Molar den höchsten Wert erreicht, während das Material Durafill eine um die Hälfte geringere Plaqueanlagerung hatte (Abb. 21). Eine einfaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung der Unterschiede zwischen den getesteten Materialien ergab mit Hilfe des Tukey-post-hoc-Testes ($\alpha = 0.05$) zwei eindeutig zu trennende homogene Untergruppen. Dabei zeigt sich, dass das Material Ketac Molar mit dem höchsten Mittelwert der Plaqueanlagerung eine Gruppe darstellte. Eine homogene Gruppe fasst die Materialien mit der niedrigeren Plaqueanlagerung zusammen: Tetric Flow, Dyract, Definite, Durafill, Tetric Ceram, Pertac II und Empress Keramik.

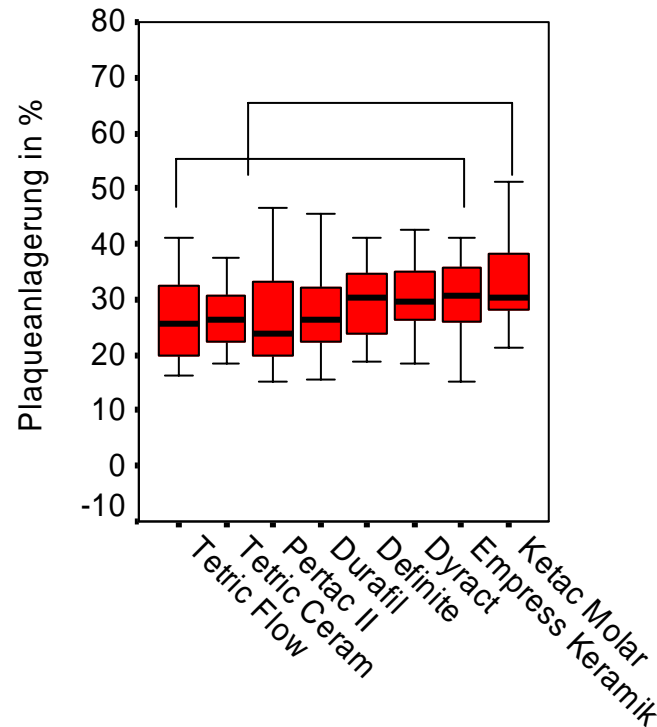


Abb.22 Plaqueanlagerung nach Auswertung mit dem Corpus Programm mit Rand vor Ablösung

Im Ranking der Mittelwerte der Plaqueanlagerung nach 12 h, wobei die Proben mit Corpus Programme ohne Rand vor dem Sonicare Zahnbürstmaschine ausgewertet wurden, hat das Material Ketac Molar den höchsten Wert erreicht, während das Material Tetric Flow den niedrigsten Wert aufwies (Abb. 22). Eine einfaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung der Unterschiede zwischen den getesteten Materialien ergab mit Hilfe des Tukey-post-hoc-Testes ($\alpha = 0.05$) zwei homogene Untergruppen. Dabei zeigt sich, dass die Materialien Pertac II, Durafil, Definite, Dyract, Empress Keramik und Ketac Molar höhere Mittelwerte der Plaqueanlagerung aufweisen und sich nicht signifikant voneinander unterscheiden. Eine weitere homogene Gruppe fasst die Materialien mit der niedrigeren Plaqueanlagerung zusammen: Tetric Flow, Tetric Ceram, Pertac II, Durafil, Definite, Dyract und Empress Keramik.

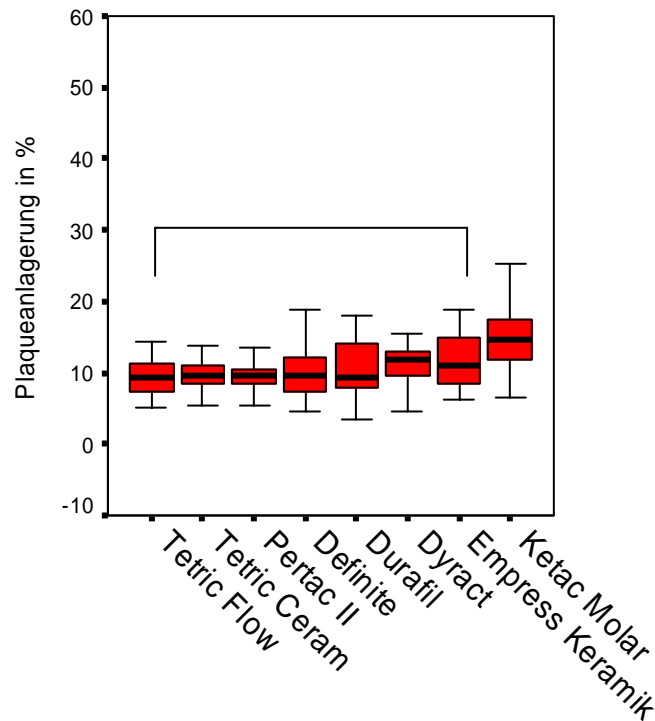


Abb.23 Plaqueanlagerung nach Auswertung mit dem Corpus Programm mit Rand nach Ablösung

Im Ranking der Mittelwerte der Plaqueanlagerung nach 12 h, wobei die Proben mit Corpus Programme mit Rand nach dem Sonicare Zahnbürstmaschine ausgewertet wurden, hat das Material Ketac Molar den höchsten Wert erreicht, während das Material Tetric Flow den niedrigsten Wert hatte (Abb. 23). Eine einfaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung der Unterschiede zwischen den getesteten Materialien ergab mit Hilfe des Tukey-post-hoc-Testes ($\alpha = 0.05$) zwei homogene Untergruppen. Dabei zeigt sich, dass alle Materialien außer Ketac Molar zu einer homogenen Gruppe gehören.

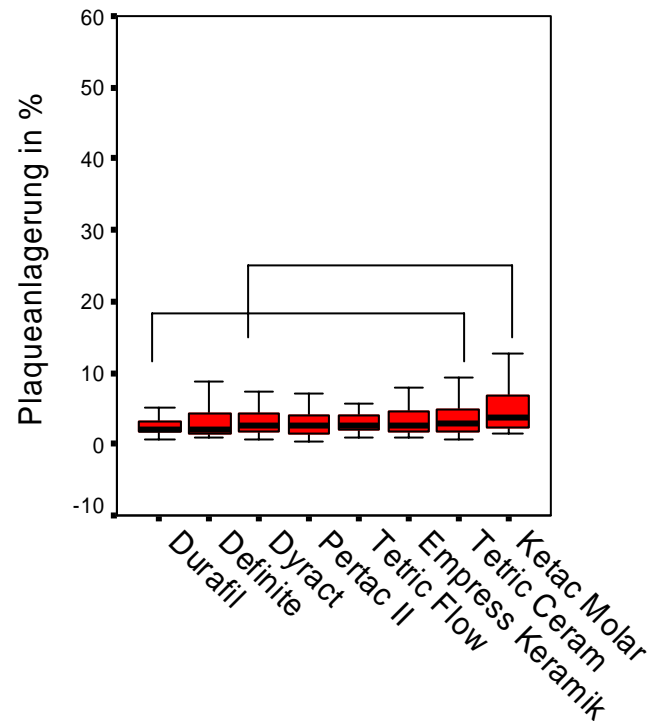


Abb.24 Plaqueanlagerung nach Auswertung mit dem Image J Programm ohne Rand vor Ablösung

Im Ranking der Mittelwerte der Plaqueanlagerung nach 12 h, wobei die Proben mit Programm Image J ohne Rand vor dem Sonicare Zahnbürstmaschine ausgewertet wurden, hat das Material Ketac Molar den höchsten Wert erreicht, während Material Durafill den niedrigsten Wert hatte (Abb. 24). Eine einfaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung der Unterschiede zwischen den getesteten Materialien ergab mit Hilfe des Tukey-post-hoc-Testes ($\alpha = 0.05$) zwei eindeutig zu trennende homogene Untergruppen. Dabei zeigt sich, dass das Material Ketac Molar den höchsten Mittelwert der Plaqueanlagerung aufweist. Eine weitere homogene Gruppe fasst die Materialien mit niedrigeren Plaqueanlagerung zusammen: Durafill, Definite, Dyract, Pertac II, Tetric Flow, Empress Keramik, Tetric Ceram. Die Materialien Dyract, Pertac II, Tetric Flow, Empress Keramik, Tetric Ceram und Ketac Molar gehören zu einer homogenen Gruppen.

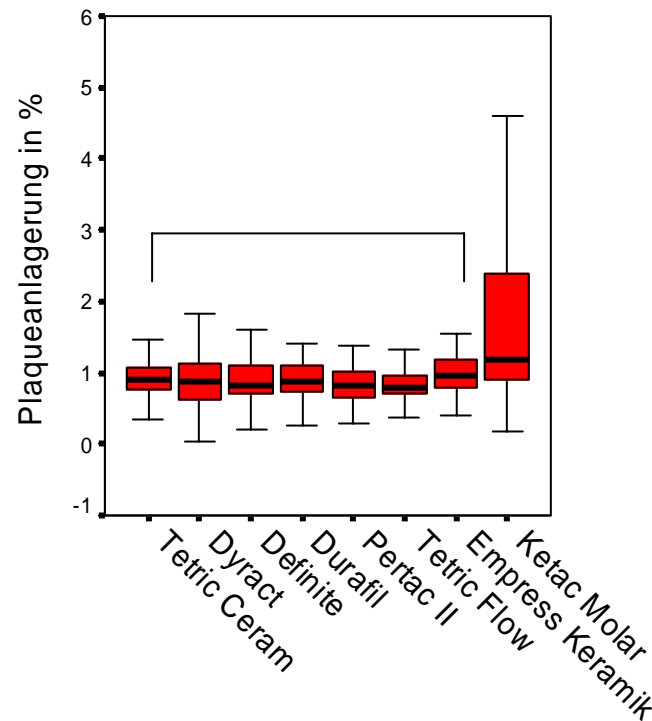


Abb.25 Plaqueanlagerung nach Auswertung mit dem Image J Programm ohne Rand nach Ablösung

Im Ranking der Mittelwerte der Plaqueanlagerung nach 12 h, wobei die Proben mit Programm Image J ohne Rand nach dem Sonicare Zahnbürstmaschine ausgewertet wurden, hat das Material Ketac Molar den höchsten Wert erreicht, während das Material Tetric Ceram den niedrigeren Wert hatte (Abb. 25). Eine einfaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung der Unterschiede zwischen den getesteten Materialien ergab mit Hilfe des Tukey-post-hoc-Testes ($\alpha = 0.05$) zwei eindeutig zu trennende homogene Untergruppen. Ketac Molar stellte eine Untergruppe dar. Eine weitere homogene Gruppe umfasst die restlichen Materialien mit der niedrigeren Plaqueanlagerung.

5.4 Fluoreszenz

Um den Anteil lebender bzw. toter Bakterien zu bestimmen, wurden die Proben mit der Fluoreszenzfärbung eingefärbt und mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Durch die Fluoreszenzfärbung wurden die lebenden Bakterien grün gefärbt und die toten Bakterien wurden rot gefärbt. Für die Untersuchung wurden nur tote Bakterien ausgewertet. Die Proben wurden mit zwei verschiedenen Methoden ausgewertet und verglichen.

1. Die Proben wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen eingefärbt und mit der Software Image J ausgewertet.

2. Die Proben wurden mit Mira 2 Ton Standard eingefärbt und mit der Software Image J ausgewertet. In beiden Fällen wurden Randartefakte eliminiert.

Für die zwei untersuchten Bakterienanfärbemethoden wurde keine Korrelation gefunden (Kendall-Tau-b).

			Image J ohne Rand Fluor mit Corpus ausgewertet	Image J ohne Rand Mira 2 Ton mit Corpus
Kendall-Tau- b	Image J ohne Rand Fluor mit Corpus ausgewertet	Korrelation Signifikanz (2-seitig) N	.1000 143	.045 .431 143
Kendall-Tau- b	Image J ohne Rand Mira 2 Ton mit Corpus	Korrelation Signifikanz (2-seitig) N	.045 .431 143	1.000 166

Tab.10 Die Korrelationen zwischen den 2 Methoden

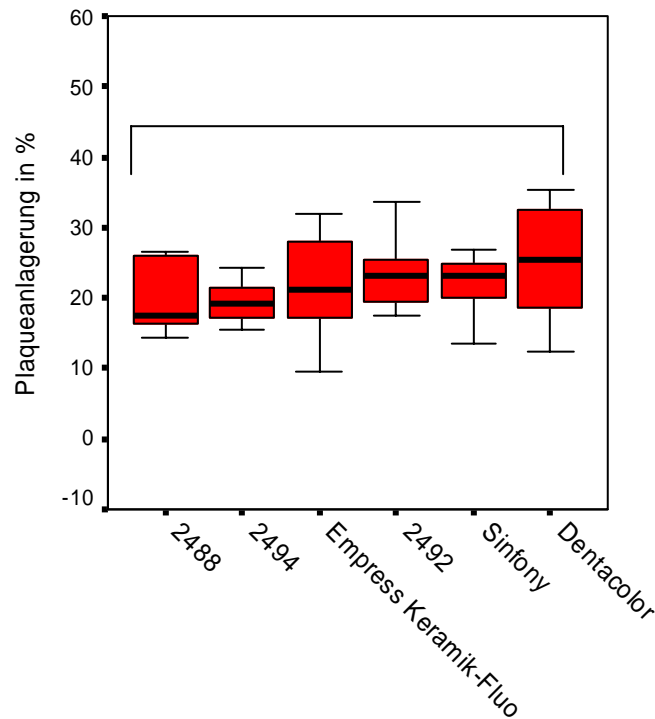


Abb.26 Plaqueeinlagerung an experimentellen Materialien mit dem Fluoreszenzmikroskop (tote Bakterien) ohne Rand nach Mira 2 Ton Einfärbung, wobei die Proben mit der Software Image J ausgewertet wurden

Im Ranking der Mittelwerte der Plaqueeinlagerung nach 12 h, wobei die Proben mit dem Fluoreszenzmikroskop ohne Rand fotografiert und ausgewertet wurden, hat das Material Dentacolor den höchsten Wert erreicht, während das Material 2488 nur halb so hohe Werte erreichte (Abb. 26). Eine einfaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung der Unterschiede zwischen den getesteten Materialien ergab mit Hilfe des Tukey-post-hoc-Testes ($\alpha = 0.05$) keine eindeutig zu trennende homogene Untergruppen.

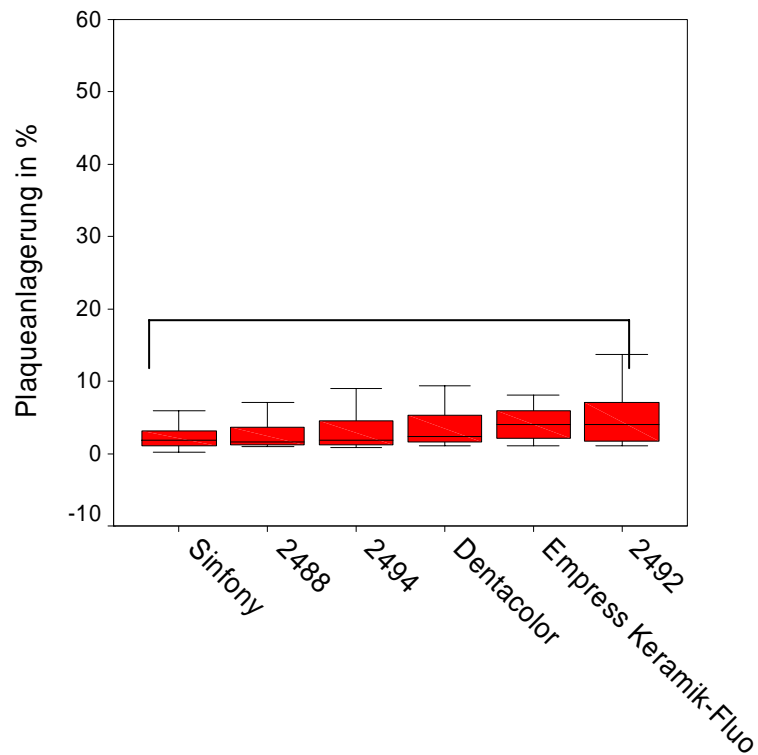


Abb.27 Plaqueanlagerung an experimentellen Materialien mit dem Fluoreszenzmikroskop (tote Bakterien) ohne Rand nach Fluoreszenzfärbung, wo die Proben mit der Software Image J ausgewertet wurden

Im Ranking der Mittelwerte der Plaqueanlagerung nach 12 h, wobei die Proben mit dem Fluoreszenzmikroskop ohne Rand mit dem Corpus Programm fotografiert und ausgewertet wurden, hat das Material 2492 den höchsten Wert erreicht, während das Material Sinfony einen halb so hohen Wert erreichte (Abb.27). Eine einfaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung der Unterschiede zwischen den getesteten Materialien ergab mit Hilfe des Tukey-post-hoc-Testes ($\alpha = 0.05$) keine eindeutig zu trennende homogene Untergruppen.

6. Diskussion

6.1 Material und Methode

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Plaqueanlagerung in situ an experimentellen Materialien mit Polyalkenoatzusatz verschiedener Neutralisationsgrade (Forbiomat Projekt) und an kommerziellen Materialien.

Es wurde ein Vorversuch mit zwei verschiedenen Methoden der Plaquemessung durchgeführt. Beim ersten Versuch wurden die Testproben je nach 2, 4, 8 und 12 h Tragezeit angefärbt, fotografiert und gemessen. Beim zweiten Versuch wurden die Proben 12 h ohne Zwischenmessungen getragen, angefärbt, fotografiert und gemessen. Nach dem statistischen Vergleich der beiden Methoden konnte deutlich erkannt werden, dass sich an den Proben, die 12 h ohne Zwischenmessungen getragen worden sind, im Vergleich zur ersten Methode mit Zwischenmessungen mehr Bakterien ansammelten. Deshalb wurden alle Versuche 12 h ohne Zwischenmessungen durchgeführt, da sich auf diese Weise ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis ergibt.

Die Proben wurden tagsüber 12 Stunden in der Zeit 8:00 h bis 20:00 h getragen. Dieser Zeitraum wurde in der Literatur als ausreichend bewertet (Kistler 1999, Lie 1978, Quiryen 1985, Hahn 1992). Zwischen den Mahlzeiten und in der Nacht waren die Schienen im Wasser gelagert. Es konnte nicht genau kontrolliert werden, ob die Probanden die Schienen tatsächlich 12 h im Mund getragen haben. Bei den Probanden wurden unterschiedliche Ergebnisse beobachtet. Bei einigen Probanden gab es auch Unterschiede in der Plaqueanlagerung in verschiedenen Phasen des Versuches.

Die Probanden hatten keinen besonderen Ernährungsplan, da die absoluten Plaquewerte zwischen den einzelnen Probanden aufgrund großer intra- und

interindividuellen Schwankungen nicht vergleichbar wären, wie von anderen Autoren bestätigt wird (Orstavik 1981, Smales 1981, Weber 1987).

Alle untersuchten Proben wurden nach 12 h Tragezeit entnommen und die Probenoberfläche mit einem unspezifischen Plaquerelevator Mira 2 Ton (Hager & Werken, Duisburg) eingefärbt. Zur Plaquequantifizierung wurde eine planimetrische Auswertung der gefärbten Areale vorgenommen und die Proben wurden unter dem Lichtmikroskop bei 10 fachen Vergrößerung digitalisiert. Mit den Bildbearbeitungsprogrammen (Corpus und Image J) wurde der prozentuelle Anteil der Plaqueanlagerungen an den Proben ausgewertet.

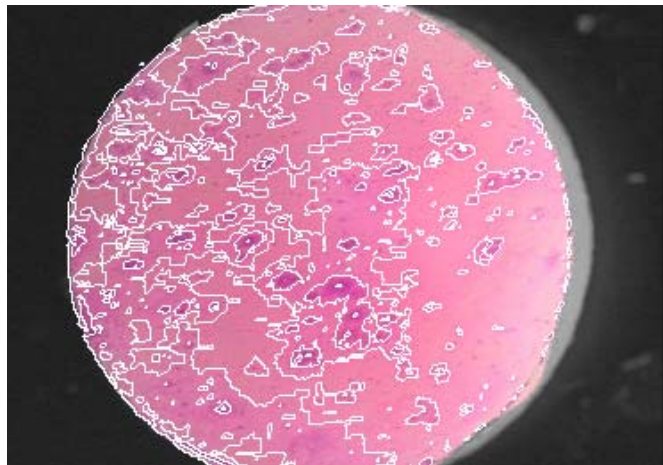


Abb.28 Ergebnis der Segmentierung als Basis für die prozentuelle Auswertung mit dem Corpus Programm

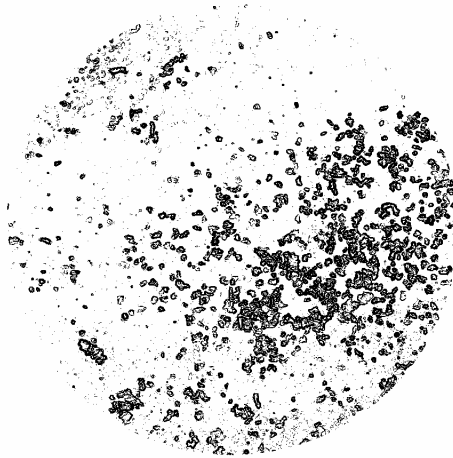


Abb.29 Ergebnis der Segmentierung als Basis für die prozentuelle Auswertung mit dem Image J Programm (andere Probe als in Abb.28)

Nach den prozentuellen Auswertungen der Plaqueanlagerung wurde die Plaqueablösung von den Proben mit Hilfe der elektrischen Zahnbürste Sonicare Ultraschall (Philips) bei 10 s Anwendungsdauer im Wasser im 1 mm Abstand getestet (Standford 1997). Danach wurde erneuert die Plaqueanlagerung an den Proben getestet (Abb.30).

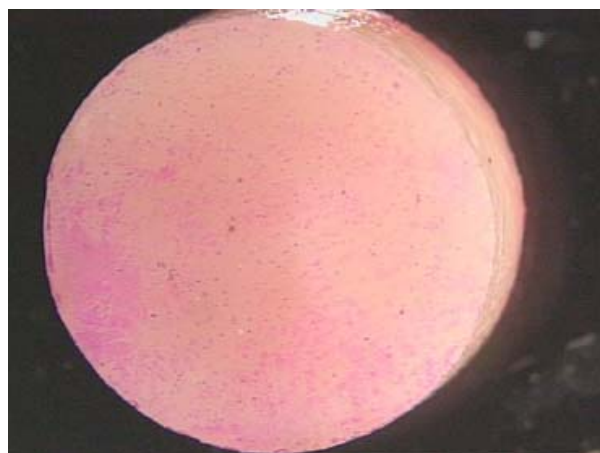


Abb.30 Plaqueanlagerung nach der Plaqueablösung mit der elektrischen Zahnbürste Sonicare

6.1.1 Einfluss der Positionen

Die Plaquebesiedelung intraoraler Substratoberflächen ist ein Ergebnis komplizierter, physikalisch-chemischer Grenzflächenphänomene zwischen einem Adsorbens und einem flüssigen Adhäsiv (Speichel, Sulkusfluid). Von wesentlicher Bedeutung sind die Mikromorphologie bzw. das Mikrorelief der Oberfläche (Keenan, Shillingburg et. al 1980), die freie Oberflächenenergie bzw. deren Veränderung durch absorbierte Speichelglykoproteine (Pellicel) (De Jong 1984, Krämer 1989, Van Dijk 1987) und ggf. direkte bakteriostatische bzw. bakterizide Eigenschaften der Restaurationsmaterialien selbst (Augthun 1988, Dummer 1982, Van Dijk 1987). Darüber hinaus bestehen biologische Wechselwirkungen z.B. mit den unspezifischen und spezifischen Abwehrmechanismen des Wirts (König 1987). *Hahn und Hannig* beobachteten, dass sich am ersten Molar im Oberkiefer mehr Plaque ansammelt, als bei den anderen Positionen. Der Speichel der Gl. Parotis beeinflusst die Plaqueanlagerung. Deswegen wurden in dieser Studie alle Proben in allen Positionen vom ersten Prämolare bis zweiten Molar links und ersten Prämolare bis zweiten Molar rechts getestet und vermessen. Für die statistischen Auswertungen wurden prozentuelle Ergebnisse der beiden Seiten genommen, da im Vorversuch festgestellt wurde, dass zwischen der linken und der rechten Seite keine Unterschiede sind.

6.1.2 Einfluss der Prüfareale mit oder ohne Rand

Die untersuchten Proben wurden mit dem Corpus Programm und Image J ausgewertet. Mit dem Corpus Programm wurden die Proben mit zwei verschiedenen Methoden ausgewertet. Bei der ersten Methode wurden die gesamte

Probenoberfläche und auch alle Artefakte ausgewertet. Wie bereits beschrieben, wachsen Bakterien zuerst im Randspalt und von Randspalt besiedeln sie dann die gesamte Probe (Quiryne und Bowlen 1995). Das Ziel der zweiten Methode war es, den Einfluss der Artefakte durch den Randspalt zu vermeiden. Dafür wurde ein konzentrisches, kreisförmiges Areal untersucht, welches kleiner als der Probedurchmesser war. Auf diese Weise konnten die Einflüsse des Randanteils teilweise vermieden werden. Die Proben mit Rand waren im Durchmesser 6 mm lang, während die Proben ohne Rand im Durchmesser 5 mm lang waren. Mit Image J Programm wurden nur Proben ohne Rand ausgewertet.

6.1.3 Fluoreszenzfärbung

Ein Problem der oben beschriebenen Methode war, dass Mira 2 Ton lediglich eine unspezifische Proteinfärbung zuließ, bei der keine klare Aussage darüber genannt werden konnte, ob auch Matrix des Füllungsmaterials mit angefärbt wurde.

Um dieses Problem zu lösen wurde eine Fluoreszenzfärbung vorgenommen, mit der es möglich ist, sowohl Bakterien zu identifizieren, als auch eine Differenzierung zwischen lebenden und toten Bakterien zu treffen. Diese Untersuchung konnte nur bei den Materialien Sinfony, 2448, 2494, 2492, Empress Keramik und Dentacolor durchgeführt werden, da in restlichen Materialien Fluoreszenzzusätze in der Matrix enthalten sind.

Die Proben wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Live/Dead BacLight Viability Kit L-7012 rot bzw. grün (Lot 02A1-2) der Firma Molecular Probes, Eugena, USA angefärbt. Die Inkubationszeit war 15 min und danach wurden die Proben unter klarem Leitungswasser gespült. Durch die Fluoreszenzfärbung wurden die toten Bakterien rot verfärbt. Die Auswertung wurde für tote Bakterien vor der Plaqueablösung vorgenommen.

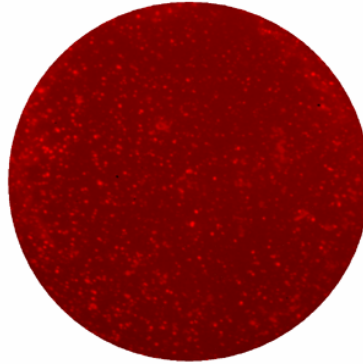


Abb.31 Abfärbung von toten Bakterien unter dem Fluoreszenzmikroskop

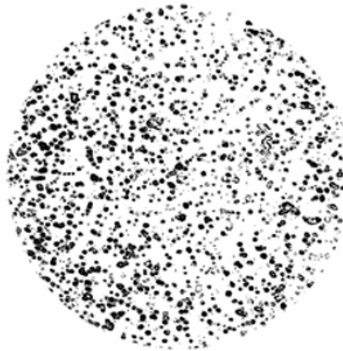


Abb.32 Segmentierungsergebnis als Voraussetzung für die prozentuelle Auswertung mit Image J (gleiche Probe wie in Abb. 31)

6.2 Ergebnisse

6.2.1 Experimentelle Materialien

Die Rauigkeit der Oberfläche kann in Übereinstimmung mit anderen Autoren als ein Hauptfaktor für die Plaqueanlagerung gesehen werden (Buchmann 1992, Chan

1986, Geurtsen 1990, Mierau 1984, Quiryne 1990, Riethe 1984, Smales 1981, Van Dijk 1987, Weber 1992). Die Oberflächenbeschaffenheit ist ihrerseits abhängig von der physikalischen Grundstruktur des Werkstoffes sowie von seiner Verarbeitung und Politur (Körper 1994). Grundsätzlich wird für die in der Mundhöhle eingesetzten Materialien zur Verringerung der Plaqueanlagerung eine möglichst glatte Oberfläche gefordert (Buchmann 1992, Riethe 1984, Weber 1992). Untersucht wurden die experimentellen Materialien der Firma 3M-ESPE, welche als Zusatz Aluminium und Calcium Polyacrylate mit verschiedenen Neutralisationsgrad hatten, sowie auch Materialien, welche kein Glasionomerezementzusatz hatte.

Nach dem Auswerten der Ergebnisse der Gruppe der experimentelle Materialien ist erkennbar, dass an der gesamten Oberfläche der Proben ohne abgeschnittenen Rand größere Plaqueanlagerung zu beobachten war, im Vergleich zu den Proben mit eliminiertem Rand. Durch die Schrumpfung des Komposites entsteht ein Spalt zwischen Probe und dem Probenträger. Das ist eine bevorzugte Stelle für Bakterienadhäsion.

Aus den Auswertungen mit dem Corpus Programm ist sichtbar, dass sich an dem Referenzmaterial Empress Keramik mehr Plaque angesammelt hat, als an den Materialien Sinfony mit oder ohne Glasionomerezusatz. An dem Material Sinfony mit Aluminium und Calcium Polyacrylaten lagerte sich mehr Plaque an im Vergleich zu dem Referenzmaterial Empress Keramik. Es zeichnet sich die Tendenz ab, dass sich an Material Sinfony ohne Glasionomerezementzusatz weniger Plaque anlagert, als bei den anderen Materialien. Das gleiche konnte auch nach der Plaqueentfernung mit Sonicare Zahnbürsten beobachtet werden. Material Sinfony mit niedrig neutralisiertem Aluminium-Polyacrylatzusatz schneidet hinsichtlich der Plaqueanlagerung und insbesondere der Plaqueablösbarkeit besser ab als Material Sinfony mit Calcium-Polyacrylatzusatz. Innerhalb der Calcium-

Polyacrylate scheint ein zunehmender Neutralisationsgrad die Plaqueanlagerung tendenziell zu begünstigen.

Der Verblendkunststoff Sinfony wurde aus Bismethacrylaten, silanisierten Glasfüllstoffen und silanisierter Kieselsäure hergestellt. Diesen Grundpasten wurden Photoinitiatoren-D, L-Campherchinon, modifizierte Amine und Phosphinoxid-derivate sowie Stabilisatoren und Pigmente zugesetzt.

Bei den experimentellen Materialien kommt es durch den nicht standardisierten Herstellungsprozess häufiger zu Inhomogenitäten und Lufteinschlüssen, die bei der nachfolgenden Oberflächenbearbeitung zu Mikroporitäten führen und damit die Ahnfärbbarkeit und die Plaqueretention verbessern.

Hier erschließt sich ein gravierender Nachteil der Methode eines Anfärbens mit unselektiven Farbstoffen: Es kann nicht differenziert werden, ob tatsächlich Bakterien, Detritus oder Oberflächendefekte der Materialproben markiert werden. Für eine nähere Untersuchung wurden die Materialien mit Fluoreszenzfarbstoff angefärbt und Image J Programm ausgewertet.

Das Corpus Programm ist in der Lage Unterschiede zwischen Proben zu entdecken. Durch die Auswertungen mit Image J ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben. Aufgrund fehlender Dateiinformatoren zum Auswertealgorithmus von Corpus, kann dieser Unterschied nicht weiter diskutiert werden.

6.2.2 Kommerzielle Materialien

In Ergänzung zum Forbiomat Projekt wurden kommerzielle Füllungswerkstoffe mit verschiedenen Eigenschaften getestet. Es handelte sich um Komposite, Ormocere, Glasionomere und Kompomere. Als Referenzmaterial diente erneut Empress Keramik.

In den Ergebnissen der kommerziellen Materialien sind die geringen Differenzen zwischen den einzelnen Mittelwerten und Standardabweichungen auffällig. Die Varianzanalyse und der Nachgeschaltete Post-Hoc-Test zeigen lediglich für Ketac Molar eine höhere Tendenz zur Plaqueanlagerung. Die Ursache dafür kann eine schlechtere Oberflächenpolierbarkeit und daraus resultierende raue Oberfläche sein.

Moderne zahnärztliche Kompositmaterialien bestehen aus verschiedenen Komponenten, welche die Eigenschaften des Werkstoffes beeinflussen. Die drei Hauptbestandteile sind organische Matrix (niedrige freie Oberflächenenergie) (Schwuger 1996), disperse Phase (Füller) und Verbundphase (Silane, Kopolymere) (Hellwig 1999). Nur Glasionomerzement besitzt keine PMMA-Matrix, sonst sind alle anderen Materialien auf Kunststoffbasis hergestellt. Glasionomerzement erhält Partikel aus Glas als Füllkörper und Polyacrylsäure als Matrix und härtet durch eine Säure-Base-Reaktion aus. Das Glas besitzt eine höhere Oberflächenenergie als die organische Matrix der Polymethylmetacrylate. In der Literatur wurden eine plaqueinhibierende Wirkung für Glasionomerzemente beschrieben (Friedl 1997). Obwohl der Glasionomerzement als Füllkörper Glas enthält, liegt die freie Oberflächenenergie nicht oberhalb der untersuchten Kunststoffe. Glasionomerzement gehört zu den Materialien, in welchen Oberflächenrauigkeit keinen Einfluss auf die Oberflächenenergie hat (Busscher et al 1984). Die Rauheit der geschliffenen Ketac Molar Proben ist niedriger, als die Rauheit der polierten Proben. Man kann vermuten, dass beim Schleifen der Proben sowohl Füllkörper als auch Matrix gleichmäßig reduziert werden, während bei der Politur der Proben mit Diamantsschleifspray GIZ Matrix stärker eliminiert wird als GIZ Füllkörper. Dadurch wird durch Polieren eine höhere Rauigkeit erzeugt.

Statistische Auswertungen von den kommerziellen Materialien zeigen, dass die Plaqueanlagerung an Materialien ähnlich wie in bei den experimentellen

Materialien ist. Mit beiden Auswertemethoden wurde an den Proben aus Ketac Molar mehr Plaque beobachtet, wahrscheinlich wegen der schwierigen Politur der Oberfläche bei diesem Material. Bei den Auswertungen mit Corpus und Image J unterscheiden sich deutlich zwei homogene Untergruppen. In der Gruppe der kommerziellen Materialien hatte das Material Ketac Molar eine signifikant höhere Plaqueanlagerung als die anderen getesteten Materialien. Zwischen den Restmaterialien wurden keine signifikanten Unterschiede an der Plaqueanlagerung und Plaqueablösung beobachtet.

6.2.3 Vergleich der experimentellen und kommerziellen Materialien

Das tendenziell schlechtere Abschneiden der experimentellen Materialien im Vergleich zu den kommerziellen Materialien gibt einen wichtigen Hinweis darauf, dass die Oberflächenrauigkeit der Materialien – trotz intensiven Bemühens um eine gleichmäßige Bearbeitung und Politur einen dominierenden Faktor für die Plaqueanlagerung bzw. Plaqueanfärbung darstellt. Insbesondere die ähnlichen Plaquewerte der experimentellen Materialien zum schlecht polierbaren Glasionomierzement würden dieser These nahe legen.

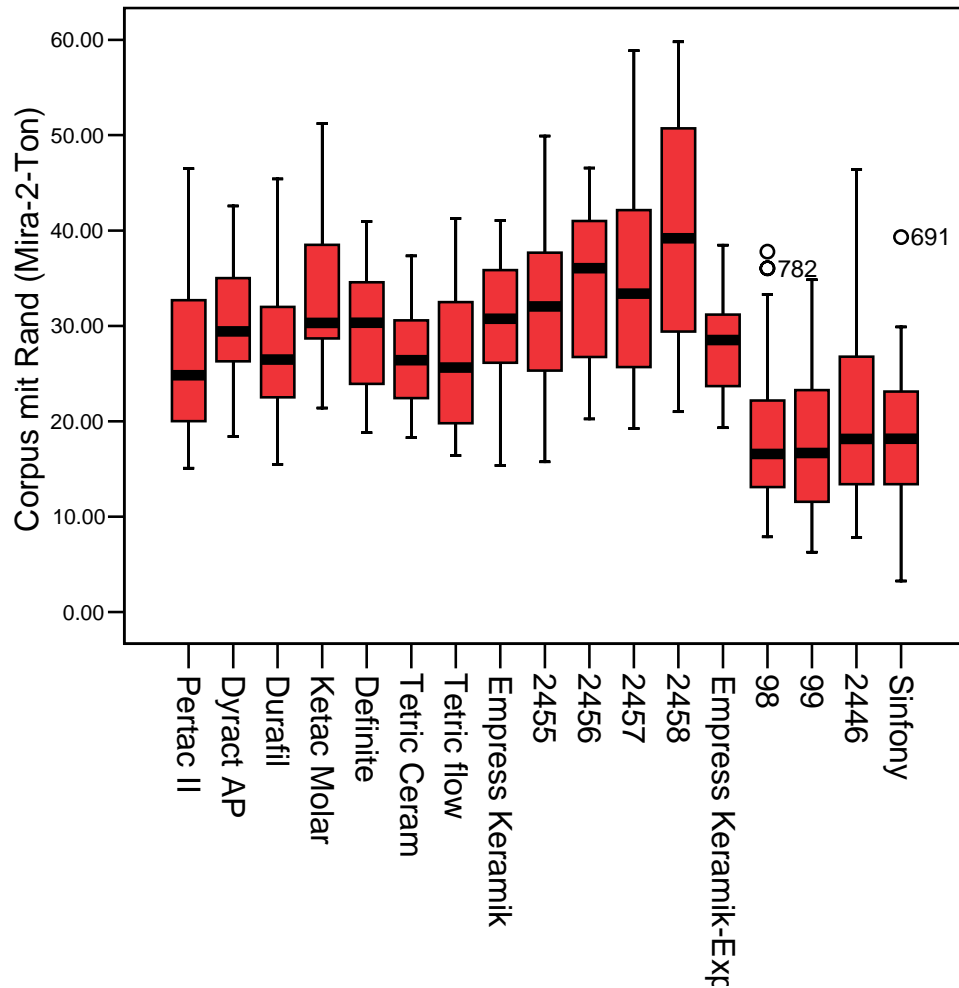


Abb.33 Vergleich der Auswertungen der gesamten geprüften Materialien

6.3 Fluoreszenzstudie

Durch die Vitalfluoreszenztechnik wurde gezeigt, dass in junger Plaque die Anzahl der lebenden Keime geringer ist als in älteren Plaqueproben (Netuschil 1983, Tabak, Bowen 1989). Dies wird wahrscheinlich durch eine höhere Spezifität und einen leichteren Zugang der sich im Speichel befindlichen, antimikrobakteriellen Faktoren zu den Bakterien hervorgerufen. Die quantitative Zunahme der Plaque geschieht durch Teilungsvorgänge innerhalb der bestehenden Plaque und die Anheftung weiterer Mikroorganismen.

Die in dieser Studie angewandte Methode wird in zahlreichen Publikationen in ähnlicher Prozedur als Standarduntersuchung eingesetzt. Auch die Meßmethode war in Vorversuchen im Vergleich der Materialien Dentacolor und Sinfony in der Lage, signifikante Unterschiede bei der Plaquebesiedelung festzustellen und wurde für den dargestellten Versuchsablauf als geeignet gefunden.

Es wurden die 3 experimentelle Materialien auf Basis des Materials Sinfony, welches keine fluoreszierende Zusatz erhielt, untersucht und als Vergleich wurden das Referenzmaterial Empress Keramik und das Material Dentacolor (Heraeus Kulzer) herangezogen. Anschließend wurden die gleichen Proben auch mit Mira 2 Ton angefärbt, fotografiert und gemessen. Die Proben wurden mit Image J ohne Rand mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Die statistische Auswertung zeigt, dass zwischen den getesteten Materialien keine signifikanten Unterschiede zu beobachten sind. Durch die Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoff konnte weniger Plaque visualisiert werden im Vergleich zu der Anfärbung mit Mira 2 Ton. Im Gegensatz zur Fluoreszenzfärbung werden durch Mira 2 Ton auch Artefakte, die z.B. durch raue Oberfläche entstanden sind angefärbt.

Für die neuen Materialien, die im Rahmen dieser Studie ausschließlich im Hinblick auf die Oberflächenaktivität entwickelt wurde, werden und in Kürze für in vivo Tests zur Verfügung stehen, lassen sich jedoch signifikant bessere Ergebnisse erwarten.

7 Schlussfolgerungen

Aus den vorliegenden Ergebnissen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. Die experimentellen Materialien wurden durch die Auswertungen in 3 homogenen Untergruppen geteilt.
 - das Material Sinfony mit niedrig neutralisiertem Aluminium-Polyacrylatzusatz schneidet hinsichtlich der Plaqueanlagerung und Plaqueablösbarkeit besser ab als Calcium-Polyacrylate.
 - an dem Sinfony mit Calcium-Polyacrylate sammelten sich mehr Plaque
2. Bei den kommerziellen Materialien sind die geringeren Differenzen zwischen den einzelnen Mittelwerten und Standardabweichungen auffällig.
 - das Material Ketac Molar zeigt eine höhere Tendenz zur Plaqueanlagerung, was auf die schlechtere Polierbarkeit zurückzuführen sein dürfte
3. Durch die Fluoreszenzanfärbung und Untersuchung ist es möglich die Bakterien der Plaque selektiv auszuwerten, jedoch nur in Materialien, die keine Fluoreszenzzusätze enthalten. In dieser Studie wurden keine signifikante Unterschiede zwischen den getesteten Materialien festgestellt.
4. Die Plaqueanlagerung erscheint in einem hohen Maße abhängig von der Oberflächengüte des Restaurationsmaterials.
5. Im untersuchten Zeitraum der initialen Plaqueanlagerung hat die Wahl des Werkstoffes einen untergeordneten Einfluss.

8 Zusammenfassung

Plauebedingte Sekundärkaries ist die häufigste Ursache für die Erneuerung einer zahnärztlichen Restauration. Die mittlere Lebensdauer einer Kompositfüllung beträgt 3.5-6 Jahre (Friedl 1995, Mjör 1992, Qvist 1990). Dentale Kompositmaterialien werden aufgrund ihrer guten ästhetischen und mechanischen Eigenschaften und ihres im Vergleich zu Gold- und Keramikrestorationen günstigeren Preises in der Zahnmedizin heute für ein breites Indikationsspektrum eingesetzt.

Ziel des Forbiomat Projektes war es durch die Zugabe von Polyalkenoat-Partikeln (Ca-Polyakrylat-Salze, 75 %, 90 %, 100 % neutralisiert; Al-Polyakrylat-Salz, 75 % neutralisiert) einen klassischen zahnärztlichen Komposit-Kunststoff zu einem plaqueabweisenden Werkstoff entwickeln. Eine Beimischung von 2,9 % des jeweiligen Partikelpulvers hatte nach Angaben des Herstellers keinen negativen Einfluss auf Schrumpfverhalten, Biegefestigkeit, E-Modul, Druckfestigkeit, Oberfläche-härte, Vickers-, Universal- und plastische Härte. Die Abrasion war wenig erhöht. Insgesamt hatten die Versuchswerkstoffe gute toxikologische und werkstofftechnische Ergebnisse.

Im Rahmen dieser in-vivo Studie wurden 9 experimentelle Materialien der Firma 3M ESPE (Forbiomat Projekt) im Vergleich zu 8 kommerziellen Materialien, die sich in ihren Eigenschaften unterscheiden, untersucht. Bei den kommerziellen Materialien handelte es sich um Komposite, Ormocere, Glasionomere und Kompomere. Als Referenzmaterial diente Empress Keramik.

Als Probenträger wurde eine rechteckige PMMA-Schablon mit jeweils 4 Präzisionsbohrungen gewählt. Die Prüfkörper wurden mit den bukkalen Schienenflügeln verklebt. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der Wiederverwendbarkeit der Schienen für mehrere Versuchsreihen, da das

Probenträgerplättchen einfach positioniert und leicht gewechselt werden kann ohne Beeinträchtigung der Schienpassung. Diese Testkörper wurden von Probanden 12 h getragen und danach mit Mira 2 Ton (Hager & Werken, Duisburg) angefärbt. Die gefärbten Areale wurden im Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung digitalisiert (Zeiss Stemi SV 11, Oberkochen). Anschließend wurde die prozentuelle Plaqueanlagerung in Relation gesamten Probenoberfläche berechnet. Bei den Versuchen wurde festgestellt, dass die Bakterien zuerst im Randspalt wachsen und danach die ganze Probenoberfläche besiedeln. Um diesen Einfluss zu minimieren, wurde der Rand der Proben eliminiert und die Messungen wurden noch mal durchgeführt.

Ein Problem dieser Methode war, dass Mira 2 Ton lediglich eine unspezifische Proteinfärbung zuließ, bei der keine klare Aussage darüber gemacht werden konnte, ob auch Artefakte mit angefärbt wurden.

In der Fluoreszenzuntersuchung wurden 6 Materialien untersucht, welche keine fluoreszierenden Zusätze erhielten. Die Proben wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt und mit dem Fluoreszenzmikroskop wurde die Plaqueanlagerung untersucht. Es wurde die prozentuelle Anzahl der toten Bakterien bestimmt.

Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden die Unterschiede, die sich zwischen den Testmaterialien ergaben, mittels Varianzanalyse mit Messwiederholung (Repeated Measures ANOVA) und einfacher Varianzanalyse auf deren Signifikanz überprüft.

An dem Material Sinfony ohne Glasionomerzement sammelt sich wenig Plaque. Material Sinfony mit niedrig neutralisiertem Aluminium-Polyacrylatzusatz schneidet hinsichtlich der Plaqueanlagerung und Plaqueablösbarkeit besser ab als

Calcium-Polyacrylate. Bei Calcium-Polyacrylaten scheint ein zunehmender Neutralisationsgrad die Plaqueanlagerung tendenziell zu begünstigen.

Im Rahmen der kommerziellen Materialien wurden, mit Ausnahme des Materials Ketac Molar geringere Differenzen zwischen den Materialien beobachtet. Die gleichen Ergebnisse wurden nach der Plaqueablösung beobachtet.

Im Vergleich der Materialien, welche mit Fluoreszenzmikroskop untersucht wurden, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben festgestellt werden.

9 Literaturverzeichnis

Absolom, D.R., Lamberti, E.V., Policova, Z., Zingg, G., Van Oss, C.J., Neumann, A.W.: Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Appl Env Microbiol* 46: 90-97, 1983

Amaechi, T., Higham, S.M., Edgar, W.M., Milosevic, A.: Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. *J Dent Res* 78 12: 1821-1828, 1999

Augthun, M., Brauner, A.: Antibakterielle Wirkung unterschiedlicher Dental-Legierungen auf Keime der Oralen Mikroflora in-vivo. *Dtsch Zahnärztl Z* 43: 869-873, 1988

Auschill, T.M., Arweiler, N.B., Netuschil, L., Brex, M., Reich, E., Sculean, A., Artweiler, N.B.: Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol* 46 5: 471-476, 2001

Banas, J.A., Hazlett, K.R., Mazurkiewicz, J.E.: An in vitro model for studying the contributions of the *Streptococcus mutans* glucan-binding protein A to biofilm structure. *Methods Enzymol* 337: 425-33, 2001

Bergström, J.: Photogrammetric registration of dental plaque accumulation in vivo. *Acta Odontol Scand* 39: 275-284, 1984

Bose, M., Ott, K.H.R.: Zur Abschätzung des Kariesrisikos mit Speicheltests. *Dtsch Zahnärztl Z* 49: 867-872, 1994

Bowden, G.H., Hardie, J.M., Slade, G.L.: Microbial variations in approximal dental plaque. *Caries Res* 15 9: 253, 1978

Brantley, C.F., Bader, J.D., Shugars, D.A., Nesbit, S.P.: Does the cycle of re-restoration lead to larger restorations? *J Am Dent Assoc* 126: 1407-1413, 1995

Brex, M., Theilade, J., Attström, R.: An ultrastructural quantitative study of the significance of microbial multiplication during early dental plaque growth. *J*

Periodontal Res 18: 177-186, 1983

Buchmann, G., Klimm, W., Geurtsen, W.: Der Füllungsrand und dessen mikroökologische Bedeutung. Dtsch Zahnärztl Z 47: 188-191, 1992

Busscher, C.F., Van der Mei, H.C.: Physio-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. Adv Dent Res 11 1: 24-32, 1997

Busscher, H.J., Sjollema, J., Van der Mei, H.C.: Relative importance of surface free energy as a measure of hydrophobicity in bacterial adhesion to solid surfaces. Zitiert nach: *Quirynen, M., Bollen, C.M.L.:* The influence of surface roughness and surface free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. J Clin Periodontol 22: 1-14, 1995

Bussher, H.J., Uyen, M.H., Weerkamp, A.H., Postma, W.J., Arends, J.: Reversibility of adhesion of oral streptococci to solids. FEMS Microbiol Let 35: 303-306, 1986

Chan, C., Weber, H.: Plaque retention on teeth restored with full-ceramic crowns: A comparative study. J Prosth Dent 56: 666-671, 1986

Connor, J.N., Schoenfeld, C.M., Taylor, R.L.: Study of in vivo plaque formation. J Dent Res 55: 481-488, 1976

Costerton, J.W., Lewndowski, Z.: The biofilm Lifestyle. Adv. Dent Res 11 2: 192-195, 1997

De Jong, H.P., De Boer, P., Busscher, H.J., Yan Pelt, A.W., Arends, J.: Surface free energie changes of human enamel during pellicle formation. Caries Res 18: 408-415, 1984

Dobell. C.: Anthony van Leeuwenhoek and his "little animals". Dover Publications, New York 1960

Doyle, R.J., Nesbit, W.E., Taylor, K.G.: On the mechanism of adherence of streptococcus sanguis to hydroxylapatite. FEMS Microbiol Let 15: 1-5, 1982

Ellen, R.: Specificity of attachment as a tissue-tropic influence an oral bacteria. Zitiert nach: *Molecular basis of oral microbial adhesion*, Verlag Mergenhagen, S.33-39. Washington DC: American Society for Microbiology 1985

Friedl, K.-H., Hiller, K.-A., Schmalz, G.: Placement and replacement of composite restorations in Germany. *Oper Dent* 20: 34-38, 1995

Friedl, K.-H., Schmalz, G., Hiller, K.-A.: Flüssigkeitskulturen zur Prüfung der Wirkung zahnärztlicher Werkstoffe auf das Bakterienwachstum. *Dtsch Zahnärztl Z* 47: 826-831, 1992

Friedl, K.-H., Schmalz, G., Hiller, K.-H., Shams, M.: Resin modified glass ionomer cements: fluoride release and influence on *Streptococcus mutans* growth. *Eur J Oral Sci* 105: 81, 1997

Ganeshkumar, N., Hannam, P.M., Kolenbrander, P.E.: Nucleotide sequence of a gene coding for a saliva-binding protein (SsaB) from *Streptococcus sanguis* 12 and possible role of the protein in coaggregation with actinomyces. *Infect Immun* 59: 1093-1099, 1993

Geurtsen, W.: Der Kronen und Füllungsrand. *Dtsch Zahnärztl Z* 45: 380-386, 1990

Geurtsen, W.: Untersuchungen zur Toxizitätsdauer eines Komposites. *Dtsch Zahnärztl Z* 41: 496-498, 1986

Gibbons, R.J.: Adhesion of bacteria to surfaces of the mouth. Zitiert nach: *Microbial adhesion to surfaces*, eds. Berkeley, R. C.W, Lynch, 3. M., Melling, 3., Rutter, P R. & Vincent, B., pp. 351-388, Chichester 1980

Gibbons, R.J., Etherden, I.: Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles. *Infection and Immunity* 41: 1190-1196, 1983

Gibbons, R.J., Hay, D.I.: Human salivary acidic proline-rich proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to apatitic surfaces. *Infect Immun* 56 2: 439-45, 1988

Gibbons, R.J.: Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. *J Dent Res* 63: 378-385, 1984

Gibbons, R.J.: Bacterial adhesion to oral tissues: A model for infectious diseases. *J Dent Res* 68: 750-760, 1989

Glushka, J., Cassels, F.J., Carlson, R.W., Van Halbeck, H.: Complete structure of the adhesin receptor polysaccharide of streptococcus oralis ATCC 55229 (*Streptococcus sanguis* H1). *Biochemistry* 10; 31, 44: 10741-6, 1992

Guggenheim, B., Giertsen, W., Schupbach, P., Shapiro, S.: Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res* Jan 80, 1: 2001

Hahn, R., Netuschil, L., Löst, C.: Initiale Plaquebesiedelung keramischer Restaurationsmaterialien. *Dtsch Zahnärztl Z* 47: 330-334, 1992

Hahn, R., Netuschil, M.: Microbial accumulation and vitality on different restorative materials. *Dent Mater* 9: 312-316, 1992

Hannig, M.: Building, Funktion und Bedeutung der Pellikel. *Oralprophylaxe* 16: 39-46, 1994

Hannig, M., Balz, M.: Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. *Caries Res* 33: 372-379, 1999

Hannig, M.: Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials in vivo. *Eur Oral Sci* 105: 422-433, 1997

Hannig, M.: Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Lin Oral Investig* 3 2: 88-95, 1999

Hasty, D.L., Ofek, I., Courtney, H.S., Doyle, R.J.: Multiple adhesions of streptococci. *Infect Immun* 60 6: 2147-52, 1992

Jendresen, M.D., Glantz, P.-O.: Clinical adhesiveness of selected dental materials. *Acta Odontol Scand* 39: 39-45, 1981

Jensen, B., Brathall, D.: A new method for the estimation of Mutans Streptococci in human saliva. *J Dent Res* 68: 468-471, 1989

- Kolenbrander, P.E., London, J.:* Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *Journal of Bacteriology*, June 3247-3252, 1993
- König, K.G.:* Karies und Parodontopathien. Thieme, Stuttgart 1987
- Krämer, A., Weber, H., Geis – Gerstorfer, J., Kratzenstein, B.:* Zur Benetzbarkeit verschiedener Zahnersatzmaterialien. *Dtsch Zahnärztl Z* 44: 788-790, 1989
- Krekeler, C., Ziehr, H.:* Physical methods for characterization of microbial cell surfaces. *Experientia* 45: 1047-1055, 1989
- Kruner, M.:* Die Adhäsion von Bakterien an Zahnärztlichen Kunststoffen und Keramiken. Zahnmed Diss Erlangen-Nürnberg, 1992
- Laurisch, L.:* Ein mikrobiologisches Nachweisverfahren zur Bestimmung karies-relevanter Keime. *Zahnärztl Welt* 98: 872-874, 1989
- Lehmann, R.R.:* Ökologie der Mundhöhle. Thieme, Stuttgart 1991
- Leonhardt, A., Olsson, J., Dahlen, G.:* Bacterial colonisation on Titanium, Hydroxyapatite, and Amalgam Surfaces in vivo. *J Dent Res* 74: 1607-1612, 1995
- Lie, T.:* Early dental plaque morphogenesis. *J Periodontal Res* 12: 73-89, 1977
- Lie, T.:* Morphologic studies on dental plaque formation. *Acta Odontol Scand* 3: 73-85, 1979
- Lie, T.:* Ultrastructural study of early dental plaque formation. *J Periodontal Res* 13 5: 391-409, 1978
- Listgarten, M.A.:* Nature of periodontal diseases: pathogenetic mechanism. *J Periodont Res* 22, 172, 1987
- Macpherson, L.M., Macfarlane, T.W., Stephen, K.W.:* An in situ microbiological study of the early colonisation of human enamel surfaces. *Microb Ecol Health Dis* 4, 39, 1991
- Manganiello, A.D., Sokransky, S.S., Propas, D.:* Attempts to increase viable count recovery of human supragingival plaque. *J Periodontal Res* 12: 107-119, 1977

- Marsh, P.D., Bradshaw, D.J.:* Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* 15: 169-175, 1995
- Mierau, H.-D.:* Beziehung zwischen Plaquebildung und Rauigkeit der Zahnoberfläche und Selbstreinigung. *Dtsch Zahnärztl Z* 39: 691-698, 1984
- Miller, W.D.:* Original investigations concerning pyoorhoea alveolaris. In: *The microorganisms of the human mouth*, S Karger Verlag, 1973
- Mjör, I.A., Toffenetti, F.:* Placement and replacement of resin-based composite restorations in Italy. *Oper Dent* 17: 82-85, 1992
- Mjör, I.A.:* The reasons for replacement and the age of failed restorations in general dental practice. *Acta Odontol Scand* 55: 58-63, 1997a
- Mjör, I.A.:* Frequency of secondary caries at various anatomical locations. *Oper Dent* 10: 88-92, 1985
- Müller, R.F., Künzel, W., Küstner, M.:* Eine Methode zur rastelektro-nenmikroskopischen Einschätzung der initialen Plaquebildung in-vivo. *Zahn-Mund- Kieferheilkunde* 76: 268-272, 1988
- Netuschil, L., Reich, E., Brex, M.:* Direct measurement of the bacterial effect of chlorhexidine on human dental plaque. *J Clin Periodontol* 16: 484-488, 1989
- Netuschil, L.:* Vitalfärbung von Plaque – Mikroorganismen mit Fluoresceindiacetat und Ethidiumbromid. *Dtsch Zahnärztl Z* 38: 914-917, 1983
- Nyvad, B., Fejerskov, O.:* Transmission electron microscopy of early microbial colonization of human enamel an root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 85, 1987
- Nyvad, B., Kilian, M.:* Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res* 24: 267, 1990
- O'Brien, N.J., Fan, P.L., Loesche, W. J., Walker, M.L., Apostolid, A.:* Adsorption of streptococcus mutans on chemically treated hydroxyapatite. *J Dent Res* 57: 910, 1978

Olsson, J., Carlen, A., Holmberg, K.: Inhibition of streptococcus mutans adherence by means of surface hydrophilisation. J Dent Res 69: 1586-1591, 1990

Olsson, J., van der Heijde, Y., Holmberg, K.: Plaque formation in-vivo and bacterial attachment in-vitro on permanently hydrophobic and hydrophilic surfaces. Caries Res 26: 428-433, 1992

Onose, H., Miazaki, T., Nomoto, S.: Effect of electrical potential on the adherence of streptococcus sanguis to gold plate. J Dent Res 59: 1179, 1980

Orstavik, D., Arneberg, P., Valderhaug, J.: Bacterial growth on dental restorative materials in mucosal contact. Acta Odontol Scand 39: 267-274, 1981

Orstavik, D., Orstavik, J.: Two hour bacterial colonization of dental luting cements in – vivo. Acta Odontol Scand 39: 115-123, 1981

Pospiech, P.: Werkstoffkundliche und klinische Untersuchungen zur vollkeramischen Klebebrücke. Med. Habil., München 1997

Prakobphol, A., Burdsal, C.A., Fischer, S.J.: Quantifying the Strength of Bacterial Adhesive Interaction with salivary Glycoproteins. J Dent Res 74: 1212-1218, 1995

Quirynen, M., Bollen, C.M.L.: The influence of surface roughness and surface free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. J Clin Periodontol 22: 1-14, 1995

Quirynen, M., Marechal, M., Busscher, H.J., Weerkamp, A.H., Darius, P.L., van Steenberghe, D.: The influence of surface energy and surface roughness on early plaque formation. J Clin Periodontol 17: 138-144, 1990

Quirynen, M., Steenberghe, D., Vuylsteke, M.: The possibility of measuring plaque growth in-vivo within 24 hours. J Periodontol Res 20: 321-328, 1985

Quirynen, M., Steenberghe, D.: Is early plaque growth rate constant with time? J Clin Periodontol 16: 278-283, 1989

- Quirynen, M., van Steenberghe, D.:* Bacterial adhesion to oral implants and assessment of attachment and marginal bone level. *Dtsch Zahnärztl Z* 48: 158-160, 1993
- Qvist, V., Qvist, J., Mjör, IA.:* Placement and longevity of tooth colored restorations in Denmark. *Acta Odontol Scand* 48: 305, 1990
- Rammelsberg, P., Pospiech, P., Gernet, W.:* Clinical factors affecting adhesive fixed partial dentures: a 6-year study. *J Prosth Dent* 70: 300-307, 1993
- Rekola, M., Scheinin, A.:* Quantification of dental Plaque trough planimetric analysis. *Scand J Dent Res* 85 1: 51-55, 1977
- Riethe, P.:* Welche Füllungsmaterialien sind im gingivalen Bereich vertretbar. *Dtsch Zahnärztl Z* 39: 589-598, 1991
- Ritz, H.L.:* Microbial population shifts in developing human dental plaques. *Archs Oral Biol* 12, 1561, 1967
- Sagel, P.A., Lapujqde, P.G., Miller, J.M., Sunberg, R.J.:* Objektive Quantification of plaque using digital image anlysis. *Monogr Oral Sci* 17: 130-134, 2000
- Sandig, H.C., Endert, G., Pfister, W.:* Untersuchungen über adhäsive Eigenschaften stomatologischer Legierungen nach mikrobieller Deckschichtbildung. *Zahn Mund Kieferheilkunde* 71: 694-699, 1983
- Scannapieco, F.A.:* Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Critical reviews in Oral Biology and Medicine* 5 3&4: 203-248, 1994
- Scheie, A.A.:* Mechanismus of plaque formation. *Adv Dent Res* 82: 246-253, 1994
- Schiffner, U.:* Der Einfluß von Speichelproteinen auf die Demineralisation von Zahnschmelz. Hanser, München 1997
- Schilling K.M., Bowen, W.H.:* Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function an specific binding sites for streptococcus mutans. *Infection and Immunity* 60, 284, 1992

Schneider, H.: Kariologie. In: Konservierende Zahnheilkunde, Apollonia Verlag, Lunnich 1994

Sheiham, A., Maizels, J., Cushing, A., Holmes, J.: Dental attendance and dental status. *Community Dent Oral Epidemiol* 13: 304-309, 1985

Siegrist, B.E. : In vivo early human dental plaque formation on different supporting substances. A scanning electron microscopic and bacteriological study. *Clin Oral Impl Res* 2: 38-46, 1991

Silness, J., L e, H. : Periodontal disease in pregnancy. *Acta Odontol Scand* 22: 121-135, 1964

Smales, R.J.: Plaque growth on dental restorative materials. *J Dent* 9: 133-140, 1981

Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Tanner, A.C.R.: Statistical analyses of microbial counts of dental plaque. *J Periodontal Res* 18: 187-199, 1983

Socransky, S.S., Manganiello, D., Propas, D.: Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *J Periodontol Res* 12: 90-106, 1977

Tabak, L.A., Bowen, W.H.: Roles of saliva (pellicle), diet and nutrition on plaque formation. *J Dent Res* 68: 1560-1566, 1989

Theilade, E., Fejerskov, O., Karring, T., Theilade, J.: Predominant cultivable microflora of human dental fissure plaque. *Infect Immun* 36: 977-982, 1982

Theilade, E., Theilade, J., Mikkelsen, L.: Microbiological studies on early dentogingival plaque on teeth and mylar strips in humans. *J Periodontol Res* 17: 12-25, 1982

Theilade, E., Fejerskov, O., Prachyabrued, W., Kilian, M.: Microbiologic study on developing plaque in human fissures. *Scand J Dent Res* 82: 420-427, 1974

Trapp, L.D., Noble, W.H., Navarro, R., Green, E.: Objektive quantification method for measuring in vivo accumulated dental plaque. *J Dent Res* 54 1: 164-167, 1975

- Van Dijk, J., Herkströter, F., Busscher, H., Weerkamp, A.:* Surface – free energie and bacterial adhesion. *J Clin Periodontol* 14: 300-304, 1987
- Van Loosdrecht, M.C., Norde, W., Zehnder, A.J.:* Physical chemical description of bacterial adhesion. *J Biomater Appl* 5 2: 91-106, 1990
- Van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., Zehnder, A.J.:* Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measured to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl Environ Microbiol* 53, 8: 1898-901, 1987
- Van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Zehnder, A.J.B.:* Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol Rev* 54: 78-87, 1990
- Van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Zehnder, A.J.B.:* Bacterial adhesion: A physicochemical approach. *Microbial Ecology* 17: 1-15, 1989
- Wahl, G., Müller, F., Schaal, K.P.:* Die mikrobielle Besiedelung von Implantatelementen aus Kunststoff und Titan. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 102: 1321-1326, 1992
- Walker, K.K.:* Begünstigende Faktoren für Akkumulation und Retention von Plaque. *Philip J Restorative Zahnmed* 2: 105-109, 1989
- Weber, H., Netuschil, J.:* Biokompatibilität und Plaqueswachstum bei unterschiedlichen Restaurationsmaterialien. *Dtsch Zahnärztl Z* 47: 278-281, 1992
- Weber, H.P., Brex, M., Lang, N.P.:* Early human dental plaque formation in individuals with a history of longstanding or recently achieved gingival health. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 97: 751-755, 1987
- Weerkamp, A.H., Uyen, H.M. ; Buscher, H.J. :* Effect of zeta-potenzial and surface energy on bacterial adhesion to uncoated and saliva-coated human enamel and dentin. *J Dent Res* 67 12: 1483-1487, 1988
- Weerkamp, A.H., Uyen, H.M., Busscher, H.J.:* Effect of zeta potential and surface energie on bacterial adhesion to uncoated and saliva – coated human enamel and dentin. *J Dent Res* 67: 1483-1487, 1988

Weerkamp, A.H., Van der Mei, H.C., Buscher, H.J.: The surface free energy of oral streptococci after being coated with saliva and its relation to adhesion in the mouth. *J Dent Res* 64, 10 : 1204-1210, 1985

Wilson, N.F., Burke, F.J., Mjör, I.A.: Reasons for placement and replacement of restorations of direct restorative materials by a selected group of practitioners in the United Kingdom. *Quintessence Int* 28: 245-248, 1997

Wood, S.R., Kirkham, J., Marsh, P.D., Shore, R.C., Nattres, B., Robinson, C.: Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res* 79 1: 21-27, 2000

Yeganeh, S., Lynch, E., Jovanovski, V., Zou, L.: Quantification of root surface plaque using a new 3-D laser scanning method. *J Clin Periodontol* 26 10: 692-697, 1999

Zappa, U.: Aspekte der bakteriellen Ätiologie. *Philip J Restaurative Zahnmed* 5: 214-217, 1993

Zaura-Arite, E., Ten Cate, J.M.: Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *Eur J Oral Sci* 108 2: 154-161, 2000

Zee, K.Y., Samaranayake, L.P., Attstrom, R.: An in vivo replica study of microbial colonization in "rapid" and "slow" dental plaque formers. *APMIS* 108 2: 113-21, 2000

10 Danksagung

Für die Überlassen des Themas, die vielen wertvollen Ratschläge und die großzügige Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit und für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich meinem Betreuer, Herrn Professor Doktor K.-H. Kunzelmann, ganz herzlich.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Professor Doktor R.Hickel für Erlaubnis bedanken, die Dissertation in seiner Abteilung durchführen zu dürfen.

Ferner möchte ich Deutscher Akademischer Austausch Dienst (DAAD) meinen herzlichen Dank aussprechen für allseitige Hilfe und Unterstützung dadurch ich einen Aufenthalt durchzuführen konnte.

Besonderes danke ich Frau Dr. Dipl.-Ing. N. Ilie für die wertvollen Hinweise und bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich auch bei allen Kolleginnen und Kollegen des Tribolabors für eine angenehme Atmosphäre und kollegiale Unterstützung, Herrn Dipl.-Ing. T. Obermeier für schnelle Hilfe und Unterstützung mit Computern, Fr. E. Köbele für großzügige Hilfe und Unterstützung beim Arbeit, Frau Dr. M. Thum für vielseitige Hilfe beim korrigieren, Frau K. Schunn für die schönen Bilder und für den Kaffee.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für Ihre vielseitige Unterstützung.

11 Lebenslauf

Name: Nyamaa
Vorname: Indra
Familienstand: ledig
Geburtsdatum: 02.06.1971 in Ulan-Bator, Mongolei

Schulbildung

1979-1989 Besuch der Oberschule 23 in Ulan-Bator
Abschluss: Abitur

Studium

1990-1994 Medizinische Akademie, Fakultät für
Zahnmedizin in Sofia, Bulgarien

1994-1996 Medizinische Universität, Fakultät für
Zahnmedizin in Ulan-Bator
Approbation als Zahnärztin

Beruflicher Werdegang

1996-1999 Zahnärztin in der privat Zahnklinik „Sonne“, Ulan-Bator

1996-1998 Weiterbildung und Magisterprüfung an der medizinische
Universität, Ulan-Bator

Seit 15.11.1999 Gastzahnärztin und Stipendiatin von DAAD an der
Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der
Ludwig-Maximilians-Universität in München
(Direktor Prof. Dr. R. Hickel)