

Biochemische Analyse des residualen Dentins nach selektiver Kariesentfernung mit einem fluoreszenzgesteuerten Er:YAG Laser

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Thorsten Peschel geb. Dörschlag
aus Rendsburg

2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. S. Jepsen

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Götz

Tag der Mündlichen Prüfung: 22.09.2008

Aus der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde
des Universitätsklinikums der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Direktor: Professor Dr. Dr. S. Jepsen

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungen.....	5
1 Einleitung	6
1.1 Das Dentin und seine Zusammensetzung.....	7
1.2 Die zwei Schichten kariösen Dentins	8
1.2.1 Das äußere kariöse Dentin.....	8
1.2.2 Das innere kariöse Dentin	8
1.3 Biochemische Analyse der zwei Schichten kariösen Dentins.....	9
1.4 Die Kollagenquervernetzungs-komponenten des ausgereiften Kollagens	10
1.5 Porphyrine.....	11
1.5.1 Aufbau und Funktionen von Porphyrinen	11
1.5.2 Porphyrinsynthese	12
1.5.3 Fluoreszenzeigenschaften	13
1.5.4 Kariesbakterien und deren Fluoreszenzverhalten	13
1.6 Aufbau und Funktionsweise eines Lasers.....	15
1.7 Funktionsweise der Laserfluoreszenzmessung.....	16
1.8 Ziel der Arbeit.....	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Verwendeter Laser.....	19
2.2 Sammlung der Proben für die Vor- und Hauptuntersuchung	20
2.3 Voruntersuchung.....	20
2.4 Probengewinnung für die Voruntersuchung	20
2.5 Festlegung des Schwellenwertes für die Kariesentfernung.....	21
2.6 Probengewinnung für die Hauptuntersuchung	21
2.7 Vorbereitung der Proben für die Analyse	22
2.7.1 Vorbereitung der Dialyseschläuche.....	22
2.7.2 Vorbereitung der Demineralisation.....	23
2.7.3 Durchführung der Demineralisation.....	24
2.7.4 Neutralisation der Proben.....	25

2.7.5	Zentrifugation der Proben.....	25
2.8	Methode der Analyse	25
2.9	Vorbehandlung des Säulenmaterials	26
2.10	Vorbereitung der Proben für die HPLC-Analyse.....	27
2.10.1	Hydrolysen der Proben	27
2.10.2	Weiteres Vorgehen	27
2.11	Analyse der Proben durch das HPLC-Verfahren.....	29
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Ergebnisse aus den Voruntersuchungen	31
3.1.1	Kontrollgruppe gesundes Dentin	31
3.1.2	Kontrollgruppe gesundes gelasertes Dentin.....	32
3.1.3	Kontrollgruppe kariöse Dentinprobe.....	32
3.2	Ergebnisse aus den Hauptuntersuchungen	33
3.2.1	FeedbackEinstellung 5 / 1	33
3.2.2	FeedbackEinstellung 5 / 2	33
3.2.3	Zusammenfassung FeedbackEinstellung 5.....	34
3.2.4	FeedbackEinstellung 10 / 1	34
3.2.5	FeedbackEinstellung 10 / 2	35
3.2.6	Zusammenfassung FeedbackEinstellung 10.....	35
4	Diskussion	36
5	Zusammenfassung	43
6	Literatur.....	44
7	Danksagung.....	54

Abkürzungen

DPD	Desoxypyridinolin (=LP)
LP	Lysylpyridinolin
HP	Hydroxylslylpyridinolin
CF-1	fibröse Cellulose
HAc	Essigsäure
HCL	Salzsäure
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
μmol	Mikromol
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
mM	Millimol
l	Liter
μl	Mikroliter
YAG	Ytrium-Aluminium-Granat
Nd	Neodymium
Er	Erbium
nm	Nanometer
Hz	Hertz
mW	Milliwatt
mJ	Millijoule
U/min	Umdrehung pro Minute
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
M	Molar
ml	Milliliter
MW	Molekulargewicht
HFBA	Heptafluorbuttersäure
Hyp	Hydroxyprolin
pmol	Pikomol

1 Einleitung

Die Caries profunda führt, sofern keine invasiven therapeutischen Maßnahmen erfolgen, bedingt durch die massive bakterielle Besiedelung zu einer entzündlichen Abwehrreaktion der Pulpa. Im weiteren Verlauf kann es dann zu deren Untergang kommen. Ziel Zahn erhaltender Maßnahmen ist es daher, alle infizierten Bereiche, unter Schonung von gesunden, unbefallenen Bezirken, Substanz schonend vollständig zu entfernen, um ein weiteres Vordringen von Toxinen, Antigenen und Bakterien zu unterbinden. Doch wie erkennt der praktizierende Zahnarzt, ob eine Kavität kariesfrei ist oder wo die bakterielle Besiedelung des Dentins endet?

Die Diagnose, ob erweichtes bzw. kariöses Dentin vorliegt, wird in der zahnärztlichen Praxis in der Regel visuell-taktil mit der Sonde geprüft. Dabei wird die Festigkeit des Dentins als Kriterium herangezogen. Dringt die Sonde ohne „klirrendes“ Geräusch in die obersten Dentinschichten ein, so ist dies ein Indiz für kariöses Dentin. Erst wenn die Sonde, ohne Spuren zu hinterlassen, über das Dentin gleitet und dabei ein „klirrendes“ Geräusch verursacht, spricht dies für kariesfreies Dentin. Als zusätzliches Kriterium wird meistens die Dentinverfärbung mit herangezogen. So deuten stark verfärbte Areale in Verbindung mit einer Verfärbung des Dentins auf eine Karies hin. Diese gebräuchliche Methode unterliegt aber starken subjektiven Kriterien (Anderson und Chabeneau 1985). Zum einen setzt das Erkennen des „Klirrens“ der Sonde auf gesundem Dentin eine gewisse Erfahrung des Behandlers voraus. Zum anderen gibt es keine standardisierten Werte für Sondengröße und Sondendruck. Die Überprüfung der Dentinhärte mit Handexcavatoren oder Rosenbohrern unterliegt den gleichen subjektiven Schwankungen wie die Überprüfung mit der Sonde (Banerjee et al. 2000). Die Verfärbung als zweites Kriterium kann ebenfalls nicht als objektive Beurteilungsmethode genutzt werden, da Verfärbungen nicht unbedingt kariösen Ursprungs sein müssen. So kann es zu Einlagerungen von Metallionen in das Kollagengefüge kommen, die dann eine ähnliche Verfärbung wie bei einer Karies hervorrufen (Kurosaki und Fusayama 1973).

Schon 1969 konnten Terashima et al. und in den folgenden Jahren auch Anderson et al. (1985) und Kielbassa et al. (1994) bei ihren Untersuchungen zeigen, dass die Grenze zwischen krankem und gesundem Dentin mit subjektiven Kriterien nicht

sicher erkannt werden kann. Heute liegen, gerade mit Hinblick auf die Unterschiede zwischen chronischer und akuter Karies, noch zahlreiche weitere Studien vor, die belegen, dass es klinisch, aber auch histologisch, sehr schwierig ist, eine kariöse Läsion in nur zwei Bereiche zu unterteilen, wie von Fusayama Anfang der siebziger Jahre beschrieben (Fusayama und Terashima 1972), von denen „einfach“ der infizierte Bereich zu entfernen ist. Üblicherweise beendet der Behandler die Kariesexcavation, wenn das Dentin sondenfest und keine Verfärbung mehr sichtbar ist. Auf Grund der zuvor dargestellten Ausführungen kann dabei aber nicht ausgeschlossen werden, dass infizierte, ungefärbte Dentinareale verbleiben, die nur punktuell erscheinen mögen, aber dreidimensional größere Ausmaße annehmen können. In anderen Bereichen der Kavität ist eine Überexcavation nicht ausgeschlossen, und es werden oft Areale mit entfernt, die remineralisierbar und somit erhaltungswürdig wären.

1.1 Das Dentin und seine Zusammensetzung

Das Dentin besteht aus einem organischen und einem anorganischen Anteil. Der organische Anteil besteht zu 91 – 92% aus Kollagen und zu 8 – 9% aus nicht kollagener Grundsubstanz. Das Kollagen ist fast ausschließlich vom Typ I, mit weniger als 3% Typ-V-Kollagen. Der Mineralanteil des Dentins (Hydroxylapatitkristalle) enthält im wesentlichen Kalzium und Phosphat im Gleichgewichtsverhältnis von 1 : 2,13. Die Kristalle sind etwa 3 – 4 nm breit und 60 – 70 nm lang (Schröder 1992). Sowohl die Zusammensetzung der anorganischen Bestandteile als auch die des Kollagens variieren in den verschiedenen Dentinschichten, z.B. Manteldentin, peritubuläres Dentin und zirkumpulpaes Dentin (Craig et al. 1959; Kleter et al. 1997; Schulz et al. 1991).

Die Kollagenstruktur setzt sich aus drei Einzelsträngen zusammen, die intramolekular und intermolekular dreidimensional quervernetzt sind. In diesem dreidimensionalen Netzwerk sind die anorganischen Bestandteile eingelagert (Kühn - München 1970; Ramachandran und Reddi 1976).

1.2 Die zwei Schichten kariösen Dentins

Die Verfärbung des Dentins korreliert nicht immer mit der Erweichung bzw. der bakteriellen Invasionsfront. In einer Reihe von Studien wurde gezeigt, dass sich kariöses Dentin aus zwei Schichten zusammensetzt: dem inneren und dem äußeren kariösen Dentin (Ohgushi und Fusayama 1973; Fusayama 1979; Kuboki et al. 1983; Shimizu et al. 1981).

1.2.1 Das äußere kariöse Dentin

In der äußeren Schicht weist die Kollagenstruktur eine deutlich andere Morphologie auf als im gesunden, nicht kariösen Dentin bzw. in der zweiten kariösen Schicht. Hier sind viele Dentintubuli mit Bakterien gefüllt, und das peritubuläre Dentin ist aufgelöst (Anderson und Chabeneau 1985; Anderson et al. 1985; Wirthlin 1970). Die Kollagenmatrix des intertubulären Dentins zeigt in ihrer Struktur starke Abweichungen im Vergleich zum gesunden Dentin.

Die anorganische Struktur weist ebenfalls starke Unterschiede im Vergleich zum gesunden Dentin auf. So findet man granulatähnliche Kristalle, welche irregulär verteilt sind und scheinbar keinen Bezug zum Kollagen aufweisen. In dieser Schicht ist eine Remineralisation des Dentins nicht mehr möglich, da die Kollagenstruktur irreparabel zerstört ist. Die erste kariöse Schicht ist folglich irreversibel geschädigt und muss entfernt werden, um eine sinnvolle Füllungstherapie durchführen zu können (Fusayama 1980).

1.2.2 Das innere kariöse Dentin

Die innere kariöse Schicht weist eine normale organische Struktur auf, welche eine odontoblastische Aktivität besitzt. Das Kollagennetzwerk ist intakt und zeigt die gleiche Struktur wie im gesunden Dentin. Die anorganische Struktur hat Apatitkristalle, welche regulär an Kollagenstrukturen gebunden sind. Wesentlicher Unterschied zum gesunden Dentin ist, dass die Dichte des anorganischen Materials geringer ist. Dies ist auf Bakterienprodukte zurückzuführen, die in unmittelbarer

Nachbarschaft liegen, jedoch diese Schicht nicht infiltriert haben (Fusayama et al. 1966). Die zweite kariöse Schicht ist im Gegensatz zur ersten außerdem in der Lage, Metallbestandteile einzulagern (Kurosaki und Fusayama 1973). So wurde nachgewiesen, dass sich an den Kollagenfibrillen des Dentins Metallionen binden können. Hieraus resultiert eine Verfärbung des Dentins, welche aber keinen Einfluss auf die Reparationsfähigkeit hat.

Die zweite kariöse Schicht sollte somit im Sinne der konservativen Therapie erhalten werden. Nicht zuletzt ist natürliche Zahnhartsubstanz der beste Schutz der Pulpa vor Reizen jeglicher Art.

1.3 Biochemische Analyse der zwei Schichten kariösen Dentins

Die biochemische Zusammensetzung der zwei Kariesschichten wurde von Kuboki et al. (1977) intensiv untersucht. Dabei wurde kein Unterschied in der Bilanz der Aminosäuren im gesunden Dentin sowie in den zwei Schichten kariösen Dentins gefunden. Ein Vergleich von Säulenchromatographien in Bezug auf die Quervernetzungsbestandteile des Kollagens zeigte jedoch deutliche Unterschiede in den zwei kariösen Schichten und im gesunden Dentin (Armstrong 1961; Kleter et al. 1998; Kuboki 1977). Verglichen mit gesundem Dentin wies die innere kariöse Schicht Veränderungen in den Quervernetzungsbestandteilen auf. Es zeigte sich eine beginnende Kollagendegradation, bedingt durch die Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich. Diese Veränderungen sind jedoch so initial, dass nach Neutralisation des pH-Wertes das Kollagen seine Ausgangsstruktur und –zusammensetzung wieder annimmt. In der äußeren kariösen Schicht sind hingegen die Quervernetzungsbestandteile und deren Vorstufen stark vermindert (Kuboki et al. 1977; Kleter et al. 1998) und die Kollagenstrukturen irreversibel zerstört. Diese biochemischen Erkenntnisse decken sich mit elektromikroskopischen Untersuchungen (Johansen und Parks 1961; Okawa et al. 1983; Ohgushi und Fusayama 1973). Hier zeigen sich die typischen „cross-band“-Strukturen und Interbanden der Kollagenfibrillen nur in der inneren kariösen Schicht und im gesunden Dentin. Eine Remineralisation kann nur in der inneren kariösen Schicht mit den hier vorliegenden reversiblen Kollagenveränderungen stattfinden (Shinichi und Fusayama 1967; Miyauchi et al. 1978).

1.4 Die Kollagenquervernetzungs-komponenten des ausgereiften Kollagens

Die kovalenten intra- und intermolekularen Quervernetzungen (cross-links) zwischen Kollagenmolekülen in makromolekularen Fibrillen sind essentielle Bestandteile der Knochen-, Dentin- und Bindegewebsmatrix. Hydroxylysylpyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP), auch Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD) genannt, sind die zwei nicht reduzierbaren intermolekularen Quervernetzungen des Kollagens, die durch posttranslationale Modifikation der Hydroxylysyl- und Lysylreste während der Kollagenreifung an den so genannten Telopeptiden in den Kollagenketten entstehen (Eyre 1987; Preedy et al. 1991). HP ist ein Derivat aus drei Hydroxylysinresten und lässt sich in nahezu allen ausgereiften Geweben, die Kollagen der Typen I, II, II und IX enthalten, nachweisen (z.B. Sehnen, Knorpel, Zähne, Knochen). LP besteht aus zwei Hydroxylysinresten und einem Lysylrest und kommt hauptsächlich in Knochen und Dentin vor (Preedy et al. 1991; Eyre 1992; Delmas 1992). Die Strukturformeln von HP und LP sind in Abbildung 1 dargestellt.

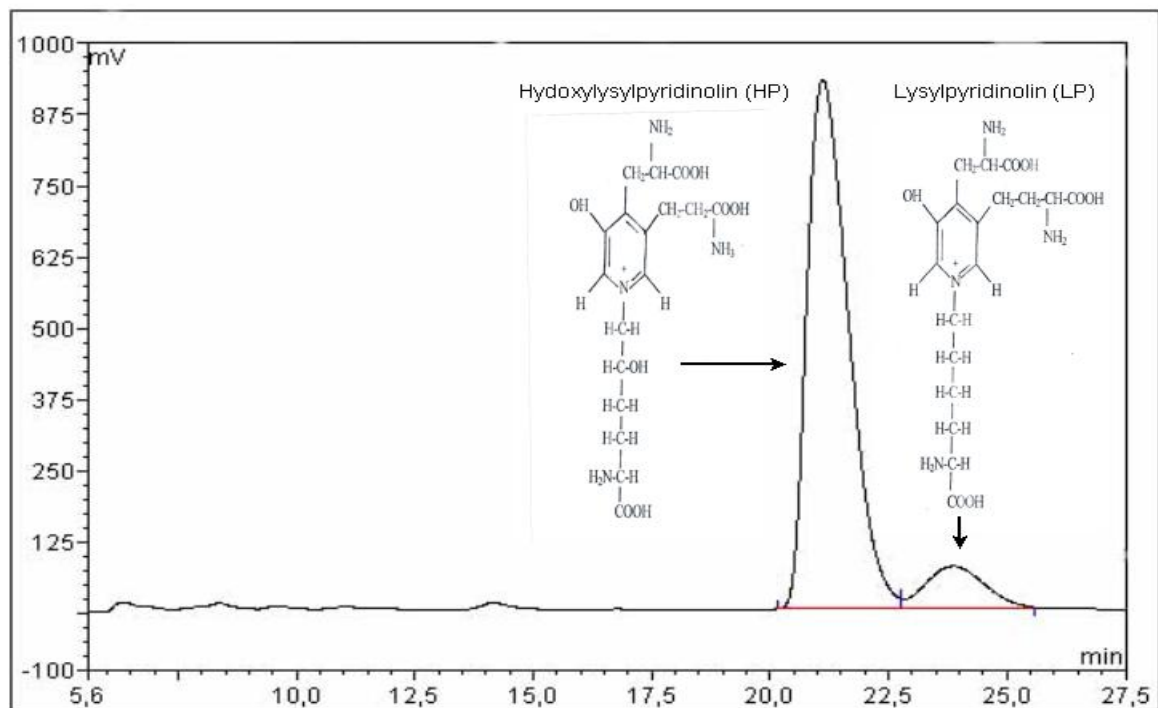


Abbildung 1: Chromatogramm nach HPLC-Analyse und Strukturformeln von Hydroxylysylpyridinolin und Lysylpyridinolin

Der chromatographische Nachweis beruht allein auf der natürlichen Fluoreszenz der peptidfreien Pyridinumkomponenten. Zunächst wird eine komplette Hydrolyse des Probenmaterials notwendig, um den Gehalt an kollagenen cross-links zu bestimmen. Dadurch wird die peptidgebundene Fraktion in freie, fluoreszierende Derivate umgewandelt. Nach Anreicherung durch eine vorgeschaltete Adsorptions-Chromatographie werden die Proben mittels Hochempfindlichkeits-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgetrennt, wobei HP und LP gemäß ihren unterschiedlichen Retentionszeiten quantitativ bestimmt werden können.

1.5 Porphyrine

Nach König sind die Porphyrine, speziell Protoporphyrin IX, verantwortlich für die Fluoreszenz von Karies (König et al. 1999). Im folgenden Abschnitt werden die Porphyrine allgemein in ihrer Funktion erläutert. Die Kariesbakterien, die nach Untersuchungen von König Porphyrine synthetisieren, sind in Unterabschnitt 1.5.4 beschrieben.

1.5.1 Aufbau und Funktionen von Porphyrinen

Porphyrene sind in zahlreichen Proteinen auch an grundlegenden Prozessen wie z.B. Sauerstofftransport (Hämoglobin bzw. Myoglobin), Elektronentransport (Cytochrom C) und Energieumwandlung beteiligt. Porphyrine werden als Zwischenschritte bei der Hämbiosynthese gebildet. Auch die Cytochrome, das Chlorophyll oder das Vitamin B12 enthalten Porphyrine als Grundgerüst in ihrem Aufbau. Die Porphyrine gehören zur Gruppe der Tetrapyrrole, die in ihrem Zentrum Metallionen tragen können. Die Abbildung 2 zeigt die Strukturformel eines Porphyringerüsts.

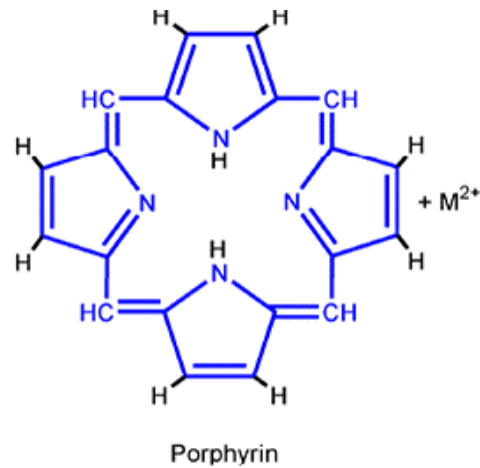


Abbildung 2: Porphyringerüst [Allgemeine Chemie Online, 2005]

1.5.2 Porphyrinsynthese

Im Folgenden wird die Porphyrinsynthese erläutert, die bei Menschen, Tieren, einigen Bakterien sowie Pflanzen auftritt.

Alle Zellen von Säugern synthetisieren Porphyrine und Häm. Die Hauptsyntheseorte sind neben der Leber vor allem die Retikulozyten des Knochenmarks. Die Syntheseschritte finden bei Menschen, Tieren und einigen oben bereits erwähnten Bakterien teils in den Mitochondrien, teils in den zytosomalen Abschnitten der Zelle statt. Bei Pflanzen sind die Chloroplasten der Syntheseort. Der erste Schritt ist dabei die Kondensation von Glycin und Succinyl-CoA zu 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) in den Mitochondrien. Das Kondensationsprodukt aus zwei Molekülen 5-Aminolävulinsäure geht unter Zyklisierung, Protonen- und Wasserabspaltung in Porphobilinogen über. Vier solcher Einheiten bilden durch Zusammenlagerung das Porphyrinskelett. Die nächsten drei Schritte im Cytosol beinhalten die Oxidation der Substituenten an den Pyrrolringen. Zuerst entsteht unter Abspaltung von 4NH₃-Molekülen Uroporphyrinogen (Typ III). Dieses wird zu Koproporphyrinogen (Typ III) decarboxyliert und anschließend zu Protoporphyrinogen IX oxidiert, welches wieder ins Mitochondrium zurück transportiert wird. Durch Oxidation der Methylengruppen, welche die Pyrrole verbinden, entsteht Protoporphyrin IX. Durch Einbau von Eisen entsteht schließlich Häm (Alakkozai 2003).

1.5.3 Fluoreszenzeigenschaften

Der Begriff „Porphyrin“ leitet sich von dem griechischen Wort „porphura“ ab, welches die Farbe des Purpurs beschreibt. Bereits 1883 wurde von Soret eine intensive Absorptionsbande bei einer Wellenlänge von ungefähr 400 nm für Hämoglobin gefunden. Diese Soret-Bande ist charakteristisch für alle Tetrapyrrole mit einem konjugierten Ringsystem (Andersson-Engels et al. 1989). Nach der „International Union of Pure and Applied Chemistry“ (IUPAC) sind alle Substanzen, die vier Pyrrole oder pyrrolähnliche Ringe beinhalten, welche über Kohlenstoff- oder Stickstoffbrücken miteinander verbunden sind, Tetrapyrrole. Hierzu zählt auch die Gruppe der Porphyrine.

Porphyrine sind endogene Fluorophore, welche die Fähigkeit haben, unter Einwirkung von Licht zu fluoreszieren (Andersson-Engels 1989). Dies bezeichnet man als Eigen- oder Autofluoreszenz. Dadurch wird ein biochemischer Prozess gestartet, der Sauerstoff freisetzt. Man nennt diesen Prozess "Reduzierung", d.h. Sauerstoff wird vom Molekül abgespalten. Dieser photochemisch-toxische Prozess wird auf dem Gebiet der photodynamischen Therapie verwendet. Porphyrine sind lichtempfindlich, und so vermindert sich die Fluoreszenzintensität bereits nach kurzer Einwirkung von Licht. Untersucht man Porphyrinlösungen auf Fluoreszenz, so muss darauf geachtet werden, dass die geringste Konzentration von Protoporphyrin IX, die noch detektiert werden kann, bei ca. 2 µmol/l liegt (Hibst et al. 2001b)

1.5.4 Kariesbakterien und deren Fluoreszenzverhalten

In Tabelle 1 werden exemplarisch einige Karies involvierte Bakterien genannt, die im Zusammenhang mit der Plaqueentstehung und -entwicklung stehen. Einige werden auch als so genannte Leitkeime der Parodontitis bezeichnet. Die genannten Bakterien sind in der Lage, Porphyrine, insbesondere das Protoporphyrin IX, zu synthetisieren, und zeigen somit ein Fluoreszenzverhalten (König et al. 1993, 1998, 2000; Buchalla et al. 2005).

Tabelle 1: Bakterien mit Fluoreszenzverhalten

<i>Actinomyces odontolyticus</i>	Aktinomyzeten stehen in Zusammenhang mit der Kariesentstehung und der Plaqueakkumulation (Müller 2001). Sie werden auch im Zusammenhang mit der Dentinkaries (König et al. 2000) sowie mit der Wurzelkaries genannt (Hellwig et al. 1999).
<i>Bacteroides intermedius</i>	<i>Bacteroides intermedius</i> ist ein Karies - sowie Parodontitis involviertes Bakterium (Müller 2001; König et al. 1993, 1998, 2000).
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i> steht in Zusammenhang mit der Kariesentstehung bei der Bildung supragingivaler Plaque (Müller 2001; König et al. 2000; Roper et al. 2000).
<i>Prevotella species</i>	Prevotellen stehen in Zusammenhang mit der Kariesentstehung und mit Parodontitis (Müller 2001; König et al. 2000).
<i>Corynebakterien</i>	Corynebakterien sind an der Plaquebildung beteiligt (Hellwig et al. 1999; König et al. 1993).
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> ist ein Plaque- und Parodontitis assoziierter Keim (Hellwig et al. 1999; Müller 2001; König et al. 2000).

Nach König produzieren der wesentliche Kariesinitiator *Streptococcus mutans* sowie die Laktobazillen keine Porphyrine (König et al. 1993). Buchalla et al. (2005) konnten hingegen ein geringes Fluoreszenzverhalten im roten Spektralbereich nachweisen. Die Mikroorganismen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Prevotella species* fluoreszieren bei Anregung im roten Spektralbereich, was auf eine Porphyrinsynthese schließen lässt (König et al. 1993, 2000; König und Schneckenburger 1994; Banerjee et al. 2004).

1.6 Aufbau und Funktionsweise eines Lasers

Die Abkürzung Laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, dt. Lichtverstärkung durch induzierte Strahlungsemission) beschreibt im Wesentlichen die gesteuerte Wechselwirkung zwischen Photonen und Elektronen in der Hülle von Atomen.

Durch die Zuführung von Energie, das so genannte Pumpen, werden die Elektronen eines Atoms auf ein energetisch höheres Niveau befördert. Den physikalischen Gesetzen folgend würde ein solchermaßen angeregtes Elektron unter Energieabgabe wieder auf sein stabiles Energieniveau zurückkehren. Dieser Vorgang wird als spontane Emission von Strahlung bezeichnet. Bei der induzierten Emission von Strahlung werden die bereits angeregten Atome erneut von Photonen getroffen, dadurch fallen die Elektronen ebenfalls von ihrem energetisch höheren Level auf ihr Ursprungsniveau zurück. Dabei wird ein Photon emittiert, das in seinen Eigenschaften mit dem die Emission auslösenden Photon übereinstimmt. Dies bedeutet, dass beide Photonen über die gleiche Wellenlänge verfügen (Monochromasie), die Wellen räumlich und zeitlich phasengleich sind (Kohärenz) und parallel verlaufen (Kollimation). Die emittierte Energie wird in Form eines gebündelten Lichtstrahls nach außen geführt. Um die Wirkung zu verstärken, bewirken Spiegel im Inneren des Lasers einen mehrfachen Umlauf im Rahmen der stimulierten Emission, so dass möglichst viele Elektronen zur Energieabgabe angeregt werden (Gutknecht 1999; Romanos et al. 1999; Rechmann 2002). Grundsätzlich besteht ein Laser aus dem Lasermedium, einem Spiegelsystem und einem Pumpmechanismus (Romanos et al. 1999).

Der Festkörperlaser besteht aus dem Wirtskristall Yttrium-Aluminium-Granat (YAG), der mit optisch aktiven Ionen in Gestalt seltener Erden (Neodymium, Holmium, Erbium) besetzt ist. Die Anregungsenergie kann beim Festkörperlaser in sehr kurzer Zeit abgegeben werden, was eine extrem hohe Leistungsdichte ermöglicht (Gutknecht 1999). Das Spiegelsystem (optischer Resonator) bewirkt die Oszillation des Lichtes im Lasermedium und daraus resultierend eine lawinenartige Verstärkung des Emissionsvorganges (Gutknecht 1999).

Der Pumpmechanismus kann beispielsweise mittels elektrischer, chemischer oder optischer Einwirkung die unterschiedlichen, zuvor beschriebenen Lasermedien anregen (Romanos et al. 1999). Bei der Abgabe des Laserstrahles unterscheidet man im Wesentlichen zwischen der kontinuierlichen Leistungsabgabe (Dauerstrich-Betrieb) und der gepulsten Leistungsabgabe, bei der in sehr kurzen Pulsdauern sehr hohe Leistungen erreicht werden. Beide Betriebsmodi werden vom Pumpmechanismus und dem Lasermedium bestimmt.

1.7 Funktionsweise der Laserfluoreszenzmessung

Das Prinzip des Laserfluoreszenz-Messgerätes beruht auf einem kariös bedingten Fluoreszenzanstieg der Zahnhartsubstanz nach Anregung mit Licht von 655 nm. König et al. (1999) nehmen an, dass es sich bei den Fluorophoren hauptsächlich um Protoporphyrin IX und metallfreie Porphyrine handelt. Weitere Quellen für Fluoreszenzen könnten z.B. die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin oder die Coenzyme NADH und NADPH sowie Flavine sein (König et al. 1998). Kariesläsionen erzeugen bei dieser Anregung im roten Bereich des sichtbaren Spektrums eine Fluoreszenz über 680 nm, die von dem Gerät detektiert wird (Heinrich-Weltzien et al. 2003). Durch ein Empfangsfiltersystem wird erreicht, dass nur Licht mit einer Wellenlänge von mehr als 680 nm empfangen wird. Das Filtersystem blockiert somit das Anregungslicht sowie alle kurzwellige Streustrahlung anderer Strahlungsquellen, wie zum Beispiel Tageslicht oder künstliche Beleuchtung. Langwellige Störstrahlung wird durch Modulation des Anregungslichtes eliminiert, da die Fotodiode nur dieses modulierte Licht detektiert. Somit ist gewährleistet, dass der Messwert mit der Ausdehnung der Karies korreliert (Hibst 1999).

Die schematischen Darstellungen in Abbildungen 3 und 4 zeigen die Konstruktion und Funktionsweise des Laserfluoreszenz-Feedbacksystems des Er:YAG Lasers.

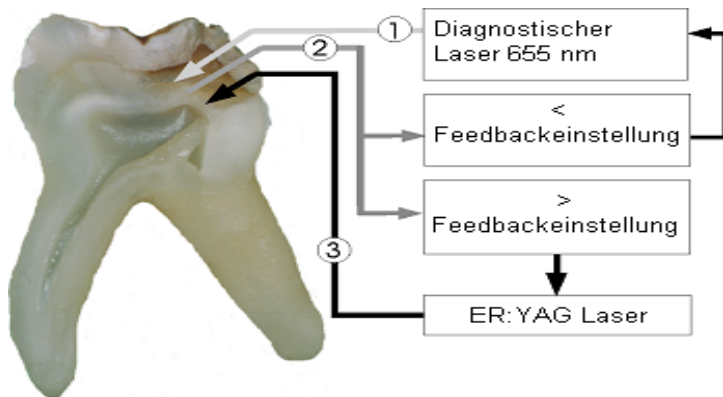


Abbildung 3: Funktionsweise des Feedbacksystems

Der diagnostische Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 655nm wird über ein Fiberglasbündel zum Austrittsfenster am Handstück geleitet (1). Das von der Zahnschmelze emittierte Fluoreszenzsignal wird über andere Fiberglasbündel zu der internen Analyseeinheit geleitet, welche die Intensität des Fluoreszenzsignals in einen Wert von 0 – 100 umrechnet (2). Ist das errechnete Fluoreszenzsignal kleiner als der eingestellte Schwellenwert, wird nur der Diagnoselaser erneut aktiviert. Ein Wert über dem Schwellenwert aktiviert zusätzlich den therapeutischen ER:YAG Laser. Das Laserlicht wird über separate Lichtleitungen an das Austrittsfenster geleitet und trägt die Zahnschmelze ab (3)

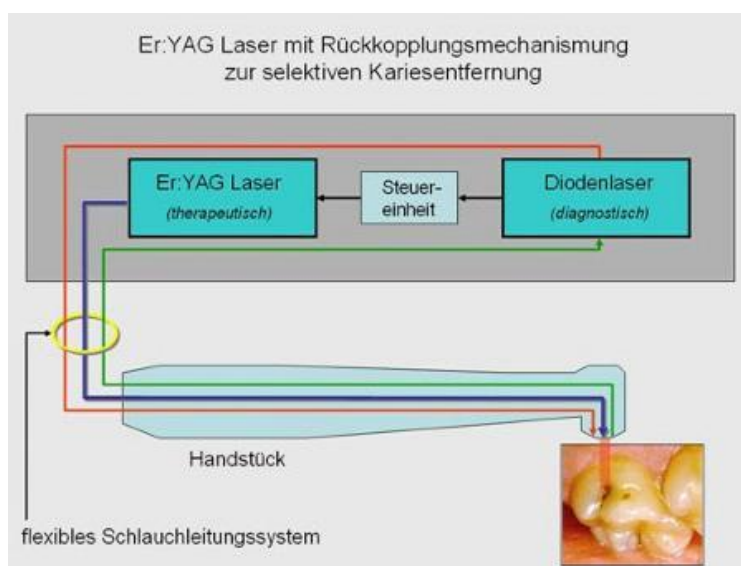


Abbildung 4: Funktionsweise und Lichtleitung des Feedbacksystems

1.8 Ziel der Arbeit

Ziel Zahn erhaltender Maßnahmen ist es, alle infizierten und durch die Karies irreparabel geschädigten Bereiche unter Schonung von gesunden, unbeeinträchtigten Bezirken vollständig zu entfernen, um ein weiteres Vordringen von Toxinen, Antigenen und Bakterien zu unterbinden. Die zur Zeit klinisch gebräuchlichen Diagnosemethoden, um den Endpunkt der Kariesentfernung festzulegen, sind alle subjektiven Einflüssen unterworfen, was meistens zu einer Über- oder Unterexkavation führt, da die Konsistenz des Dentins nicht mit der Eindringtiefe der Bakterien und der Kollagendenaturierung, sondern mit der Demineralisierung des Dentins einhergeht (Fusayama et al. 1966; Banerjee et al. 2000).

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Möglichkeiten einer selektiven Kariesentfernung durch einen fluoreszenzgesteuerten Er:YAG Laser mittels biochemischer Analyse des Dentinkollagens und hier insbesondere der Kollagenquervernetzungs-komponenten zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendeter Laser

Für die Studie wurde ein Er:YAG Festkörperlaser, Laserklasse 4, der Firma Kavo, Biberach verwendet. Der Kavo Key Laser 3 hat eine Wellenlänge von 2,94 μm bei einer Pulsenergie von bis zu 600mJ. Die Pulsfrequenz ist von 1- 25 Hz einstellbar. Das integrierte Laserfluoreszenz-Feedbacksystem arbeitet mit einem Pilotstrahl mit einer Wellenlänge von 655 nm und einer Leistung von 1mW. Die Bestrahlung mit einem fokussierten Laserstrahl wurde mit dem kontaktlosen Handstück 2060 durchgeführt.



Laserdaten	
Lasertyp	Er:YAG Festkörperlaser, Laserklasse 4
Wellenlänge	2,94 μm
Pulsenergie	bis 600 mJ
Pulsfrequenz	1-25 Hz
Pilotstrahl	655 nm /1 mw
Leistungsaufnahme	max. 2,3 kW
Anschluss	230 V, 50/60 Hz, 12 A
Abmessungen	950 x 360 x 660 mm (HxBxT)
Gewicht	70 kg

Abbildung 5: Kavo Key Laser III und technische Daten

2.2 Sammlung der Proben für die Vor- und Hauptuntersuchung

Bei niedergelassenen Zahnärzten und Kieferchirurgen wurden kariöse, extrahierte Zähne gesammelt. Die Zähne wurden sofort nach der Extraktion in 0,5 %iger Natriumacidlösung im Kühlschrank bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Nach Abschluss der Sammlung wurden die Zähne auf Ihre Tauglichkeit hin überprüft, d.h. es wurde visuell-taktil entschieden, ob eine Karies vorlag und ob diese so groß war, dass eine sichere Beteiligung des Dentins zu erwarten war. Jene, bei denen dies nicht der Fall war, wurden verworfen.

2.3 Voruntersuchung

Da die Kariesentfernung mittels des Lasers eine thermische Einwirkung auf das Kollagen des zu untersuchenden Dentins zur Folge hat, sollte zunächst ermittelt werden, ob die thermische Einwirkung einen Einfluss auf den Gehalt an cross-links im Dentin hat.

2.4 Probengewinnung für die Voruntersuchung

Für die Voruntersuchung wurden 3 Versuchsgruppen gebildet. In den ersten beiden Versuchsgruppen wurden jeweils 30 Zähne gepoolt. In der dritten Gruppe wurden 60 Zähne gepoolt.

Tabelle 2: Übersicht Versuchsgruppen der Voruntersuchung

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
30 kariesfreie Zähne	30 kariesfreie Zähne	60 kariöse Zähne
unbehandeltes Dentin	gelasertes Dentin	kariöses Dentin

Bei allen Zähnen wurde das gesamte Dentin freigelegt, indem die Zahnkronen mit einer wassergekühlten, diamantierten Säge entfernt wurden. In der ersten Gruppe wurde das nun freiliegende intakte Dentin mit einem Rosenbohrer im grünen Winkelstück bei 350 – 450 U/min trocken excaviert und die anfallenden Dentinspäne in einem Probenbehälter gesammelt. Die so gewonnenen Proben wurden in den jeweiligen Gruppen gepoolt. In der zweiten Gruppe wurde das gesamte freiliegende intakte Dentin mit dem Laser bearbeitet. Für die Lasereinstellung wurde eine Leistung von 250 mJ und eine Frequenz von 4 Hz gewählt. Der Abstand des kontaktlosen Handstücks 2060 wurde so gewählt, dass der Laserstrahl maximal auf die Oberfläche fokussiert war. Das so bearbeitete Dentin wurde ebenfalls mit einem Rosenbohrer im grünen Winkelstück bei 350 – 450 U/min trocken excaviert und in einem Probenbehälter gesammelt. Auch diese Proben wurden in ihrer Gruppe gepoolt. In Gruppe 3 wurde von jedem Zahn eine Probe kariösen Dentins entnommen und gepoolt. Das weitere analytische Verfahren entspricht demjenigen der Hauptuntersuchung

2.5 Festlegung des Schwellenwertes für die Kariesentfernung

Zur Festlegung des Schwellenwertes wurde die natürliche Eigenfluoreszenz an 40 kariesfreien Zähnen gemessen. Der Wert schwankte zwischen 0 – 3. Die Messwerte wurden gemittelt. Dabei ergab sich ein mittlerer Fluoreszenzwert von 2. Um eine Überexcavation zu vermeiden wurde der Schwellenwert für die vollständige Kariesentfernung auf 5 und der Schwellenwert für die unvollständige Kariesentfernung auf 10 festgesetzt.

2.6 Probengewinnung für die Hauptuntersuchung

Jeder Zahn wurde unmittelbar vor seiner weiteren Verwendung aus der Natriumacidlösung entnommen. Als erstes wurde die Karies mit einem roten Winkelstück und grobkörnigen Diamanten bei 120.000 U/min unter Wasserkühlung dargestellt. Eindeutig erweichtes, kariöses Dentin wurde zunächst ohne den Laser mit einem Handexcavator entfernt. Dann erfolgte die Kariesentfernung mittels des

Lasers bei 250 mJ und 4 Hz. Das Feedbacksystem wurde entsprechend der Gruppeneinteilung auf 5 bzw. 10 eingestellt. Die Kariesentfernung erfolgte mit einem fokussierten Laserstrahl (kontaktloses Handstück 2060) unter Wasserkühlung (1ml/min) und wurde so lange durchgeführt, bis das Feedbacksystem des Lasers nicht mehr auslöste. Der Laserstrahl wurde entsprechend dem Abtrag kontinuierlich nachfokussiert. Von dem so gelaserten Dentin wurde mittels des Rosenbohrers im grünen Winkelstück bei 350 – 450 U/min die oberflächliche Dentinschicht als Probe gewonnen. Diese wurde in einem Probengefäß gesammelt. Die so gewonnenen Proben von jeweils 30 Zähnen wurden gepoolt. Für jede Lasereinstellung wurden jeweils 2 Probengruppen mit je 30 Zähnen angefertigt. Kam es beim Excavieren zur akzidentiellen Eröffnung der Pulpa, so wurde das jeweilige Probenmaterial verworfen.

Tabelle 3: Übersicht der Versuchsgruppen der Hauptuntersuchung

Schwellenwert 5		Schwellenwert 10	
Gruppe 5/1	Gruppe 5/2	Gruppe 10/1	Gruppe 10/2
30	30	30	30
kariöse Zähne	kariöse Zähne	kariöse Zähne	kariöse Zähne

2.7 Vorbereitung der Proben für die Analyse

2.7.1 Vorbereitung der Dialyseschläuche

Das Verfahren dient dazu, die durch die Herstellung bedingten, eventuell noch vorhandenen Schwermetallsalze wie z.B. Quecksilber zu entfernen, da diese sonst im weiteren Analyseverfahren zu unvorhersehbaren Problemen führen würden.

Hierfür wurden die Dialyseschläuche (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) wie folgt verarbeitet:

1. Anfertigen von ca. 50 cm langen Stücken, welche von einer Rolle abgeschnitten wurden.

2. Ansetzen einer Lösung bestehend aus 1 Liter bidestilliertem Wasser mit 0,01 M Tris und 0,001 M EDTA.
3. Die Dialyseschläuche wurden in die Lösung gegeben und alles zusammen gekocht. Die Temperatur wurde für 1,5 Stunden aufrechterhalten.
4. Nach Abkühlung der Flüssigkeit erfolgte die Umsetzung der Dialyseschläuche in 0,5% Essigsäure (HAc).
5. Die so vorbereiteten Dialyseschläuche wurden bis zur weiteren Verwendung in 0,5% Essigsäure bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.7.2 Vorbereitung der Demineralisation

Für die Demineralisation des Probematerials wurde zunächst eine 0,5 M EDTA Lösung angesetzt. Hierbei wurde wie folgt vorgegangen:

1. 750 ml bidestilliertes Wasser wurde in ein entsprechendes Reagenzglas gegeben.
2. Dem Wasser wurden 186,15 g EDTA zugesetzt.
3. Durch Zugabe von NaOH wurde das EDTA in Lösung gebracht und gleichzeitig ein pH-Wert von 7,6 eingestellt.
4. Unter Kontrolle des pH-Wertes wurde das Volumen schließlich auf 1 Liter aufgefüllt.

2.7.3 Durchführung der Demineralisation

1. Die vorbereiteten Dialyseschläuche (MW 12 - 14000 Dalton) wurden jeweils an einem Ende verknotet.
2. Das Probenmaterial, welches in pulverförmigem Zustand vorlag, wurde mittels 5 ml der oben beschriebenen EDTA-Lösung versetzt und gelöst, so dass eine Suspension entstand. Zusätzlich wurde 100 µl Inhibitorencocktail zugefügt. Dieser bestand aus 2 mM Pefabloc, 216 µM Leupeptin, 146 nM Aprotinin, 2 mM Diisopropylfluorophosphat, 4 mM Quecksilberchlorid, 2 mM Phenylmethan-sulfonylfluorid, 2 mM Natriumacid und 0,2 % Triton X-100. Diese Suspension wurde daraufhin in den Dialyseschlauch gegeben, der schließlich verknotet und somit verschlossen wurde. Die Resuspension der Proben wurde dadurch erreicht, dass sie drei Tage auf einem Rührwerk bei Raumtemperatur durchgemischt wurde
3. Der Schlauch mit der enthaltenen Probe wurde in einen zweiten gegeben, hier wurden 6 ml der 0,5 M EDTA-Lösung zugesetzt und auch dieser verschlossen.
4. Der Dialyseschlauch wurde entsprechend gekennzeichnet und in die zuvor beschriebene EDTA-Lösung gegeben. Dieses Verfahren wurde für alle Proben analog durchgeführt.

Die nun so gewonnene EDTA-Lösung mit den darin befindlichen Proben wurde für 10 Tage unter dem Abzug bei Raumtemperatur mittels eines Magnetrührers gerührt. Einmal täglich wurden die Proben per Hand homogenisiert.

2.7.4 Neutralisation der Proben

Nach 10 Tagen wurden die Proben aus der 0,5 M EDTA-Lösung entnommen und in eine zuvor angesetzte 0,5%ige HAc-Lösung umgesetzt. Nach 2, 6 und 12 Stunden wurden die Proben jeweils noch einmal in eine neue 0,5%ige HAc-Lösung umgesetzt, um die noch vorhandene EDTA-Lösung weiter zu entfernen. Die Proben verblieben für die entsprechenden Zeiträume unter dem Abzug und wurden gerührt. In der letzten Lösung verblieben die Proben für drei Tage bei Raumtemperatur unter dem Abzug. Nach Ablauf der drei Tage wurde das demineralisierte Probenmaterial aus den Dialyseschläuchen entnommen und in Reagenzgläser gegeben. Die Schläuche wurden zweimal in 0,5% HAc-Lösung gespült und die Suspension zu den entsprechenden Proben hinzugegeben.

2.7.5 Zentrifugation der Proben

Die neutralisierten Proben wurden nun zentrifugiert. Hierfür wurden jeweils 4 ml der Suspension in einen Mikrokonzentrator gegeben (MW 100.000 Dalton, Fa. Intersep Witten) und für 25 min. bei 4500 U/min zentrifugiert (Minifug 4400 GL, Heraeus Christ GmbH, Osterode). Die durch den Filter getretene Flüssigkeit (=Ultrafiltrat) wurde in einem entsprechenden Reagenzglas gesammelt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis das gesamte Ausgangsmaterial zentrifugiert war. Ein ml bliebe als Ausgangsmaterial für die weitere Analyse erhalten. Danach wurde der Mikrofilter zweimal mit 2 ml 0,5 % HAc-Lösung gespült, zentrifugiert und die durch den Filter getretene Flüssigkeit zum Ultrafiltrat gegeben. Die so gewonnen Proben (Ausgangsmaterial, Ultrafiltrat und Pellet) wurden bei – 70°C gefroren und anschließend lyophilisiert.

2.8 Methode der Analyse

Die Kollagenquervernetzungsbestandteile (cross-links = Hydroxylsilylpyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP)) sind mittels ihrer natürlichen Fluoreszenz nachweisbar. Um sie von den Peptiden freizusetzen, muss eine Hydrolyse in 6 M

HCL durchgeführt werden. Da HP und LP fluoreszieren, können deren Konzentrationen in den Proben nach der Trennung mittels einer „Reverse-Phase-Säule“ (HPLC) und anschließender Fluoreszenzdetektion bestimmt werden. Dies wurde mit etablierten Methoden durchgeführt (Açil und Müller 1994).

2.9 Vorbehandlung des Säulenmaterials

Das Adsorptionsmaterial CF-1 (Whatman, Springfield Mill Maidstone, England) wurde wie folgt vorbereitet:

- 1.) 100 CF-1 wurden in 3 Liter 1 M Natriumacetat gelöst und mit einem Magnetrührer bei Raumtemperatur 20 Minuten gerührt.
- 2.) Die Zellulose (CF-1) setzte sich nach ca. 10 Minuten am Boden ab, und der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.
- 3.) Das Sediment wurde in einem Bücher-Trichter (G2) nahezu trocken abgenutscht.
- 4.) Anschließend wurde der Filterkuchen in 3 Liter 0,5 M NaOH gelöst und mit einem Magnetrührer 20 Minuten gerührt, abgesetzt, der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, wie oben nahezu trocken abgenutscht und abfiltriert.

Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt

- 5.) Dann wurde der Filterkuchen in 3 Liter bidestilliertem H₂O resuspendiert, 20 Minuten gerührt, abgesetzt, der Überstand abgesaugt, wie oben nahezu trocken abgenutscht und abfiltriert.
- 6.) Danach wurde die Zellulose in 3 Liter 0,5 M HCL gelöst, 5 Minuten gerührt, abgesetzt, abgesaugt und abfiltriert.

Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt.

- 7.) Als nächstes wurde der Filterkuchen in 3 Liter 0,1 M HCL und 95%igem Ethanol gewaschen, abgesetzt, abgesaugt und abfiltriert.
- 8.) Danach wurde CF-1 zweimal in 3 Liter bidestilliertem H₂O gewaschen, abgesetzt, abgesaugt und abfiltriert.
- 9.) Der Filterkuchen wurde dann über Nacht in 3 Liter 0,1 M Natriumacetat und 3 mM EDTA gelagert.
- 10.) Zum Schluss wurde das Filtermaterial dreimal in 3 Liter bidestilliertem H₂O gewaschen, abgesetzt, abgesaugt und abfiltriert.
- 11.) CF-1 wurde nahezu trocken genutscht und in 10 ml Chloroform (Konservierungsstoff) bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.10 Vorbereitung der Proben für die HPLC-Analyse

2.10.1 Hydrolysen der Proben

Die lyophilisierten Proben wurden jeweils mit 1 ml 6 M Salzsäure versetzt und in einem Ofen bei 110°C für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Hydrolysat bei 1000U/min für 5 Minuten zentrifugiert (Minifuge 4400 GL, Heraeus-Christ GmbH, Osterode). Von dem gewonnenen Hydrolysat wurden jeweils 50 µl für die Hydroxyprolinbestimmung abpipettiert, entsprechend gekennzeichnet und zunächst bis zur weiteren Verwendung bei -70°C tiefgefroren.

2.10.2 Weiteres Vorgehen

Zur Reinigung der Pyridinoline (HP und LP) im Hydrolysat von organischen Komponenten wie Aminosäuren, Kohlenhydraten und Ammoniak sowie anorganischen Bestandteilen wurde nach dem Prinzip der

Adsorptionschromatographie 10%iges CF-1 (Whatman, Springfield Mill Maidstone, England) verwendet:

1. Aus dem zentrifugierten Überstand des Hydrolysats wurde 1 ml für die Adsorptionschromatographie entnommen.
2. Die Probe wurde mit 1 ml Eisessig, 2 ml N-Butanol, 5 ml CF-1 gemischt.
3. Das Gemisch aus Hydrolysat, Eisessig, N-Butanol und CF-1 wurde dann auf die Säule gefüllt.
4. Das gewonnene Eluat wurde nochmals auf die Säule aufgetragen.
5. Die Säule wurde dann mit 2 x 5 ml Lösung Laufmittel gewaschen und das daraus entstandene Eluat verworfen.
6. Die Desorption der cross-links (Pyridinoline) erfolgte mittels 3 x 2 ml bidestilliertem H₂O, das auf die Säule aufgetragen wurde. Die sich auf der Oberfläche des Eluats abgesetzte n-Butanolschicht wurde mit einer Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt, da sich darunter die Kollagen-cross-links (Pyridinoline) befanden.
7. Nach dem Einfrieren bei – 70 °C und anschließender Lyophilisation wurden die cross-links in 500 µl 0,22 %iger Heptafluorbuttersäure (HFBA) gelöst, im Vortex-Rührer jeweils 1 Minute lang gemischt und schließlich bei 1000 U/min 5 Minuten lang wie oben zentrifugiert.
8. Die Proben wurden in 1,5 ml Analyseflaschen umgefüllt und 200 µl davon durch Hochempfindlichkeits-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) (Gynotek, Gemering) analysiert.

2.11 Analyse der Proben durch das HPLC-Verfahren

Die quantitative Bestimmung der Pyridinoline fand bei Raumtemperatur und einer Flussgeschwindigkeit von 0,7 ml/min statt. Die Fluoreszenz-Detektion (Fluoreszenz-Detektor RF 1002, Gynotek, Gemering) erfolgte bei 297 nm Extinktion und 397 nm Emission.

Der Gradient wurde aus folgenden Lösungsmitteln gebildet:

- à Laufmittel A: 0,22% HFBA in bidestilliertem Wasser und
- à Laufmittel B: 0,22% HFBA in Acetonitril/bidestilliertem Wasser (80:20)

Beide Laufmittel wurden mit einem Degaser ständig entgast. Der Gradient wurde in vier Stufen gebildet (Abb.8):

- In der Startphase waren 19 % des Laufmittels B und 81% des Laufmittels A vorhanden.
- Nach 20 Minuten war die Konzentration von Laufmittel B auf 21% gestiegen.
- Anschließend erreichte Laufmittel B innerhalb von 5 Minuten 25%
- 1 Minute später erreichte Laufmittel B zur Reinigung der Säule 100% und blieb 5 Minuten bei 100%.
- In der letzten Phase reduzierte sich Laufmittel B innerhalb von 42 Minuten auf 19%.
- Bevor die nächste Analyse stattfand, blieb das Verhältnis zwischen den Laufmitteln A und B bei 81: 19.

Mit Hilfe der oben erwähnten externen Standards wurden die unbekannt Konzentrationen der cross-links ermittelt und die Trennschärfe der Säule kontrolliert (Bätge et al. 1994).

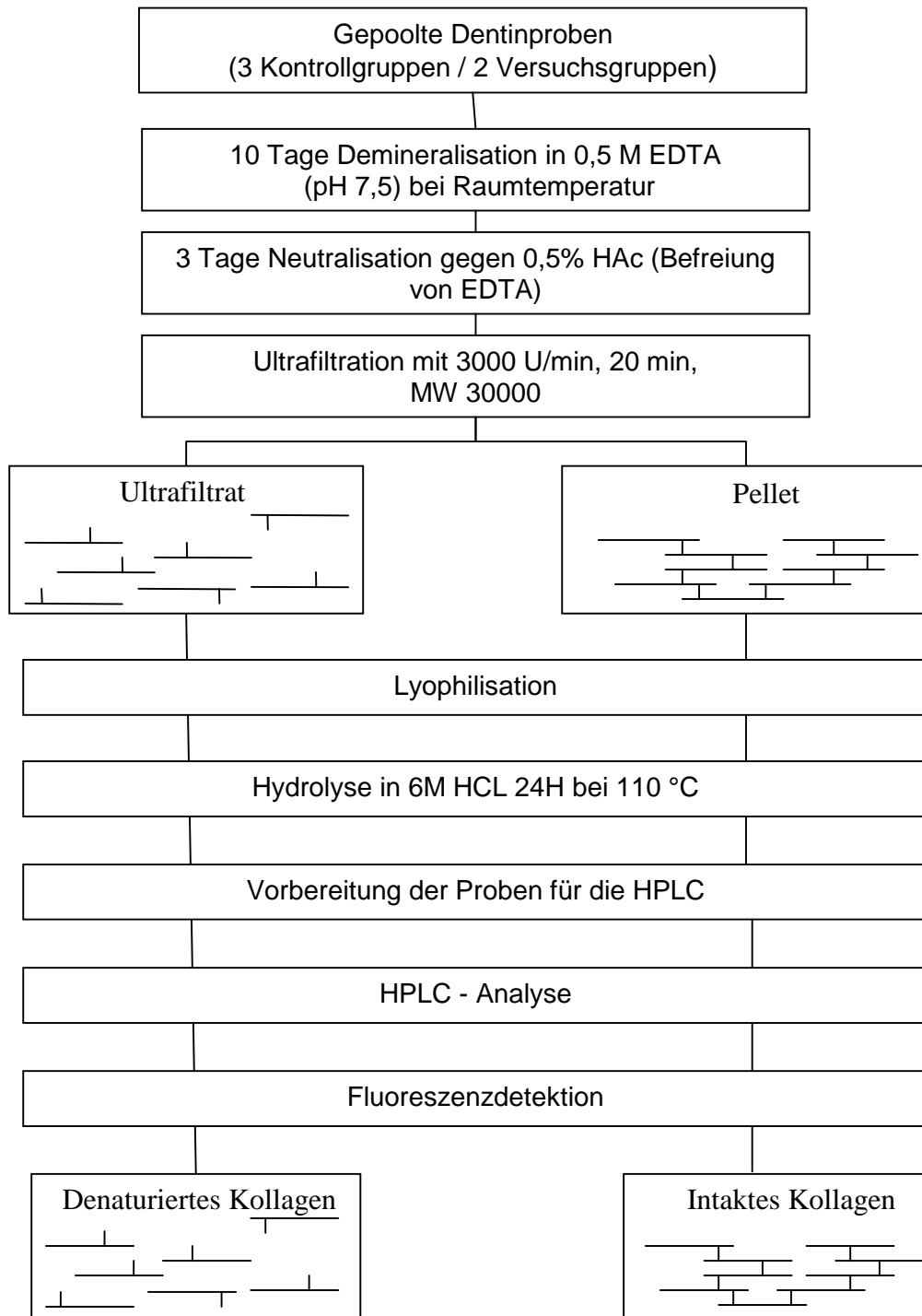


Abbildung 6: Flussdiagramm des Versuchsablaufs

3 Ergebnisse

Die in den Vor- und Hauptuntersuchungen gewonnenen Proben wurden auf ihre Konzentration von Hydroxylysylpyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP) hin untersucht. Die in den jeweiligen Ultrafiltrationsproben gefundenen Konzentrationen von HP / LP wurden zu deren Konzentrationen in den entsprechenden Gesamtproben (Ultrafiltrat und Pellet) in Beziehung gesetzt und als relativer Anteil in Prozent ausgedrückt. Die Prozentangabe repräsentiert dementsprechend die gefundene Menge an denaturiertem Kollagen in der jeweiligen Probe.

3.1 Ergebnisse aus den Voruntersuchungen

3.1.1 Kontrollgruppe gesundes Dentin

Tabelle 4 zeigt die detaillierten Werte von HP und LP im Ultrafiltrat und Pellet sowie die relativen Anteile der Konzentration von HP und LP aus dem Ultrafiltrat in Bezug zur Gesamtprobe (Ultrafiltrat + Pellet) in Prozent.

Tabelle 4: Daten gesundes Dentin

	Unbehandeltes gesundes Dentin	
	HP	LP
Ultrafiltrat (pmol/ml)	123	82
Pellet (pmol/ml)	37545	11925
%	0,33	0,68

3.1.2 Kontrollgruppe gesundes gelasertes Dentin

Tabelle 5 zeigt die detaillierten Werte von HP und LP im Ultrafiltrat und Pellet sowie die relativen Anteile der Konzentration von HP und LP aus dem Ultrafiltrat in Bezug zur Gesamtprobe (Ultrafiltrat + Pellet) in Prozent.

Tabelle 5: Daten gesundes gelasertes Dentin

	gesundes gelasertes Dentin	
	HP	LP
Ultrafiltrat (pmol/ml)	274	121
Pellet (pmol/ml)	38317	13296
%	0,71	0,91

3.1.3 Kontrollgruppe kariöse Dentinprobe

Tabelle 6 zeigt die detaillierten Werte von HP und LP im Ultrafiltrat und Pellet sowie die relativen Anteile der Konzentration von HP und LP aus dem Ultrafiltrat in Bezug zur Gesamtprobe (Ultrafiltrat + Pellet) in Prozent.

Tabelle 6: Daten kariöses Dentin

	kariöses Dentin	
	HP	LP
Ultrafiltrat (pmol/ml)	39047	4657
Pellet (pmol/ml)	584	119
%	98,5	97,5

3.2 Ergebnisse aus den Hauptuntersuchungen

3.2.1 Feedbackeinstellung 5 / 1

Tabelle 7 zeigt die detaillierten Werte von HP und LP im Ultrafiltrat und Pellet sowie die relativen Anteile der Konzentration von HP und LP aus dem Ultrafiltrat in Bezug zur Gesamtprobe (Ultrafiltrat + Pellet) in Prozent.

Tabelle 7: Daten Feedbackeinstellung 5 / 1

	Feedbackeinstellung 5 - Gruppe 1	
	HP	LP
Ultrafiltrat (pmol/ml)	257	141
Pellet(pmol/ml)	34571	9591
%	0,74	1,45

3.2.2 Feedbackeinstellung 5 / 2

Tabelle 8 zeigt die detaillierten Werte von HP und LP im Ultrafiltrat und Pellet sowie die relativen Anteile der Konzentration von HP und LP aus dem Ultrafiltrat in Bezug zur Gesamtprobe (Ultrafiltrat + Pellet) in Prozent.

Tabelle 8: Daten Feedbackeinstellung 5 / 2

	Feedbackeinstellung 5 - Gruppe 2	
	HP	LP
Ultrafiltrat (pmol/ml)	340	135
Pellet(pmol/ml)	36343	12676
%	0,93	1,07

3.2.3 Zusammenfassung FeedbackEinstellung 5

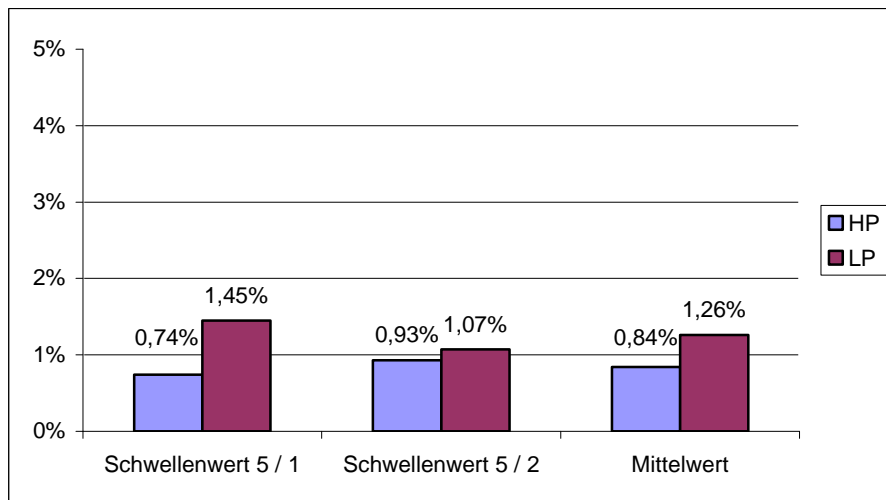


Abbildung 7: Graphische Darstellung der relativen Anteile der HP und LP Konzentration (%) nach Kariesentfernung mit FeedbackEinstellung 5 und Mittelwert

3.2.4 FeedbackEinstellung 10 / 1

Tabelle 9 zeigt die detaillierten Werte von HP und LP im Ultrafiltrat und Pellet sowie die relativen Anteile der Konzentration von HP und LP aus dem Ultrafiltrat in Bezug zur Gesamtprobe (Ultrafiltrat + Pellet) in Prozent.

Tabelle 9: Daten FeedbackEinstellung 10 / 1

	FeedbackEinstellung 10 - Gruppe 1	
	HP	LP
Ultrafiltrat (pmol/ml)	586	88
Pellet (pmol/ml)	34294	3131
%	1,68	2,73

3.2.5 FeedbackEinstellung 10 / 2

Tabelle 10 zeigt die detaillierten Werte von HP und LP im Ultrafiltrat und Pellet sowie die relativen Anteile der Konzentration von HP und LP aus dem Ultrafiltrat in Bezug zur Gesamtprobe (Ultrafiltrat + Pellet) in Prozent.

Tabelle 10: Daten FeedbackEinstellung 10 / 2

	FeedbackEinstellung 10 - Gruppe 2	
	HP	LP
Ultrafiltrat (pmol/ml)	410	277
Pellet (pmol/ml)	28275	12116
%	1,45	2,24

3.2.6 Zusammenfassung FeedbackEinstellung 10

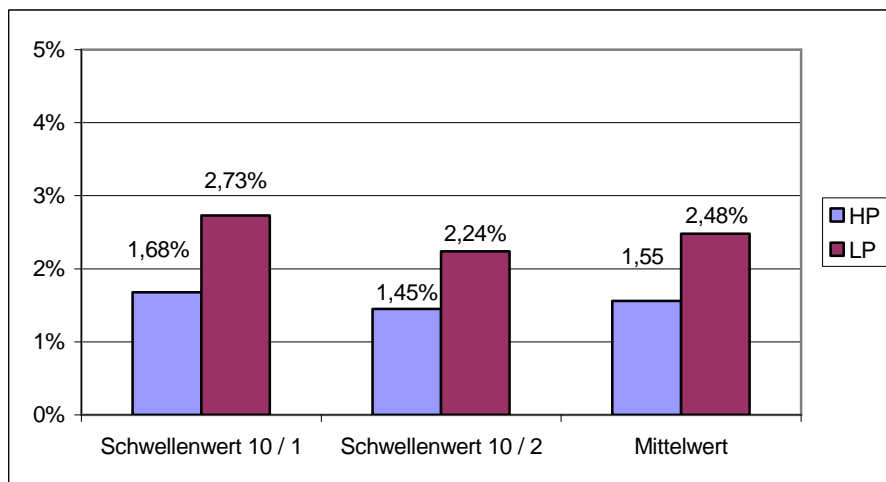


Abbildung 8 : Graphische Darstellung der relativen Anteile der HP und LP Konzentration (%) nach Kariesentfernung mit FeedbackEinstellung 10 und Mittelwert

4 Diskussion

Ziel dieser Studie war es, die Möglichkeiten eines fluoreszenzgesteuerten Er:YAG Lasers auf die Möglichkeit hin zu untersuchen, Karies selektiv zu entfernen und damit eine Über- bzw. Unterexcavation zu verhindern.

Während der Excavation ist die visuelle Differenzierung zwischen gesunden und noch veränderten Dentinbereichen oft äußerst problematisch. Die Beurteilung einer excavierten Läsion anhand visueller und taktiler Maßnahmen unterliegt subjektiven Kriterien und ist mit dem Nachteil behaftet, dass entweder gesunde Zahnschubstanz geopfert oder dass möglicherweise Restkaries belassen wird (Anderson und Chabeneau 1985; Banerjee et al. 2000; Anderson et al. 1985; Kielbassa et al. 1994). Die Entfernung kariöser Zahnhartsubstanz setzt jedoch ihre sichere Erkennung und die Möglichkeit ihrer Abgrenzung vom gesunden Material voraus. Die übliche Diagnose erfolgt mit der zahnärztlichen Sonde („cri dentaire“) unter Berücksichtigung von Farbe und Härte des Dentins. Schon Teraschima et. al (1969) stellten fest, dass die Beurteilung des Kavitätenbodens mit der zahnärztlichen Sonde oder die Kontrolle der Dentinhärte mit dem Handexcavator bzw. dem laufenden Rosenbohrer, erheblichen Schwankungen unterliegen. Die zur Zeit klinisch gebräuchlichen Diagnosemethoden, um den Endpunkt der Kariesentfernung festzulegen, sind alle subjektiven Einflüssen unterworfen, was meistens zu einer Über- oder Unterexcavation führt, da die Konsistenz des Dentins nicht mit der Eindringtiefe der Bakterien und der Kollagendenaturierung, sondern mit der Demineralisierung des Dentins einhergeht (Fusayama et al. 1966; Banerjee et al. 2000).

In der vorliegenden in vitro Studie konnte gezeigt werden, dass ein fluoreszenzgesteuerter Er:YAG Laser geeignet ist, selektiv kariöses Dentin zu entfernen, bis die Zusammensetzung des verbliebenen Dentins derjenigen von gesundem Dentin entspricht.

Überprüft wurde dies durch biochemische Analyse des Kavitätenbodens nach der Kariesentfernung, da ein Parameter, der das verbliebene Dentin nach der Kariesentfernung beschreiben kann, die chemische Zusammensetzung des Dentins,

insbesondere der Zustand des Kollagens, ist. Die Zone der Penetration ist durch denaturiertes Dentin charakterisiert. Der Anteil des denaturierten Dentinkollagens kann durch eine biochemische Untersuchung berechnet werden. Dazu wurde mittels Ultrafiltration (MW 30.000 Dalton) intaktes von denaturiertem Dentinkollagen getrennt und dessen Konzentration durch Bestimmung der Kollagenquervernetzungs-komponenten HP und LP ermittelt (Jepsen et al. 1999), da in humanem Dentin die Menge von HP und LP eng mit dem Kollagengehalt korreliert (Rivera und Yamauchi 1993).

Der Anteil denaturierten Kollagens am Kavitätenboden lag nach dem Einsatz des Er:YAG Lasers bei einem Schwellenwert von 5 für das Feedbacksystem bei 0,84 % (HP) und 1,26 % (LP). Bei einem Schwellenwert von 10 lagen die Werte für HP und LP bei 1,56 % und 2,48 %. Die Werte bei einer SchwellenwertEinstellung von 5 entsprachen denjenigen der Kontrollgruppe mit kariesfreiem Dentin. Bei einer SchwellenwertEinstellung von 10 lagen die Werte geringfügig über denen der Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse dieser In vitro Untersuchung konnten zeigen, dass die Bestimmung der kollagenen cross-links Hydroxylysylypyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP) übereinstimmend den Denaturierungsgrad des Dentinkollagens am Kavitätenboden charakterisieren konnten.

In der Voruntersuchung wurde eine gesunde Dentinprobe mit dem Er:YAG Laser bearbeitet, um einen möglichen Einfluss der Laserbestrahlung auf die Kollagenstruktur zu untersuchen. Gleichzeitig wurden eine Probe kariösen Dentins sowie die dazu entsprechende kariesfreie Dentinprobe biochemisch untersucht. Die Analyse entsprach dem Verfahren in der Hauptuntersuchung. Die Werte des kariösen Dentins für HP und LP lagen hier bei 98,4% und 97,2 %. Die Werte für gesundes Dentin lagen für HP und LP bei 0,33 % und 0,69 %.

Die Ergebnisse aus der Voruntersuchung belegen, dass die Bearbeitung der Dentinoberfläche mit einem Er:YAG Laser selbst keinen Einfluss auf die Menge der cross-links HP und LP im Dentin hat und dass das Kollagen im kariösen Dentin nahezu vollständig denaturiert ist.

Die gesunde Dentinprobe zeigt einen geringen Anteil an denaturiertem Dentinkollagen. Die Werte für gesundes Dentin lagen bei 0,33 % (HP) und 0,69 % (LP). Die Daten in Bezug auf die Konzentration von Hydroxylysylpyridinolin und Lysylpyridinolin in gesundem Dentin stimmen mit den Erkenntnissen von Kuboki et al. (1993), Kleter et al. (1994), Jepsen et al. (1999), Ail et al. (2002) überein, die ebenfalls das HPLC-Verfahren verwendeten. Die Proben gesunden Dentins, die mit dem Er:YAG Laser bearbeitet worden sind, zeigten bei der anschließenden Analyse der Konzentration von Hydroxylysylpyridinolin und Lysylpyridinolin keine signifikant abweichenden Werte. So lagen die Werte von gelaserten Dentinproben für HP bei 0,71 % und für LP bei 0,91 %. Da geringe Mengen an denaturiertem Kollagen in allen Gruppen, inklusive der Kontrollgruppen, gefunden wurden, ist anzunehmen, dass es bei der Probengewinnung mit dem Rosenbohrer zu mechanischen Zerstörungen des Kollagens gekommen ist und damit Kollagenfragmente entstanden sind, die kleiner als 30.000 Dalton sind und damit bei der Ultrafiltration durch den Filter gelangen konnten.

In vorangegangenen Studien konnte demonstriert werden, dass kein Unterschied zwischen den Konzentrationen von HP und LP in unterschiedlichen Zähnen unterschiedlichen Alters besteht (Ail et al. 2002). Deshalb erscheint die Analyse in dieser Studie als verlässliches Mittel, denaturiertes Kollagen in Dentinproben zu messen.

Mit den gewonnenen Daten aus der Voruntersuchung konnte die Hauptuntersuchung gestartet werden. Hier sollte ermittelt werden, ob der Er:YAG Laser mit integriertem Feedbacksystem dem Anspruch gerecht wird, sämtliches irreversibel zerstörtes Kollagen (uere kariöse Schicht) selektiv zu entfernen. Die Auswertung der Daten, des nach der Excavation mit dem Laser bei einem Schwellenwert von 5 am Kavitätenboden verbliebenen Dentins ergaben eine Konzentration von 0,74 % - 0,93 % Hydroxylysylpyridinolin und 1,07 – 1,45 % Lysylpyridinolin im Ultrafiltrat. Diese sehr geringen Anteile von Hydroxylysylpyridinolin und Lysylpyridinolin deuten darauf hin, dass der Er:YAG Laser mit integriertem Feedbacksystem tatsächlich in der Lage ist sämtliche Dentinbereiche, welche zerstörtes Kollagen beinhalten, selektiv zu entfernen.

Die Auswertung der Daten des nach der Excavation mit dem Laser bei einem Schwellenwert von 10 am Kavitätenboden verbliebenen Dentins, ergaben eine Konzentration von 1,45 % - 1,68 % Hydroxylsilylpyridinolin und 2,24 – 2,73 % Lsilylpyridinolin im Ultrafiltrat. Hier liegen die Werte leicht über denen der Kontrollgruppe mit gesundem Dentin. Die Erhöhung des Feedbacklevels auf 10 hat somit eine höhere Menge an denaturiertem Kollagen im verbliebenen Dentin zur Folge und entspricht evtl. einer weniger strengen Excavation. Die klinische Relevanz des Unterschieds ist nicht bekannt und sollte Grundlage für weitere Untersuchungen sein.

Auf der Suche nach einer Lösung für das Problem der selektiven Kariesentfernung wurden bereits die unterschiedlichsten Methoden in Betracht gezogen (Lennon et al. 2006). Mehrere alternative Möglichkeiten der selektiven Kariesentfernung sind in den letzten Jahrzehnten bereits untersucht worden.

Beispielsweise wurden bei der Kariesentfernung mittels chemischer Substanzen wie dem „Karies Detector“, Erythrosin, Fuchsin etc. verbliebenes kariöses Dentin angefärbt. Sie werden meistens nach der Excavation zur Darstellung evtl. verbliebener Karies genutzt (Sato & Fusayama 1976; Kidd et al. 1993; Yip et al. 1994). Nachteil dieser Substanzen ist, dass sie nicht nur die Karies, sondern auch die Schmelz-Dentin-Grenze, circumpulpaes und demineralisiertes Dentin anfärben und es zu einer Überbehandlung der Läsion kommen kann (Kidd et. al. 1993; McComb, 2000). So scheint zum Beispiel die erhöhte Anfärbbarkeit durch Säurerot ein Merkmal des reduzierten Mineralanteils und weniger spezifisch für eine Kariesläsion zu sein [Kidd et al. 1993; Yip et al. 1994).

Bei der chemomechanischen Kariesentfernung werden die durch die Karies partiell denaturierten Kollagenfasern chloridiert. Dies führt zu einer Unterbrechung der interfibrillären Hydrogenbindungen, wodurch sich das kariöse Gewebe in Form eines Gels leicht aus der Kavität entfernen lassen soll (Yip et al. 1995a,b; Ericson et al. 1999). Die chemomechanische Kariesentfernung birgt allerdings das Risiko, Restkaries in der Kavität zu belassen (Jepsen et al. 1999). So konnte nachgewiesen werden, dass sich nach der Excavation noch Bakterien in den Dentintubuli befanden (Cederlund et al. 1999). Des weiteren ist sie wesentlich zeitaufwendiger als die

konventionelle Kariesentfernung (Tavares et al. 1988; Cederlund et al. 1999; Ericson et al. 1999).

Auf Grundlage der lichtinduzierten Fluoreszenz wurden verschiedene Messsysteme entwickelt. Bei der FACE-Methode (fluorescence aided caries excavation) wird die kariöse Zahnhartsubstanz mittels violetter Licht (370 – 420 nm) angeregt und durch einen Filter (530 nm) sichtbar gemacht. Die kariösen Areale färben sich orange-rot und können selektiv mit einem rotierenden Instrument entfernt werden (Lennon et al. 2002; Lennon 2003). Bei der QLF-Methode (quantitative lichtinduzierte Fluoreszenz) wird die Fluoreszenz durch eine Xenon-Bogenlampe (370 nm) hervorgerufen. Bisher war es jedoch nicht möglich, die lichtunterstützten Methoden in der Praxis zu etablieren (Hibst, 1999b).

Eine weitere Möglichkeit der lichtinduzierten Fluoreszenz ist die Anregung durch einen Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 655 nm. Die Wellenlänge von 655 nm (Lussi et al. 1999; Hibst 1999b) ist geeignet, Bakterien und deren Stoffwechselprodukt Porphyrin anzuregen und ein Fluoreszenzsignal zu induzieren (König et al. 1998; Iwami et al. 2003; Braun et al. 2005; Lussi et al. 2006; Lussi & Hellwig 2006; Iwami et al. 2006). Die Intensität der Fluoreszenz ist ein Zeichen für das Ausmaß der bakteriellen Infektion und somit der kariösen Destruktion (Lussi et al. 1999; Hibst 1999b). Die Laserfluoreszenz hat sich bereits als nützliches Mittel bei der Detektion von beginnenden okklusalen Kariesläsionen bewährt (Lussi et al. 1999; Lussi et al. 2001; Francescut und Lussi 2003). 1998 wurde das DIAGNOdent-Gerät zur Diagnostik okklusaler Karies in den Markt eingeführt (Kavo, Biberbach, Germany).

Die Methode, mit einem Er:YAG Laser in vitro und in vivo Karies effektiv zu entfernen, hat sich bewährt (Aoki et al. 1998; Armengol et al. 1999; Keller und Hibst 1997; Keller et al. 1998). Der Abtrag der Zahnhartsubstanz erfolgt in Form einer thermisch induzierten Mikroexplosion. Da das Wasser ein Absorptionsmaximum im Bereich von 2,94 nm besitzt, kommt es durch die Bestrahlung mit einem Laser dieser Wellenlänge zu einer schlagartigen Erwärmung und in Folge dessen zur Verdampfung des im Dentin enthaltenen Wassers. Durch diesen plötzlichen Wechsel in den „gasförmigen“ Aggregatzustand kommt es zu einer Volumenvergrößerung, die

für die Aussprengung der Zahnhartsubstanz verantwortlich ist (Aoki et al. 1998). Durch den höheren Wassergehalt im kariösen Dentin wird dieses effektiver abgetragen als gesundes Dentin (Aoki et al. 1998). Im Allgemeinen ist es akzeptiert, dass unter adäquater Wasserkühlung und einer vorsichtigen Bestrahlungstechnik mit einem Er:YAG Laser Kavitäten ohne ein Anzeichen thermischer Schädigungen des umgebenden Gewebes und der Pulpa produziert werden können (Sonntag et al. 1996; Hossain et al. 1999; Yamada et al. 2001; Nair et al. 2003).

Gestützt auf diese Entdeckungen ist die interessante Idee entstanden, einen Er:YAG Laser für die Entfernung von Zahnhartsubstanz bei der Kariesentfernung zu benutzen, der durch die Laserfluoreszenz gesteuert wird und den herkömmlichen momentanen Methoden zur selektiven Kariesentfernung überlegen ist. In einer Gemeinschaftsproduktion zwischen ILM (Institut für Lasertechnologie in der Medizin) und Kavo wurde ein Fluoreszenzdetektionssystem in einen Er:YAG Laser integriert (Hibst 2001).

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass nach der Kariesentfernung mit dem Laserfluoreszenz gesteuerten Er:YAG Laser eine durchschnittliche Menge von weniger als 1,5% an HP und LP im Ultrafiltrat vorhanden war. In Folge dessen wurden weniger als 1,5% denaturierten Kollagens in diesen Proben gefunden, was in etwa den Mengen an HP und LP in den kariesfreien Kontrollgruppen entspricht.

Deshalb ist der Schluss gerechtfertigt, dass ein fluoreszenzgesteuerter Er:YAG-Laser bei einer FeedbackEinstellung von 5 bzw. 10 zuverlässig kariös denaturiertes Dentinkollagen feststellen und entfernen kann.

Für den klinischen Gebrauch des Fluoreszenz-Feedbacksystems ist es entscheidend zu wissen, in wie weit die Fluoreszenz mit der Eindringtiefe der Bakterien und der irreversiblen Denaturierung des Dentins einhergeht. Eberhard et al. (2005) konnten in einer in vitro Studie feststellen, dass bei einer FeedbackEinstellung von 3 – 7 keine Bakterien mehr in der oberflächlichen Dentinschicht des Kavitätenbodens feststellbar waren. Bei einer FeedbackEinstellung von 10 und höher waren hingegen noch ca. 80% dieser Dentinschicht mit Bakterien besiedelt. In zwei in vivo Studien konnten Krause et al. (2008) und Dommisch et al. (2008) zeigen, dass bei einer FeedbackEinstellung von 7 auch unter klinischen Bedingungen nur noch irrelevante

Mengen an Bakterien am Kavitätenboden nachgewiesen werden konnten. In der Studie von Dommisch et al. (2008) konnte zudem kein Unterschied zwischen einem Rosenbohrer und der selektiven Kariesentfernung mit einer FeedbackEinstellung von 7 bezüglich der Kontamination mit Bakterien festgestellt werden.

Ein deutlicher Vorteil der Laserbehandlung gegenüber der Behandlung durch rotierende Instrumente stellt dessen bakterizide Wirkung dar. Sie wurde für alle gängigen Therapielaser und für alle Anwendungsgebiete der Laser nachgewiesen (Keller et al. 1989; Hibst 1996; Hibst 1999a,b; Mehl et al. 1999; Folwaczny et al. 2000; Hibst et al. 2001; Hossain et al. 2003). Der bakterizide Effekt ist bis zu 0,4 mm Tiefe bei einer Pulsenergie von 300mJ feststellbar (Hibst et al. 1996). Als weiterer Vorteil sind die geringen thermischen und mechanischen Nebenwirkungen bei der Excavation anzusehen (Hibst 1999), wodurch eine weitgehend schmerzfreie Präparation möglich ist (Cozean et al. 1998; Dostalova et al. 1998; Keller et al. 1998). Dies führt zu einem höheren Patientenkomfort (Dommisch et al. 2008; Krause et al. 2008)

Im Vergleich zwischen einer konventionellen Laserbehandlung und dem rotierenden Bohrer stellte sich aber ein wesentlich höherer Zeitaufwand (2-3 x) für die Behandlung mit dem Er:YAG-Laser als für die Behandlung mit rotierenden Instrumenten heraus (Keller und Hibst 1989; Aoki et al. 1998; Yammada et al. 2001; Krause et al. 2008).

Zusammenfassend zeigen die Resultate, dass ein Er:YAG Laser ausgestattet mit einem Laserfluoreszenz-Feedbacksystem und einer FeedbackEinstellung kleiner 10 in der Lage ist, kariöses Dentin so weit zu entfernen, bis die chemische Zusammensetzung des Dentins am Kavitätenboden derjenigen von gesundem Dentin entspricht.

5 Zusammenfassung

Der Endpunkt der konventionellen Kariesentfernung unterliegt subjektiven Einflüssen, so dass es leicht zu einer Überexkavation mit Gefährdung der vitalen Pulpa oder aber zu einer Unterbehandlung mit der Gefahr eines Kariesrezidivs kommen kann. In dieser Studie wurde die Möglichkeit einer selektiven Kariesentfernung durch Anwendung eines fluoreszenzgesteuerten Er:YAG-Lasers untersucht. Ziel dieser in vitro Studie war es, den Endpunkt der Kariesentfernung mit diesem neuartigen Lasersystem durch biochemische Analyse des Dentinkollagens zu evaluieren.

Es wurden insgesamt 180 Zähne mit Dentinkaries und 60 kariesfreie Zähne in die Untersuchung einbezogen. Bei 120 kariösen Zähnen wurde die Karies mit dem fluoreszenzkontrollierten Er:YAG Laser (2.94 μm , 250mJ, 4Hz) im Nicht-Kontakt-Modus entfernt. Dabei wurden jeweils 60 kariöse Läsionen mit der SchwellenwertEinstellung von 5 bzw. 10 behandelt und anschließend eine Dentinprobe vom Kavitätenboden entnommen. Proben aus kariösen nicht behandelten Zähnen sowie aus kariesfreien laserbestrahlten sowie unbestrahlten Zähnen dienten zur Kontrolle. Im Rahmen der biochemischen Analyse wurde mittels Ultrafiltration intaktes von denaturiertem Dentinkollagen getrennt und der jeweilige Kollagenanteil durch anschließende HPLC-Analyse der Kollagen-Quervernetzungs-komponenten Hydroxylsilylpyridinolin (HP) und Lsilylpyridinolin (LP) quantitativ bestimmt.

Im kariösen Dentin wurden HP und LP erwartungsgemäss zu annähernd 100% im Ultrafiltrat gefunden, wohingegen deren prozentualer Anteil bei Dentinproben aus kariesfreien Zähnen lediglich 0,33% (HP) bzw. 0,68% (LP) ausmachte. Im Anschluß an die Kariesentfernung mit dem fluoreszenzgesteuerten Er:YAG Laser betrugen die entsprechenden Werte für Proben aus dem residualen Dentin am Kavitätenboden bei einem Schwellenwert von 5 0,84% (HP) bzw. 1,26% (LP) und bei einem Schwellenwert von 10 1,26% (HP) bzw. 2,48% (LP).

Es konnte somit durch biochemische Analyse des Dentinkollagens am Kavitätenboden gezeigt werden, dass das residuale Dentin in seinem Denaturierungsgrad demjenigen von gesundem Dentin entsprach. Die vorliegende Untersuchung konnte somit erstmals zeigen, dass ein fluoreszenzgesteuerter Er:YAG Laser denaturiertes Kollagen in kariösem Dentin entfernen kann und somit eine selektive Kariesentfernung ermöglicht.

6 Literatur

Açil Y, Müller PK. Rapid method for the isolation of the mature collagen cross-links, hydroxylsypyrindinoline and lysylpyridinoline. J Chrom A 1994; 664: 183 - 185

Açil Y, Springer ING, Prasse JG, Hedderich J, Jepsen S. Concentration of collagen cross-links in human dentin bears no relation to the individual age. Int J Legal Med 2002; 116: 340 - 344

Alakkozai, R. Quantifizierung der 5- Aminolävulinsäure-induzierten Protoporphyrin-IX-Fluoreszenz bei der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms. Dissertation: Ludwig-Maximilian-Universität zu München, 2003

Allgemeine Chemie Online: <http://chimge.unil.ch/De/complexes/1cpx35.htm>; Stand: Juli 2005

Andersson-Engels S, Johansson J, Svanberg S, Svanberg K. Fluorescence diagnosis and photochemical treatment of diseased tissue using lasers: Part I. Anal Chem 1989; 61:1367A-1373A

Anderson MH, Chabeneau GT. Comparison of digital and optical criteria for detecting carious dentin. J Prosthet Dent 1985; 53: 643 - 646

Anderson MH, Loesche WJ, Chabeneau GT. Bacteriologic study of a basic fuchsin caries-disclosing dye. J Prosthet Dent 1985; 54: 51 - 55

Aoki A, Ishikawa I, Yamada T, Otsuki M, Watanabe H, Tagami J, Ando Y, Yamamoto H. Comparison between Er:YAG laser and conventional technique for root caries treatment in vitro. J Dent Res 1998; 77: 1404 - 1414

Armengol V, Jean A, Rohanizadeh R, Hamel H. Scanning electron microscopic analysis of diseased and healthy dental hard tissues after Er:YAG laser irradiation: in vitro study. J Endod 1999; 25: 543 - 546

Armstrong WG. A quantitative comparison of the amino-acid composition of sound dentine, carious dentine and collagenase resistant fraction of carious dentine. Arch Oral Biol 1961; 5: 115 - 124

Banerjee A, Kidd EA, Watson R. In vitro evaluation of five alternative methods of carious dentine excavation. Caries Res 2000; 34: 144 - 150

Banerjee A, Gilmour A, Kidd E, Watson T. Relationship between S. mutans and the autofluorescence of carious dentin. Am J Dent 2004; 17: 233 - 236

Bätge B, Açil Y, Schlatterer A, Seitzer U, Müller PK. Pyridinum Quervernetzungen im Knochengewebe: Vergleich mit Kollagenmodifikationen und Morphometrie. Osteologie 1994; 3: 119 - 124

Braun A, Krause F, Jepsen S. The influence of the calibration mode of a laser fluorescence device on caries detection. Caries Res 2005; 39: 144 -149

Buchalla W, Lennon AM, Brune L, Zimmermann O, Gross U, Attin T. Red and green fluorescence emitted by cultured bacteria. Caries Res 2005; 39: 302-303

Cederlund A, Lindskog S, Blomlöf J. Efficacy of carisolv-assisted caries excavation. Int J Period Res Dent 1999; 19: 464 - 469

Cozean CD, Collet D, Powell GL. Er:YAG clinical results on hard tissue: Phase II. In: Featherstone JD, Rechmann P, Fried DS, HRSG. Lasers in Dentistry IV. Bellingham: SPIE, 1998: 33 – 39

Craig RG, Gehring PE, Peyton FA. Relation of structure to microhardness of human dentin. J Dent Res 1959; 38: 624 – 630

Delmas PD. Clinical use of biochemical markers of bone remodeling. J Bone Miner Res 1992; 13: 17 – 21

Domisch H, Peus K, Kneist S, Krause F, Braun A, Hedderich J, Jepsen S, Eberhard J. Fluorescence-controlled Er:YAG laser for caries removal in permanent teeth: a randomized clinical trial. *Eur J Oral Sci* 2008; 116: 170 -176.

Dostalova T, Jelinkova H, Kucerova H, Krejsa O, Hamal K, Kubelka J, Prochazka S. Noncontact Er:YAG laser ablation: clinical evaluation. *J Clin Laser Med Surg* 1998; 16: 273 - 282

Eberhard J, Eisenbeiss AK, Braun A, Hedderich J, Jepsen S. Evaluation of selective caries removal by a laser fluorescence feedback-controlled Er:YAG laser in vitro. *Caries Res* 2005; 39: 496 - 504

Ericson DM, Zimmermann M, Raber H, Gotrick B, Bornstein R, Thorell J. Clinical evaluation of efficacy and safety of a new method for chemo-mechanical removal of caries. A multi center study. *Caries Res* 1999; 33: 171 - 177

Eyre DR. Collagen cross-linking amino acids. *Methods Enzymol* 1987; 144: 115 - 139

Eyre DR. New markers of bone resorption. *J Clin Endocrinol* 1992; 74: 470 - 480

Folwaczny M, Mehl A, Haffner C, Benz C, Hickel R. Root substance removal with Er:YAG laser radiation at different parameters using a new delivery system. *J Periodontol* 2000; 71: 147 - 155

Francescut P, Lussi A. Correlation between discoloration, Diagnodent measurements, and caries depth; an in vitro study. *Pediatr Dent* 2003; 25: 559 - 564

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

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

Fusayama T. Two layers of carious dentin, diagnosis and treatment. Oper Dent 1979; 4: 63 - 70

Fusayama T. New Concepts in operative dentistry. Quintessence Publishing CO, Chicago 1980; 14 - 59

Gutknecht N. Lasertherapie in der zahnärztlichen Praxis. Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH, 1.Aufl. 1999

Heinrich-Weltzien R, Kühnisch J, Oehme T, Weeheijm K, Stößer L. Occlusalkaries-Diagnostik - Ein Vergleich von DIAGNOdent mit konventionellen Methoden. Oralprophylaxe 2003; 25: 77 - 80.

Hellwig, E. Klimek J, Attin T. Einführung in die Zahnerhaltung. München: Urban & Fischer Verlag, 1999

Hibst R. Technik, Wirkungsweise und medizinische Anwendungen von Holmium- und Erbium-Lasern. Berlin, Laser- und Medizin-Technologie Berlin, 1996

Hibst R, Stock K, Gall R, Keller U. Controlled tooth surface heating and sterilization by the Er:YAG-laser. In: G. B. Altshuler, HRSG. Laser Applications in Medicine and Dentistry. Bellingham: SPIE, 1996: 119 - 126

Hibst R. Kariestherapie mit Lasern. ZWR 1999a; 108: 26 - 31

Hibst R. Optische Meßmethoden zur Kariesdiagnose. ZWR 1999b; 108: 50 - 55

Hibst R, Paulus R, Lussi A. Detection of occlusal caries by laser fluorescence: Basic and clinical investigations. Med Laser Appl 2001; 16: 205 - 213

Hibst R. Laser: Aktueller Stand und neue Entwicklungen. Zahnärztliche Mitteilungen 2001; 10: 54 – 65

Hossain M, Nakamura Y, Yamada Y, Kimura Y, Matsumoto N, Matsumoto K. Effects of ER, CR:YSGG laser irradiation in human enamel and dentine: ablation and morphological studies. *J Clin Laser Med Surg* 1999; 17: 155 - 159

Hossain M, Nakamura Y, Murakami Y, Yamada Y, Matsumoto K. A comparative study on compositional changes and knoop hardness measurements of the cavity floor prepared by Er:YAG laser irradiation and mechanical bur cavity. *J Clin Laser Med and Surg* 2003; 21: 29 - 33

Iwami Y, Shimuzu A, Yamamoto H, Takeshige F, Ebisu S. In vitro study of caries detection through sound dentin using a laser fluorescence device, DIAGNOdent. *Eur J Oral Sci* 2003; 112: 419 - 423

Iwami Y, Shimuzu A, Takeshige F, Ebisu S. Relationship between colors of carious dentin and laser fluorescence evaluations in caries diagnostics. *Dent Mat J* 2006; 25: 584 - 590

Jepsen S, Açil Y, Zuch B, Albers HK. Biochemische Analyse der Kollagenstruktur residualen Dentins nach chemo-mechanischer Kariesbehandlung (Carisolv). *Dtsch Zahnärztl Z* 1999; 54: 120 - 123

Johansen E, Parks HF. Electron-microscopic observations on soft carious human dentin. *J Dent Res* 1961; 40: 235 – 248

Keller U, Hibst R, Steiner R. Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances. *Laser Surg Med* 1989; 9: 338 - 334

Keller U, Hibst R, Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances: II. Light microscopic and SEM investigations. *Laser Surg Med* 1989; 9: 345 - 351

Keller U, Hibst R. Effects of Er:YAG laser in caries treatment: a clinical pilot study. *Lasers Surg Med* 1997; 20: 32 – 38

Keller U, Hibst R, Geurtsen W, Schilke R, Heidemann D, Klaiber B, Raab WH. Erbium:YAG laser application in caries therapy. Evaluation of patient perception and acceptance. *J Dent* 1998; 26: 649 - 656

Kidd EAM, Joyston-Bechal S, Beighton D. The use of a caries detector dye during cavity preparation: a microbiological assessment. *Brit Dent J* 1993; 174: 245 - 248

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

Kleter GA, Damen JJM, Buijus MJ, Ten Cate JM. The millard reaction in demineralized dentin in vitro. *J Eur Oral Sci* 1997; 105: 278 - 284

Kleter GA, Damen JJM, Buijus MJ, ten Cate JM. Modification of amino acid residues in carious dentin matrix. *J Dent Res* 1998; 77: 488 – 495

Kleter GA, Damen JJ, Everts V, Niehof J, Ten Cate JM. The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin in vitro. *J Dent Res* 1994; 73: 1523 – 1529

König K, Hibst R, Meyer H, Flemming G, Schneckenburger H. Laser-induced autofluorescence of caries regions of human teeth and caries-involved bacteria. In: Altshuler GB, Hibst R, HRSG. *Dental Applications of Lasers*. Bellingham: SPIE, 1993

König K, Schneckenburger H. Laser-induced autofluorescence for medical diagnosis. *J Fluoresc* 1994; Vol. 4: No. 1

König K, Flemming G, Hibst R. Laser induced autofluorescence spectroscopy of dental caries. *Cell Mol Biol* 1998; 44: 1293 - 1300

König K, Schneckenburger H, Hibst R. Time-gated in vivo autofluorescence imaging of dental caries. *Cell Mol Biol* 1999; 45: 233 - 239

König K, Teschke M, Sigusch B, Glockmann E, Eick S, Pfister W. Red light kills bacteria via photodynamic action. *Cell Mol Biol* 2000; 46: 1297 - 1303

Krause F, Braun A, Lotz G, Kneist S, Jepsen S, Eberhard J. Evaluation of selective caries removal in deciduous teeth by a fluorescence feedback-controlled Er:YAG laser in vivo. *Clin Oral Investig* 2008

Kurosaki N, Fusayama T. Penetration of elements from amalgam into dentin. *J Dent Res* 1973; 52: 309 - 317

Kühn-München K. Biochemische Grundlagen des Gewebezersatzes. *Archiv für Chirurgie* 1970; 327: 1073 - 1083

Kuboki U, Ohgushi K, Fusayama T. Collagen biochemistry of the two layers of carious dentin. *J Dent Res* 1977; 56: 1233 - 1237

Kuboki Y, Liu CF, Fusayama T. Mechanism of differential staining in carious dentin. *J Dent Res* 1983; 62: 713 - 714

Kuboki Y, Okuguchi M, Takita H, Kimura M, Tsuzaki M, Takakura A, Tsunazawa S, Sakiyama F, Hirano H. Amino-terminal location of pyridinoline in dentin collagen. *Connect Tissue Res* 1993; 29: 99 - 110.

Lennon AM, Buchalla W, Switalski L, Stookey GK. Residual caries detection using visible fluorescence. *Caries Res* 2002; 36: 315 - 319

Lennon AM. Fluorescence-aided caries excavation (FACE) compared to conventional method. *Oper Dent* 2003; 28: 341 - 345

Lussi A, Imwinkelried S, Pitts NB, Longbottom C, Reich E. Performance and reproducibility of a laser fluorescence system for detection of occlusal caries in vitro. *Caries Res* 1999; 33: 261 - 266

Lussi A, Megert B, Longbottom C, Reich E, Francescut P. Clinical performance of a laser fluorescence device for detection of occlusal caries lesions. *Eur J Oral Sci* 2001; 109: 14 - 19

Lussi A, Reich E. The influence of toothpastes and prophylaxis pastes on fluorescence measurements for caries detection in vitro. *Eur J Oral Sci* 2005; 113: 141 – 144

Lussi A, Hellwig E. Performance of a new laser fluorescence device for the detection of occlusal caries in vitro. *J Dent* 2006; 34: 467 - 471

Lussi A, Hack A, Hug I, Heckenberger H, Megert B, Stich H. Detection of approximal caries with a new laser fluorescence device. *Caries Res* 2006; 40: 97 - 103

Mc Comb D. Caries-detector dyes - how accurate and useful are they?. *J Can Dent Ass* 2000; 66: 195 - 198

Mehl A, Folwaczny M, Haffner C, Hickel R. Bacterial effects of 2.94 microns Er:YAG-laser radiation in dental root canals. *J Endod* 1999; 25: 490 - 493

Mittermayer C. *Oralpathologie: Erkrankungen der Mundregion, Lehrbuch für Zahnmedizin, Mund- und Kieferheilkunde*. Stuttgart - New York: Schattauer, 1993

Miyauchi H, Iwaku M, Fusayama T. Physiological recalcification of carious dentin. *Bull Tokyo Med Dent Univ* 1978; 25: 169 – 179

Müller HP. *Parodontologie*. Stuttgart – New York: Georg Thieme Verlag, 2001

Nair PN, Baltensperger MM, Luder HU, Eyrich GK. Pulpal response to Er:YAG laser drilling of dentine in healthy human third molars. *Lasers Surg Med* 2003; 32: 203 - 209

Oghushi Y, Fusayama T. Electron microscopic structure of the transparent layer of human carious dentin. *J Dent Res* 1973; 62: 7 - 10

Okawa Y, Yamashita T, Ichijo O, Fusayama T. The ultrastructure and hardness of the transparent layer of human carious dentin. *J Dent Res* 1983; 62: 7 - 10

Preedy VR, Sherwood RA, Akpoguma CO. The urinary excretion of the collagen degrading markers pyridinoline and deoxypyridinoline in an experimental rat model of alcoholic bone disease. *Alcohol* 1991; 26: 191 - 198

Ramachandran GN, Reddi AH. *Biochemistry of collagen*. New York: Plenum Publ Co., 1976

Rivera EM, Yamauchi M. Site comparisons of dentine collagen cross-links from extracted human teeth. *Arch Oral Biol* 1993; 38: 541 - 546

Romanos G, Deppe H, Ertl T, Gutknecht N, Purucker P. *Atlas der chirurgischen Laserzahnheilkunde* 1. Aufl. München: Urban & Fischer, 1999

Roper J, Raux E, Brindley AA, Schubert HL, Gharbia SE, Shah HS, Warren MJ. The Enigma of Cobalamin (Vitamin B12) Biosynthesis in *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* 2000; Vol. 275, No. 51: 40316 - 40323,

Sato Y, Fusayama T. Removal of dentin by fuchsin staining. *J Dent Res* 1976; 55: 678 - 683

Schroeder HE. *Orale Strukturbiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1992: 114 - 118

Schulz SD, Roth KKF, Platzer U. Härtegrad verschiedener kariöser Schichten an Zähnen mit chronischer Dentinkaries. *Dtsch Zahnärztl Z* 1991; 46: 420 - 422

Shimuzu O, Yamashita Y, Ichijo T, Fusayama T. Carious change of dentin observed on longspan ultrathin sections. *J Dent Res* 1981; 60: 1826 - 1831

Shinichi K, Fusayama T. Recalcification of artificially decalcified dentin in vivo. *J Dent Res* 1967; 49: 1060 - 1065

Sonntag KD, Klitzman B, Burkes EJ, Hoke J, Moshonov J. Pulpal response to cavity preparation with the Er:YAG and MARK III free electron Lasers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 8: 695 - 702

Tavares M, Soparkar PM, De Paola PF. Evaluation of a chemomechanical method of caries removal in root surface lesions. *Quintessence Int* 1988; 19: 29 - 32

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

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

Yamada Y, Hossain M, Nakamura Y, Suzuki N, Matsumoto K. Comparison between the removal effect of mechanical, Nd:YAG, and Er:YAG laser systems in carious dentine. *J Clin Laser Med Surg* 2001; 19: 239 - 243

Yip HK, Stevenson AG, Beeley JA. The specificity of caries detector dyes in cavity preparation. *Brit Dent J* 1994; 176: 417 - 421

Yip HK, Stevenson AG, Beeley JA. An improved reagent for chemomechanical caries removal in permanent and deciduous teeth: an in vitro study. *J Dent* 1995a; 23: 197 - 204

Yip HK, Beeley JA, Stevenson AG. Mineral content of the dentine remaining after chemomechanical caries removal. *Caries Res* 1995b; 29: 111 - 117

7 Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. S. Jepsen, der mir bereitwillig die Bearbeitung des Themas überlassen hat. Er hat die Entstehung dieser Arbeit intensiv und stets hilfsbereit begleitet.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. J. Eberhard für den Rat und die konstruktive Kritik bei der Durchführung der Versuche.

Herrn Prof. Dr. Y. Açil danke ich dafür, dass er es mir ermöglichte, diese Untersuchungen in den wissenschaftlichen Laboratorien der Klinik für Zahn-, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Christian-Albrechts Universität zu Kiel durchzuführen.

Mein größtes Dankeschön geht an meine Frau Stephanie, die in den letzten Jahren viel Geduld bewies und mich immer wieder ermutigte weiterzumachen.