

# Penetration verschiedener Adhäsive in initiale Schmelzläsionen *in vitro*

## Zusammenfassung

Das Ziel dieser *In-vitro*-Studie war die Bestimmung der Eindringtiefe verschiedener Adhäsive (Heliobond<sup>®</sup>, Excite<sup>®</sup>, Vivadent; Resulcin<sup>®</sup>, Merz; Solobond M<sup>®</sup>, Voco; Adper Prompt L-Pop<sup>®</sup>, 3M-Espe) und eines Fissurenversieglers (Helioseal<sup>®</sup>, Vivadent) in initiale Schmelzdemineralisationen. Aus 27 Rinderzähnen wurden 54 Schmelzproben präpariert und mit Nagellack (Kontrolle) bestrichen, sodass drei Bereiche für die Behandlung entstanden. Nach der Demineralisierung (pH 5,0; 14 d) wurden zwei Bereiche (A und B) mit Phosphorsäure (20%ig) geätzt. Der dritte Bereich (C) diente als Kontrolle des demineralisierten Schmelzes. Die Proben wurden in sechs Gruppen randomisiert aufgeteilt (n=9) und das jeweilige Material wurde einmal (A) oder zweimal (B) appliziert (90 s) und nach jeder Applikation lichtgehärtet. Die Proben wurden anschließend senkrecht zur Oberfläche geschnitten und ein mit Rhodamin-B-Isothiocyanat gefärbter Kunststoff (Spurr) in die verbliebenen Poren gepresst. Mit Hilfe des Konfokalen Laser-Raster-Mikroskops (CLSM) wurden die Penetrationstiefe und die Dicke der Sauerstoffinhibitionsschicht der verwendeten Materialien gemessen (ImageJ). Nach einmaliger Applikation penetrierten [Mittelwert (± Standardabweichung)] die Adhäsive Resulcin<sup>®</sup> [89 (± 22)%] und Helioseal<sup>®</sup> [98 (± 6)%] nahezu vollständig die Läsionen. Heliobond<sup>®</sup> [126 (± 33)%] und Excite<sup>®</sup> [184 (± 40)%] penetrierten über die definierte Grenze des Läsionskörpers hinaus. Eine zweifache Applikation führte bei Excite<sup>®</sup> zu einer signifikanten Verringerung der Sauerstoffinhibitionsschicht von 34 (± 20)% nach einmaliger Applikation auf 5 (± 2)% der Penetrationstiefe. Mit Hilfe des vorgestellten Verfahrens wurde erstmals gezeigt, dass einige kommerziell erhältliche Adhäsive zur nahezu vollständigen Versiegelung von initialen Schmelzläsionen geeignet scheinen.

H. MEYER-LUECKEL<sup>a</sup>, J. MUELLER<sup>a</sup>, S. PARIS<sup>a</sup>,  
M. HUMMEL<sup>b</sup>, A. M. KIELBASSA<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Poliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie, Klinik und Polikliniken für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Campus Benjamin Franklin, Charité – Universitätsmedizin Berlin

<sup>b</sup> Institut für Pathologie, Campus Benjamin Franklin, Charité – Universitätsmedizin Berlin

Schweiz Monatsschr Zahnmed 115: 316–323 (2005)

Schlüsselwörter: Versiegelung, Demineralisation, Approximalläsion, konfokale Mikroskopie, Penetration, Adhäsiv, CLSM, VIRIN

Zur Veröffentlichung angenommen: 17. Januar 2005

Korrespondenzadresse:

Jan Müller

Poliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie,  
Klinik und Polikliniken für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde,  
Campus Benjamin Franklin,

Charité – Universitätsmedizin Berlin

Assmannshäuserstr. 4–6, D-14197 Berlin

Tel. +49-30-84456129, Fax +49-30-84456204

E-Mail: Jan.Mueller@charite.de

## Einleitung

Im Rahmen einer präventiv ausgerichteten, non-invasiven Behandlung werden initiale Schmelzdemineralisationen auf Glattflächen oder Approximallflächen durch Fluoridierungsmassnahmen behandelt, um somit eine Arretierung oder idealerweise eine Remineralisation der Läsion zu erreichen. Dies scheint dauerhaft allerdings nur bei einer perfekten Mundhygiene des Patienten möglich. Auf den der Mundhygiene gut zugänglichen Glattflächen ist daher der Stillstand einer Läsion möglich (BACKER-DIRKS 1966). Der Approximalraum ist einer ausreichenden Mundhygiene sehr viel schwerer zugänglich, sodass hier die

kariogene Plaque von den wenigsten Patienten dauerhaft vollständig eliminiert werden kann. Daher verwundert es nicht, dass in der Literatur eine vollständig remineralisierte Approximalkaries nur selten dokumentiert ist (BILLE & CARSTENS 1989). Die speichelbedingte Remineralisation im approximalen Schmelzbereich scheint zudem durch Proteine inhibiert zu werden (FEATHERSTONE et al. 1993) und ist vom Mineralgehalt der Läsion abhängig (KLINGER & WIEDEMANN 1985). Liegt bereits eine Kavitation vor, die bei einer röntgenologisch bis in das Dentin reichenden Läsion in 90% der Fälle zu erwarten ist (DE ARAUJO et al. 1992), ist eine Remineralisation durch Fluoridierungsmaßnahmen nicht mehr erreichbar.

Im Falle einer bei initialen Schmelzdeminerationen durchgeführten Füllungstherapie ergibt sich eine ungünstige Schaden/Nutzen-Relation, da selbst eine minimalinvasiv präparierte Kavität zu einer Schwächung des Zahnes führt und sämtliche füllungstherapeutische Massnahmen nur eine begrenzte Lebensdauer besitzen. Daher könnte die Versiegelung initialer Schmelzdeminerationen mit Hilfe von Kunststoffen eine gute Alternative darstellen. Bereits 1975 wurde versucht, initiale Schmelzdeminerationen mit Adhäsiven zu behandeln (DAVILA et al. 1975). Mit Hilfe lichtmikroskopischer Aufnahmen wurde gezeigt, dass künstlich erzeugte humane Schmelzläsionen zu 60% durch ein Adhäsivmaterial gefüllt werden können (ROBINSON et al. 2001), bzw. eine bis zu 95%ige Penetration der Läsionen, dokumentiert anhand von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen, möglich ist (GRAY & SHELLIS 2002). Diese Untersuchungen bezogen sich jedoch immer auf den Läsionskörper, da die verwendeten Methoden nicht empfindlich genug waren, um die tiefer gehende Demineralisationsfront darzustellen.

Bisher liegen in der zugänglichen Literatur kaum Untersuchungen vor, welche die Penetrationstiefen von unterschiedlichen Materialien miteinander verglichen haben. Zudem wurde in einigen der bisherigen Studien ein Überschuss des Haftvermittlers auf der Läsionsoberfläche belassen (DAVILA et al. 1975, ROBINSON et al. 2001); dies dürfte zwar primär in einem kariespräventiven Effekt resultieren, scheint jedoch aus sekundärkariespräventiver und parodontalprophylaktischer Sicht nicht vorteilhaft.

Das Ziel der vorliegenden Studie war daher die Bestimmung der Penetrationstiefen sowie der Dicke der Sauerstoffinhibitionsschichten von fünf verschiedenen Adhäsiven und eines Fissurenversiegler nach ein- bzw. zweimaliger Applikation auf künstliche bovine Schmelzdeminerationen. Hierfür wurde ein neu entwickeltes Verfahren zur Visualisierung von porösen Mikrostrukturen eingesetzt.

## Materialien und Methoden

Die Schmelzproben wurden aus 27 frisch extrahierten Rinderfrontzähnen gewonnen. Nach vorsichtiger Reinigung erfolgte das Zuschneiden der Zähne unter Wasserkühlung mit Hilfe einer Bandsäge (Exakt 300 cl; Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland). Aus der mesio- und distobukkalen Fläche der Zahnkrone wurden insgesamt 54 Schmelzproben (4×5 mm<sup>2</sup>) präpariert. Anschliessend wurden die Proben in kaltpolymerisierenden Kunststoff (Technovit 4071; Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) eingebettet und unter Wasserkühlung parallel zur Oberfläche in aufsteigender Reihenfolge der Korngrössen (Schleifpapier Körnung: #1200 > #2500 > #4000; Exakt Apparatebau) plangeschliffen und poliert (Schleif- und Poliermaschine Phoenix Alpha; Buehler, Düsseldorf, Deutschland). Die Zähne

wurden stets in einem feuchten Milieu gelagert (0,9% NaCl-Lösung; DeltaSelect GmbH, Pfullingen, Deutschland).

Zwei Teilbereiche der Probe wurden mit Nagellack (Betrix, Frankfurt/Main, Deutschland) abgedeckt und dienten somit als Kontrolle der gesunden Oberfläche (Abb. 1). Die Proben wurden anschliessend für 14 Tage demineralisiert (pH 5,0; 37 °C; Tab. I) (BUSKES et al. 1985). Der pH-Wert der Lösung wurde täglich überprüft und konstant im Bereich pH 5,0-5,1 justiert. Die Probenoberflächen wurden in jeweils fünf Bereiche unterteilt [zwei Kontrollzonen sowie drei Bereiche A, B und C (Leerläsion) mit initialen Läsionen], wobei die Leerläsion als Kontrolle des demineralisierten Schmelzes diente. Auf den Bereichen A und B erfolgte eine Ätzung für fünf Sekunden (Gluma Etch 20 Gel; Haereus Kulzer). Das Ätzgel wurde mit Leitungswasser abgespült (30 Sekunden) und die Proben mit einem ölfreien Luftstrom getrocknet (30 Sekunden).

Die Proben wurden auf sechs Gruppen randomisiert verteilt. Auf jede Einzelprobe wurde nun eines von sechs unterschiedlichen Materialien (fünf Adhäsive, ein Fissurenversiegler) vorsichtig (Microbrush; Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) appliziert und nach einer Einwirkzeit von 90 Sekunden für 30 Sekunden lichtgehärtet (Translux CL; Haereus Kulzer). Auf den Bereich B wurde ein weiteres Mal das jeweilige Material für 90 Sekunden appliziert und lichtgehärtet. Hierbei wurde nach jeder Einwirkzeit ein eventuell vorhandener (flüssiger) Überschuss mit einem kleinen Abziehgummi (Gummikelch; Gebr. Brasseler, Lengo, Deutschland) vor der Lichthärtung parallel zur Probenoberfläche entfernt.

Verwendet wurden ein wasserhaltiges (Adper Prompt L-Pop<sup>®</sup>, 3M-Espe, Seefeld, Deutschland), ein acetonhaltiges (Solobond M<sup>®</sup>, Voco, Cuxhaven, Deutschland), ein ethanolhaltiges (Excite<sup>®</sup>, Ivoclar Vivadent) und zwei lösungsmittelfreie Adhäsive (Helio-bond<sup>®</sup>, Ivoclar Vivadent; Resulcin<sup>®</sup> Monobond, Merz, Lütjenburg, Deutschland) sowie ein lösungsmittelfreier Fissurenversiegler (Helioseal<sup>®</sup>, Ivoclar Vivadent). Die Schmelzproben wurden anschliessend senkrecht zur Oberfläche durchtrennt (Bandsäge Exakt 300 cl) und für das Konfokale Laser Raster Mikroskop (TCS NT – CLSM, Leica, Wetzlar, Deutschland) vorbereitet (Abb. 1).

## Verfahren zur Visualisierung von porösen Mikrostrukturen

Die Porositäten der Zahnhartsubstanzen in den vorbereiteten Probenhälften wurden in einem Silikonschlauch unter Druck (0,8 MPa) mit einem mit Rhodamin-B-Isothiocyanat (RITC) eingefärbten niedrig viskosen Kunststoff (Spurr 1969) gefüllt. Der verschlossene Schlauch wurde in einem Autoklaven (Ivomat IP3, Ivoclar Vivadent) unter gleich bleibendem Druck (0,8 MPa) und mit konstanter Temperatur (70 °C) ausgehärtet (3 h). Mit Hilfe der Bandsäge (Exakt 300 cl) wurde nun der ausgehärtete Probenzylinder in einzelne Proben zerschnitten und diese parallel zur Schnittfläche auf Objektträger (diaplus, Oststeinbeck, Deutschland) aufgeklebt (Sekundenkleber; orbis dental, Offenbach, Deutschland). Nachfolgend wurden alle Überschüsse des Kunststoffes (*Spurr*) bis zum Anfang der Probenschnittfläche sowie die ersten 100 µm der Probenschnittfläche zur Minimierung von Artefakten zurückgeschliffen (Schleifsystem Exakt 400 cs). Abschliessend erfolgte unter Wasserkühlung eine Politur der Oberfläche.

## Erzeugung und Auswertung der CLSM-Bilder

Die Proben wurden mit Hilfe eines Konfokalen Laser-Raster-Mikroskops (TCS NT – CLSM, Leica) untersucht. Das Licht eines Ar/Kr-Lasers mit einem Wellenlängenmaximum bei 568 nm regte den Farbstoff RITC zur Fluoreszenzlichtemission an. Das

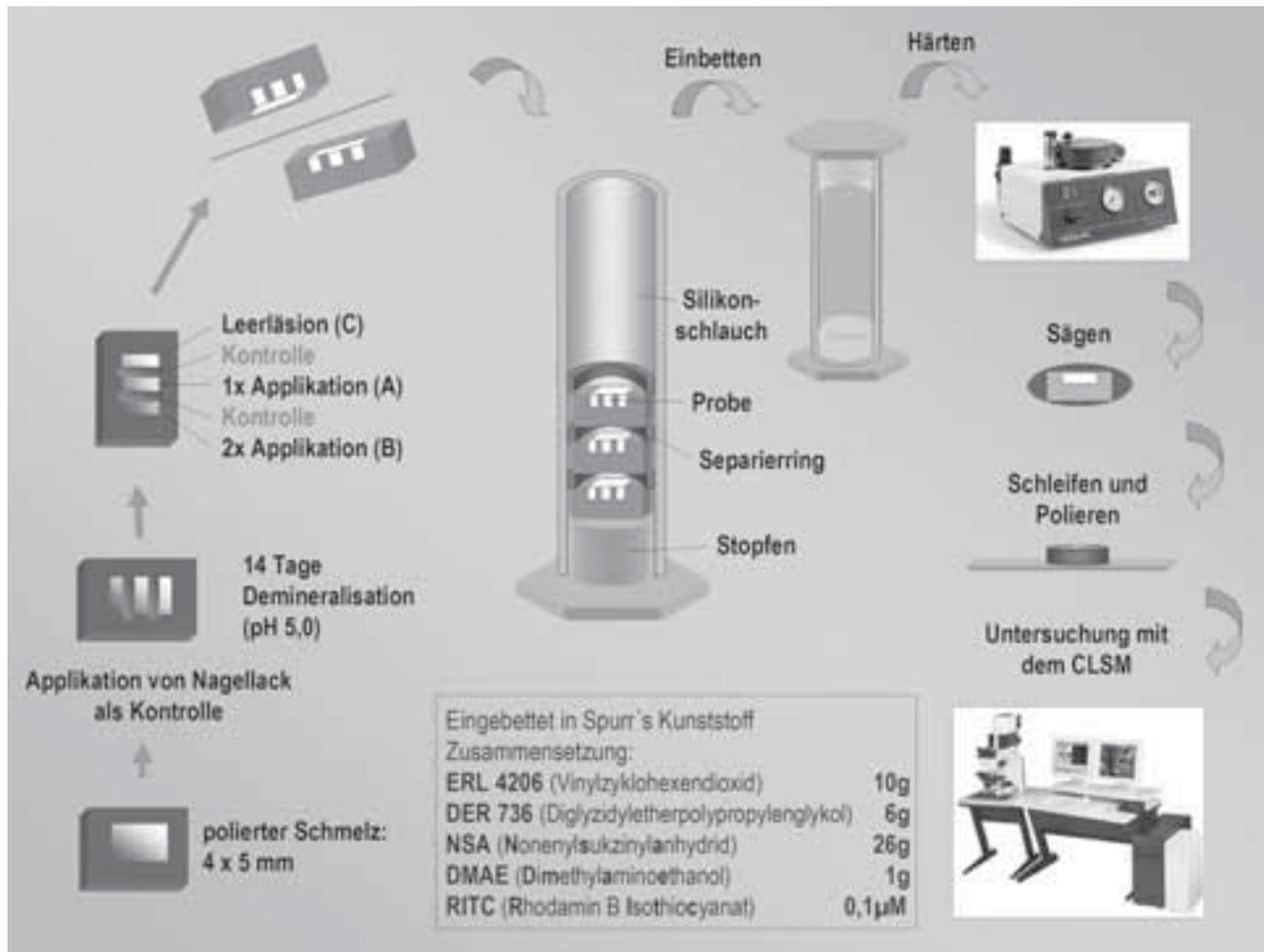


Abb. 1 Verarbeitung der eingebetteten Schmelzproben. Nach Demineralisation (14 d) erfolgte nach 5 s Anätzung der Oberfläche die einmalige (A) oder zweimalige (B) Applikation eines der verschiedenen Adhäsive oder eines Fissurenversieglers. Nach dem Trennen der Probe wurde eine Hälfte einer jeden Probe in einen Silikon-schlauch eingebettet und dieser mit einem Rhodamin-B-Isothiocyanat gefärbten Kunststoff (Spurr) aufgefüllt. Der verschlossene Schlauch wurde in einem Autoklaven unter gleich bleibendem Druck (70 °C, 3 h) ausgehärtet. Der ausgehärtete Probenzylinder wurde in einzelne Proben zerschnitten und diese parallel zur Schnittfläche auf Objektträger aufgeklebt, nachfolgend alle Überschüsse des Kunststoffes (Spurr) bis zum Anfang der Probenschnittfläche weggeschliffen. Die Proben wurden anschliessend mit Hilfe eines Konfokalen Laser-Raster-Mikroskops (TCS NT-CLSM, Leica) untersucht (Gerätekfotos: Copyright von Ivoclar Vivadent und Leica).

Tab. 1 Zusammensetzung der Demineralisationslösung nach BUSKES et al. (1985)

Konzentration	Inhaltsstoff	Mengen
3 mM	Kalziumchlorid-2-hydrat (CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O)	2205,00 mg
3 mM	Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2040,00 mg
50 mM	Essigsäure (CH <sub>3</sub> COOH)	15,16 g
10 M	Kalilauge ad pH 5 (KOH)	~ 18 ml
6 µM	MHDP (Methylen-diphosphonsäure) CH <sub>2</sub> [P(O)(OH) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub>	5,28 mg
	Thymol	in Spuren
	aqua dest. (H <sub>2</sub> O)	ad 5 Liter

Wellenlängenmaximum des von RITC emittierten Lichtes lag bei 610 nm, weshalb ein Langpassfilter (LP 590) eingesetzt wurde, um kurzwelligeres Reflexionslicht (< 590 nm) zu eliminieren. Mit dem CLSM wurden Aufnahmen mit 10facher Vergrößerung (Auflösung 1024×1024 Pixel, entspricht 1,02 Pixel/µm) und mit 256 Graustufen angefertigt. Um eine farbliche Darstellung zu

erhalten, wurde der Weissanteil des Schwarz/Weiss-Bildes durch die Farbe Rot ersetzt. Die Abtastung der Proben erfolgte 10 µm unterhalb der Oberfläche des Probenquerschnitts (Leica Confocal Software; Leica Microsystems Heidelberg GmbH, v.1.4, Deutschland), um Artefakte zu vermeiden. Diejenigen Bereiche der Probe, welche den RITC-gefärbten Kunststoff enthielten, leuchteten rot, während alle anderen Bereiche schwarz erschienen. Die Farbstoffkonzentration wurde so gewählt, dass die Eigenfluoreszenz des Schmelzes vernachlässigt werden konnte. Jeweils drei Bilder einer Läsion, welche in Bezug auf den Bildausschnitt identisch waren, wurden mit unterschiedlichen Detektorempfindlichkeiten [PhotoMultiPlier (PMT)-Einstellungen] angefertigt. Das erste Bild erfolgte mit geringer Detektorempfindlichkeit (PMT 300), sodass nur die Oberflächenschicht bzw. die Inhibitionsschicht qualitativ sehr gut dargestellt wurde. Alle anderen Bereiche wurden bei dieser Einstellung zu dunkel abgebildet. Mit Hilfe der mittleren PMT-Einstellung (500) konnte der Läsionskörper dargestellt werden. Die dritte Aufnahme ergab bei einer PMT-Einstellung von 700 ein gut beurteilbares Bild im

Bereich der fortschreitenden Demineralisation unterhalb des Läsionskörpers, während gesunde Schmelzbereiche immer schwarz abgebildet wurden.

Die drei Bilder wurden mit Hilfe des Programmes ImageJ (ImageJ, v1.29x, National Institutes of Health, Rockville MD, USA) derartig kombiniert (Average-Modus), dass ein einziges neu berechnetes Bild entstand. Die auf diese Weise erzeugten Durchschnittsbilder der Läsionen konnten aufgrund verschiedener Grauwerte in zwei Bereiche differenziert werden. Der beginnend ab der Schmelzoberfläche heller dargestellte Bereich der Läsion wurde als Dicke des Läsionskörpers (III) definiert. Die darunter liegende, wesentlich dunkler erscheinende Zone bildete die voranschreitende Läsionsfront und wurde, von der Läsionsoberfläche gemessen, als maximale Läsionstiefe (IV) definiert (Abb. 2). Nun wurde ein Rasterbild mit vertikalen Linien auf das Durchschnittsbild gelegt. Der Abstand zwischen den Linien betrug 50 µm und ihr Verlauf bildete einen rechten Winkel zur Läsionsoberfläche. Im Bereich dreier benachbarter Linien wurden die Läsionstiefen (III und IV), die Dicken der Sauerstoffinhibitionsschichten (I) und die Penetrationstiefen (II) der verschiedenen Materialien gemessen (Abb. 2); die jeweiligen Mittelwerte wurden dokumentiert. Die Penetrationstiefe stellte die durchschnittliche Eindringtiefe des jeweiligen Adhäsivs in die künstliche Schmelzläsion dar. Zwischen den Penetrationstiefen (A und B) und den Tiefen der Läsionskörper wurden Verhältniswerte gebildet, um die Penetrationstiefen der verschiedenen Materialien innerhalb und zwischen den Gruppen vergleichen zu können. Die Penetrationstiefen konnten daher, sofern das Adhäsiv über

den Läsionskörper hinaus penetrierte, Werte grösser als 100% annehmen. Die Sauerstoffinhibitionsschicht (SIS) wurde definiert als der oberflächliche Bereich der Läsion, welcher kein ausgehärtetes Adhäsiv bzw. keinen Fissurenversiegler enthielt, sondern durch Kunststoff (*Spurr*) aufgefüllt wurde.

### Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SPSS (Version 11.5 für Windows; SPSS, München, Deutschland). Der Anpassungstest nach Kolmogorov-Smirnov wurde zur Überprüfung der Normalverteilung durchgeführt. Um Unterschiede bezüglich der Penetrationstiefen bzw. der Dicken der Sauerstoffinhibitionsschichten zwischen den Gruppen festzustellen, wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit nachgeschaltetem Post-hoc-Test nach Bonferroni angewandt. Für den Vergleich der verschiedenen Penetrationstiefen innerhalb der Läsion wurde der t-Test für gepaarte Stichproben verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgelegt.

## Resultate

### Qualitative Darstellung der Adhäsivpenetrationen

Die Läsionen wurden von HeliOSEAL®, Heliobond®, Resulcin® Monobond, Solobond M® und Excite® gleichmässig penetriert; die Penetrationstiefen variierten innerhalb der Probe kaum. Zudem bildeten diese Materialien homogene, in der CLSM-Darstellung durchgehend schwarz erscheinende Schichten aus (Abb. 3). Starke Schwankungen der Homogenität sowie der

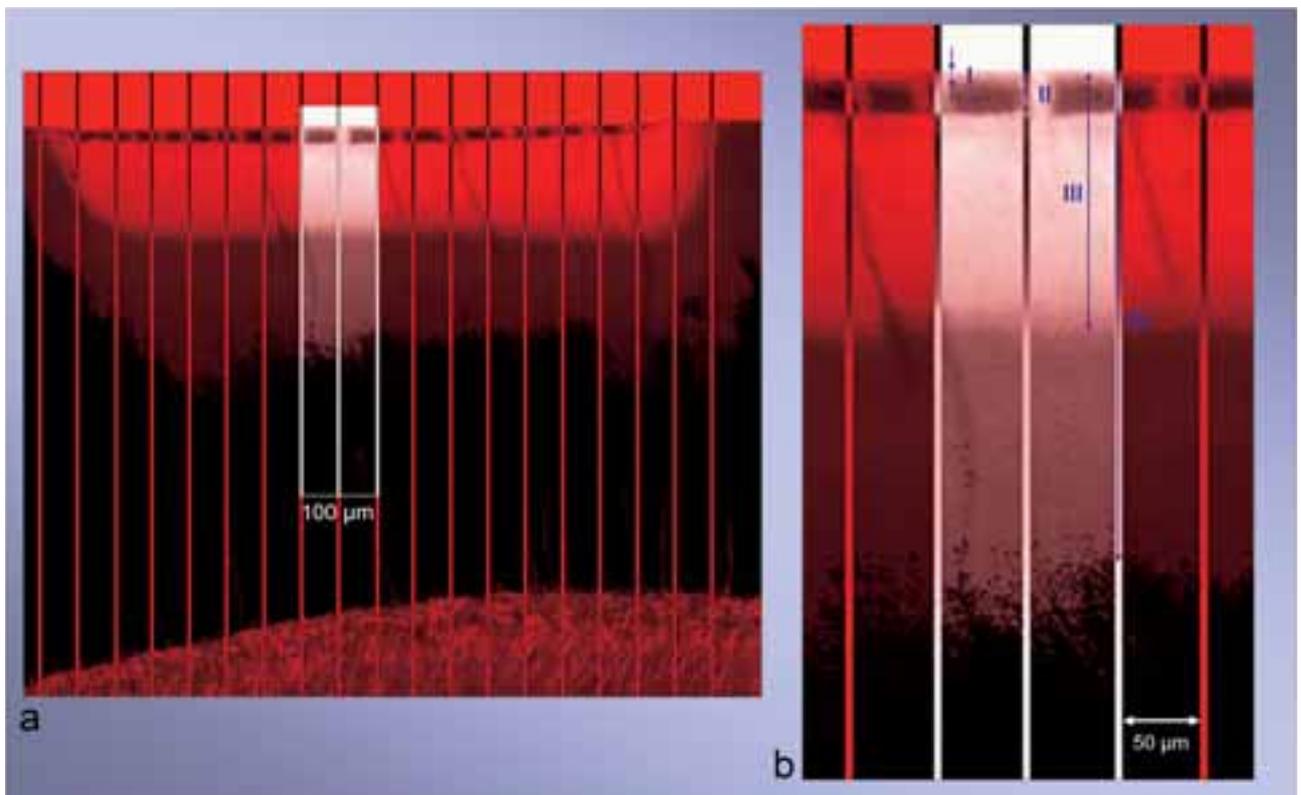


Abb. 2 Exemplarische Darstellung der angefertigten CLSM-Aufnahmen mit 10facher Vergrösserung (a) sowie einer Ausschnittsvergrösserung (b) einer mit Solobond M® behandelten Läsion. Auf das Bild des Probenquerschnitts wurde ein Raster vertikal zur Probenoberfläche und mit einem Linienabstand von 50 µm gelegt. An drei benachbarten Linien erfolgte die Messung des Läsionskörpers (III) sowie der maximalen Läsionstiefe (IV), der Penetrationstiefe (II) des applizierten Kunststoffes und der Dicke der dazugehörigen Sauerstoffinhibitionsschicht (I).

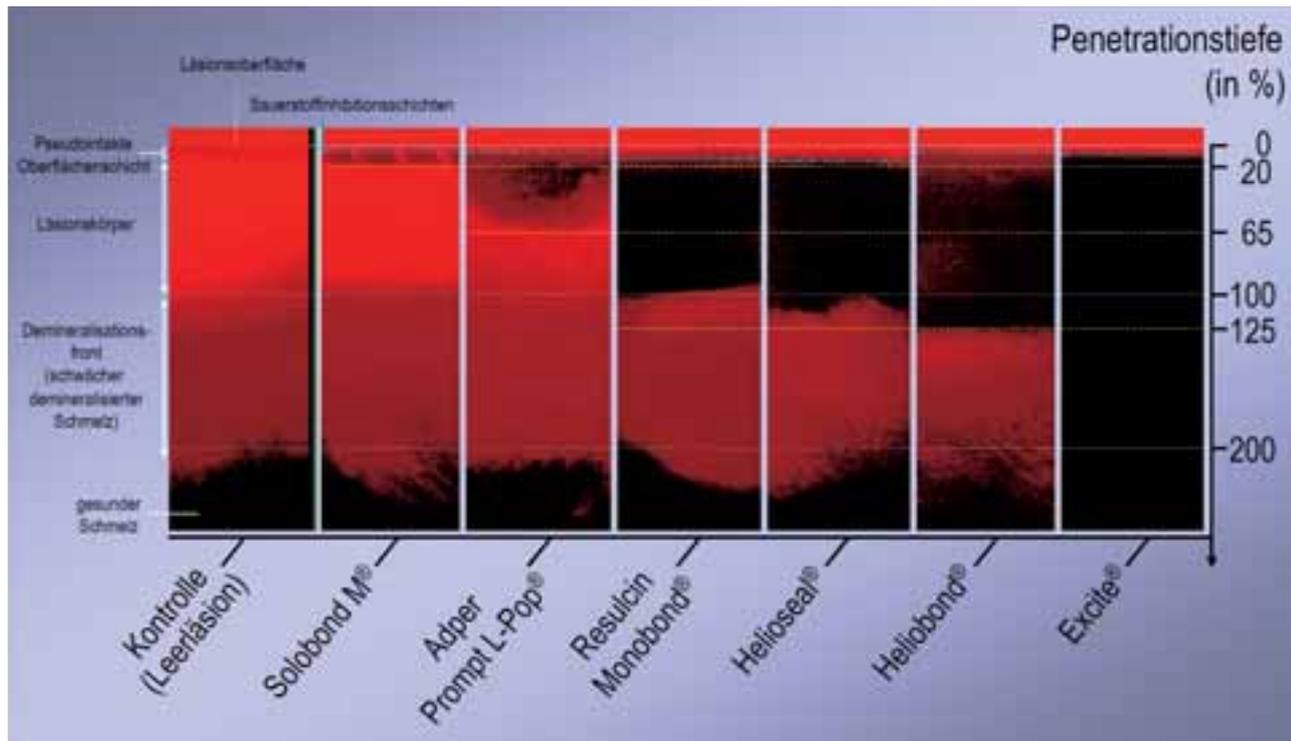


Abb. 3 Exemplarische CLSM-Aufnahmen einer Leerläsion sowie von allen verwendeten Materialien nach zweimaliger Applikation. Innerhalb der Leerläsion kann man den Läsionskörper (hellrote Bereich beginnend an der Grundlinie) von der weiterführenden Demineralisationsfront (dunkelrote Zone weiter oben) unterscheiden. Diese Bereiche konnten mit Hilfe des Adhäsivs Excite® vollständig gefüllt werden.

Penetration konnten dagegen bei Adper Prompt L-Pop® festgestellt werden. Keines der verwendeten Materialien härtete an den Läsionsoberflächen vollständig aus (Sauerstoffinhibitionschicht), sodass die oberflächlichen Schmelzbereiche in der CLSM-Darstellung aufgrund der Kunststoff-Infiltration (*Spurr*) rot erschienen (Abb. 2 und 3). Nach einmaliger Applikation zeigten sich bei Heliobond®, Heliobond®, Resulcin® Monobond und Solobond M® gleichmäßige Sauerstoffinhibitionschichten. Bei Excite® und Adper Prompt L-Pop® waren diese hingegen unregelmässig tief und mit polymerisierten Anteilen durchsetzt. Nach zweimaliger Applikation konnte bei Excite® eine gleichmässige SIS beobachtet werden (Abb. 3), wohingegen es bei allen anderen Materialien zu keiner qualitativen Änderung der SIS kam.

#### Quantitative Auswertung der Adhäsivschichten

Die durchschnittliche Tiefe (SD) der Strecke III (Läsionskörper) der Leerläsionen (C) betrug  $105 (\pm 21) \mu\text{m}$ . Die maximale Tiefe der Läsionen (Strecke IV) betrug  $237 (\pm 53) \mu\text{m}$ . Der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest zeigte zwischen den Gruppen keine signifikanten Abweichungen von einer Normalverteilung. Die Läsionstiefen unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht signifikant ( $p > 0,05$ ; ANOVA, post hoc Bonferroni). Die Tiefen der Läsionskörper waren in den mit Excite®, Heliobond® und Heliobond® behandelten Bereichen (A und B) teilweise nicht mehr messbar, da die Materialien tiefer penetrierten, sodass in diesen Fällen die Messwerte der zugehörigen Leerläsionen (C) herangezogen wurden.

Excite® penetrierte tiefer als Heliobond® ( $p < 0,01$ ; ANOVA, post hoc Bonferroni) sowie tiefer als die anderen Materialien ( $p < 0,001$ ) und drang zu  $184 (\pm 40)\%$  in die initialen Schmelzdemineralisa-

tionen ein (Abb. 3 und 4). Heliobond®, Heliobond® und Resulcin® Monobond penetrierten nahezu vollständig den Läsionskörper. Signifikant schlechter drangen dagegen Adper Prompt L-Pop® und Solobond M® in die Läsionen ein ( $p < 0,05$ ; ANOVA, post hoc Bonferroni).

Durch zweimalige Applikation wurde von keinem der Materialien eine signifikante Steigerung der Penetrationstiefe erreicht ( $p > 0,05$ ; t-Test für gepaarte Stichproben). Nach einmaliger Applikation bildeten die Adhäsive Excite® und Adper Prompt L-Pop® an der Oberfläche signifikant dickere Sauerstoffinhibitionschichten aus ( $p < 0,05$ ; ANOVA, post hoc Bonferroni) (Tab. II). Nach zweimaliger Applikation verringerte sich bei Excite® die Dicke der Sauerstoffinhibitionschicht auf  $5 (\pm 2)\%$ . Die SIS der verwendeten Materialien zeigten in diesem Fall keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ; ANOVA, post hoc Bonferroni) (Tab. II).

#### Diskussion

Für die vorliegende Studie wurden frisch extrahierte Rinderzähne verwendet. Rinderzahnschmelz ist in seinem chemischen Aufbau dem menschlichen Schmelz sehr ähnlich (DAVIDSON et al. 1973).

In der Vergangenheit wurden verschiedene Methoden zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung kariöser Strukturen beschrieben (FONTANA et al. 1996, PIOCH et al. 1997, GONZALEZ-CABEZAS et al. 1998, IJIMA et al. 1998). Grundlage dieser Verfahren ist das Einbringen von fluoreszierenden Farbstoffen in die Poren der Schmelzläsionen. Die am häufigsten verwendeten Farbstoffe sind Rhodamin B und Fluorescein sowie deren Thiocyanate. Die einfachste Methode stellt die Einfärbung der Proben mittels

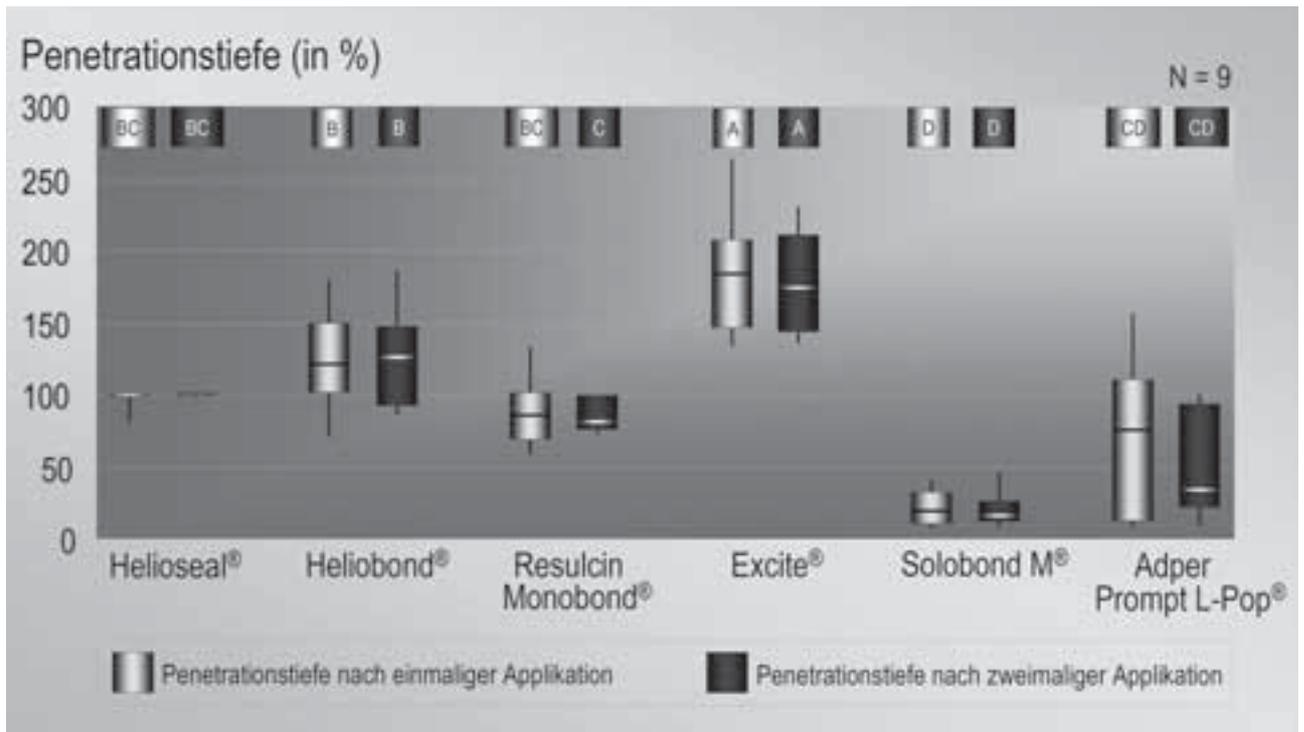


Abb. 4 Box-and-whisker-plots der Penetrationstiefen nach ein- und zweimaliger Applikation aller verwendeten Materialien. Gruppen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ; Bonferroni).

Tab. II Ausmasse der Sauerstoffinhibitionsschichten

		Heliobond	Heliobond	Resulcin Monobond	Excite	Solobond M	Adper Prompt L-Pop
Dicke der Sauerstoffinhibitionsschicht (A) (in %)	MW	5	5	6	34	3	30
	SD	1	2	4	20	2	29
	Sig.	A	A	A	B	A	B
Dicke der Sauerstoffinhibitionsschicht (B) (in %)	MW	5	4	6	5	2	9
	SD	2	2	3	2	1	12
	Sig.	A	A	A	A	A	A

Angegeben sind Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und Signifikanzen (Sig). Ungleiche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p < 0,05$ ; Bonferroni).

wässriger Lösungen der verwendeten Farbstoffe dar. Der Vorteil dieser Methode liegt in der einfachen Infiltration der Proben mit Farbstoff. Nachteilig ist jedoch, dass die Farbstoffe nicht fest an die Zahnhartsubstanz gebunden werden und somit bei der Probenverarbeitung leicht herausgewaschen werden können. Beim Diffundieren der Farbstofflösung von der Probenoberfläche in tiefere Regionen der Probe lagern sich Farbstoffmoleküle bevorzugt an der Oberfläche der Probe ab. Bei einem Querschnitt durch die Probe sind somit grundsätzlich unterschiedliche Farbstoffkonzentrationen zu erwarten.

Für Quantifizierungen von Mineralverlusten in den Läsionen wurde bei der Bestimmung der Läsionstiefen mit Hilfe einer Färbemethode auf Wasserbasis und Benutzung eines Konfokalen Laser-Raster-Mikroskops im Vergleich mit der Mikroradiografie ein hoher Korrelationskoeffizient ermittelt (FONTANA et al. 1996). Somit scheint diese Methode geeignet, die Tiefe des Läsionskörpers zu vermessen. Allerdings besitzt diese Methode damit einen ähnlichen Nachteil wie das mikroradiografische Verfahren, da die über den Läsionskörper hinausgehenden geringfügiger demineralisierten Bereiche der Läsionsfront nicht erfasst werden können.

Einige Probleme der oben beschriebenen Methode konnten mit einem speziellen Hochdruckverfahren umgangen werden (UCHTMANN & WILKIE 1997). Die Infiltration der Zahnhartsubstanz mittels angefärbten Kunststoffes unter hohem Druck (2000 bar) in einer eigens zu diesem Zweck entwickelten Apparatur ermöglicht nicht nur das vollständige Ausfüllen aller in der Zahnhartsubstanz vorhandenen Porositäten bis unter  $0,1 \mu\text{m}$  Grösse, sondern führt durch die Fixierung der Porositäten zu einer Steigerung der Resistenz der kariösen Läsionen gegen Zerstörungen, welche bei Säge- und Poliervorgängen auftreten können. Ein Auswaschen des Kunststoffes bei der weiteren Verarbeitung ist dabei ausgeschlossen. Die beschriebene Methode erfordert jedoch einen erhöhten apparativen Aufwand, da der verwendete Kunststoff infolge seiner Zähflüssigkeit nur unter hohem Druck alle Porositäten ausfließt. Aufgrund der hohen Viskosität des verwendeten Kunststoffes können darüber hinaus während des Einpressens die oftmals sehr graziilen, instabilen demineralisierten Schmelzstrukturen zerstört werden. Um die empfindlichen Zahnhartsubstanzstrukturen nicht zu beschädigen, wurde daher in der vorliegenden Studie ein sehr

niedrigvisköser Kunststoff (SPURR 1969) verwendet, der zudem über gute Benetzungseigenschaften der Zahnhartsubstanzen verfügt. Somit können über den Läsionskörper hinausgehend demineralisierte Bereiche der Probe angefärbt und ausgewertet werden. Das in der vorliegenden Studie beschriebene Verfahren zur Visualisierung von porösen Mikrostrukturen wurde VIRIN (Visualisation by Resin Infiltration) (von den Autoren bisher noch unveröffentlicht) genannt.

Die verschiedenen Bereiche der Schmelzkaries sind in Abb. 2 und 3 erkennbar und im Text erläutert. Demzufolge entspricht die Strecke III (Abb. 2) dem Läsionskörper. Die maximale Läsionstiefe ist durch Strecke IV definiert und stellt die voranschreitende Demineralisationsfront dar. Weitere Untersuchungen müssen bestätigen, ob es sich hierbei um die transluzente Zone handelt. Die dunkle Zone als Übergangszone zwischen Läsionskörper und transluzenter Zone ist mit der CLSM-Darstellung nicht eindeutig abgrenzbar. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bis auf die «dark zone» alle Teilbereiche einer Läsion beschrieben werden können. Hierbei ist aber unklar, ob die mit der VIRIN-Methode beschriebenen Zonen mit denen, welche durch andere Untersuchungstechniken gefunden wurden, übereinstimmen.

Abweichend von der in der vorliegenden Studie beschriebenen Methode können anstelle des (*Spurr*-)Kunststoffes die Adhäsive eingefärbt werden (PIOCH et al. 1997). Da jedoch in der CLSM-Darstellung nur der Farbstoff sichtbar wird, hat dieses Verfahren den Nachteil, dass unklar bleibt, ob nur der im Lösungsmittel befindliche Farbstoff oder die aushärtenden Adhäsivbestandteile die Penetrationstiefe definieren. Darüber hinaus könnten die Penetrationseigenschaften des Adhäsivs durch den zugesetzten Farbstoff beeinflusst werden.

Bezüglich des Applikationsverfahrens der verschiedenen Adhäsive wurde im Gegensatz zu den meisten anderen Studien (DAVILA et al. 1975, ROBINSON et al. 2001) kein Überschuss des jeweiligen Kunststoffmaterials auf den initialen Schmelzdemineralisationen belassen. Eine Abdichtung der Läsion sollte somit nicht durch eine oberflächliche Versiegelung, sondern durch das Ausfüllen des Porenvolumens erreicht werden.

Um das gesamte Porenvolumen im demineralisierten Schmelz auffüllen zu können, muss für die Adhäsive ein optimaler Zugang zum Läsionskörper geschaffen werden. Die Oberflächenschicht einer initialen Läsion besitzt ein Porenvolumen von nur 1% (GRAY & SHELLIS 2002). Diese Barrierewirkung ist so stark, dass sie von den Adhäsiven bei Applikation auf die unbehandelte Läsionsoberfläche nicht überwunden wird, sodass eine Penetration in die Tiefe der Läsion von nur 4,4% erreicht wurde (GRAY & SHELLIS 2002). Das oberflächliche Ätzen der Läsion für den kurzen Zeitraum von 5 s reicht zumindest bei künstlich hergestellten Demineralisationen aus, um einen verbesserten Zugang zur Läsion zu ermöglichen. Eine längere Ätzzeit führte *in vitro* neben einem grösseren Substanzverlust zu einer Destabilisierung der Läsionsoberfläche, jedoch zu keiner Erhöhung der Penetrationstiefen (GRAY & SHELLIS 2002). Für natürliche Läsionen muss die Optimierung der Ätzzeit in weiterführenden Studien bestimmt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen erstmalig, dass es möglich ist, den Läsionskörper sowie tiefere Läsionsbereiche mit einem Adhäsiv zu penetrieren. Ob diese tiefer gehende Penetration überhaupt notwendig ist, um die Resistenz der behandelten Läsion gegenüber kariogenen Angriffen zu steigern, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Die im Vergleich zu anderen Materialien sehr dicke Sauerstoffinhibitionsschicht (der Begriff wird in diesem Zusammenhang für

alle oberflächlichen Defekte der Adhäsivschichten verwendet und gibt nur teilweise Aufschluss über die möglichen Ursachen) bei Excite® nach einmaliger Applikation lässt sich vermutlich auf den Lösungsmittelanteil von 25% Ethanol zurückführen. Da das Lösungsmittel nur über die Läsionsoberfläche verdunsten konnte, fehlte möglicherweise deshalb im oberen Bereich der Läsion der Kunststoff. Erst nach zweimaliger Applikation verringerte sich die SIS auf ähnliche Werte wie bei den anderen Materialien, da der Ethanolanteil nur einen wesentlich kleineren Bereich der ursprünglichen Läsion ausfüllen konnte. Eine ausgedehnte SIS dürfte bei der Behandlung der Schmelzläsionen einen Schwachpunkt darstellen. Da die mittlere Ausdehnung nach zweimaligem Auftragen lediglich ca. 5% (etwa 5 µm) betrug, scheint diese Vorgehensweise akzeptabel. Darüber hinaus zeigte sich, dass bereits die einmalige Applikation/Lichthärtung zu einer offensichtlich ausreichend dichten Versiegelung führte und somit das erneute Auftragen nicht zu einer erhöhten Penetration beitrug.

Adper Prompt L-Pop® enthält Wasser als Lösungsmittel. Da dieses wesentlich langsamer verdunstet als Ethanol, entstand vermutlich die sehr inhomogene Adhäsivschicht, die zudem nicht nur an der Oberfläche beobachtet wurde. Die Materialien Monobond®, Heliobond® und Heliobond® enthielten dagegen keine Lösungsmittel und zeigten möglicherweise deshalb keine Porositäten innerhalb der Adhäsivschicht. Bei diesen Materialien fehlte nur an der Oberfläche die Kunststoffschicht, was eventuell durch eine von Sauerstoff inhibierte Polymerisation begründet sein könnte.

Eine erste klinische Studie zur vorliegenden Problematik konnte anhand von periodisch angefertigten Bissflügelaufnahmen zeigen, dass 77% der mit den Präparaten Concise® (3M-ESPE, Seefeld, Deutschland) oder Gluma One® (Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) versiegelten Läsionen keine Progression nach zwei Jahren aufwiesen (EKSTRAND & MARTIGNON 2004). Damit stellt die Versiegelung initialer approximaler Läsionen mit Adhäsiven eine erfolgreiche Therapie während des untersuchten Zeitraumes dar, da eine invasive Intervention entsprechend hinausgezögert werden kann. Weitere Studien über längere Beobachtungszeiträume sind daher zur Bestätigung dieser Befunde wünschenswert.

## Schlussfolgerung

Mit Hilfe der vorgestellten Untersuchungsmethode (VIRIN) können poröse Mikrostrukturen der Zahnhartsubstanzen visualisiert werden. Unter Anwendung dieses Verfahrens wurde erstmals gezeigt, dass kommerziell erhältliche Adhäsive, insbesondere Excite®, zur nahezu vollständigen Versiegelung der Läsionskörper sowie tieferer Bereiche von initialen Schmelzläsionen geeignet erscheinen. Sofern sich diese viel versprechenden Ergebnisse auch in weiterführenden Studien an natürlichen Läsionen reproduzieren lassen, dürfte dies die zukünftige klinische Kariesprävention entscheidend beeinflussen.

## Verdankung

Die Autoren bedanken sich herzlichst bei Herrn Professor Dr. H. Stein (Institut für Pathologie, Campus Benjamin Franklin, Charité – Universitätsmedizin Berlin) für die Möglichkeit der Nutzung des Konfokalen Laser-Raster-Mikroskops und bei Herrn PD Dr. Dr. Hopfenmüller (Institut für medizinische Informatik, Bereich Biometrie und Klinische Epidemiologie, Campus Benjamin Franklin, Charité – Universitätsmedizin Berlin) für die Beratung bei der statistischen Auswertung.

## Summary

MEYER-LUECKEL H, MUELLER J, PARIS S, HUMMEL M, KIELBASSA A M: **The penetration of various adhesives into initial enamel lesions in vitro** (in German). *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 115: 316–323 (2005)

The aim of the present study was to evaluate the penetration depth (PD) and the thickness of the oxygen inhibition layer (OIL) of a fissure sealant (Heliobond®, Vivadent) and various adhesives (Heliobond®, Excite®, Vivadent; Resulcin®, Merz; Solobond M®, Voco; Prompt L-Pop®, 3M-Espe) applied to enamel lesions in vitro. From 27 bovine teeth 54 enamel specimens were prepared and covered with nail varnish (control) thus obtaining three windows for treatment. After demineralisation (pH 5.0, 14 d) two of the windows were etched with phosphoric acid (20%, 5 s), whereas the third area served as control. The specimens were divided randomly into six groups (n=9) and the respective adhesive was applied (90 s), either once or twice. Light-curing followed each application. Enamel slabs (perpendicular to the surface) were cut and studied after infiltration with a fluorescent low-viscous resin using confocal microscopy (CLSM). The image of the lesion was divided into two areas with different grey values. Lesion depths were calculated (ImageJ) from the surface to that point in the lesion where the grey value clearly changed to a darker grey value. The zone with the darker grey values marked the front of demineralisation. Mean lesion depths ( $\pm$ SD) after demineralisation were measured at 105 ( $\pm$ 21)  $\mu$ m. After single application, Resulcin® [89 ( $\pm$ 22)%] and Heliobond® [98 ( $\pm$ 6)%] had almost completely penetrated the lesion. Heliobond® [126 ( $\pm$ 33)%] and Excite® [184 ( $\pm$ 40)%] penetrated even deeper than the defined lesion. For Excite® double application decreased the OIL significantly ( $p=0.03$ ; adjusted paired t-test). Adhesives are capable to penetrate artificial initial enamel lesions completely. Follow-up studies are needed to confirm this effect for natural lesions.

## Résumé

L'objectif de cette étude en laboratoire était de déterminer la profondeur de pénétration de divers adhésifs (Heliobond®, Excite®, Vivadent; Resulcin®, Merz; Solobond M®, Voco; Adper Prompt L-Pop®, 3M-Espe) et d'un obturateur de fissures (Heliobond®, Vivadent) dans des déminéralisations initiales de l'émail dentaire. A partir de 27 dents bovines, 54 échantillons d'émail ont été préparés et recouverts de vernis à ongles (contrôle), dans le but de créer trois zones de traitement. Après la déminéralisation, (pH 5,0, 14 jours), deux zones (A et B) ont été mordancées à l'acide phosphorique (20%). Le 3<sup>e</sup> domaine a servi de contrôle de l'émail déminéralisé. Les échantillons ont été subdivisés de façon aléatoire en six groupes (n=9) et le matériau sélectionné a été appliqué une seule fois (A) ou deux fois (B) (90 s) et polymérisé à la lumière après chaque application. Les échantillons ont ensuite été sectionnés de façon perpendiculaire à la surface et une résine (*Spurr*) teinte à l'isocyanate de rhodamine B a été pressée dans les pores restantes. La profondeur de pénétration et l'épaisseur de la couche d'inhibition de l'oxygène des matériaux utilisés ont été évaluées à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser. L'image de la lésion a été divisée en deux régions avec différentes valeurs de gris. La profondeur de lésion a été calculée (ImageJ) à partir de la surface jusqu'au point dans la lésion où la valeur de gris vire nettement au gris foncé. Cette dernière zone est considérée comme étant le front de déminéralisation. La profondeur moyenne des lésions est de 105  $\mu$ m (déviat. standard: 21  $\mu$ m). Après une seule application, les adhésifs Resulcin® [89% (22)] et Heliobond® [98% (6)] ont

presqu'entièrement pénétré les lésions, tandis que Heliobond® [126% (33)] et Excite® [184% (40)] sont même allés au-delà de la limite définie. Dans le cas du produit Excite®, la double application a conduit à une réduction significative de la couche d'inhibition de l'oxygène, passant de 34% (20) de la profondeur de pénétration après une seule application à 5% (2). A l'aide du procédé développé, il a pu être démontré pour la première fois que certains adhésifs commerciaux semblent capables d'obturer des fissures de lésions d'émail initiales de façon quasi complète.

## Literaturverzeichnis

- BACKER-DIRKS O: Post-eruptive changes in dental enamel. *J Dent Res* 45: 503–511 (1966)
- BILLE J, CARSTENS K: Approximal caries progression in 13- to 15-year-old Danish children. *Acta Odontol Scand* 47: 347–354 (1989)
- BUSKES J A, CHRISTOFFERSEN J, ARENDS J: Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions. A new technique with applications. *Caries Res* 19: 490–496 (1985)
- DAVIDSON C L, BOOM G, ARENDS J: Calcium distribution in human and bovine surface enamel. *Caries Res* 7: 349–359 (1973)
- DAVILA J M, BUONOCORE M G, GREELEY C B, PROVENZA D V: Adhesive penetration in human artificial and natural white spots. *J Dent Res* 54: 999–1008 (1975)
- DE ARAUJO F B, ROSITO D B, TOIGO E, DOS SANTOS C K: Diagnosis of approximal caries: radiographic versus clinical examination using tooth separation. *Am J Dent* 5: 245–248 (1992)
- EKSTRAND K R, MARTIGNON S: Managing Approximal Carious Lesions: A New Non-Operative Approach. *Caries Res* 38: 357–412 (2004)
- FEATHERSTONE J D, BEHRMAN J M, BELL J E: Effect of whole saliva components on enamel demineralization in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med* 4: 357–362 (1993)
- FONTANA M, LI Y, DUNIPACE A J, NOBLITT T W, FISCHER G, KATZ B P, STOOKEY G K: Measurement of enamel demineralization using microradiography and confocal microscopy. A correlation study. *Caries Res* 30: 317–325 (1996)
- GONZALEZ-CABEZAS C, FONTANA M, DUNIPACE A J, LI Y, FISCHER G M, PROSKIN H M, STOOKEY G K: Measurement of enamel remineralization using microradiography and confocal microscopy. A correlational study. *Caries Res* 32: 385–392 (1998)
- GRAY G B, SHELLIS P: Infiltration of resin into white spot caries-like lesions of enamel: an in vitro study. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 10: 27–32 (2002)
- IJIMA Y, TAKAGI O, DUSCHNER H, RUBEN J, ARENDS J: Influence of nail varnish on the remineralization of enamel single sections assessed by microradiography and confocal laser scanning microscopy. *Caries Res* 32: 393–400 (1998)
- KLINGER H G, WIEDEMANN W: [Limits of the capacity for remineralization in initial caries]. *Dtsch Zahnärztl Z* 40: 16–22 (1985)
- PIOCH T, STOTZ S, STAEHLE H J, DUSCHNER H: Applications of confocal laser scanning microscopy to dental bonding. *Adv Dent Res* 11: 453–461 (1997)
- ROBINSON C, BROOKES S J, KIRKHAM J, WOOD S R, SHORE R C: In vitro studies of the penetration of adhesive resins into artificial caries-like lesions. *Caries Res* 35: 136–141 (2001)
- SPURR A R: A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 26: 31–43 (1969)
- UCHTMANN H, WILKIE D: High-pressure replica technique for in vitro imaging of pore morphologies in teeth. *Adv Dent Res* 11: 467–471 (1997)