

**Biochemische Analyse der Kollagenstruktur residualen Dentins
nach chemo-mechanischer Kariestherapie**

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

Michael Burkart Zuch
aus Bremen

2014

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Søren Jepsen, MS

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Werner Götz

Tag der Mündlichen Prüfung: 22.10.2014

Aus der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde
des Universitätsklinikums der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Søren Jepsen, MS

Widmungen

Gewidmet meiner lieben Mutter, Ursula Zuch, geborene Waldmann, Fremdsprachenkorrespondentin, der ich, durch ihre hohe Allgemeinbildung und Empathie ein gutes Fundament meiner Bildung und emotionalen Struktur verdanke.

Ferner gewidmet meinem geliebten Vater, Erhard Wolfgang Wilfried Zuch, Architekt und Innenarchitekt, der mir immer der beste Ratgeber war, an mich geglaubt hat und durch seine Vorbildfunktion in Ehrenhaftig- und Zielstrebigkeit, Disziplin und Liebe zu seinem Beruf an meinem Erfolg maßgeblichen Anteil hatte, den Abschluss meiner Dissertation jedoch leider nicht mehr miterleben durfte.

Zudem widme ich diese Arbeit meiner Frau Mandana Zuch, geborene Pishehvar, Diplom Ingenieur Architektin und Innendesignerin, und meinen beiden Söhnen Arian Marcel Zuch und Kiano Valentin Zuch, die mir das Wertvollste sind, was ich je hatte und mich in der langen Schaffensphase dieser Arbeit unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis.....	07
1.	Einleitung.....	08
1.1	Zahnaufbau.....	08
1.1.1	Das Dentin und seine Zusammensetzung.....	08
1.2	Pathogenese der Karies.....	09
1.2.1	Kariesentstehung.....	09
1.2.2	Dentinkaries.....	10
1.2.3	Fortgeschrittene Dentinkaries.....	11
1.3	Die zwei Schichten kariösen Dentins.....	12
1.3.1	Das äußere kariöse Dentin.....	13
1.3.2	Das innere kariöse Dentin.....	13
1.4	Biochemische Analyse der zwei Schichten kariösen Dentins.....	14
1.5	Proteine in humanem Dentin.....	15
1.5.1	Struktur und Aufbau von Proteinen.....	15
1.5.2	Struktur und Aufbau von Kollagen.....	15
1.6	Die Kollagenquervernetzungs-komponenten (Cross-links) des ausgereiften Kollagens als Marker des Kollagenstoffwechsels.....	17
1.6.1	Kollagenbildung und -abbau.....	17
1.6.2	Pyridinoline.....	18
1.7	Hydroxylslylpyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP).....	21
1.8	Hydroxyprolin.....	21
1.9	Herkömmliche Standardverfahren zur Kariesentfernung.....	21
1.10	Chemo-mechanische Verfahren der Kariesentfernung.....	22
1.10.1	N-Monochlorglycinsäure (NMG).....	22
1.10.2	Caridex TM (GK101).....	23
1.10.3	Carisolv TM	24
1.11	Fragestellung.....	25
2.	Material und Methoden.....	26
2.1	Untersuchungsvorbereitungen.....	26
2.2	Carisolv TM	26
2.2.1	Klinisches Vorgehen.....	26
2.3	Sammlung der Untersuchungsproben.....	28
2.4	Vorbereitung der Proben für die Analyse.....	29
2.4.1	Vorbereitung der Dialyseschläuche.....	29
2.4.2	Vorbereitung der Demineralisation.....	30
2.4.3	Durchführung der Demineralisation.....	30
2.4.4	Neutralisation der Proben.....	31
2.4.5	Zentrifugation der Proben.....	31
2.5	Methode der Analyse.....	32
2.6	Vorbehandlung des Säulenmaterials.....	33
2.7	Vorbereitung der Proben für die HPLC-Analyse.....	34
2.7.1	Hydrolyse der Proben.....	34
2.7.2	Weiteres Vorgehen.....	34
2.8	Analyse der Proben durch das HPLC-Verfahren.....	35
2.9	Quantitative Bestimmung von Hydroxyprolin.....	36

3.	Ergebnisse.....	37
3.1	Chromatogramme.....	37
3.2	Ergebnisse der Milchzahnproben (primäre Dentition).....	39
3.2.1	Relative HP-, LP- und Hyp-Konzentration im Ultrafiltrat der kariesfreien Dentinprobe der primären Dentition (gesunde Dentinprobe).....	39
3.2.2	Relative HP-, LP- und Hyp-Konzentration im Ultrafiltrat der kariösen Dentinprobe der primären Dentition (nach Anwendung mit Carisolv™).....	40
3.2.3	Relative HP-, LP- und Hyp-Konzentration im Ultrafiltrat der 1. residualen Dentinprobe der primären Dentition	41
3.2.4	Relative HP-, LP- und Hyp-Konzentration im Ultrafiltrat der 2. residualen Dentinprobe der primären Dentition	42
3.3	Ergebnisse der bleibenden Zähne (permanente Dentition).....	43
3.3.1	Relative HP-, LP- und Hyp-Konzentration im Ultrafiltrat der kariesfreien Dentinprobe der permanenten Dentition (gesunde Dentinprobe).....	43
3.3.2	Relative HP-, LP- und Hyp-Konzentration im Ultrafiltrat der kariösen Dentinprobe der permanenten Dentition (nach Anwendung von Carisolv™)	44
3.3.3	Relative HP-, LP- und Hyp-Konzentration im Ultrafiltrat der 1. residualen Dentinprobe der permanenten Dentition	45
3.3.4	Relative HP-, LP- und Hyp-Konzentration im Ultrafiltrat der 2. residualen Dentinprobe der permanenten Dentition.....	46
3.4	Vergleich aller Proben.....	47
4.	Diskussion.....	48
5.	Zusammenfassung.....	59
6.	Literaturverzeichnis.....	60
7.	Danksagung.....	70

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
C	Celsius
CaOH	Kalziumhydroxid
CMC	Caboxymethylcellulose
C-term	Carboxy-terminal, Endung mit einer Carboxygruppe
DPD	Desoxypyridinolin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Komplexbildner)
g	Gramm
GK 101	N-Monochlorglycinsäure
GK 101 E	ethylierte Form des GK 101
Gly	Glycin
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
HFBA	Heptafluorbuttersäure
HP	Hydroxylslypyridinolin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochempfindlichkeits Flüssigkeitschromatographie)
Hyp	Hydroxyprolin
H ₂ O	Wasser
KDa	Kilo-Dalton
LP	Lysylpyridinolin
M	Molar
MG	Molekulargewicht
mg	Milli-Gramm
min.	Minute
ml	Milli-Liter
mM	Milli-Mol
MW	Molecular Weight (Molekülmasse)
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalzlösung)
NaOCl	Natriumhypochlorit
nm	Nanometer
NMG	N-Monochlorglycinsäure
N-terminal	Aminoende eines Moleküls
pH	Wert für den Säuregrad (Maß für die Protonenaktivität in wässriger Lösung)
PICP	Procollagen Typ I C-terminales Polypeptid
PINP	Procollagen Typ I N-terminales Polypeptid
Pm	Picometer
PYD	Pyridinolin
sek.	Sekunde
Tab.	Tabelle
TM	Trade Mark
UF	Ultrafiltrat
U/min.	Umdrehungen pro Minute

1. Einleitung

Seit 1998 steht eine neu entwickelte Methode zur chemo-mechanischen Kariesentfernung zur Verfügung und das Produkt Carisolv™ wurde in mehreren europäischen Ländern zugelassen.

Sie zählt, neben der Anwendung von Lasern, der kinetischen Behandlung kariöser Läsionen mit Hilfe von Pulverstrahl- und Sonoabrasion und der Handexcavation zu den Alternativen zur konventionellen mechanischen Kariesentfernung mit rotierenden Instrumenten (Banerjee et al., 2000).

Zur rotationsfreien Exkavation stehen für das Carisolv™-System fünf Handinstrumente mit jeweils zwei in Größe und Form unterschiedlichen Arbeitsenden zur Verfügung.

Carisolv™ besteht aus zwei Phasen, die vor der Excavationsbehandlung miteinander vermischt werden müssen. Neuerdings ist es als Carisolv 2™ in Form einer Mischkanüle erhältlich, die zu einer praktikableren und zeitsparenderen Durchmischung beider Komponenten verhelfen soll. Die gelförmig-visköse erste Phase beinhaltet die drei Aminosäuren Glutaminsäure, Lysin und Leucin in einer Konzentration von 0,1 M, den roten Farbstoff Erythrosin, CMC 200 (Carboxymethylcellulose) und Kochsalzlösung (NaCl). Die zweite Phase besteht aus einer niedrigviskösen 0,5 % Natriumhypochloritlösung (NaOCl), deren aggressiver Effekt durch die Aminosäuren abgeschwächt wird (Tonami et al., 2003). Diese Kombination soll bei einer Excavation von Dentinkaries einen Abtrag gesunden Dentins verhindern.

1.1 Zahnaufbau

1.1.1 Dentin und seine Zusammensetzung

Die chemische Zusammensetzung des Dentins ähnelt der von Wurzelzement und Knochen (Schroeder 1992). Die organische Matrix des Dentins 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-Zusatz. Glycosaminoglycane und speziell Chondroitinsulfat dürften eine spezielle Rolle bei der Mineralisation des Dentins spielen (Schroeder, 1992).

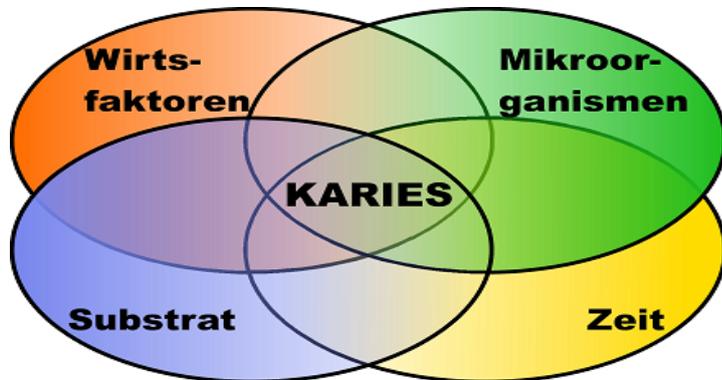
Der Mineralanteil des Dentins (Hydroxylapatitkristalle) enthält im Wesentlichen Kalzium und Phosphat im Gewichtsverhältnis von 1:2,13. Die Kristalle sind etwa 3-4 nm breit und 60-70 nm lang. Sowohl die Zusammensetzung der anorganischen Bestandteile als auch die des Kollagens variieren in den verschiedenen Dentinschichten z.B. Manteldentin, peritubuläres Dentin, zirkumpulpaes Dentin (Craig et al., 2004; Kleter et al., 1997; Schulz et al., 1991).

Die Kollagenstruktur setzt sich aus 3 Einzelsträngen zusammen, die intermolekular und intramolekular dreidimensional quervernetzt sind. In dieses dreidimensionale Netzwerk sind die anorganischen Bestandteile eingelagert (Kühn, 1970; Ramachandran und Reddi, 1976).

1.2 Pathogenese der Karies

1.2.1 Kariesentstehung

Vereinfacht formuliert entsteht Karies als Folge einer bakteriellen Stoffwechselaktivität, an deren Ende die Produktion organischer Säuren steht. Als Substrat für diese Stoffwechselaktivität spielen vor allem niedermolekulare Kohlenhydrate eine Schlüsselrolle. Wiederholt sich die Säurefreisetzung häufig genug und sind die Einwirkzeiten auf die Zahnhartsubstanzen lange genug, kommt es zur Auflösung von Hydroxylapatitkristallen ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$) und nachfolgend zum Verlust der strukturellen Integrität der Hartsubstanz. Karies entsteht demnach durch bakteriell induzierte Demineralisation gesunder Zahnhartsubstanz.



Die Pathogenese einer Karies setzt die Präsenz von 4 Faktoren voraus:

- 1) Wirtsfaktoren
- 2) Mikroorganismen (Bakterien)
- 3) Zeit
- 4) Substrat (Nutrition)

Abbildung 1: 4 Faktoren zur Entstehung von Karies (Zimmer et al., 2000)

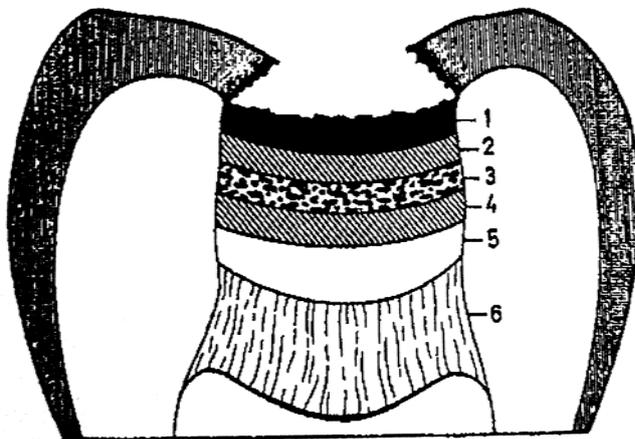
Nur bei gleichzeitigem Vorliegen aller 4 Faktoren, kann ein kariöser Defekt entstehen; bei Ausbleiben nur eines dieser Faktoren ist die Gefahr der Kariesentstehung schon nicht mehr gegeben. Unterschieden werden nach ihrer Ätiologie die Initialkaries, die neu entstehende Primärkaries, die an Zahnrestorationen entstehende Sekundärkaries und das Kariesrezidiv.

1.2.2 Dentinkaries

Im Gegensatz zu einer reinen Schmelzkaries ist die Dentinkaries ein wesentlich komplexerer Prozess. Ihre Ausbreitung erfolgt entlang der Dentintubuli und der darin enthaltenen Odontoblastenfortsätze (Mittermayer, 1993; Fejerskov und Thylstrup, 1986). Primär breitet sich Dentinkaries entlang der Schmelz-Dentin-Grenze aus. Erste morphologisch fassbare Veränderung ist dabei eine feintropfige degenerative Verfettung der Zytoplasmafortsätze. Die Vorhut der Mikroben wandert streng innerhalb der Tubuli. Durch weiteres Vordringen der Bakterien kommt es zur perlschnurartigen Auftreibung der Tubuli. Als direkte Wirkung der Bakterien folgt eine Reizung der Odontoblastenfortsätze. Diese reagieren entweder mit einer Sklerosierung der Tubuli (Zone der Transparenz, Abb. 2) oder es kommt sogar zum Absterben der Odontoblastenfortsätze („dead tract“). Die Sklerosierung der Tubuli kommt meist in Zusammenhang mit der Karies an den Kauflächen vor. Hierbei werden sie mit Kalziumsalzen gefüllt. Die stimulierten Odontoblasten beginnen an der Dentin-Pulpa-Grenze neues Dentin abzulagern. Dieses, auch sekundäres Dentin genannt, liegt hügelartig dem primären Dentin auf. Auch das sekundäre Dentin ist tubulär aufgebaut. Allerdings erfolgt die Ablagerung schichtweise, so dass gelegentlich Formationen, wie das ringförmige Wachstum von Bäumen im Schnittbild zu erkennen sind. Je nach Irregularität der Dentintubuli, die teilweise gewunden, verzweigt oder geknickt verlaufen, spricht man von irregulärem Dentin I, II oder III. Je nach Abknickungsgrad der Tubuli wird das Vordringen der Bakterien in den Kanälchen erschwert. Es entstehen so unterschiedliche Haltepausen in der Ausbreitung der Karies. Bei der histologischen Betrachtung ist das Sekundärdentin deutlich vom Primärdentin abgesetzt. Das Sekundärdentin enthält so viele Dentintubuli, wie überlebende Odontoblastenfortsätze vorhanden sind. Es ist meist bräunlich verfärbt (Kurosaki und Fusayama, 1973). Zwischen der Ablagerung von Sekundärdentin und dem Vordringen der Karies kommt es zu einem „zeitlichen Wettlauf“, der meistens von der kariösen Destruktion gewonnen wird (Mittermayer, 1993).

Die Dentinkaries besteht aus mehreren unterschiedlichen Schichten verschiedener Härtegrade (Ogawa et al., 1983; Schulz et al., 1991), von denen die Äußerste die stark aufgeweichte Nekrosezone bildet (Zone der Erweichung/Nekrose, Abb. 2). Die folgende Zone der bakteriellen Invasion ist die Penetrationszone (Abb. 2), hier sind histologisch die aktiven bakteriellen Besiedelungen erkennbar. Hierauf folgt die Zone der Entkalkung (Demineralisation, Abb. 2), sie stellt die Zone der gänzlichen Entmineralisation dar. Die Zone der Trübung („Dead Tract“, Abb. 2) ist einer Demineralisation ähnlich, da in ihr die Odontoblastenfortsätze der Pulpahöhle nicht

mehr die Dentintubuli ausfüllen, weil diese in der Zone der Transparenz (Sklerosezone, Abb.2), die eine Hypermineralisation darstellt, zunehmend verschlossen werden. In der Zone der vitalen Reaktion wird Reizdentin gebildet (Pilz et al., 1985).



- 1.) Zone der Erweichung (Nekrose)
- 2.) Zone der bakteriellen Invasion (Penetration)
- 3.) Zone der Entkalkung (Demineralisation)
- 4.) Zone der Trübung (Dead tract)
- 5.) Zone der Transparenz (Sklerose)
- 6.) Zone der vitalen Reaktion

Abbildung 2: Schematische Darstellung der 6 Schichten kariösen Dentins (in Anlehnung an Pilz et al., 1985)

1.2.3 Fortgeschrittene Dentinkaries

Die Besiedelung der Dentintubuli mit Bakterien schreitet von der Schmelz-Dentingrenze ausgehend zentripetal weiter fort. Die Demineralisierung führt zu starken Erweiterungen und schließlich zur Fusion von benachbarten Tubuli. Die organische Substanz kann dabei noch lange Zeit erhalten bleiben. Werden diese Herde größer, so spricht man von „Verflüssigungsherden“. Diese sind parallel zur Richtung der Tubuli angeordnet und haben gewöhnlich Spindelform. Später verschwindet der flüssige Anteil, es entsteht eine Höhle (Kavität). Hier spielen vor allem proteolytische und andere fermentative Prozesse beim Abbau des Eiweißgerüsts eine Rolle (Fejerskov et al. 2008). Im aufgeweichten Dentin entstehen nun auch Risse und Spalten, die in der Regel senkrecht zu den Dentintubuli, also parallel zur Schmelzoberfläche, angeordnet sind. Sowohl primäres als auch sekundäres Dentin ist von der Auflösung betroffen, bis schließlich nur noch eine bröckelige Masse übrig bleibt. Auch das sekundäre Dentin wird schließlich von Bakterien besiedelt. Allerdings geht diese Besiedelung hier meist wesentlich langsamer voran, da die Tubuli weniger regelmäßig angeordnet sind und das Sekundärdentin oft achatartig geschichtet ist. Hier muss Schicht für Schicht von den Bakterien überwunden werden (Mittermayer, 1993). Die Progression einer Dentinkaries kann als Resultat des Wechselspiels zwischen steigender Permeabilität, bedingt durch die Öffnung der Dentintubuli (zunächst an der Schmelz-

Dentingrenze und später dann entlang lateraler Tubuli weiter in die Tiefe des Zahnes), und sinkender Permeabilität angesehen werden, die zunächst durch die Abwehrreaktion des dentinopulpären Organs, der Sklerosierung der Dentintubuli, später dann durch eine Akkumulation von natürlichen Pigmenten in die Läsion vonstatten geht. Die Herkunft und präzise Natur dieser Pigmente ist noch nicht ganz geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass sie durch Verbindungen von Carbohydrat-Zerfallsprodukten mit anderen Produkten von Proteindegredationen stammen (Miller, 1969). Ausschlaggebend für den Zerfallsprozess der Dentinmatrix ist der mit Bakterieninvasion entlang der Tubuli massiv abfallende pH-Wert durch die penetrierenden Bakteriensäuren. Dies führt, wie beim Zahnschmelz auch, zu einer Demineralisierung der mineralischen interfibrillären Kollagenmatrix, sodass dadurch der Weg für eine enzymatische Degradation von Kollagen und anderen organischen Dentinbestandteilen durch bakterielle Proteasen und andere Hydrolasen frei wird (Beeley et al., 2000). Die hierbei auftretende sogenannte Maillard-Reaktion zwischen Carbohydrat und Kollagenprotein, die für die Braunverfärbung von kariösen Läsionen verantwortlich gemacht wird, setzt die Sensitivität des Dentinkollagens gegenüber der Carboxylprotease Pepsin, die in chronischer Dentinkaries wirkt, herab (Kleter et al., 1997).

In einer elektronenmikroskopischen Studie über kariöses Dentin zeigten Johansen und Parks bereits 1961 den deutlichen Hinweis einer zentripetalen bakteriellen Invasion entlang der Dentintubuli, indem sie auf ihren Bildern massive intratubuläre Bakterienakkumulationen nachwiesen und auffällige Verteilungsunterschiede des mineralisierten Dentins aufzeigten. Die stark mineralisierten Schichten, die die Dentinkanälchen säumten, standen in deutlichem Kontrast zu der extensiv, wenn auch unregelmäßig, demineralisierten intrakanalikulären Matrix.

1.3 Die zwei Schichten kariösen Dentins

Nach ultramikroskopischen- und chemisch-strukturellen Aspekten kann kariöses Dentin in zwei Schichten unterteilt werden: dem inneren und äußeren kariösen Dentin (Ohgushi und Fusayama, 1975; Kuboki et al., 1983; Fusayama, 1979; Shimizu et al., 1981). Zur genaueren Verdeutlichung der einzelnen Schichten werden von einigen Autoren wie im Folgenden 6 Zonen der Dentinkaries beschrieben. Diese bestehen aus den 3 irreversibel zerstörten Zonen: der äußeren Zone der Erweichung, der darauffolgenden Zone der Entkalkung sowie der Zone der bakteriellen Invasion, die zur äußeren kariösen Schicht zusammengefasst sind. Dann folgt die innere kariöse Schicht, mit ihren 3 reversibel geschädigten Zonen, die aus der Zone der Trübung, der Zone der

Transparenz sowie der Zone der vitalen Reaktion (Abb.2) bestehen.

Beide Schichten sind zusätzlich noch durch eine typische Discoloration der äußeren Schicht zu differenzieren (Fusayama, 1979). An der Grenzschicht zwischen irreversibel und reversibel zerstörter Dentinkarieszone ist nach Ohgushi und Fusayama (1975) die Demineralisation der anorganischen Matrix entlang des peritubulären Dentins elektronenmikroskopisch deutlich ausgeprägter, als im intertubulären Anteil.

1.3.1 Das äußere kariöse Dentin

Die äußere, bakteriell infizierte, devitale, nicht remineralisierbare und weichere Kariesschicht ist mit 0,5 % basischer Fuchsin/Propylenglycol Lösung anfärb- und damit darstellbar. Diese kann auch von Elementen, wie Zink und Zinn, die Bestandteile von Amalgamfüllungen darstellen (Kurosaki und Fusayama, 1973) penetriert werden. Ihre Kollagenstruktur weist eine deutlich andere Morphologie auf, als die der zweiten kariösen Dentinschicht und die der im gesunden Dentin vorhandenen Kollagene auf (siehe hierzu Kapitel 1.3.2.). Hier sind viele Dentintubuli mit Bakterien besiedelt 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 zu der im gesunden Dentin. Ihre anorganische Struktur weist ebenfalls starke Unterschiede im Vergleich zum gesunden Dentin auf. So finden sich granulaähnliche Kristalle, die irregulär verteilt sind und scheinbar keinen Bezug zum Kollagen aufweisen. Sie ist irreparabel geschädigt und muss folglich restlos entfernt werden, um eine dauerhafte und sinnvolle Füllungstherapie des Zahnes durchführen zu können (Fusayama, 1980).

1.3.2 Das innere kariöse Dentin

Sie ist die tiefere, nicht infizierte, vitale, remineralisierbare, härtere und nicht anfärbbare Dentinschicht, die bei Exkavation zu schonen ist, was Habib et al. (1975) und Kurosaki et al.

(1977) bereits therapeutisch berücksichtigten. Die anorganische Struktur besitzt Apatitkristalle, welche regulär an Kollagenstrukturen gebunden sind. Wesentlicher Unterschied zum gesunden Dentin ist die geringere Dichte anorganischen Materials. Dies ist auf Bakterienprodukte zurückzuführen, die in unmittelbarer Nachbarschaft liegen, jedoch diese Schicht noch nicht

infiltriert haben (Fusayama et al., 1966).

Es ist beobachtet worden, dass in einer Dentinkaries die tiefergelegene kariöse Schicht im Gegensatz zur äußeren Schicht, eine intakte organische Matrix mit unversehrten Kollagenfasern und intakten Odontoblastenfortsätzen in den Dentintubuli enthält (Kuboki et al., 1977; Ohgushi und Fusayama, 1975). Somit weist sie eine normale organische Struktur auf, die derjenigen gesunden Dentins ähnelt. Der intakte Kollagenrahmen dieser inneren Schicht besitzt, vor allem durch die Präsenz von Odontoblastenfortsätzen in den Dentintubuli, die Möglichkeit, remineralisiert zu werden (Miyachi et al., 1978), während die Remineralisation der äußeren kariösen Schicht unmöglich ist (Kato und Fusayama, 1970).

1.4 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 Schichten kariösen Dentins gefunden. Ein Vergleich von Säulenchromatographien zeigte jedoch deutlich Unterschiede in den zwei kariösen Schichten und im gesunden Dentin in Bezug auf die Quervernetzungsbestandteile des Kollagens (siehe 1.5.) (Armstrong, 1961; Kleter et al., 1998).

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 sauren 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 folglich irreversibel zerstört.

Diese biochemischen Kenntnisse decken sich mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Johansen und Parks, 1961; Ogawa et al., 1983; Ohgushi und Fusayama, 1975). 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 (Schinichi und Fusayama, 1967; Miyachi et al., 1978).

1.5 Proteine in humanem Dentin

1.5.1 Struktur und Aufbau von Proteinen

Dentin ist zu 70 % mineralisch, 10 % beträgt der Wasseranteil und 20 % macht der organische Anteil aus. Dieser organische Teil besteht zu 18 % aus Kollagen und zu 2 % aus nicht-kollagenösen Komponenten wie Chondroitinsulfaten, anderen Proteoglykanen und Phosphorinen (Beeley et al., 2000).

1.5.2 Struktur und Aufbau von Kollagen

Kollagen ist ein sehr ungewöhnliches Protein, das sich strukturell von den anderen bekannten Proteinen abgrenzt. Es besteht zu einem Drittel aus Glycin, einer Aminosäure, die keine Seitenketten besitzt und zeigt in 95 % seiner, aus etwa 1050 Aminosäuren bestehenden Peptidketten, die regelmäßige Sequenz Gly-X-Y (Timpl, 1977). Neben dieser regelmäßigen Struktur gibt es sowohl am Amino- als auch am Carboxylende der Peptidkette kurze Segmente (9-25 Aminosäuren), die nicht in jeder dritten Position der Peptidkette Glycin aufweisen. Außerdem weist Kollagen große Mengen der Aminosäuren Prolin und 4-Hydroxyprolin auf, die dem Protein eine zusätzliche Stabilität verleihen, wobei Hydroxyprolin und das ebenso auftretende Hydroxylysin Produkte einer posttranslationalen Modifikation darstellen (Veränderungen an den Aminosäuren, die erst nach ihrer Synthese erfolgen). Diese Modifikation hat eine sehr wichtige Funktion, da sich die Schmelztemperatur der Tripelhelix im hydrolysierten Zustand von 25°C auf 37°C, also Körpertemperatur, erhöht (Timpl, 1977). Ein weiterer Unterschied zu vielen anderen globulären Proteinen besteht in der Anordnung der Seitenketten. Im Kollagen liegen die Aminosäuren X und Y in der Tripletsequenz an der Oberfläche der Tripelhelix und weisen mit ihren teilweise großen hydrophoben oder polaren Seitenketten nach außen. Bei vielen anderen liegen diese im Inneren.

Von den 4 Kollagentypen finden sich in der Dentinmatrix 90-95 % Kollagen Typ I. Das Bindegewebe der infizierten Pulpahöhle besteht zudem noch aus Kollagen Typ III, das im Dentin kaum nachzuweisen ist (Kollagen Typ II und IV sind Bestandteile von Knorpelgewebe und Basalmembranen). Nach Karjalainen et al. (1986) bilden die Kollagenfibrillen eine Zellmigrationsbarriere zum Schutz der noch intakten Gewebsanteile. Im Falle des Kollagens geschieht die Fibrillenbildung durch eine Seit-an-Seit Anordnung der Topokollageneinheiten

(Beeley et al., 2000). Kollagen stellt hierfür ein besonders interessantes Faserprotein dar, das durch seine relative Größe selbst lichtmikroskopisch als Faserbündel oder Faser sichtbar ist und je nach Gewebe in völlig verschiedenen räumlichen Anordnungen vorliegt. So besteht zum Beispiel ein überaus großer Unterschied zwischen einem sehr losen Fasernetzwerk in lockerem Bindegewebe und der sehr harten und hochfesten Anordnung in menschlichem Dentin, wo die Fibrillen ein dichtes Netzwerk bilden, welches dann mineralisiert (Beeley et al., 2000). Hierbei kann der Durchmesser der Fasern von 2 bis 200 μm variieren (Kühn, 1970). Eine Fibrille dagegen liegt dann schon an der Grenze des lichtmikroskopischen Auflösungsvermögens und die nächst kleineren Baueinheiten sind nur noch mit Hilfe eines Elektronenmikroskops sichtbar. Die Synthese von Kollagen erfolgt, wie für jedes andere Protein, in der Zelle, während der Aufbau des Fasernetzwerkes dann im Extrazellulärraum stattfindet. Dabei laufen 2 unterschiedliche Entwicklungsschritte ab:

1. die Aggregation der Kollagenmoleküle zu Fibrillen und
2. die mechanische Verfestigung der Fibrillen, die sie dann auch unlöslich macht.

Diese Fibrillen sind zwar zunächst noch in Neutralsalzlösungen oder verdünnten Säuren löslich, gehen dann aber langsam in einen unlöslichen Zustand über. Hierfür verantwortlich ist die Ausbildung von kovalenten intermolekularen Bindungen, die die Polypeptidketten innerhalb des Fibrillenverbandes miteinander quervernetzen. Diese Bindungen verleihen den Fibrillen gleichzeitig ihre mechanische Stabilität, die sie für ihre physiologische Funktion als Stütz- und Gerüstsubstanz im jeweiligen Gewebe benötigen. Vergleichende Untersuchungen haben gezeigt, dass Kollagenfibrillen aus verschiedenen Bindegeweben verschiedene Quervernetzungszustände aufweisen.

1.6 Die Kollagenquervernetzungs-komponenten (Cross-links) des ausgereiften Kollagens als Marker des Kollagenstoffwechsels

1.6.1 Kollagenbildung und-abbau

Die organische Matrix des Dentins und Knochens besteht zu 90 % aus Kollagen Typ I. 10 % stellen nicht-kollagene Matrixproteine dar, zu denen im Knochen beispielsweise Osteocalcin und Osteopontin zählen. Kollagen Typ I wird von aktivierten Osteoblasten (und Fibroblasten) überwiegend in ihrer Proliferationsphase gebildet und in den Extrazellulär-raum sezerniert. In der Reifungsphase der Osteoblasten, in der das Kollagen in die Osteoidsäume eingelagert wird, überwiegt die Expression der alkalischen Phosphatase. In der Mineralisationsphase stellt Osteocalcin das Hauptprodukt der Osteoblasten dar.

Kollagen Typ I ist ein Heterotrimer aus drei Polypeptid-Ketten (α - Ketten), zwei $\alpha 1$ - Ketten und einer $\alpha 2$ - Kette, die eine Tripel-Helix ausbilden. Am Amino- und Carboxyterminalen (N- und C-terminalen) Ende der Peptidketten befinden sich nicht-helicale Telopeptide (mit 16 bzw. 25 Aminosäuren), die für die Quervernetzung der Kollagen-Tripelhelix-Moleküle untereinander von entscheidender Bedeutung sind. Die Telopeptide stellen darüber hinaus die am meisten immunogen wirkenden Regionen des Kollagenmoleküls dar (Munksgaard und Moe, 1980). Die Kollagenbildung beginnt intrazellulär mit der Synthese eines Prokollagen-Moleküls, wobei Pro- $\alpha 1$ - und Pro- $\alpha 2$ -Ketten gleichzeitig synthetisiert werden. Das N-terminale Propeptid des Typ I Pro-Kollagen (PINP) ist notwendig für den intrazellulären Transport ins endoplasmatische Retikulum. Von dort erfolgt der Weitertransport in den Golgi-Apparat und schließlich die Exozytose des Moleküls über spezifische sekretorische Vesikel. Das C-terminale Propeptid (PICP) ist cysteinreich und bildet Disulfidbrücken zwischen jeweils drei α -Ketten aus. Die Ausbildung der Disulfidbrücken ist entscheidend für die Aggregation der α -Ketten und für die Entwicklung der Tripel-Helix.

Nach Exozytose des Prokollagen-Moleküls werden extrazellulär die beiden N- und C- terminalen Propeptide durch spezielle Proteasen abgespalten. Die Menge der Propeptide entspricht somit der Menge des neu gebildeten Kollagens. Aufgrund unterschiedlicher hydrophober und hydrophiler Sequenzregionen mit negativen und positiven Ladungsschwerpunkten lagern sich die 280 nm langen Kollagenmoleküle jeweils mit einem Versatz von 70 nm zu pentameren Mikrofibrillen zusammen. Diese Parallelaggregation wird durch die Ausbildung von Quervernetzungen (sog. „Cross-links“) nochmals deutlich stabilisiert. Die „Cross-links“ sind kovalente Bindungen, die

z.B. zwischen Lysin- und Hydroxylysin-Aminosäuren ausgebildet werden.

Zwei Bildungswege der „Cross-links“ werden unterschieden. In Haut, Cornea und Skleren entstehen sie aus Allysin (Aldehyd des Lysins). Im Knochen ist Hydroxyallysin (Aldehyd des Hydroxylysins) die prädominante Aminosäure, die an der Bildung der „Cross-links“ beteiligt ist. Die Aldehyde werden unter Wirkung des Enzyms Lysyloxidase gebildet. Jeweils eine Lysin- oder Hydroxylysin-Aminosäure befindet sich im N- und C-terminalen Telopeptid sowie zwei weitere im helikalen Bereich des Kollagens an Position 87 und 930. Aus 2 Hydroxyallysin-Molekülen und 1 Lysin- bzw. Hydroxylysin- Aminosäuren entstehen Deoxypyridinolin (oder Lysyl-Pyridinolin, DPD) bzw. Pyridinolin (oder Hydroxylysyl-Pyridinolin, PYD). Diese Moleküle sind keiner enzymatischen Spaltung mehr zugänglich. Es werden jeweils zwei Lysine der α 1-Ketten aus der Telopeptid-Region eines Kollagen-Moleküls mit einem Lysin aus der helikalen Region eines zweiten Kollagen-Moleküls miteinander zu einem Pyridinolin vernetzt.

Darüber hinaus existieren auch andere Strukturformen der „Cross-links“, z.B. Pyrrole als Produkt des Hydroxylysin Bildungswegs, die jedoch im Gegensatz zu den Pyridinolinen instabil sind. Pyrrole finden sich vor allem im Bereich der N-terminalen Telopeptide. Weitere „Cross-links“ unter Einbeziehung der Aminosäure Histidin finden sich z.B. in Typ I Kollagenen der Haut. Der im Rahmen sowohl des physiologischen Remodellings als auch bei pathologischen Prozessen stattfindende enzymatische Kollagenabbau wird durch verschiedene Proteasen gesteuert. Diese Kollagenasen sind teilweise organspezifisch und weisen unterschiedliche Merkmale bezüglich ihrer kollagenolytischen Fähigkeiten auf.

Weitere Kollagenasen, die nicht knochenspezifisch sind, sind Metalloproteinasen. Insbesondere im Bereich der Telopeptide entstehen durch diese Kollagenasen andere als durch Kathepsin K gebildete Spaltprodukte. Diese unterschiedlichen Degradationsprodukte der Telopeptide werden von verschiedenen Immunoassays speziell detektiert.

1.6.2 Pyridinoline

Die Pyridinolin- und Hydroxypyridinolin-„Cross-links“ bilden sich während des extrazellulär stattfindenden Reifungsprozesses fibrillärer Kollagene. Daher reflektiert der Nachweis dieser „Cross-links“ (im Gegensatz zu Hydroxyprolin) den Abbau des reifen, bereits in ein Gewebe inkorporierten Kollagens. Pyridinoline finden sich in Serum und Urin als freie oder peptidgebundene Formen. Der Nachweis der gebundenen Pyridinoline erfolgt nach Abspaltung der Peptide durch Hydrolyse (in vitro).

Die kovalenten intra- und intermolekularen Quervernetzungsbestandteile (Cross-links) zwischen Kollagenmolekülen in makromolekularen Fibrillen sind essentielle Bestandteile der Knochen-, Dentin- und Bindegewebsmatrix (Scott, 1980).

Hydroxylysylpyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP), auch Desoxypyridinolin (DPD) und Pyridinolin (PYD) genannt, sind die zwei nicht reduzierbaren intermolekularen Quervernetzungsbestandteile des Kollagens, die durch posttranslationale Modifikation der Hydroxylysyl- und Lysylreste während der Kollagenreifung an den sogenannten Telopeptiden in den Kollagenketten entstehen (Eyre et al., 1987).

HP ist ein Derivat aus drei Hydroxylysinresten und lässt sich in nahezu allen ausgereiften Geweben, die Kollagen der Typen I, II, III und IV enthalten, nachweisen (z.B. Sehnen, Knorpel, Zähne und Knochen). LP besteht aus zwei Hydroxylysinresten und einem Lysinrest und kommt hauptsächlich in Knochen und Dentin vor (Wu et al., 1992). Die Strukturformeln von HP und LP sind in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

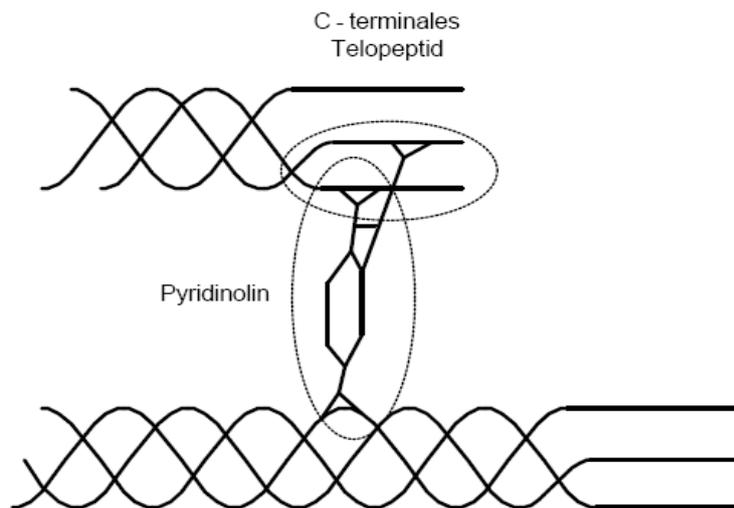


Abbildung 3: Cross-link-Verbindungen zwischen benachbarten Kollagenketten (aus Knott und Bailey, 1998)

Das Kollagen besteht aus einer durch zwei α -(I)-Ketten und einer α -(II)-Kette gebildeten Doppelhelix. Es sind mindestens vierzehn Kollagentypen beschrieben, die sich in Primärstruktur, Quervernetzung und posttranslationaler Modifikation unterscheiden. Ihr Grundaufbau, aus einer helikalen Domäne, einer Propeptiddomäne und einer Teloptiddomäne, ist jedoch identisch (Kuboki et al., 1993).

Die Knochen- und Dentinproteinmatrix besteht zu 85-90 % aus Kollagen Typ I. Die Ausbildung von Cross-links in der extrazellulären Matrix stellt dabei eine besondere Modifikation dar. Diese Quervernetzung entsteht in einem zeitabhängigen Prozess, der einige Tage bis Wochen andauert und in Abhängigkeit vom Ausmaß der Kollagenreifung durch die Wirkung des Enzyms Lysyloxidase steht. Lysyloxidase wirkt dabei auf die spezifischen Lysin-bzw. Hydroxylysinreste im Bereich der Telozeptidregion, sowie der Helix.

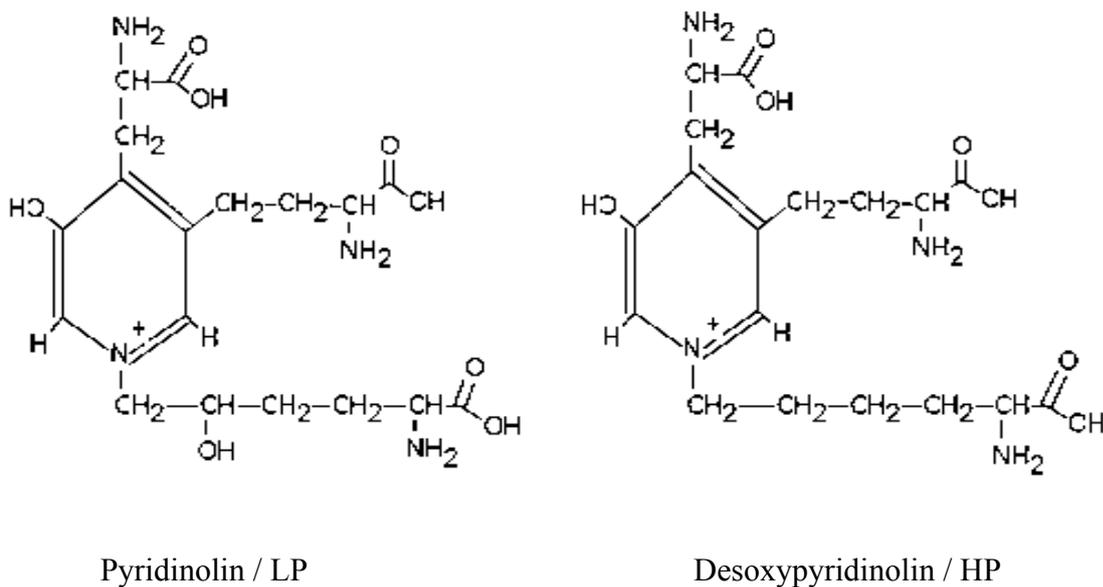


Abbildung 4: Chemische Struktur von Pyridinolin und Desoxypyridinolin (aus Knott und Bailey, 1998)

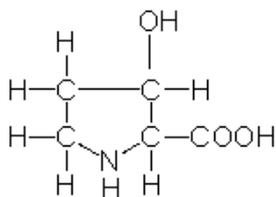
Der chromatographische Nachweis beruht allein auf der natürlichen Fluoreszenz der peptidfreien Pyridiniumkomponenten. Zunächst wird eine komplette Hydrolyse des Probenmaterials notwendig, um den Gehalt an Cross-links zu bestimmen. Dadurch wird die peptidgebundene Fraktion in freie, fluoreszierende Derivate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

1.7 Hydroxylysylpyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP)

Hydroxylysylpyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP) sind die beiden nicht reduzierbaren Quervernetzungsbestandteile zwischen den Kollagenfibrillen in makromolekularen Fasern gesunden Dentins. Diese sogenannten Cross-links oder Crossbands finden sich jedoch auch vergleichbar mit denen gesunden Dentins in der zweiten kariösen Schicht wieder (Kuboki et al., 1977). Sie sind zugleich allgemein akzeptierte Marker für die Kollagen Degradation mineralisierter Gewebe (Açil et al., 1995). In humanem Dentin ist die Menge von HP bzw. LP eng mit dem Kollagengehalt korreliert (Rivera und Yamauchi, 1993).

1.8 Hydroxyprolin

Eine weitere Methode, mit der allgemein anerkannt die Kollagen Degradation bestimmt werden kann, ist die Bestimmung von Hydroxyprolin im reifen Kollagen (Levine, 1971, 1972). Hydroxyprolin entsteht intrazellulär während der Kollagenbildung durch die posttranslationale Hydroxylierung von Prolin.



Hydroxyprolin

Abbildung 5: Chemische Struktur von Hydroxyprolin (aus Knott und Bailey, 1998)

1.9 Herkömmliche Standardverfahren der Kariesentfernung

Die Diagnose, ob erweichtes bzw. kariöses Dentin vorliegt, wird in der Praxis in der Regel nach visuell-taktilen Gesichtspunkten beurteilt (Imfeld et al., 1990). Das erweichte Dentin wird hierbei durch Kratzen mit der Sonde erkannt und bei Erweichung mit niedrigtourigen Rosenbohrern oder mit Handexkavatoren nach hochtouriger Eröffnung der teilweise vom Zahnschmelz bedeckten Läsion entfernt. Der Endpunkt dieser Behandlung ist dann erreicht, wenn

der Behandler durch das typische klirrende Kratzgeräusch (sog. „Crie dentaire“) der Sonde auf hartes und glattes Dentin gestoßen ist. Dies spricht für gesundes und kariesfreies Dentin. Hierbei kann er jedoch nicht ausschließen, dass sich noch kleinere kariöse Dentinarreale zurückgeblieben sind. Sollten diese residualen Kariesstellen auch nur punktuell sein, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sie dreidimensional größere Ausmaße annehmen.

Als zusätzliches Kriterium wird meistens die Verfärbung des Dentins mit herangezogen. So deuten stark verfärbte oder entfärbte Bereiche in der Regel auf kariöses Dentin hin.

Aus dieser Beschreibung geht hervor, dass die Entfernung von kariösem Dentin stark subjektiven Kriterien unterworfen ist (Anderson und Charbeneau, 1985). So gibt es z.B. keine standardisierten Werte für Sondengröße und Sondendruck. Auch das Klirren der Sonde verlangt vom Behandler ein gewisses Maß an Routine und Erfahrung und ist somit ebenfalls nicht objektiv. Vielmehr geht aus verschiedenen Studien hervor, dass eben eine Verfärbung des Dentin nicht zwangsläufig kariösen Ursprungs sein muss (Kurosaki und Fusayama, 1973).

So kann es z.B. zur Einlagerung von Metallionen in das Kollagengefüge kommen. Diese rufen dann eine ähnliche Verfärbung wie bei einer Karies hervor, obwohl das Dentin gesund, kariesfrei und somit erhaltungswürdig ist.

Auch eine Überexcavation ist nicht ausgeschlossen und es werden oft Dentinbereiche mit entfernt, die remineralisierbar und somit erhaltungswürdig wären.

1.10 Chemo-mechanische Verfahren der Kariesentfernung

Es wird angenommen, dass chemo-mechanische Verfahren zur Kariesentfernung helfen, denaturiertes Kollagen in der kariösen Läsion aufzulösen und intaktes Kollagen innerhalb der Läsion erhalten werden kann. Dieses Dentin hätte dann die Möglichkeit zu remineralisieren, was im Gegensatz zu der aggressiveren traditionellen Kariesentfernung stünde, bei der diese exakte Abgrenzung zwischen dauerhaft- und reversibel geschädigtem Dentin nicht möglich ist. Zu diesen chemo-mechanischen Verfahren kann man nach der Chronologie ihrer Entwicklung die N-Monochlorglycinsäure, auf dessen chemischer Grundlage später das so genannte CaridexTM erschienen ist und das in dieser Studie untersuchte CarisolvTM zählen.

1.10.1 N-Monochlorglycinsäure (NMG)

Schutzbank et al. (1975) und Kronman et al. (1977) beschrieben erstmalig eine solche chemo-mechanische Kariesentfernung, indem sie zeigten, dass die N-Monochlorglycinsäure (NMG,

GK101) kariöses Dentin anlösen kann. Die sekundäre und quaternäre Struktur des denaturierten Kollagens wird dabei durch Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen zerstört (Kremers und Kniha, 1988). Dies ermöglichte dann die minimal invasive stumpfe mechanische Entfernung des kariösen Dentins.

Schutzbank et al. (1978) zeigten, dass mit dem ethylierten Derivat von GK 101 (NMG), dem GK 101 E (NMAB, N-monochloro-DL-2-Aminobutyrat) eine Steigerung der Geschwindigkeit einer chemo-mechanischen Kariesentfernung möglich wäre, wobei sich hierbei nach Yip et al. (1995) vor allem in der Kariesbehandlung von Zähnen der primären Dentition eine erhöhte Wirksamkeit und praktischer Nutzen ergibt.

1.10.2 Caridex™ (GK101)

Ein auf dieser Entwicklung basierendes System zur chemo-mechanischen Kariesentfernung kam 1984, zugelassen unter dem Namen Caridex™, in den USA auf den Markt. Erfreulich bei dieser Methode war die hohe Patientenakzeptanz durch die signifikant schmerzfreiere Behandlung (Anusavice und Kinchelde, 1987; Kremers und Kniha, 1988; Tavares et al., 1988) und das Ausbleiben des typischen Bohrergeräusches. Dementsprechend war auch wesentlich weniger Lokalanästhesie nötig oder wurde sogar in den meisten Fällen gänzlich überflüssig (Roth und Domnick, 1989). Es wurde also die Möglichkeit eines deutlich entspannteren Patienten-Zahnarzt Verhältnisses geschaffen, das gerade in der pädiatrischen Zahnmedizin eine bedeutende Rolle spielt (Brannstrom et al., 1980).

Dieses System basierte auf einem unspezifischen proteolytischen Effekt von Natriumhypochlorit (NaOCl), dem zur Herabsetzung seiner aggressiven Wirkung auf die gesunde Dentinschicht eine Aminosäure zugegeben wurde (Habib et al., 1975).

Der Wirkungsmechanismus von GK-101E (NMAB) besteht in der Chlorierung partiell denaturierten Kollagens in kariösem Dentin und der Konversion von Hydroxyprolin in Pyrrol-2-Carboxyl-Säure. Diese initiiert eine Disruption des geschädigten Kollagens in einer Dentinkaries, welche dadurch leichter ablös- und entfernbar wurde (Kronman et al., 1977). Nach Kurosaki et al. (1977) wird eine selektive Ablösung nur der äußeren irreversibel geschädigten Dentinkariesschicht ohne nennenswerte Schädigung des darunterliegenden Gewebes einschließlich der Pulpa (Kronman et al., 1976) und ohne Veränderung des Mineralisationsgrades (Sakae et al., 1988) und mineralischen Bestandteile (Yip et al., 1995) des bleibenden Dentins erreicht. Die Effektivität bezüglich der restlosen Kariesentfernung durch Caridex™ wurde viel und kontrovers diskutiert. Während Kremers und Kniha (1988) eine, bis auf vereinzelt kleinere,

rotierend zu entfernende Verfärbungen im Randbereich der kariösen Läsionen, in allen Fällen erreichte Kariesfreiheit beschrieben, kommen Roth und Domnick (1989) bei alleiniger Anwendung von Caridex™ durch verbleibende Karies an der Schmelz-Dentingrenze und teilweise sogar größeren Resten erweichten Dentins (Scheutzel, 1989) zu keinem befriedigenden Exkavationsergebnis. Das machte diese Behandlungsform für eine routinemäßige Anwendung im Praxisbetrieb noch wesentlich verbesserungsbedürftig.

Barwart et al. (1991) konnten sogar keinerlei Behandlungserleichterung in Bezug auf die Menge der Exkavationszüge, den Anpressdruck und die benötigte Behandlungszeit von GK 101 im direkten Vergleich mit einer reinen Behandlung unter Wasserspülung feststellen.

Positiv bewertet wurde das Caridex™-System jedoch wiederum in Hinblick auf die Möglichkeiten einer anschließenden konservierenden Füllungsversorgung. Nach Studien mit Abrissversuchen von McInnes-Ledoux et al. (1986) und Wolski et al. (1989) findet sich auf dem Dentin kein Smear-layer, wie er nach konventioneller Methode mit dem Rosenbohrer entsteht, sondern eine rauhe Oberflächentextur mit zum Teil elektronenmikroskopisch sichtbaren offenen Dentintubuli. Diese ermöglichte eine bessere Haftung verschiedener untersuchter Bondingsysteme unter anderem auch durch eine bessere Benetzbarkeit, indem die Oberflächenspannung des chemomechanisch behandelten Dentins nach Emanuel und Broome (1988) fast doppelt so hoch war, wie die rotierend behandelten Dentins.

Letztlich hatte sich jedoch diese Art der Kariestherapie aufgrund seines deutlich höheren zeitlichen, finanziellen und apparativen Aufwands nicht durchsetzen können (Bader et al., 1998).

1.10.3 Carisolv™

Carisolv™ soll diesbezüglich nach Herstellerangaben eine Weiterentwicklung des Caridex™-Systems darstellen und eine höhere Effektivität aufweisen.

Zwar konnten erste In-vitro-Studien über Carisolv™ eine erhöhte Wirksamkeit im Vergleich zu einem Plazebogel zeigen (Ericson, 1998) und es liegen auch Informationen bezüglich einer hohen Sicherheit und Effektivität dieses Verfahrens vor (Ericson et al., 1999), jedoch kann die Verlässlichkeit dieses Systems in bezug auf Residualkaries (Cederlund et al., 1999) und ein mögliches Wiederauftreten (Rezidiv oder Sekundärkaries) behandelter und entfernter Karies erst nach weiteren durchgeführten objektiven Kariesuntersuchungen und Longitudinalstudien verlässlich beurteilt werden.

Der Wirkungsmechanismus von Carisolv™ basiert ebenfalls auf der Chlorierung der Kollagenmoleküle durch das Natriumhypochlorit, wobei es durch die drei enthaltenen Aminosäuren in seiner chemischen Aggressivität abgeschwächt wird (Baker, 1947). Dies soll eine selektive Ablösung des kariösen Dentins gewährleisten, während gesundes intaktes Dentin verschont bleibt (Beeley et al., 2000; Hannig, 1999). Auch durch den Gebrauch von Carisolv™ entsteht eine Oberflächentextur, die, wie beim Vorgänger Caridex™, rauer ist und somit einem Bondingsystem eine bessere Haftung ermöglicht (Wennerberg et al., 1999; Splieth et al., 1999). Bezüglich der Schmerzempfindung für den Patienten, des Behandlungskomforts und der Effektivität von Carisolv™, wurden in verschiedenen Studien mit Caridex™ vergleichbare Ergebnisse angegeben. So ist das subjektive (Ericson et al., 1999) und objektive (Braun et al., 2000) Schmerzempfinden bei Kariesexkavation mittels Carisolv™ deutlich geringer, als bei konventioneller Behandlung und der Behandlungskomfort durch eine deutlich entspanntere Behandlungssituation signifikant gesteigert. Es fand sich allerdings auch nach Carisolv™-Therapie noch deutliche Residualkaries an der Schmelz-Dentingrenze (Cederlund et al., 1999). Daher ist es in Fällen tiefer ausgebreiteter Karies unerlässlich, die eventuell noch vorhandene Deckschicht aus Zahnschmelz mit einem rotierenden Instrument mechanisch zu entfernen (Bader et al., 1998), um eine klinisch ausreichende Darstellbarkeit der Kavität zu schaffen und eben diese Karies an der Schmelz-Dentingrenze zu beseitigen.

1.11 Fragestellung

Mit der vorliegenden Untersuchung sollte die Frage geklärt werden, ob eine selektive Kariesentfernung mit Carisolv™ tatsächlich möglich ist. Im Rahmen einer In-vitro-Studie wurde die Kollagenstruktur im residualen Dentin am Kavitätenboden nach chemo-mechanischer Kariesentfernung mit Carisolv™ biochemisch analysiert und mit derjenigen nach konventioneller Kariestherapie verglichen. Es wurden Versuchsreihen sowohl an Zähnen der primären als auch der permanenten Dentition durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsvorbereitungen

In der Klinik für Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie (bis 2002 Direktor Prof. Dr. Dr. F. Härle) der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel sowie bei niedergelassenen Zahnärzten wurden kariesfreie sowie kariöse Zähne gesammelt, die extrahiert worden waren. Diese wurden sofort nach der Extraktion in 0,1%iger Natriumacidlösung bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Nachdem die Sammlung abgeschlossen war, wurden die Zähne auf ihre Tauglichkeit hin überprüft, d.h. es wurde visuell und taktil untersucht, ob eine Dentinkaries vorliegt und welches Ausmaß diese besitzt. Die nicht geeigneten Zähne wurden verworfen. Des weiteren wurden solche Zähne nicht verwendet, bei denen mit Sicherheit eine Pulpabeteiligung zu erwarten war.

2.2 Carisolv™

Die Karies wurde chemo-mechanisch mittels Carisolv™ (Medi Team AB, Sävedalen, Schweden) entsprechend den Herstellerangaben, in den dafür vorgesehenen Einwegampullen vermischt und mit speziellen Handinstrumenten entfernt. Hierbei wurde exakt auf die Einhaltung der vom Hersteller vorgeschriebenen Mischungs- und Verarbeitungszeit von 20 Minuten geachtet.

2.2.1 Klinisches Vorgehen

Das Carisolv™ Gel soll nach Herstellerinformation weder gesundes Dentin noch das Weichgewebe beeinträchtigen. Genauso wenig soll es den Zahnschmelz angreifen. Somit sollte Carisolv™ in Kombination mit dem Bohrer oder alternativen Techniken eingesetzt werden (Morrow et al., 2000; Maragakis et al., 2001; Munshi et al., 2001).

Deshalb wird in der Regel zunächst mit konventionellen rotierenden Instrumenten durch Entfernung nicht dentingestützter Schmelzareale ein Zugang zum kariösen Dentin ermöglicht (Abb. 6).



Abbildung 6: Schmelzentfernung mittels Bohrer

Anschließend wird die Karies in der Kavität mit dem Carisolv™ Gel bedeckt und es wird 20 Sekunden gewartet, bis das kariöse Dentin erweicht ist (Abb. 7).



Abbildung 7: Chemische Erweichung des kariösen Dentins

Die erweichte Karies kann nun mit Hilfe der Carisolv™ Handinstrumente ausgeschabt werden (Abb. 8).



Abbildung 8: Ausschabung der ersten kariösen Dentinschicht mit speziellen Handinstrumenten

Diese Schritte werden solange wiederholt, bis sich kein kariöses Dentin mehr entfernen lässt. Anschließend kann die Kavität mit einer Füllung verschlossen werden (Abb. 9).



Abbildung 9: Füllungsverschluss der Kavität

(alle Abbildungen in Anlehnung an Dentares-online)

2.3 Sammlung der Untersuchungsproben

Jeweils 35 Zähne der permanenten und der primären Dentition mit Dentinkaries ohne Pulpabeteiligung standen aus der Region Kiel und Oldenburg in Oldenburg mit Umland zur Verfügung. Die frisch extrahierten Zähne wurden über kurze Zeit in 0,1 % Natriumacid als Antiseptikum in physiologischer Kochsalzlösung bei 4° C aufbewahrt. Die zu untersuchenden Zähne wurden longitudinal durch den jeweiligen Kariesdefekt mittels einer diamantierten Trennscheibe unter Wasserkühlung gespalten. Um die beiden Schichten kariösen Dentins abgrenzen zu können, wurde nach der Spaltung eine der beiden Sektionsflächen mit 0,5 % Fuchsin-Propylenglycollösung benetzt und mit Natriumchlorid gespült. Hierbei wurde der Kariesdetektor mittels Schaumstoffpellets auf die kariösen Bereiche aufgetragen. Nun wurde je nach Herstellerangaben zwischen 10 - 40 Sekunden gewartet und die Kavität dann mit Wasser gründlich gespült und getrocknet.

Die eventuell noch vorhandene Schmelzschicht wurde vor Kariesexcavation mit einem roten Winkelstück und grobkörnigem Diamanten hoctourig unter Wasserkühlung entfernt. Das so freigelegte kariöse Dentin wurde daraufhin mittels Carisolv™ und den dafür vorgesehenen Handinstrumenten nach Herstellerangaben exkaviert und in einem Probebehälter gesammelt. Dieses Vorgehen wurde nun bei den restlichen kariösen Zähnen sowohl der primären, als auch der sekundären Dentition wiederholt, die Proben gesammelt, gepoolt und im Kühlschrank bei 4°C gelagert (*kariöse Dentinprobe*). Der Endpunkt der Kariesentfernung mit Carisolv™ war dann erreicht, wenn sich kein weiteres Material aus der Läsion mehr entfernen ließ. Die fehlende Eintrübung des Gels in der Kavität wurde als weiteres Kriterium herangezogen. Die Zeit für eine

derartige Kariesentfernung betrug zwischen 4 und 39 Minuten. Wurden 20 Minuten überschritten, wurde eine neue Ampulle Carisolv™ verwendet.

Anschließend wurde eine weitere dünne Schicht Dentin am Kavitätenboden niedertourig mit einem Rosenbohrer und grünem Winkelstück bei 350-450 U/min exkaviert (*1. residuale Dentinprobe*). Der Endpunkt für diese Maßnahme war dann erreicht, wenn der Behandler und zwei Untersucher unabhängig voneinander und übereinstimmend festgestellt hatten, dass der Kavitätenboden nach klinisch optischen und taktilen Gesichtspunkten sondenfest und kariesfrei (Kuhhornsonde, Hu-Friedy, Leimen) war.

Abschließend wurde eine zusätzliche Dentinprobe vom Kavitätenboden ebenfalls niedertourig mit dem Rosenbohrer entnommen (*2. residuale Dentinprobe*).

Als Kontrollgruppe wurden aus 30 kariesfreien Zähnen, jeweils der primären und der permanenten Dentition, ebenfalls Dentinproben (*gesunde Dentinprobe*) mittels Rosenbohrer und grünem Winkelstück trocken rotierend bei 350-450 U/min gewonnen.

Auf diese Weise entstanden jeweils für die primäre und die sekundäre Dentition (Milchzähne und bleibende Zähne) 3 Probegruppen und 1 Kontrollgruppe, die der weiteren Analyse zugeführt werden konnten.

2.4 Vorbereitung der Proben für die Analyse

2.4.1 Vorbereitung der Dialyseschläuche

Hierfür wurden 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 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.

Das zuvor aufgeführte Verfahren diente dazu, die durch die Herstellung bedingten, eventuell noch vorhandenen Schwermetallsalze wie z.B. Quecksilber zu entfernen. Diese hätten sonst im weiteren Analyseverfahren zu unvorhersehbaren Problemen führen können.

2.4.2 Vorbereitung der Demineralisation

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

- 1.) 1500 ml bidestilliertes Wasser wurde in ein entsprechendes Reagenzglas gegeben.
- 2.) Dem Wasser wurde 372 g EDTA als Pulver 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 2 Liter aufgefüllt.

2.4.3 Durchführung der Demineralisation

- 1.) Die vorbereiteten Dialyseschläuche (MW 30 000 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, sodass eine Suspension entstand. Diese Suspension wurde daraufhin in den Dialyseschlauch gegeben, der schließlich verknotet und somit verschlossen wurde.
- 3.) Der Schlauch mit der enthaltenen Probe wurde in einen zweiten gegeben, hier wurden 6 ml 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.

2.4.4 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 mit 0,5 % HAc-Lösung gespült und die Suspension zu den entsprechenden Proben hinzugegeben. Die zuvor bei -70° C eingefrorenen Proben wurden daraufhin lyophilisiert. Die lyophilisierten Proben wurden mit 10 ml 0,5 %iger HAc-Lösung aufgefüllt. Zusätzlich wurden 50 µl Inhibitorecocktail zugesetzt. Dieser bestand aus 2 mM Pefabloc, 216 µM Leupeptin, 146 mM Aprotinin, 2 mM Diisopropylfluorphosphat, 4 mM Quecksilberchlorid, 2 mM Phenylmethan-sulfonylfluorid, 2 mM Natriumacid und 0,2 % Triton X-100.

Die Resuspension der Proben wurde dadurch erreicht, dass sie drei Tage auf einem Rührwerk bei Raumtemperatur durchgemischt wurden.

2.4.5 Zentrifugation der Proben

Die zuvor durch Rühren homogen gelösten Proben wurden nun zentrifugiert. Hierfür wurden jeweils 2 ml der Suspension in einen Mikrofilter gegeben (MW 30 000 Dalton, Fa. Carl Roth, Karlsruhe) und für 20 Minuten bei 3000 U/min. zentrifugiert (Minifuge 4400 GL, Heraeus Christ GmbH, Osterode). Die durch den Filter getretene Flüssigkeit (entspricht dem Ultrafiltrat = UF) wurde in einem entsprechenden Reagenzglas gesammelt. Dieser Vorgang wurde 4x wiederholt, bis 8 ml Ausgangsmaterial zentrifugiert waren. 2 ml blieben als Ausgangsmaterialprobe 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 Lösung zum Ultrafiltrat gegeben. Die oberhalb des Molekularsiebes verbliebenen Bestandteile (Pellet) am Boden des Filters wurden anschließend mittels 2 x 2 ml 0,5 % HAc in Lösung gebracht und in ein zweites Reagenzglas gegeben (Abb. 11).

Die so gewonnenen Proben (Ausgangsmaterial, Ultrafiltrat und Pellet) wurden bei -70° C gefroren und anschließend lyophilisiert.

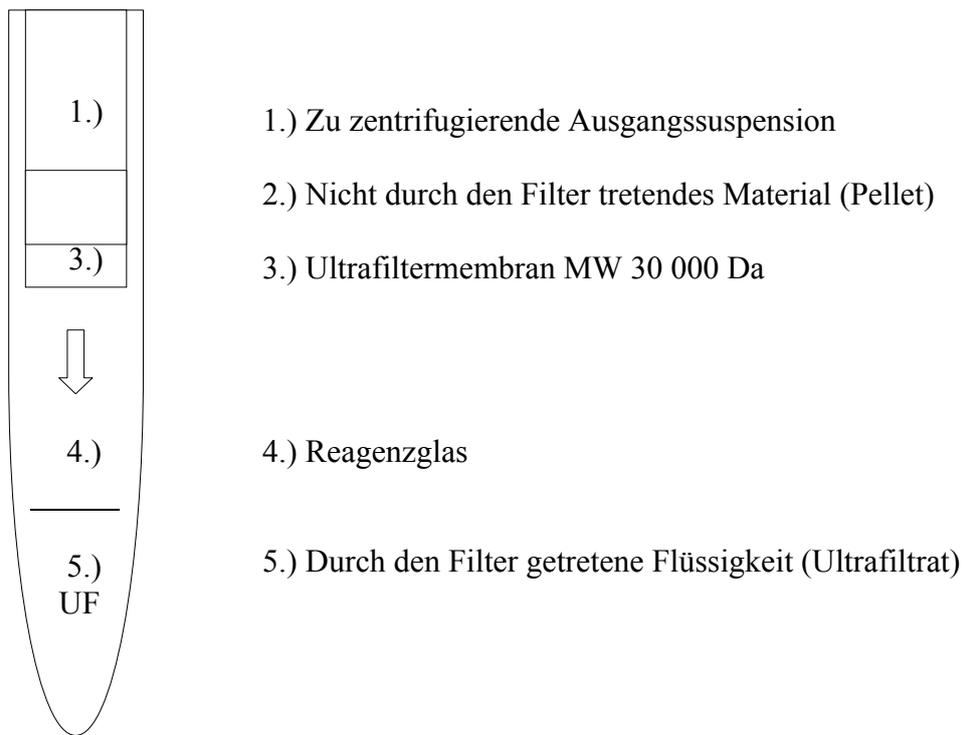


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Ultrafiltration

2.5 Methode der Analyse

Die Kollagenquervernetzungs-komponenten (Cross-links) Hydroxylylsylpyridinolin (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 - High performance liquid chromatography) und anschließender Fluoreszenzdetektion bestimmt werden.

Die Analysen wurden in den wissenschaftlichen Laboratorien der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (Prof. rer. nat. Y. Açil) mit den dort etablierten Methoden durchgeführt (Açil und Müller, 1994).

2.6 Vorbehandlung des Säulenmaterials

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

- 1.) 100 g 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 Blücher-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 H_2O 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 H_2O 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 H_2O gewaschen, abgesetzt, abgesaugt und abfiltriert.
- 11.) CF -1 wurde nahezu trocken genutscht und in 10 ml Chloroform (Konservierungsstoff) bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.7 Vorbereitung der Proben für die HPLC- Analyse

2.7.1 Hydrolyse der Proben

Die lyophilisierten Proben wurden dann schließlich mit 1 ml 6 M HCl versetzt und in einem Ofen für 24 Stunden bei 110 °C hydrolysiert.

Anschließend wurde das Hydrolysat bei 1000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert (Minifuge 4400 GL, Heraeus-Christ GmbH, Osterode).

Für die Hydroxyprolinbestimmung wurden 50 ml abpipettiert, entsprechend gekennzeichnet und zunächst bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C tiefgefroren.

2.7.2 Weiteres Vorgehen

Um aus dem Hydrolysat die Pyridinoline (HP und LP) von organischen (Aminosäuren, Ammoniak und Reste von Kohlenhydraten) und anorganischen Stoffen (Salze) zu befreien, wurde nach dem Prinzip der Adsorptionschromatographie vorbehandeltes 10 %iges CF-1 (Whatman, Springfield Mill Maidstone, England) wie folgt verwendet:

1.) Aus dem zentrifugierten Überstand des Hydrolysats wurde 1 ml für die Adsorptionschromatographie entnommen.

2.) Nun wurden gemischt: 1 ml der Probe

+ 1 ml Eisessig

+ 5 ml 10 %iges CF-1

(in n-Butanol/ Eisessig C₂H₄O₂: 1: 1 = Laufmittel)

+ 2 ml n-Butanol

3.) Das Gemisch aus Hydrolysat, Eisessig, 2 ml n-Butanol und 5 ml CF-1-Lösung wurde dann auf die Säule gefüllt.

4.) Das gewonnene Eluat wurde nochmals auf die Säule aufgetragen.

5.) Die Säule wurde dann mit 3 x 5 ml Lösung 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 Eluat abgesetzte n-

Butanolschicht wurde mit einer Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt, da sich darunter die Cross-links (Pyridinoline) befanden.

7.) Nach dem Einfrieren bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ und anschließender Lyophilisation wurden die Cross-links (Pyridinoline) in $500\text{ }\mu\text{l}$ 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 $200\text{ }\mu\text{l}$ davon durch Hochempfindlichkeits-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) (Gynkotek, Germering, Deutschland) analysiert.

2.8 Analyse der Proben durch das HPLC-Verfahren

Die Analyse der Pyridinoline erfolgte bei Raumtemperatur und mit einer Flussgeschwindigkeit von $0,7\text{ ml/min}$, die Detektion wurde mittels eines Fluoreszenz-Detektors (Fluoreszenz-Detektor RF 1002, Gynkotek, Germering) bei 297 nm Extinktion und 397 nm Emission durchgeführt.

Der Gradient wurde aus folgenden Lösungsmitteln gebildet:

- ▶ Laufmittel A: 0,22 % HFBA in bidestilliertem H_2O und
- ▶ Laufmittel B: 0,22 % HFBA in Acetonitril/ bidestilliertem H_2O (80: 20)

Beide Laufmittel wurden mit einem Degaser ständig entgast.

Der Gradient wurde in vier Stufen gebildet:

- In der Startphase waren 19 % des Laufmittels B und 81 % A vorhanden
- Nach 20 Minuten war die Konzentration von Laufmittel B auf 21 % gestiegen
- Anschließend erreichte Laufmittel B innerhalb von 5 Minuten 25 %.
- Danach erreichte Laufmittel B zur Reinigung der Säule innerhalb von 1 Minute 100 % und blieb 5 Minuten bei 100 %.
- In der letzten Phase reduzierte sich Laufmittel B innerhalb von 4 Minuten auf 19 %.
- Bevor die nächste Analyse stattfand, blieb das Verhältnis zwischen den Laufmitteln A und B 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).

2.9 Quantitative Bestimmung von Hydroxyprolin

Nach Abschluss der Hydrolyse in der Vor- und Hauptuntersuchung wurde von jeder Probe (Ausgangsmaterial, Ultrafiltrat und Pellet) jeweils 50 µl des Hydrolysats zur Bestimmung der Hydroxyprolinkonzentration entnommen. Der Test wurde wie bei Jamall et al. (1980) beschrieben durchgeführt: In einer Mikrotiterplatte (96 Wells) wurden je Platte zwei Standardverdünnungsreihen von Hydroxyprolin hergestellt: zum einen 4,6 µg/ml; 6,2 µg/ml; 9,3 µg/ml; 12,5 µg/ml; 18,7 µg/ml; 25 µg/ml; 37,5 µg/ml; 50 µg/ml; 75 µg/ml; 100 µg/ml und zum anderen 3,1 µg/ml; 5,0 µg/ml; 8,2 µg/ml; 10,3 µg/ml; 12,5 µg/ml; 20,7 µg/ml; 25 µg/ml; 41,5 µg/ml; 50 µg/ml; 83 µg/ml; 100 µg/ml; 200 µg/ml. Von den Proben wurden jeweils 3 µl entnommen, im Verhältnis 1:10 verdünnt und in die Vertiefungen gegeben. In jede Vertiefung kamen weiterhin 70 µl Propanol-Wasser (10 ml 2-Propanol + 5 ml A. dest.) und 50 µl Chloramine T (1,4 g Chloramine T + 20 ml A. dest. + 100 ml Puffer: 34,38 g Natriumacetat + 37,50 g Trinatriumcitrat + 5,5 g Citronensäure in 300 - 400 ml A. dest. gelöst (+ 400 ml 2-Propanol, auf 1000 ml A. dest. aufgefüllt). Die Platte wurde 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert, anschließend kam in jede Vertiefung 125 µl Ehrlichs Reagenz (1,2 g Dimethylaminobenzaldehyd + 1,8 g 60 % Perchlorsäure + 10 ml 2-Propanol). Anschließend wurde die Platte für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Danach wurde sie bei 550 nm im Plattenphotometer gemessen.

3. Ergebnisse

Die in den jeweiligen Ultrafiltratproben gefundenen Konzentrationen der Kollagen-Quervernetzungskomponenten Hydroxylysylpyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP) sowie von Hydroxyprolin (Hyp) wurden zu deren Konzentration in den entsprechenden Gesamtproben (Ultrafiltrat und Pellet) in Beziehung gesetzt und als relativer Anteil in Prozent ausgedrückt (Tab. 1-9).

3.1 Chromatogramme

Die Abbildungen 12 und 13 zeigen exemplarisch jeweils ein HPLC-Chromatogramm der Analyse der Kollagenquervernetzungskomponenten Hydroxylysylpyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP)/(pm/ml) im residualen Dentin am Kavitätenboden nach chemo-mechanischer Kariesentfernung permanenter Zähne in der Gesamtprobe und im Ultrafiltrat.

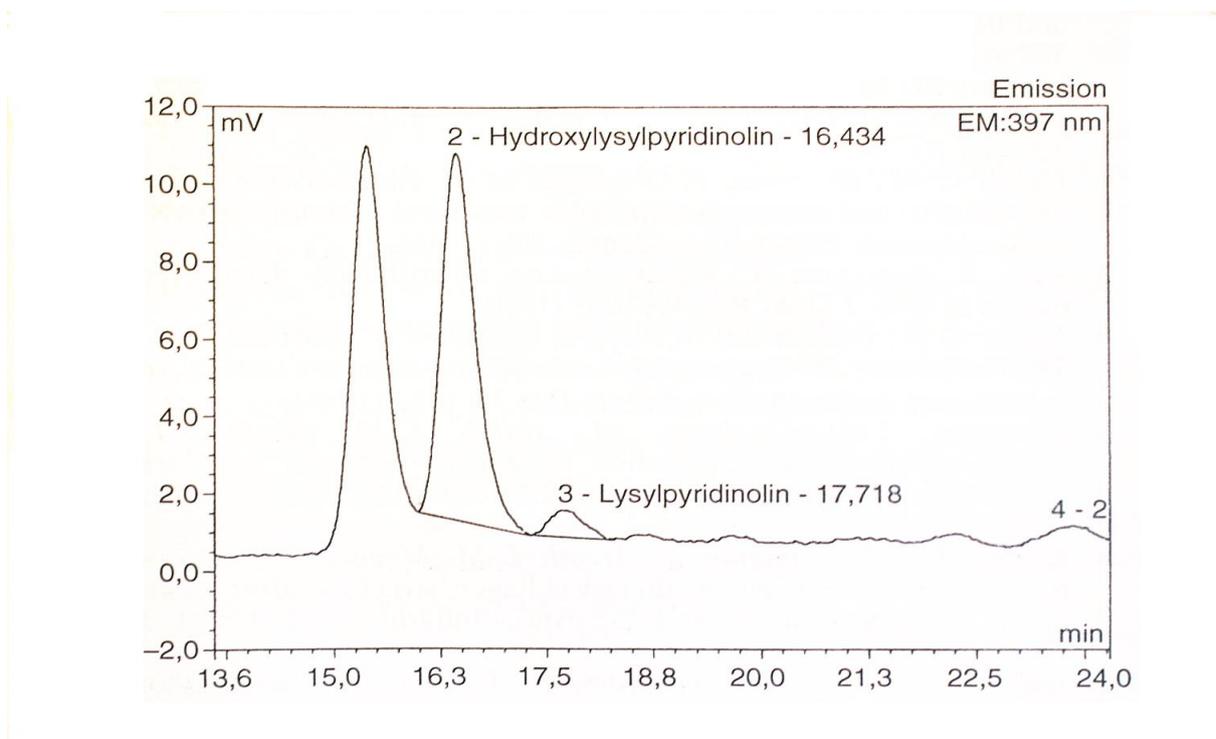


Abbildung 12: HPLC-Chromatogramm: Die Kollagenquervernetzungskomponenten HP und LP (pm/ml) im residualen Dentin am Kavitätenboden permanenter Zähne in der Gesamtprobe

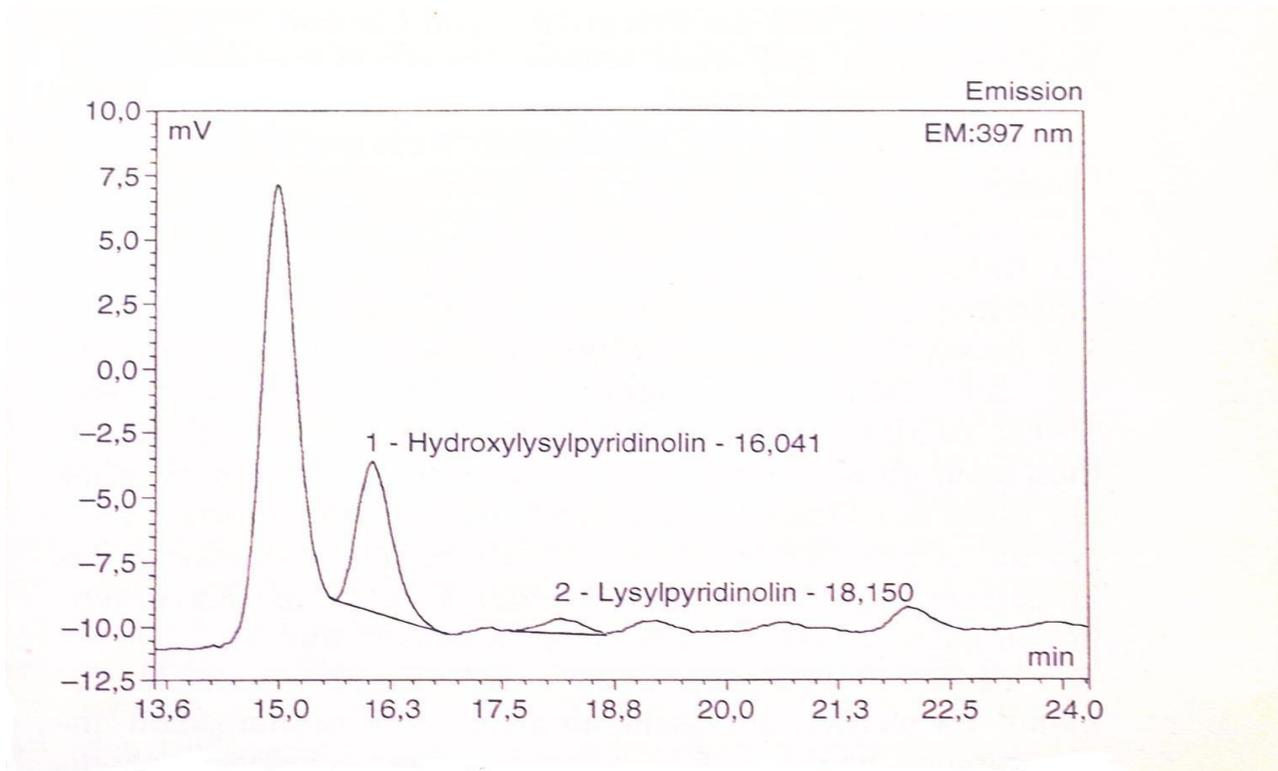


Abbildung 13: HPLC-Chromatogramm: Die Kollagenquervernetzungs-komponenten HP und LP (pm/ml) im residualen Dentin am Kavitätenboden nach chemo-mechanischer Kariesentfernung permanenter Zähne im Ultrafiltrat

3.2 Ergebnisse für die Milchzahnproben (primäre Dentition)

3.2.1 Relative HP-, LP- und Hyp-Konzentration im Ultrafiltrat der kariesfreien Dentinprobe der primären Dentition (gesunde Dentinprobe)

Tabelle 1 zeigt die relativen Anteile der HP-, LP- und Hyp-Konzentration im Ultrafiltrat für die untersuchten Referenzproben 30 kariesfreier Milchzähne.

Tabelle 1: Relativer Anteil (%) des Hydroxylysylpyridinolin (HP), Lysylpyridinolin (LP) und Hydroxyprolin (Hyp) im Ultrafiltrat kariesfreier Milchzähne.

Gesunde Dentinprobe		
HP	LP	Hyp
6,2	5,7	6,4

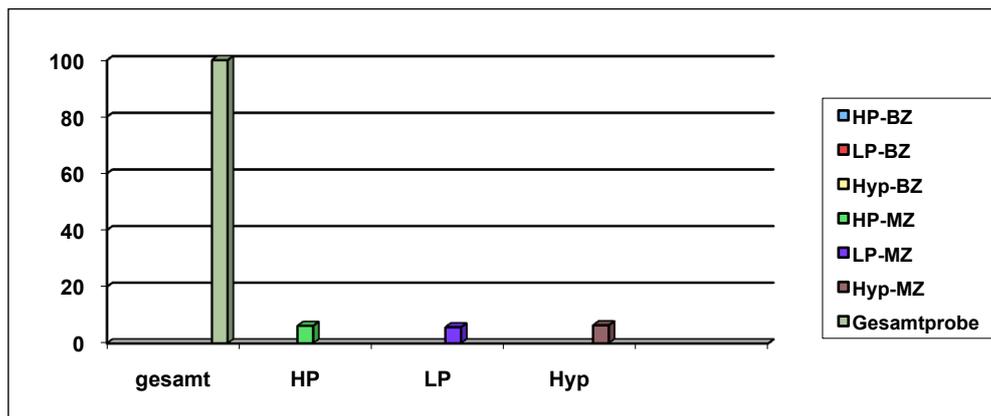


Abbildung 14: Graphische Darstellung der relativen Anteile (%) der HP-, LP- und Hyp-Konzentration

HP-MZ: Konzentration von Hydroxylysylpyridinolin in der Probe der Milchzähne

LP-MZ: Konzentration von Lysylpyridinolin in der Probe der Milchzähne

Hyp-MZ: Konzentration von Hydroxyprolin in der Probe der Milchzähne

3.2.2 Relative HP-, LP- und Hyp-Konzentration im Ultrafiltrat der kariösen Dentinprobe der primären Dentition (nach Anwendung mit Carisolv™)

Tabelle 2 zeigt die relativen Anteile der HP-, LP- und Hyp-Konzentration im Ultrafiltrat für die untersuchten Proben kariöser Milchzähne nach Exkavation mit Carisolv™.

Tabelle 2: Relativer Anteil (%) des Hydroxylysylpyridinolin (HP), Lysylpyridinolin (LP) und Hydroxyprolin (Hyp) im Ultrafiltrat kariöser Milchzähne.

Kariöse Dentinprobe		
HP	LP	Hyp
99,6	99,1	100

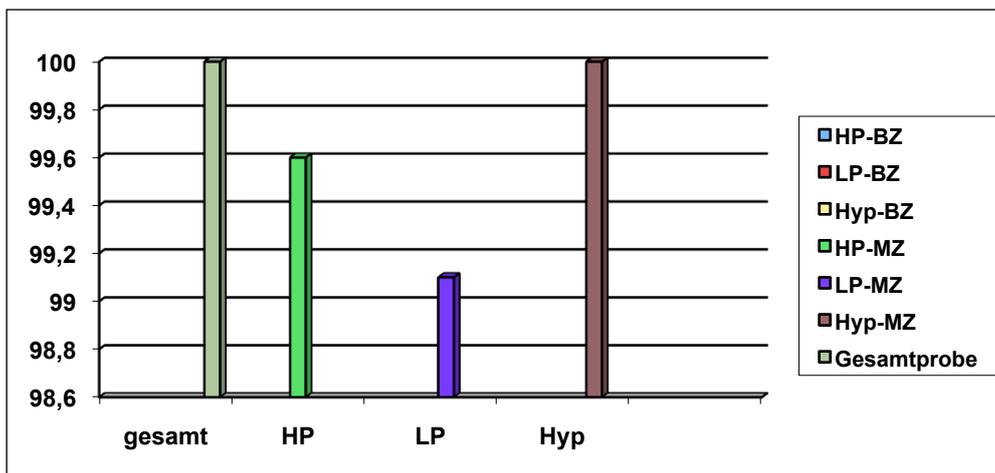


Abbildung 15: Graphische Darstellung der relativen Anteile (%) der HP-, LP- und Hyp-Konzentration

HP-MZ: Konzentration von Hydroxylysylpyridinolin in der Probe der Milchzähne

LP-MZ: Konzentration von Lysylpyridinolin in der Probe der Milchzähne

Hyp-MZ: Konzentration von Hydroxyprolin in der Probe der Milchzähne

3.2.3 Relative HP-, LP- und Hyp-Konzentration im Ultrafiltrat der 1. residualen Dentinprobe der primären Dentition

Tabelle 3 zeigt die relativen Anteile der HP-, LP- und Hyp-Konzentration im Ultrafiltrat der 1. residualen Dentinprobe kariöser Milchzähne.

Tabelle 3: Relativer Anteil (%) des Hydroxylysylpyridinolin (HP), Lysylpyridinolin (LP) und Hydroxyprolin (Hyp) im Ultrafiltrat der 1. residualen Dentinprobe.

1. residuale Dentinprobe			
	HP	LP	Hyp
	65,3	64,1	65,0

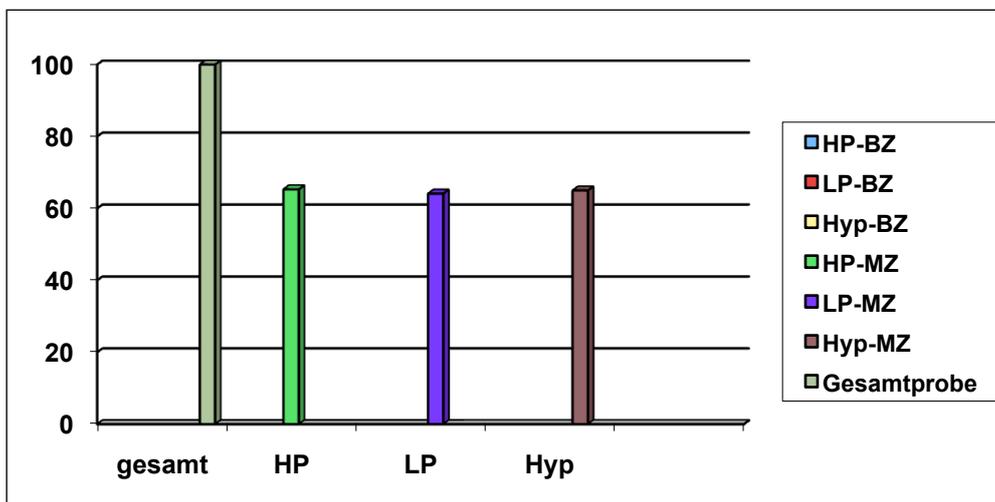


Abbildung 16: Graphische Darstellung der relativen Anteile (%) der HP-, LP- und Hyp-Konzentration der 1. residualen Dentinprobe

HP-MZ: Konzentration von Hydroxylysylpyridinolin in der Probe der Milchzähne

LP-MZ: Konzentration von Lysylpyridinolin in der Probe der Milchzähne

Hyp-MZ: Konzentration von Hydroxyprolin in der Probe der Milchzähne

3.2.4 Relative HP-, LP- und Hyp-Konzentration im Ultrafiltrat der 2. residualen Dentinprobe der primären Dentition

Tabelle 4 zeigt die relativen Anteile der HP-, LP- und Hyp-Konzentration im Ultrafiltrat der 2. residualen Dentinprobe kariöser Milchzähne.

Tabelle 4: Relativer Anteil (%) des Hydroxylylpyridinolin (HP), Lysylpyridinolin (LP) und Hydroxyprolin (Hyp) im Ultrafiltrat der 2. residualen Dentinprobe.

2. residuale Dentinprobe			
	HP	LP	Hyp
	19,8	16,6	19,6

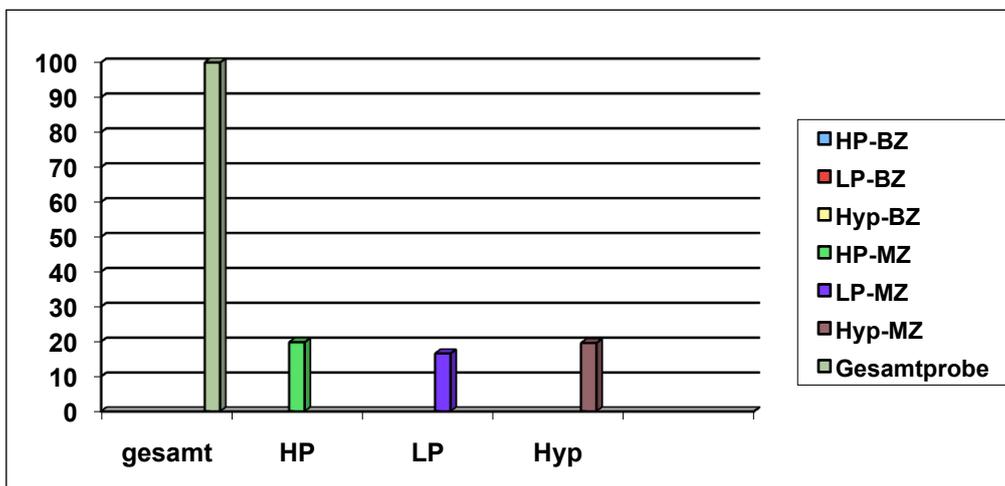


Abbildung 17: Graphische Darstellung der relativen Anteile (%) der HP-, LP- und Hyp-Konzentration der 2. residualen Dentinprobe

HP-MZ: Konzentration von Hydroxylylpyridinolin in der Probe der Milchzähne

LP-MZ: Konzentration von Lysylpyridinolin in der Probe der Milchzähne

Hyp-MZ: Konzentration von Hydroxyprolin in der Probe der Milchzähne

3.3 Ergebnisse für die bleibenden Zähne (permanente Dentition)

3.3.1 Relative HP-, LP- und Hyp-Konzentration im Ultrafiltrat der kariesfreien Dentinprobe der permanenten Dentition (gesunde Dentinprobe)

Tabelle 5 zeigt die relativen Anteile der HP-, LP- und Hyp-Konzentration im Ultrafiltrat für die untersuchten Referenzproben kariesfreier bleibender Zähne.

Tabelle 5: Relativer Anteil (%) des Hydroxylysylpyridinolin (HP), Lysylpyridinolin (LP) und Hydroxyprolin (Hyp) im Ultrafiltrat kariesfreier bleibender Zähne.

Gesunde Dentinprobe		
HP	LP	Hyp
0,2	0,2	0,2

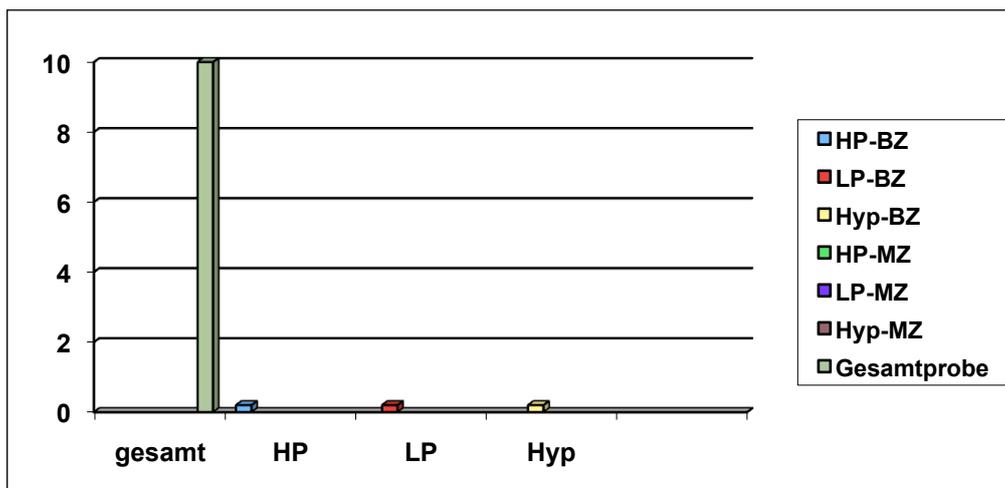


Abbildung 18: Graphische Darstellung der relativen Anteile der HP-, LP- und Hyp-Konzentration

HP-BZ: Konzentration von Hydroxylysylpyridinolin in der Probe der bleibenden Zähne

LP-BZ: Konzentration von Lysylpyridinolin in der Probe der bleibenden Zähne

Hyp-BZ: Konzentration von Hydroxyprolin in der Probe der bleibenden Zähne

3.3.2 Relative HP-, LP- und Hyp-Konzentration im Ultrafiltrat der kariösen Dentinprobe der permanenten Dentition (nach Anwendung mit Carisolv™)

Tabelle 6 zeigt die relativen Anteile der HP- und LP-Konzentration im Ultrafiltrat für die untersuchten Referenzproben kariöser bleibender Zähne nach Exkavation mit Carisolv™.

Tabelle 6: Relativer Anteil (%) des Hydroxylysylpyridinolin (HP), Lysylpyridinolin (LP) und Hydroxyprolin (Hyp) im Ultrafiltrat kariöser bleibender Zähne

Kariöse Dentinprobe		
HP	LP	Hyp
98,7	98,2	98,0

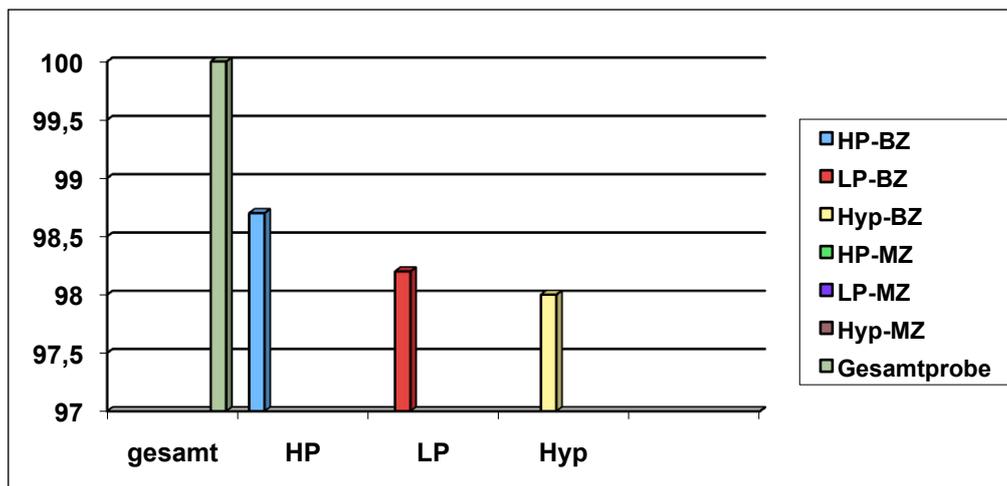


Abbildung 19: Graphische Darstellung der relativen Anteile (%) der HP-, LP- und Hyp-Konzentration der kariösen Dentinprobe

HP-BZ: Konzentration von Hydroxylysylpyridinolin in der Probe der bleibenden Zähne

LP-BZ: Konzentration von Lysylpyridinolin in der Probe der bleibenden Zähne

Hyp-BZ: Konzentration von Hydroxyprolin in der Probe der bleibenden Zähne

3.3.3 Relative HP-, LP- und Hyp-Konzentration im Ultrafiltrat der 1. residualen Dentinprobe der permanenten Dentition

Tabelle 7 zeigt die relativen Anteile der HP- und LP-Konzentration im Ultrafiltrat der 1. residualen Dentinprobe kariöser bleibender Zähne.

Tabelle 7: Relativer Anteil (%) des Hydroxylysylpyridinolin (HP), Lysylpyridinolin (LP) und Hydroxyprolin (Hyp) im Ultrafiltrat der 1. residualen Dentinprobe

1. residuale Dentinprobe		
HP	LP	Hyp
34,2	34,4	33,7

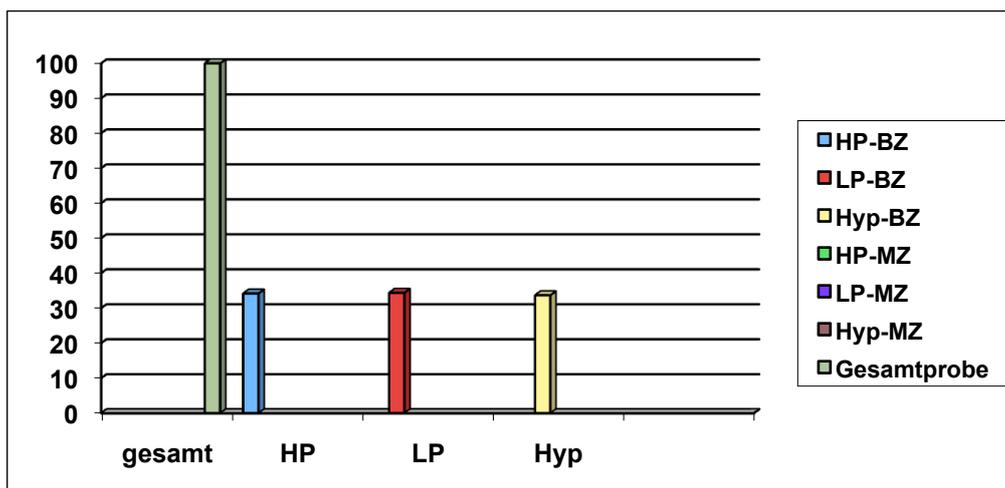


Abbildung 20: Graphische Darstellung der relativen Anteile (%) der HP-, LP- und Hyp-Konzentration der 1. residualen Dentinprobe

HP-BZ: Konzentration von Hydroxylysylpyridinolin in der Probe der bleibenden Zähne

LP-BZ: Konzentration von Lysylpyridinolin in der Probe der bleibenden Zähne

Hyp-BZ: Konzentration von Hydroxyprolin in der Probe der bleibenden Zähne

3.3.4 Relative HP-, LP- und Hyp-Konzentration im Ultrafiltrat der 2. residualen Dentinprobe der permanenten Dentition

Tabelle 8 zeigt die relativen Anteile der HP- und LP-Konzentration im Ultrafiltrat der 2. residualen Dentinprobe kariöser bleibender Zähne.

Tabelle 8: Relativer Anteil (%) des Hydroxylysylpyridinolin (HP), Lysylpyridinolin (LP) und Hydroxyprolin (Hyp) im Ultrafiltrat der 2. residualen Dentinprobe

2. residuale Dentinprobe			
	HP	LP	Hyp
	11,7	13,6	12,2

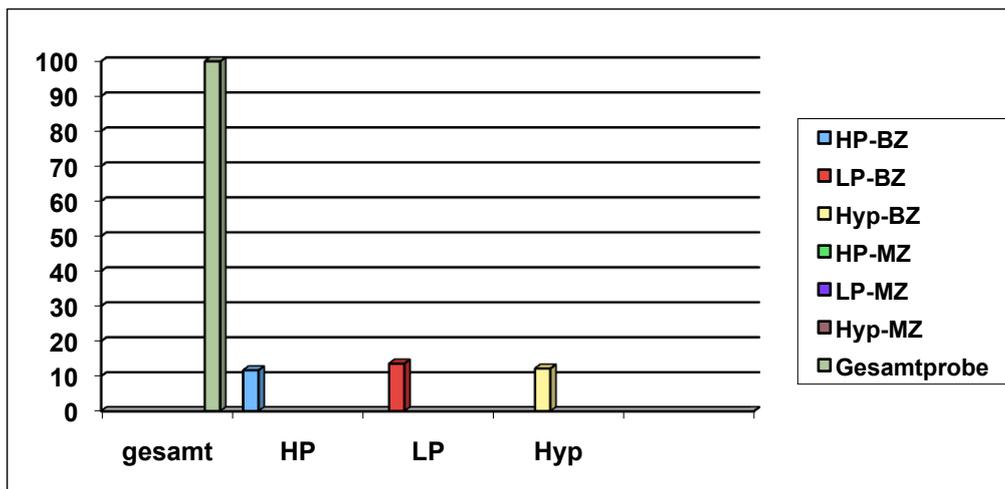


Abbildung 21: Graphische Darstellung der relativen Anteile (%) der HP-, LP- und Hyp-Konzentration der 2. residualen Dentinprobe

HP-BZ: Konzentration von Hydroxylysylpyridinolin in der Probe der bleibenden Zähne

LP-BZ: Konzentration von Lysylpyridinolin in der Probe der bleibenden Zähne

Hyp-BZ: Konzentration von Hydroxyprolin in der Probe der bleibenden Zähne

3.4 Vergleich aller Proben

Tabelle 9 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse aller Analysen für die Kollagen-Quervernetzungs-komponenten Hydroxylylsylpyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP). Die Variabilität zwischen den dreifach durchgeführten Analysen betrug weniger als 5 %.

Tabelle 9: Die in den jeweiligen Ultrafiltratproben gefundenen Konzentrationen der Kollagen-Quervernetzungs-komponenten (HP und LP) wurde zu deren Konzentration in der entsprechenden Gesamtprobe in Beziehung gesetzt und als relativer Anteil in Prozent ausgedrückt.

Material	Gesunde Dentinprobe		Kariöse Dentinprobe		1. Residuale Dentinprobe		2. Residuale Dentinprobe	
	HP	LP	HP	LP	HP	LP	HP	LP
Permanente Zähne	0,2	0,2	98,7	98,2	34,2	34,4	11,7	13,6
Milchzähne	6,2	5,7	99,6	99,1	65,3	64,1	19,8	16,6

Bei der Analyse der aus 30 kariesfreien Zähnen gewonnenen Dentinproben (*gesunde Dentinprobe*) der permanenten Dentition zeigte es sich, dass im Ultrafiltrat gesunden Dentins Hydroxylylsylpyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP) lediglich in einem Anteil von 0,2 % im Vergleich zur gesamten Dentinprobe gefunden wurden. Bei den Proben aus 30 kariesfreien Zähnen der primären Dentition lag dieser Anteil mit circa 6 % deutlich höher. Hingegen fanden sich die Kollagen-Quervernetzungs-komponenten des kariösen chemo-mechanisch entfernten Dentins (*kariöse Dentinprobe*) sowohl bei permanenten (n = 35) als auch bei Milchzähnen (n = 35) zu nahezu 100 % im Ultrafiltrat. Im residualen Dentin am Kavitätenboden (*1. residuale Dentinprobe*) lagen die entsprechenden Anteile bei 34 % (HP und LP) für permanente Zähne beziehungsweise bei 65 % (HP) und 64 % (LP) für Milchzähne. Wurde das Dentin am Kavitätenboden nach traditioneller mechanischer Kariesentfernung analysiert (*2. residuale Dentinprobe*), so fanden sich bei bleibenden Zähnen HP zu 12 % und LP zu 13 %, bei Milchzähnen HP zu 19 % und LP zu 16 % im Ultrafiltrat. Die Variabilität zwischen den dreifach durchgeführten Analysen betrug weniger als 5 %.

4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser In-vitro-Untersuchung haben gezeigt, dass die Kollagenstruktur des residualen Dentins am Kavitätenboden nach chemo-mechanischer Kariesbehandlung nicht derjenigen gesunden Dentins entsprach. Vielmehr war in erhöhtem Maße denaturiertes Kollagen zu finden. Die Annahme, dass mit einer chemo-mechanischen Kariesbehandlung selektiv der Teil kariösen Dentins entfernt werden könnte, der denaturiertes Kollagen enthielt, konnte nicht bestätigt werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellte reproduzierbare, analytische Methode stellt einen neuen Ansatz dar, um die Selektivität der chemo-mechanischen Kariesentfernung zu objektivieren und somit einen biochemischen Endpunkt in der Kariesentfernung zu definieren, der zuvor bereits häufiger in Veröffentlichungen vermisst wurde (Bader et al., 1998; Splieth et al., 1999; Banjeree et al., 2000). Bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Studie sollte eine Reihe von Punkten berücksichtigt werden. Analysiert wurden gepoolte Dentinproben aus vielen Zähnen. Somit ist keine Aussage über das Ausmaß verbliebenen denaturierten Kollagens in individuellen Zähnen möglich. Es ist vorstellbar, dass in einigen Zähnen eine weitestgehende Entfernung denaturierten Kollagens mit Carisolv™ gelang, während dies in anderen Zähnen nicht möglich war. Dies wäre durch eine unterschiedliche Karieskonsistenz in den verschiedenen Läsionen zu erklären. Dennoch lassen die ermittelten hohen Anteile denaturierten Kollagens am Kavitätenboden von 34 % für die permanenten Zähne bzw. 64 % für die Milchzähne vermuten, dass in vielen Fällen die Entfernung unvollständig war.

In einer früheren Untersuchung konnte gezeigt werden, dass zwischen unterschiedlichen Altersgruppen oder aber Zahntypen hinsichtlich der Dentinkonzentrationen von Kollagen-Quervernetzungs-komponenten keine Unterschiede bestehen (Acil et al., 2002).

Es ist denkbar, dass die Effektivität von Carisolv™ temperaturabhängig ist. Die etwas höhere Temperatur in der Mundhöhle könnte bei klinischer Anwendung einen Einfluß auf die Geschwindigkeit der chemischen Reaktion haben. Diese Tatsache könnte die relativ hohe Behandlungsdauer in der vorliegenden Untersuchung erklären.

Im Rahmen der Kollagendegradierung durch Kollagenasen entstehen Kollagenfragmente unterschiedlicher Größe (Ramachandran und Reddi, 1976). Für dieses Gemisch aus Bruchstücken legten wir als Schwelle für den Denaturierungsgrad ein Molekulargewicht von 30 000 zugrunde. Wären durch ein höheres Ausschlußvolumen auch größere Fragmente berücksichtigt worden, so wäre der Grad der Denaturierung noch weitaus höher ausgefallen. Somit stellen die ermittelten Werte eine vorsichtige Einschätzung des Denaturierungsgrades des residualen Dentins am

Kavitätenboden nach Anwendung von Carisolv™ dar.

Interessanterweise wurde auch festgestellt, daß nach traditioneller Kariesentfernung mit dem Bohrer etwas denaturiertes Kollagen am Kavitätenboden zu finden war, obwohl dieses Dentin als klinisch kariesfrei beurteilt wurde. Allerdings lag der entsprechende Anteil nach der Behandlung mit Carisolv™ noch deutlich höher. Auch war in Proben gesunden Dentins aus kariesfreien Zähnen in sehr geringer Menge denaturiertes Dentin nachweisbar. Es ist zu vermuten, dass dies Resultat einer mechanischen Destruktion des Dentinkollagens in Folge der Probeentnahme mit dem Rosenbohrer sein könnte.

Der exakte Wirkungsmechanismus von Carisolv™ ist nicht bekannt. Es werden aber sehr ähnliche Wirkungsmechanismen angenommen, wie bei den früher entwickelten und bereits erwähnten chemo-mechanischen Verfahren. Nach diesen Untersuchungen erleichterte die Einwirkung von Chlor auf das teilweise abgebaute Kollagen im kariösen Dentin dessen Entfernung (Habib et al., 1975; Kronman et al., 1977; Kronman et al., 1979).

Die verschiedenen Methoden der chemo-mechanischen Kariesentfernung wurden bezüglich ihrer Effektivität und ihrer Vorteile gegenüber anderen Verfahren in den vergangenen Jahren eingehend untersucht und kontrovers diskutiert. 1975 beschrieben Schutzbank et al. erstmalig eine solche chemo-mechanische Kariesentfernung, indem sie zeigten, dass die N-Monochlorglycinsäure (NMG, GK101) kariöses Dentin auflösen kann. Die sekundäre und quaternäre Struktur des denaturierten Kollagens wird dabei durch Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen zerstört (Kremers und Kniha, 1988).

Carisolv™ basiert auf der Weiterentwicklung seines Vorgängers Caridex™, welches zuvor aus dem GK 101™ entwickelt wurde. Nachdem sich diese bisher bekannten Systeme aufgrund unzureichender Effektivität und des zu hohen Zeit- und Kostenaufwandes nicht durchsetzen konnten, kam mit der Entwicklung von Carisolv™ bei Zahnärzten und Patienten wieder neue Hoffnung auf. Carisolv™ führt sowohl in vitro als auch in vivo zu einer alkalischen Hydrolyse zellulärer Bestandteile, denaturiert jedoch keine Bestandteile des kollagenen Gewebes und wirkt daher selektiv auf demineralisiertes Dentin (Damaschke et al., 2002; Sepet et al., 2004).

So analysierten Arvidsson et al. (2002) in ihrer In-vitro-Studie die Dentinoberfläche chemisch und topographisch und stellten fest, dass nach Carisolv™-Behandlung kein Unterschied zum herkömmlichen rotierenden Verfahren bestand. Hossain et al. (2003) untersuchten ebenfalls die Oberfläche in vitro und fanden zwar eine deutlich rauere Oberfläche durch behandlungsbedingt offene Dentintubuli, kamen aber zu dem Schluss, dass dies keinen negativen Nebeneffekte auf das Dentin besitzen würde. Auch die Mikrohärtigkeit der residualen Dentinoberfläche wird nach

Sakoolnamarka et al. (2005) durch Carisolv™ nicht negativ beeinflusst.

Diesen positiven Eindruck konnten weitere Autoren bestätigen, die in vitro einen Vergleich zwischen Carisolv™ und anderen chemischen Agenzien aufstellten. Hannig et al. (1999) beschrieben in einem direkten Vergleich zwischen Carisolv™ und einer Natriumhypochloritlösung, dass Carisolv™ keinen Effekt auf demineralisiertes Dentin zeigte, dieses auch nicht aufzulösen vermag und nur ein limitiertes Potential besitzt, denaturiertes Dentin chemisch aufzulösen. Tonami et al. (2003), sowie Yamada et al. (2010), welche die Fähigkeit von Carisolv™, organische Ablagerungen zu entfernen, mit der von Natriumhypochlorit (NaOCl) verglichen, schlussfolgerten, Carisolv™ sei chemisch sicherer und antibakteriell effektiver. Auch Dammaschke et al. (2005) und Clementino-Luedemann et al. (2006), die zusätzlich die Wirkung von Kalziumhydroxid (CaOH) beziehungsweise der Enzymlösung SFC-V betrachteten, bestätigten diese Ergebnisse. Peric und Marcovic (2007) verglichen die residuale Dentinoberfläche nach Erreichen klinischer Kariesfreiheit nach chemo-mechanischer Behandlung und Einsatz eines konventionellen Rosenbohrers elektronenmikroskopisch und histologisch. Hiernach war Carisolv™ effizient in der Entfernung kariösen Dentins. Diese Erkenntnis wurde von Avinash et al. (2012) bestätigt, die ebenfalls in ihrer In-vitro-Studie die Effizienz von Carisolv™ im Vergleich zur rein mechanischen Kariesentfernung untersuchten. Hierbei wurden die residualen Bakterienkolonien elektronenmikroskopisch untersucht und kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Verfahren festgestellt. Die Effizienz scheint allerdings nach Meller et al. (2006) stark von den eingesetzten Exkavationsinstrumenten abhängig zu sein, da die chemo-mechanische Kariesentfernung mit rotierenden Carbitbohrern signifikant gründlicher gelang, als die mit Handinstrumenten oder neuartigen rotierenden Bürsten. Pai et al. (2009) untersuchten die Oberflächenchemie und die damit zusammenhängende Menge an organischem und anorganischem Inhalt nach rotierender und chemo-mechanischer Exkavation und kamen zu dem Schluss, dass kein Unterschied in der chemischen Zusammensetzung der Dentinoberflächen bestand und lediglich der Smearlayer nach rotierender Excavation eine Verringerung der Haftung einer adhäsiven Restauration bedeuten würde.

Das System Carisolv™ schneidet jedoch nicht in allen In-vitro-Untersuchungen positiv ab und weist in der Anwendung eine Schwachstelle auf. Es handelt sich um verbleibende Karies an der Schmelz-Dentingrenze (Cederlund et al., 1999).

So wird die Kritik an der Effektivität von Carisolv™ u.a. darin begründet, dass es nach Exkavation sogar noch deutlich mehr Residualkaries als ein Rosenbohrer hinterlässt (Yazici et al., 2003). Dies bestätigen auch die Ergebnisse von Splieth et al. (2001). So konnten diese zeigen,

dass ca. ein Drittel der untersuchten Proben nicht kariesfrei waren und hielten demnach die Anwendung von Carisolv™ nicht für eine geeignete Alternative zur Kariesexkavation.

Für den Einsatz rotierender zahnärztlicher Instrumente sprechen auch die Ergebnisse histologischer Studien, welche in 6 von 10 Fällen ebenfalls noch eine auf dem chemo-mechanischen Wege nicht entfernbare Residualkaries an der Schmelz-Dentingrenze vorfanden (Bader et al., 1998; Meller et al., 2006). Flückiger et al. (2005) stellten allerdings kritisch fest, dass in vitro in direktem Vergleich mit der Handexkavation bezüglich der Menge an möglicher Residualkaries bei Milchzähnen kein Unterschied bestand. Nach Morrow et al. (2005) ist auch die mit Carisolv™ behandelte Dentinoberfläche weicher als die gesunden oder mit dem Rosenbohrer behandelten Dentins. Die Behandlung mit dem chemo-mechanischen Verfahren ist nach Magalhaes et al. (2006) sogar der reinen Handexkavation mit scharfem Löffel und nach Kinoshita et al. (2003) auch dem Er, Cr:YSGG-Laser in Effizienz und Effektivität unterlegen, was in letzterer Studie mittels Laserfluoreszenz diagnostisch belegt wurde. Ferner besitzt die residuale Dentinoberfläche nach Lennon et al. (2006) histologisch eine signifikant größere Anzahl an verbliebenen Bakterien, als nach Exkavation nach konventioneller Methode. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Peric und Markovic (2007). Sie fanden heraus, dass die mit Carisolv™ behandelten Kavitäten zwar klinisch und lichtmikroskopisch bakterienfrei erschienen, jedoch elektronenmikroskopisch nur 47 % der Kavitäten bakterienfrei waren. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach konventioneller rotierender Exkavation bei 87 % der Kavitäten eine Bakterienfreiheit. In einer jüngsten Untersuchung aller 3 Handexkavationsmethoden von Banerjee et al. (2010), in der die residuale Dentinoberfläche für eine spätere adhäsive Bondingverbindung verschiedener Systeme und Composite examiniert wurde, ergab sich ebenfalls eine eingeschränkte Effektivität von Carisolv™. Der Kavitätenboden zeigte nur nach Handexcavation ein klinisch kariesfreies und sondenhartes Dentin.

Während in vielen In-vitro-Studien und histologischen Nachuntersuchungen nach chemo-mechanischer Kariesentfernung demnach eine eher unzureichende Effizienz beschrieben wurde (Schutzbank et al., 1978; Roth et al., 1989; Scheutzel, 1989; Yip et al., 1995), stellten die meisten klinischen Studien nach Anwendung dieser Verfahren an bleibenden Zähnen hingegen Kariesfreiheit fest (Punwani et al., 1988; McNierney und Petruzillo, 1986).

So berichten zahlreiche Autoren von einer klinisch vollständig erreichten Kariesentfernung nach der Anwendung von Carisolv™. Dabei wird von einer Schonung des darunterliegenden remineralisierbaren Dentins mit intaktem Kollagengerüst gesprochen (Splieth et al. 1999, Wennerberg et al., 1999; Cederlund et al., 1999; Beeley et al., 2000; Morrow et al., 2000).

Azrak et al. (2004) beschrieben in ihrer Studie eine mit der konventionellen rotierenden Exkavation vergleichbare Gründlichkeit von Carisolv™ und stellten es damit als mögliche Alternative zum Rosenbohrer dar. Morrow et al. (2005) stellten in ihrer klinischen Studie heraus, dass es einen Unterschied in der Härte der Dentinoberfläche nach Carisolv™-Behandlung im Vergleich zu der gesunden und rotierend exkavierten kariösen Dentinoberfläche gibt. Jedoch besteht ihrer Erkenntnis nach statistisch weder ein signifikanter Unterschied zwischen dem nicht-kariösen und rotierend behandelten Dentin noch dem mit Carisolv™ und Bohrer behandelten Dentin. Auch Sakoolnamarka et al. (2005) evaluierten die Mikrohärtigkeit und bestimmten sie durch den Anteil an CaP (Calciumphosphat). Auch sie konkludierten, dass im Vergleich zu der rotierenden Instrumentierung die Exkavation mit Carisolv™ als ebenso effektiv betrachtet werden kann. Dies bestätigten Yamada et al. (2005) und Lenters et al. (2006), die feststellten, dass eine restlose Kariesentfernung durch Carisolv nicht schwierig sei, wenn ein klinischer Leitfaden hierfür existiere und befolgt werde. Lozano-Chourio et al. (2006) beschrieb in seinem klinischen Vergleich zwischen Carisolv™ und einer rotierenden Hochgeschwindigkeits-exkavation, dass diese zwar zügiger, jedoch Carisolv™ vergleichbar gründlich und sogar teilweise schonender zu gesundem Dentin sei. Es ist daher gut möglich, dass Carisolv™ dem herkömmlichen rotierenden Verfahren sogar in einigen Kriterien relativ überlegen sein kann. Nach Fure et al. (2000) ermöglicht Carisolv™ bei Wurzelkaries der permanenten Dentition 100 % Kariesfreiheit, der Rosenbohrer hingegen nicht. Lager et al. (2003) stellten fest, dass Carisolv™, verglichen mit dem herkömmlichen Verfahren, in der Entfernung von Kariesbakterien mindestens ebenbürtig, wenn nicht sogar noch effektiver ist. Barata et al. (2008) bestätigten, dass Carisolv™ ebenso wie die herkömmliche rotierende Exkavation eine vergleichbare Reduktion der Mikroorganismen ermöglicht. Auch Subramaniam et al. (2008) schrieben in ihrer klinischen Studie Carisolv™ eine gleichermassen antimikrobielle Effektivität wie der Exkavation mit dem Rosenbohrer zu. Dies traf in der Untersuchung sowohl auf die Zahl der untersuchten Lactobakterien als auch auf die gesamte Keimzahl der untersuchten Dentinproben zu. Peric et al. (2009) bestätigten diese Aussagen über Carisolv™ in ihrer klinischen Studie, die an 120 3-17-jährigen Patienten durchgeführt wurde. Kariesfreiheit wurde bei 92 % im Gegensatz zu 100 % nach rotierender Behandlung erreicht. Es wurde jedoch auch beschrieben, dass 85 % der chemomechanisch behandelten Patienten durch eine geringere Schmerzinduktion und demnach auch weniger notwendige Anästhesie mit der Carisolv™-Behandlung und nur 47 % mit der rotierenden Behandlung zufrieden gewesen wären.

Marquezan et al. (2006), welche die In-vitro- und In-vivo-Studien der letzten Jahre im Ergebnis zusammenfassend beleuchteten, beschrieben Carisolv™ als effektiv in der Kariesexkavation. Das beste Verhältnis aus geringster Invasivität und grösster Effektivität schrieben Neves et al. (2010) Carisolv™ zu, nachdem sie in ihrer Studie in-vitro 9 verschiedene Methoden zur Kariesentfernung untersucht hatten. Sie zeigten, dass die rotierenden Verfahren häufig eine Überexkavation zur Folge haben, andere chemo-mechanische Verfahren, wie Cariex™ und Cerabur™ jedoch eher zu Unterpräparation der Karies neigen.

Tsanova und Tomov (2010) erweiterten in ihrer elektronenmikroskopisch ausgewerteten In-Vitro-Studie das Untersuchungsfeld auf 4 Gruppen. Sie stellten einen direkten Vergleich zwischen beiden oben genannten niedertourigen und chemo-mechanischen Verfahren mit der rotierenden Exkavation mittels Hochgeschwindigkeits-Turbine und einem Er: YAG-Laser auf. Aus dieser Untersuchung ergab sich, dass Carisolv™, anders als die beiden rotierenden Verfahren, zwar auch eine Smear-Layer freie Oberfläche hinterlässt, der Er: YAG-Laser jedoch ein noch saubereres elektronenmikroskopisches Oberflächenbild hinterlässt, als Carisolv™. Wie bereits in diversen In-vitro-Studien beschrieben, ist es offensichtlich in einigen Fällen noch nötig, nach der Exkavation mit Carisolv™ verbliebene Residualkaries rotierend mit dem Rosenbohrer zu entfernen. Dies bestätigten Kakaboura et al. (2003) in ihrer klinischen In-vivo-Studie, in der sie primär die Akzeptanz der chemo-mechanischen Behandlung, die Schmerzinduktion und die benötigte Menge an Lokalanästhetika untersuchten. Nach ihren Ergebnissen mussten noch 10 % der mit Carisolv™ behandelten bleibenden Zähne zusätzlich rotierend von Residualkaries befreit werden. In der klinischen Studie von Chaussain-Miller et al. (2003) verblieb sogar in 22 % der Fälle rotierend zu exkavierende Karies. Verglichen mit der konventionellen Handexkavationstechnik, die von Nadanovsky et al. (2001) untersucht wurde, und bei der nur 4 von 66 Zähnen noch Residualkaries aufwiesen, hatten 7 von 66 Zähnen nach Carisolv™-Behandlung noch Karies. Dies zeigte aber auch, dass Carisolv™, verglichen mit konventioneller Handexkavation, keine signifikante Überlegenheit besaß. Dies unterstreicht die Widersprüchlichkeit der Untersuchungsergebnisse über die Effektivität von Carisolv™.

In einer der wenigen In-vitro-Studien hatten sich Correa et al. (2008) mit der Effektivität von Carisolv™ in der pädiatrischen Zahnmedizin beschäftigt. Hierbei wurde es mit einem weiteren chemo-mechanischen Verfahren zur Kariesentfernung (Papacarie™) und dem herkömmlichen rotierenden Rosenbohrer verglichen und es zeigte sich keinerlei Unterschied in den Fluoreszenzwerten der verbliebenen Dentinschichten der Milchzähne nach den 3 Verfahren.

Jedoch hatten Correa et al. (2007) zuvor mit den gleichen Exkavationsverfahren auch festgestellt, dass die Mikrohärtigkeit des residualen Dentins nach Behandlung mit den chemo-mechanischen Systemen signifikant niedriger als die des Dentins eines gesunden Milchzahnes war.

Insbesondere bei Milchzähnen, deren Behandlung als besondere Indikation für die chemo-mechanische Kariesentfernung mit Carisolv™ vorgeschlagen wird, waren nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung ca. zwei Drittel des durch Karies denaturierten Kollagens im Dentin am Kavitätenboden verblieben. Als sinnvolle und effektive Alternative zu den herkömmlichen schmerzintensiveren Verfahren stellten Goomer et al. (2013) die Kariestherapie mittels Carisolv™ gerade in der pädiatrischen Zahnheilkunde heraus, auch wenn, wie beschrieben, die Behandlungszeit signifikant höher lag.

In zahlreichen weiteren klinischen Studien zur Entfernung der Milchzahnkaries mit Carisolv™ wird die Aufmerksamkeit häufig auf die Aspekte Bakterienfreiheit, Behandlungszeit und Schmerzintensivität (inklusive der damit assoziierten Menge an notwendigem Lokalanästhetikum) gerichtet (Kavvadia et al., 2004; Bergmann et al., 2005). Azrak et al. (2004) untersuchten die Menge an exkavierten Bakterien im Vergleich zur Exkavation mit dem Rosenbohrer und stellten fest, dass diese nach beiden eingesetzten Systemen bei ca. 90 % lag. Subramaniam et al. (2008) konnten dies in ihrer Studie bestätigen. Auch sie untersuchten Lactobakterien und beschrieben eine antimikrobielle Effektivität von Carisolv™ von 91 %. Peric et al. (2009) kamen mit 92 % Effektivität auf ein vergleichbares Resultat. Dies ließ konkludieren, dass Carisolv™ eine adäquate Exkavationstechnik für die pädiatrische Zahnheilkunde ist, da nicht nur die Schmerzinduktion signifikant geringer war als bei herkömmlichen rotierenden Verfahren, sondern die chemo-mechanische Methode mittels Carisolv™ offensichtlich auch keinen nennenswerten Einfluss auf den Erfolg der Restauration nach einem Jahr zeigte.

Im Gegensatz zu diesen positiven Resultaten kamen Maragakis et al. (2001) zu einem eher negativen Ergebnis. Sie behandelten in ihrer Studie 32 Kinder mit Milchzahnkaries, um die Exkavationsgründlichkeit von Carisolv™ zu eruieren. Da in der Carisolv™-Gruppe 6 von 16 Zähnen keine komplette Kariesentfernung zeigten, in der Vergleichsgruppe mit dem Air Motor jedoch alle 16 Zähne kariesfrei waren, folgerten sie, dass Carisolv™ als Ersatz für den herkömmlichen Bohrer ungeeignet ist. Zu dieser Schlussfolgerung kamen auch Peters et al. (2006) in ihrer klinischen Milchzahnstudie. Nach ihren Ergebnissen kam die Carisolv™-Gruppe nur auf 57 % Kariesfreiheit. Auch beobachteten sie keinen Unterschied in der Menge der benötigten Lokalanästhetika.

In vielen Studien zu Carisolv™ der vergangenen Jahre zeigte sich, dass zur Optimierung der

Effektivität eine Kombination mit einer zweiten Exkavationsart sinnvoll war. Eine Kombinationsbehandlung sollte die exakte und selektive mechanische Entfernung des zuvor chemisch erweichten kariösen Dentins nach rein klinischen Gesichtspunkten ermöglichen. Ihr ist deshalb nicht nur aufgrund des höheren Behandlungskomforts im Vergleich zu einer rein manuell-mechanischen Kariesentfernung der Vorrang zu gewähren. So beschrieben Nadanovsky et al. (2001) die Kombination mit der Handexkavation als effektiver im Vergleich zu einer alleinigen Behandlung mit Handinstrumenten ohne Carisolv™. Auch durch die kombinierte Anwendung von Carisolv™ und der Luftabrasionstechnik konnte eine Erhöhung der Effektivität der Kariesentfernung erzielt werden (Kakaboura et al., 2003). Untersuchungen zu lasergestützter Kariesexkavation mit Carisolv™ ergaben eine höhere Effizienz, die mit Mikroirregularitäten des verbliebenen Dentinoberflächenreliefs und auch mit einer Entfernung des Smear Layers einhergeht, wie bezüglich des Nd: YAG-Lasers und des Er: YAG-Lasers beschrieben wurde (Yamada et al., 2000 und 2001). Der Vergleich der Exkavationen mit Hilfe eines Lasers mit und ohne Carisolv™ zeigte nach Laserbehandlung eine dünnere verbleibende Schmierschicht und weniger Zelltrümmer auf der Dentinoberfläche und damit eine deutlich höhere Effizienz gegenüber Carisolv™ (Kinoshita et al., 2003).

Dammaschke et al. (2005) attestierten der Kombination mit manueller Exkavation eine Überlegenheit von Carisolv™ gegenüber Natriumhypochlorit und Calciumhydroxid. Ein weiteres Argument, das eine Kombinationsbehandlung mit der herkömmlichen rotierenden Exkavation notwendig erscheinen läßt, ist die Feststellung, dass bei einer rein chemo-mechanischen Kariesentfernung in vielen Fällen noch kariöses Dentin unter geschlossenem Zahnschmelz verbleibt und dadurch chemo-mechanisch nicht erreichbar ist (Ziskind et al., 2005). Eine gute Kompromisslösung stellt eine Kombination der konventionellen und der chemo-mechanischen Methode auch deshalb dar, weil diese neben einer erhöhten Effektivität auch eine Verkürzung der Behandlungszeit und signifikant geringerer Schmerzinduktion zur Folge hatte (Kakaboura et al., 2003; Rafique et al., 2003).

Ericson et al. (1999) führten eine klinische Studie über die subjektive Schmerzwahrnehmung im Vergleich zur konventionellen Behandlung mit dem Rosenbohrer durch und beschrieben eine deutlich verminderte Schmerzempfindung bei der Anwendung von Carisolv™. Auch Braun et al. (2000), welche die Messung der Schmerzempfindungen über eine Ableitung der Hirnströme mit Hilfe eines Elektroenzephalogramms (EEG) durchführten, konnten keine signifikanten Schmerzpotentialmessungen während der Behandlung mit Carisolv™ registrieren. Eine klinische Studie von Lozano-Chourio et al. (2006) zeigte, dass deutlich 71 % der behandelten Kinder die

chemo-mechanische Kariesentfernung durch Carisolv™, verglichen mit der Exkavation durch den Rosenbohrer als angenehmer und schmerzfreier beurteilten und sie daher der Rosenbohrerexkavation vorzogen.

Auch andere Untersuchungen zeigten, dass bei der Anwendung von Carisolv™ im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren der Kariesentfernung eine signifikant geringere Menge an Lokalanästhetikum benötigt wurde, beziehungsweise in einigen Fällen sogar gar keine Anästhesie nötig war (Fure et al., 2000; Cederlund et al., 1999; Beeley et al., 2000; Kavadia et al., 2004; Balciuniene et al., 2005; Bergmann et al., 2005; Kirzioglu et al., 2007).

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Bewertung der Effizienz von Carisolv™ stellt die Dauer der Kariesentfernung dar. Bezogen auf die durchschnittliche Behandlungszeit bei der Verwendung von Carisolv™ stellten Ericson et al. (1999) fest, dass eine solche chemo-mechanische Behandlung mit durchschnittlich 10,4 Minuten mehr als doppelt so lange dauerte wie die Kariesentfernung mit rotierenden Instrumenten, die bei 4,4 Minuten lag. Sie wurde jedoch häufig als nicht so langdauernd empfunden (Pandit et al., 2007). Die erforderliche lange Behandlungsdauer stellt dennoch eines der Hauptkritikpunkte dar, die auch das chemo-mechanische System Carisolv™ noch verbesserungsbedürftig machen, da Zeit ein wichtiger Parameter für die Umsetzung in den zahnmedizinischen Praxisalltag ist (Beeley et al., 2000; Chaussain-Miller et al., 2003). Fure und Lingström (2004) zeigten zwar eine zeitliche Behandlungsverkürzung des neuen Carisolv II™ im Gegensatz zum bisherigen Carisolv™ - Gel, stellten jedoch fest, dass auch diese neue Version immer noch erheblich mehr Exkavationszeit in Anspruch nahm als die konventionelle Art der Kariesentfernung. Signifikant längere notwendige Behandlungszeiten wurden mehrfach im Vergleich zur reinen Handexkavation und zur rotierenden Exkavation beschrieben (Yazici et al., 2003; Flückiger et al., 2005; Lennon et al., 2006; Magalhaes et al., 2006; Hosein und Hasan, 2008; Fure und Lingström, 2009).

Maragakis et al. (2001) befragten Kinder vor Behandlungsbeginn nach ihrer Präferenz der Kariesbehandlung. Sie zeigten eine klare Abneigung gegenüber der konventionellen rotierenden Kariesexkavation und gaben an, auch längere Behandlungszeiten für eine alternative Therapie wie Carisolv™ in Kauf nehmen zu wollen. Nach der chemo-mechanischen Behandlung hingegen bestätigten sie mehrheitlich, dass sie vor allem aufgrund des unangenehmen Chlorgeschmacks und der deutlich längeren Behandlungszeit ihren Freunden diese Alternative jedoch nicht empfehlen und selber doch eher an der konventionellen Behandlungsform festhalten würden.

Bezüglich der Biokompatibilität wurde die Wirkung von Carisolv™ auf die Mukosa der Mundschleimhaut und das pulpäre Gewebe in zahlreichen Studien untersucht. Eine kurze

Einwirkzeit wird dabei generell als unbedenklich angesehen. Die Mundschleimhaut zeigte nach dreiminütiger Carisolv™-Exposition keine oder nur sehr geringe Anzeichen von Entzündungsreaktionen (Arvidsson et al., 2001; Bolut et al., 2004). Im Tierversuch mit Ratten zeigte sich, dass eine Einwirkzeit von einer Minute zu sehr geringen Schäden an Pulpazellen und Odontoblasten führte. Nach einer Kontaktzeit von 10 bis 20 Minuten hingegen wurden diese Zellen bereits deutlich geschädigt, während aber die Fibrillen der Pulpa, das Prädentin und das Dentin weiterhin intakt erschienen. Des Weiteren fand auch kein Einfluss auf die Verteilung und die Expression von Neuropeptiden sensorischer Nervenfasern in der Pulpa statt (Young und Bongehiell, 2001). Es zeigte sich, dass Carisolv™, wie das vergleichbare chemomechanische Verfahren Papacarie™, auf Pulpafibroblasten nicht zytotoxisch wirkt, sondern diese sogar eher stimuliert, Osteonectin zu produzieren, das zur Formierung neuen Dentins führt (Bussadori et al., 2014).

Aufgrund der enormen Weiterentwicklung der dentinadhäsiven Verbundsysteme in der konservierenden Zahnheilkunde der vergangenen 15 Jahre untersuchten Sirin Karaarslan et al. (2012) den Effekt der verschiedenen Kariesexkavationstechniken auf die Haftung dreier verschiedener mikrotensiler Bondingsysteme. Dabei wurden in ihrer in-vitro-Studie drei verschiedene Bondingsysteme auf ihre Dentinhaftung nach Exkavation mit einem herkömmlichen Rosenbohrer, einem Er:YAG-Laser und Carisolv™ verglichen und festgestellt, dass die Stärke der Bondinghaftung nicht von der Methode der Exkavation abhänge. Es sei lediglich preferiert, nach chemomechanischer Exkavation ein „two-step self etch-System“, also ein selbstkonditionierendes System zu verwenden, während nach Laserexkavation eher ein einzeitiges „etch-and-rinse System bevorzugt werden sollte.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in den letzten zehn Jahren eine große Anzahl von Studien die Möglichkeiten und Grenzen des chemo-mechanischen Verfahrens Carisolv™ untersucht haben und dabei zu unterschiedlichen Ergebnissen gekommen sind.

Ein effektives System zur Kariesentfernung sollte die Grenze zwischen remineralisierbarem und nicht remineralisierbarem Dentin identifizieren und letzteres vollständig entfernen. Die in dieser Arbeit vorgestellte analytische Methode stellt einen neuen Ansatz dar, um diesen Effekt zu objektivieren und somit einen biochemischen Endpunkt in der Kariesentfernung zu definieren. Sie konnte bei der Evaluation weiterer innovativer Verfahren zur Kariesentfernung, wie beispielsweise eines fluoreszenzkontrollierten Er : YAG-Lasers, bereits eingesetzt und validiert werden (Jepsen et al., 2008).

Die biochemischen Ergebnisse der vorliegenden In-vitro-Studie stellen die Möglichkeit einer selektiven und vollständigen Entfernung denaturierten Kollagens aus der Dentinkaries mit dem vorgestellten chemo-mechanischen Verfahren CarisolvTM in Frage.

5. Zusammenfassung

Chemo-mechanische Verfahren zur Kariesentfernung, wie die Anwendung von Carisolv™, werden als schonende Alternativen zur konventionellen Anwendung des Bohrers diskutiert. Es wird angenommen, dass Carisolv™ dabei hilft, das denaturierte Kollagen in der kariösen Läsion aufzulösen. Es wird darüber hinaus vermutet, dass das intakte Kollagen innerhalb der Läsion nach diesem Verfahren erhalten werden kann. Dieses Dentin hätte die Möglichkeit sich zu remineralisieren. Dies stünde im Gegensatz zu der aggressiveren traditionellen Kariesentfernung mit rotierenden Instrumenten, die sich vornehmlich an der Härte des Dentins am Kavitätenboden orientiert. Es war deshalb das Ziel der vorliegenden Untersuchung, die Kollagenstruktur des Dentins am Kavitätenboden nach chemo-mechanischer Kariesbehandlung mit Carisolv™ biochemisch zu analysieren.

Bei jeweils 35 Zähnen der permanenten und der primären Dentition wurde die Dentinkaries chemo-mechanisch mittels Carisolv™ entsprechend den Herstellerangaben mit speziellen Handinstrumenten entfernt. Anschließend wurde eine dünne Schicht Dentin am Kavitätenboden niedertourig mit einem Rosenbohrer exkaviert. Die so gewonnenen Dentinproben wurden zunächst mit 0,5 M EDTA demineralisiert, dann gegen 0,5 % Essigsäure dialysiert und anschließend durch Ultrafiltration von intakten Kollagenmolekülen befreit. Das Ultrafiltrat wurde lyophilisiert und der Bestimmung von Kollagen-Quervernetzungsbestandteilen mittels HPLC zugeführt. Als Kontrollen dienten einerseits Proben gesunden Dentins aus 60 kariesfreien Zähnen, andererseits das mittels Carisolv™ entfernte kariöse Dentin.

Während im Ultrafiltrat gesunden Dentins die Kollagen-Quervernetzungsbestandteile lediglich in einem Anteil von 0,2 % der gesamten Dentinprobe gefunden wurden, lag dieser Anteil im residualen Dentin von permanenten Zähnen bei 34 % und von Milchzähnen bei 64 %. Hingegen fanden sich die Kollagen-Crosslinks des kariösen chemo-mechanisch entfernten Dentins erwartungsgemäß zu annähernd 100 % im Ultrafiltrat.

Die Ergebnisse dieser In-vitro-Untersuchung haben gezeigt, dass die Kollagenstruktur des residualen Dentins am Kavitätenboden nach chemo-mechanischer Kariesbehandlung nicht derjenigen gesunden Dentins entsprach. Vielmehr war in erhöhtem Maß denaturiertes Kollagen zu finden. Somit muß die Möglichkeit einer selektiven und vollständigen Entfernung denaturierten Kollagens aus der Dentinkaries mit dem untersuchten chemo-mechanischen Verfahren in Frage gestellt werden.

6. Literaturverzeichnis

- Açil Y, Müller PK. Rapid method for isolation of the mature cross-links hydroxylysylpyridinoline and lysylpyridinoline. *J Chromatogr A* 1994; 664: 183-185
- Açil Y, Vetter U, Brenner R, Müller PK, Brinkmann J. Ehlers-Danlos syndrome type VI: Cross-links pattern in tissue and urine sample as diagnostic marker. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33: 522-524
- Açil Y, Springer IN, 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: 340-343
- Anusavice KJ, Kinchelde JE. Comparison of pain associated with mechanical and chemomechanical removal of caries. *J Dent Res* 1987; 66: 1680-1683
- Anderson MH, Loesche WJ, Charbeneau GT. Bacteriologic study of a basic fuchsin caries-disclosing dye. *J Prosth Dent* 1985; 54: 51-55
- Anderson MH, Charbeneau GT. A comparison of digital and optical criteria for detecting carious dentin. *J Prosth Dent* 1985; 53: 643-646
- Armstrong WG. A quantitative comparison of the amino acid composition of sound dentine, carious dentine, and the collagenase resistant fraction of carious dentine. *Arch Oral Biol* 1961; 5: 115-124
- Arvidsson A, Liedberg B, Möller K, Lyven B, Sellen A, Wennerberg A. Chemical and topographical analyses of dentine surfaces after Carisolv treatment. *J Dent* 2002; 30: 67-75
- Arvidsson A, Stirling C, Sennerby L, Wennerberg A. Reactions in the oral mucous membrane after exposure to Carisolv-combined results from a clinical screening test in humans and an experimental study in rats. *Gerodontol* 2001; 18: 109-113
- Avinash A, Grover SD, Koul M, Nayak MT, Singhvi A, Singh RK. Comparison of mechanical and chemomechanical methods of caries removal in deciduous and permanent teeth: a SEM study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2012; 30: 115-121
- Azrak B, Callaway A, Grundheber A, Stender E, Willershausen B. Comparison of the efficacy of chemomechanical caries removal (Carisolv) with that of conventional excavation in reducing the cariogenic flora. *Int J Paediatr Dent* 2004; 14: 182-191
- Bader N, Schmalz G, Hickel R. Caridex und Carisolv. *Zahnärztl Mitt* 1998; 88: 66-68
- Bätge B, Açil Y, Schlatterer A, Seitzer U, Müller PK. Pyridinum Quervernetzung im Knochengewebe: Vergleich mit Kollagenmodifikationen und Morphometrie. *Osteologie* 1994; 3: 119-124
- Baker RWR. Studies on the reaction between sodium hypochlorite and proteins. *Biochem* 1947; 41: 337

Balciuniene I, Sabalaite R, Juskiene I. Chemomechanical caries removal for children. *Stomatol* 2005; 7: 40-44

Banerjee A, Kellow S, Mannocci F, Cook RJ, Watson TF. An in vitro evaluation of microtensile bond strengths of two adhesive bonding agents to residual dentine after caries removal using three excavation techniques. *J Dent* 2010; 38: 480-489

Banerjee A, Kidd EAM, Watson TF. In vitro evaluation of five alternative methods of carious dentin excavation. *Caries Res* 2000; 34: 144-150

Banerjee A, Kidd EAM, Watson TF. Scanning electron microscopic observations of human dentine after mechanical caries excavation. *J Dent* 2000; 28: 179-186

Barata TJ, Bresciani E, Mattos MC, Lauris JR, Ericson D, Navarro MF. Comparison of two minimally invasive methods on the longevity of glass ionomer cement restorations: short term result of a pilot study. *J Appl Oral Sci* 2008; 16

Barwart O, Moschen I, Graber A, Pfaller K. In-vitro study to compare the efficacy of N-monochloro-D, L-2-aminobutyrate (NMAB, GK-101E) and water in caries removal. *J Oral Rehabil* 1991; 18: 523-529

Beeley JA, Yip HK, Stevenson AG. Chemochemical caries removal: a review of the techniques and latest developments. *Br Dent J* 2000; 188: 427-430

Bergmann J, Leitão J, Kultje C, Bergmann D, Clode MJ. Removing dentine caries in deciduous teeth with Carisolv: a randomised, controlled, prospective study with six-month follow-up, comparing chemomechanical treatment with drilling. *Oral Health Prev Dent* 2005; 3: 105-111

Bulut G, Zekioglu O, Eronat C, Bulut H. Effect of Carisolv on the human dental pulp: a histological study. *J Dent* 2004; 32: 309-314

Brannstrom M, Johnson G, Friskopp J. Microscopic observations of the dentin under caries lesions excavated with the GK-101 Technique. *J Dent Child* 1980; 47: 46-49

Braun A, Graefen O, Frentzen M, Nolden R. Objektiv darstellbare Empfindungen am Zahn während der Einwirkung von Carisolv. *Quintessenz* 2000; 51: 461-469

Bussadori SK, Amancio OM, Martins MD, Guedes CC, Alfaya TA, Santos EM, Franca CM. Production of extracellular matrix proteins by human pulp fibroblasts in contact with papácarie and carisolv. *Oral Health Prev Dent* 2014; 12: 55-59

Cederlund A, Lindskog S, Blomlof J. Effect of a chemo-mechanical caries removal system (Carisolv) on dentin topography of non-carious dentin. *Acta Odontol Scand* 1999; 57: 185-189

Cederlund A, Lindskog S, Blomlof J. Efficacy of Carisolv-assisted caries excavation. *Int J Periodont Restorat Dent* 1999; 19: 465-468

Chaussain-Miller C, Decup F, Domejean-Orliaguet S, Gillet D, Guigand M, Kaleka R, Laboux O, Lafont J, Medioni E, Serfaty R, Toumelin-Chemla F, Tubiana J, Lasfargues JJ. Clinical evaluation of the Carisolv chemomechanical caries removal technique according to the site/stage concept, a revised caries classification system. *Clin Oral Invest* 2003; 7: 32-37

Clementino-Luedemann TN, Dabanoglu A, Ilie N, Hickel R, Kunzelmann KH. Micro-computed tomographic evaluation of a new enzyme solution for caries removal in deciduous teeth. *Dent Mater J* 2006; 25: 675-683

Corrêa FN, Rocha RO, Rodrigues Filho LE, Muench A, Rodrigues CR. Chemical versus conventional caries removal techniques in primary teeth: a microhardness study. *J Clin Pediatr Dent* 2007; 31: 187-192

Corrêa FN, Rocha Rde O, Soares FZ, Rodrigues-Filho LE, Rodrigues CR. Fluorescence of primary dentine after chemomechanical and conventional rotary excavation. *Eur Arch Paediatr Dent* 2008; 9: 126-129

Corrêa FN, Rodrigues-Filho LE, Rodrigues CR: Evaluation of residual dentin after conventional and chemomechanical caries removal using SEM. *J Clin Pediatr Dent* 2008; 32: 115-120

Craig RG, Gehring PE, Peyton FA. Relation of structure to the microhardness of human dentin. *J Dent Res* 2004 ; 38 : 624-630

Dammaschke T, Eickmeier M, Schäfer E, Danesh G, Ott KH. Effectiveness of Carisolv compared with sodium hypochlorite and calcium hydroxide. *Acta Odontol Scand* 2005; 63: 110-114

Dammaschke T, Stratmann U, Mokrys K, Kaup M, Ott KH. Reaction of sound and demineralised dentine to Carisolv in vivo and in vitro. *J Dent* 2002; 30: 59-65

Emanuel R, Broome JC. Surface energy of chemomechanically prepared dentin. *Quintessence Int* 1988; 19: 369-372

Ericson D. In vitro efficacy of a new gel for chemo-mechanical caries removal. *J Dent Res* 1998; 77: 360

Ericson D, Zimmerman M, Raber H, Götrick B, Bornstein R, Thorell J. Clinical evaluation of efficacy and safety of a new method for chemo-mechanical removal of caries. *Caries Res* 1999; 33 : 171-177

Eyre DR, Apon S, Wu JJ, Ericsson LH, Walsh KA. Collagen type IX : evidence for covalent linkages to type II collagen in cartilage. *FEBS Lett* 1987 ; 220 : 337-341

Fejerskov O, Nyvad B, Kidd EAM. Pathology of dental caries. In : *Dental caries : the disease and its clinical management*. Hrsg. Fejerskov O, Kidd EAM, Blackwell Munksgaard Oxford 2008, 19-48.

Fejerskov O, Thylstrup A. *Textbook of cariology*. Munksgaard Denmark, 1986

Flückiger L, Waltimo T, Stich H, Lussi A. Comparison of chemomechanical caries removal using Carisolv or conventional hand excavation in deciduous teeth in vitro. *J Dent* 2005; 33: 87-90

Fure S, Lingstrom P, Birkhed D. Evaluation of Carisolv for the chemo-mechanical removal of primary root caries in vivo. *Caries Res* 2000; 34: 275-280

Fure S, Lingström P. Evaluation of different fluoride treatments of initial root carious lesions in vivo. *Oral Health Prev Dent* 2009; 7: 147-154

Fure S, Lingström P. Evaluation of the chemomechanical removal of dentine caries in vivo with a new modified Carisolv gel. *Clin Oral Invest* 2004; 8: 139-144

Fusayama T. Two Layers of Carious Dentin: Diagnosis and Treatment. *Oper Dent* 1979; 4: 63-70

Fusayama T. New concepts in operative dentistry. Quintessence, Chicago, 1980; 3: 14-59

Fusayama T, Kurosaki N. Structure and removal of carious dentin. *Oper Dent* 1972; 22: 401-411

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

Goomer P, Jain RL, Kaur H, Sood R. Comparison of the efficacy of chemomechanical caries removal with conventional methods- a clinical study. *J Int Oral Health* 2013; 5 : 42-47

Habib CM, Kronman J, Goldman M. A chemical evaluation of collagen and hydroxyproline after treatment with GK-101 (N-Chloroglycine). *Pharmacol Therapeut Dent* 1975; 2: 209-215

Hahn SK, Kim JW, Lee SH, Kim CC, Hahn SH, Jang KT. Microcomputed tomographic assessment of chemomechanical caries removal. *Caries Res* 2004; 38: 75-78

Hannig M. Effect of Carisolv solution on sound, demineralized and denatured dentin - an ultrastructural investigation. *Clin Oral Invest* 1999; 3: 155-159

Hossain M, Nakamura Y, Tamaki Y, Yamada Y, Jayawardena JA, Matsumoto K. Dentinal composition and Knoop hardness measurements of cavity floor following carious dentin removal with Carisolv. *Oper Dent* 2003; 28: 346-351

Hosein T, Hasan A. Efficacy of chemo-mechanical caries removal with Carisolv. *J Coll Physicians Surg Pak* 2008; 18: 222-225

Imfeld T, Barbakow F, Curilovic Z. Sondierung und Kariesdiagnose. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 1990; 100: 872-874

Jamall IS, Finelli VN, QueHee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem* 1981; 112: 70-75

Jepsen S, Springer IN, Buschmann A, Hedderich J, Açil Y. Elevated levels of collagen cross-link residues in gingival tissues and crevicular fluid of teeth with periodontal disease. *Eur J Oral Sci* 2003; 111: 198-202

Jepsen S, Açil Y, Peschel T, Kargas K, Eberhard J. Biochemical and morphological analysis of dentine following selective caries removal with a fluorescence-controlled Er:YAG laser. *Lasers Surg Med* 2008; 40: 350-357

Johansen E, Parks HF. Electron-microscopic Observations on Soft Carious Human Dentin. *J Dent Res* 1961; 40: 235-248

Kakaboura A, Masouras C, Staikou O, Vougiouklakis G. A comparative clinical study on the Carisolv caries removal method. *Quintessence Int* 2003; 34: 269-271

- Karjalainen S, Söderling E, Pelliniemi L, Foidart JM. Immunohistochemical Localisation of Types I and III Collagen and Fibronectin in the Dentin of Carious Human Teeth. *Arch Oral Biol* 1986; 31: 801-806
- Kato S, Fusayama T. Recalcification of Artificially Decalcified Dentin In Vivo. *J Dent Res* 1970; 49: 1060-1067
- Kavvadia K, Karagianni V, Polychronopoulou A, Papagiannouli L. Primary teeth caries removal using the Carisolv chemomechanical method. A clinical trial. *Pediatr Dent* 2004; 2: 23-28
- Kinoshita J, Kimura Y, Matsumoto K. Comparative study of carious dentin removal by Er, Cr: YSGG laser and Carisolv. *J Clin Laser Med Surg* 2003; 21: 307-315
- Kirzioglu Z, Gurbuz T, Yilmaz Y. Clinical evaluation of chemomechanical and mechanical caries removal: status of the restorations at 3, 6, 9 and 12 months. *Clin Oral Investig* 2007; 11: 69-76
- Kleter GA, Damen JJM, Buijs MJ, Ten Cate JM. The Maillard reaction in demineralized dentin in vitro. *Eur J Oral Sci* 1997; 105: 278-284
- Kleter GA, Damen JJM, Kettenes-van de Bosch JJ, Bank RA, te Koppele JM, Veraart JR, Ten Cate JM. A novel pyrrolenone cross-link from bovine dentine. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1381: 179-190
- Kleter GA, Damen JJ, Buijs 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
- Knott L, Bailey A. Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function and clinical relevance. *Bone* 1998; 181-187
- Kremers L, Kniha H. Caridex - Erster klinischer Erfahrungsbericht mit dem „caries removal system“. *Zahnärztl Prax* 1988; 7: 254
- Kronman JH, Goldman M, Habib CM, Mengel I. Electron microscopic evaluation of altered collagen structure induced by N-Monochloroglycine (GK-101). *J Dent Res* 1977; 56: 1539-1545
- Kronman JH, Goldman M, Cataldo E. Study of the effects of GK-101 (N-Monochloroglycine) on the dental pulp. *J Dent Res* 1976; 55: 1135
- Kronman JH, Goldman M, Habib CM, Mengel I. Electron microscopic evaluation of altered collagen structure after treatment with N-Monochloro-DL-2-Aminobutyrate (GK-101E). *J Dent Res* 1979; 58: 1914
- Kuboki Y, Liu CF, Fusayama T. Mechanism of differential staining in carious dentin. *J Dent Res* 1983 ; 62: 713-714
- Kuboki Y, Ohgushi K, Fusayama T. Collagen biochemistry of the two layers of carious dentin. *J Dent Res* 1977; 56: 1233-1237

- 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 Tiss Res* 1993; 29: 99-110
- Kühn K. Biochemische Grundlagen des Gewebeersatzes. *Langenbecks Arc für Chir* 1970; 327: 1073
- Kurosaki N, Sato Y, Iwaku M, Fusayama T. Effect of a carious dentine softener on the dentine and pulp. *J Prosth Dent* 1977; 38: 169-173
- Kurosaki N, Fusayama T. Penetration of elements from amalgam into dentine. *J Dent Res* 1972 ; 52: 309-317
- Lager A, Thornqvist E, Ericson D. Cultivable bacteria in dentine after caries excavation using rose-bur or Carisolv. *Caries Res* 2003; 37: 206-211
- Lennon AM, Buchalla W, Rassner B, Becker K, Attin T. Efficiency of 4 caries excavation methods compared. *Oper Dent* 2006; 31: 551-555
- Lenters M, van Amerongen WE, Mandari GJ. Iatrogenic damage to the adjacent surfaces of primary molars, in three different ways of preparation. *Eur Arch Paediatr Dent* 2006; 7: 6-10
- Levine RS. The distribution of hydroxyproline in sound human coronal dentine. *Arch Oral Biol* 1971; 16: 473-478
- Levine RS. The distribution of hydroxyproline in the dentine of carious human teeth. *Arch Oral Biol* 1972; 17: 127-135
- List G, Lommel TJ, Tilk MA, Murdoch HG. Use of a dye in caries identification. *Quintessence Int* 1987; 18: 343-345
- Lozano-Chourio MA, Zambrano O, Gonzalez H, Quero M. Clinical randomized controlled trial of chemomechanical caries removal (Carisolv). *Int J Pediatr Dent* 2006; 16: 161-167
- Magalhaes CS, Moreira AN, Campos WR, Rossi FM, Castilho GA, Ferreira RC. Effectiveness and efficiency of chemomechanical carious dentin removal. *Braz Dent J* 2006; 17: 63-67
- Maragakis GM, Hahn P, Hellwig E. Clinical evaluation of chemomechanical caries removal in primary molars and its acceptance by patients. *Caries Res* 2001; 35: 205-210
- Marquezan M, Faraco Junior IM, Feldens CA, Tovo MF, Ottoni AB. Evaluation of the methodologies used in clinical trials and effectiveness of chemo-mechanical caries removal with Carisolv. *Pesqui Odontol Bras* 2006; 20: 364-371
- Martin-de las Heras S, Valenzuela A, Villanueva E. Desoxypyridinoline crosslinks in human dentine and estimation of age. *Int J Legal Med* 1999; 112: 222-226
- McInnes-Ledoux P, Ledoux WR, Weinberg R. Bond strength of dentinal bonding agents to chemomechanically prepared dentine. *Dent Mater* 1986; 3: 331-336

- McNierney H, Petruzillo MA. A gentle approach to operative dentistry: the Caridex caries removal system. *Gen Dent* 1986; 34: 282
- Meller C, Nourallah AW, Heyduck C, Steffen H, Splieth CH. Chemo-mechanical dentine caries removal with Carisolv using a rotating brush. *Eur J Paediatr Dent* 2006; 7: 73-76
- Miller WA. Spread of carious lesions in dentine. *J Am Dent Assoc* 1969; 78: 1327-1330
- 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 dentine. *Bull Tokyo Med Dent Univ* 1978; 25: 169
- Morrow LA, Hassall DC, Watts DC, Wilson NH. A chemomechanical method for caries removal. *Dent Update* 2000; 27: 398-401
- Morrow LA, Wilson NH, Watts DC, Silikas N. The nature of the remaining dentin surface following application of Carisolv solution. *Am J Dent* 2005; 18: 296-300
- Munksgaard EC, Moe D. Types of collagen in an extract of odontoblasts and dentine from developing bovine teeth. *Arch oral Biol* 1980; 25: 485-489
- Munshi AK, Hegde AM, Shetty PK. Clinical evaluation of Carisolv in the chemo-mechanical removal of carious dentin. *J Clin Pediatr Dent* 2001; 26: 49-54
- Nadanovsky P, Cohen Carneiro F, Souza De Mello F. Removal of caries using only hand instruments: a comparison of mechanical and chemomechanical methods. *Caries Res* 2001; 35: 384-389
- Neves AD, Coutinho E, De Munck J, Van Meerbeek B. Caries-removal effectiveness and minimal-invasiveness potential of caries-excitation techniques: A micro-CT investigation. *J Dent* 2011; 39: 154-162
- Ogawa K, Yamashita T, Ichijo T, Fusayama T. The Ultrastructure and Hardness of the transparent layer of human carious dentin. *J Dent Res* 1983; 62: 7-10
- Ohgushi K, Fusayama T. Electron microscopic structure of the two layers of carious dentine. *J Dent Res* 1973; 54: 1019-1026
- Pai VS, Nadig RR, Jagadeesh T, Usha G, Karthik J, Sridhara K. Chemical analysis of dentine surfaces after Carisolv treatment. *J Conserv Dent* 2009; 12: 118-122
- Pandit IK, Srivastava N, Gugnani N, Gupta M, Verma L. Various methods of caries removal in children: A comparative clinical study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2007; 25: 93-96
- Peric T, Markovic D, Petrovic B. Clinical evaluation of a chemomechanical method for caries removal in children and adolescents. *Acta Odontol Scand* 2009; 18: 1-7
- Peric T, Markovic D. In vitro effectiveness of a chemo-mechanical method for caries removal. *Eur J Paediatr Dent* 2007; 8: 61-67

- Peters MC, Flamenbaum MH, Eboda NN, Feigal RJ, Inglehart MR. Chemomechanical caries removal in children: efficacy and efficiency. *J Am Dent Assoc* 2006; 137: 1658-1666; quiz 1729-1730
- Pilz W, Plathner CH, Taaz H. Die Hartgewebserkrankungen der Zähne. In *Grundlagen der Kariologie und Endodontologie*. Carl Hanser Verlag München, 1969
- Punwani IC, Anderson AW, Soh JM. Efficacy of Caridex in children and adults. *J Pedod* 1988; 12: 351-361
- Rafique S, Fiske J, Banerjee A. Clinical trial of an air-abrasion/chemomechanical operative procedure for the restorative treatment of dental patients. *Caries Res* 2003; 37: 360-364
- 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
- Roth KKF, Domnick E, Ahrens G. Untersuchungen über die Effektivität von Caridex bei der Kariesentfernung. *Dtsch Zahnärztl Z* 1989; 44: 463-465
- Roth KKF, Domnick E. Caridex oder Bohren? *Zahnärztl Mitt* 1989; 19: 2158-2162
- Sakae T, Mishima H, Kozawa Y. Changes in bovine dentin mineral with sodium hypochlorite treatment. *J Dent Res* 1988; 67: 1229-1234
- Sakoolnamarka R, Burrow MF, Swain M, Tyas MJ. Microhardness and Ca:P ratio of carious and Carisolv treated caries-affected dentine using an ultra-micro-indentation system and energy dispersive analysis of x-rays--a pilot study. *Aust Dent J* 2005; 50: 246-250
- Sato Y, Fusayama T. Removal of dentin by fuchsin staining. *J Dent Res* 1976 ; 55: 678-683
- Scheutzel P. Möglichkeiten und Grenzen des Caridex-Systems als Alternative zur herkömmlichen Kariesentfernung. *Dtsch Zahnärztl Z* 1989; 44: 612
- Schinichi K, Fusayama T. Recalcification of artificially decalcified dentin in vivo. *J Dent Res* 1967; 49: 1060-1065
- Schmidt HJ. Grundregeln für klinische Kariestests. *Zahnärztl Welt* 1966; 20: 774-778
- Schroeder HE. *Orale Strukturbiologie*, 4. überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1992: 114-218
- Schulz SD, Roth KF, Platzer U. Härtegrad verschiedener kariöser Schichten an Zähnen mit chronischer Dentinkaries. *Dtsch Zahnärztl Z* 1991; 46: 420-422
- Schutzbank SG, Marchwinski M, Kronman JH, Goldman M, Clark RE. In vitro study of the effect of GK-101 on the removal of carious material. *J Dent Res* 1975 ; 54 : 907
- Schutzbank SG, Galaini JM, Kronman JH, Goldman M, Clark RE. A comparative in vitro study of GK-101 and GK-101E in carious removal. *J Dent Res* 1978 ; 57: 861

- Scott PG. A major intermolecular cross-linking site in bovine dentine collagen involving the $\alpha 2$ chain and stabilizing the 4D overlap. *Biochem* 1980; 19: 6118-6124
- Sepet E, Bilir A, Akcin O, Aytepe Z. The effects of a caries-removing gel (Carisolv) on FM3A cell-line in vitro. *J Dent* 2004; 32: 213-218
- Shimizu C, Yamashita Y, Ichijo T, Fusayama T. Carious change of dentin observed on longspan ultrathin sections. *J Dent Res* 1981; 60: 1826-1831
- Sirin Karaarslan E, Yildiz E, Cebe MA, Yegin Z, Ozturk B. Evaluation of micro-tensile bond strength of caries-affected human dentine after three different caries removal techniques. *J Dent* 2012; 40 : 793-801
- Splieth C, Rosin M, Gellissen B. Determination of residual dentin caries after conventional mechanical and chemomechanical caries removal with Carisolv. *Clin Oral Investig* 2001; 5: 250-253
- Splieth M, Rosin M, Brecke T. Vergleich von chemisch-mechanischer Kariesentfernung mit Carisolv und der konventionellen Excavation. *Dtsch Zahnärztl Z* 1999; 54: 117-119
- Subramaniam P, Babu KL, Neeraja G. Comparison of the antimicrobial efficacy of chemomechanical caries removal (Carisolv) with that of conventional drilling in reducing cariogenic flora. *J Clin Pediatr Dent* 2008; 32: 215-219
- Tavares M, Soparkar PM, DePaola PF. Evaluation of a chemomechanical method of caries removal in root surface lesions. *Quintessence Int* 1988; 19: 29-32
- Timpl R. Struktur, Biosynthese und Immunologie des Kollagens. *Medizin in unserer Zeit* 1977; 1: 119-125
- Tonami K, Araki K, Mataka S, Kurosaki N. Effects of chloramines and sodium hypochlorite on carious dentin. *J Med Dent Sci* 2003; 50: 139-146
- Tsanova Sts, Tomov GT. Morphological changes in hard dental tissues prepared by Er: YAG laser (LiteTouch, Syneron), Carisolv and rotary instruments. A scanning electron microscopy evaluation. *Folia Med* 2010; 52: 46-55
- Wennerberg A, Sawase T, Kultje C. The influence of Carisolv on enamel and dentin surface topography. *Eur J Oral Sci* 1999; 107: 297-306
- Wirthlin MR. Acid-reacting stains, softening and bacterial invasion in human carious dentin. *J Dent Res* 1970; 49: 42-46
- Wolski KM, Goldman M, Kronman JH, Nathanson D. Dentinal bonding after chemomechanical caries removal - effect of surface topography. *Oper Dent* 1989; 14: 87-92
- Wu JJ, Woods PE, Eyre DR. Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding. *J Biol Chem* 1992; 267: 23007-23014

- Yamada Y, Hossain M, Kawanaka T, Kinoshita J, Matsumoto K. Removal effects of the Nd:YAG laser and Carisolv on carious dentin. *Clin Laser Med* 2000; 18: 241-245
- Yamada Y, Hossain M, Kimura Y, Masuda Y, Jayawardena JA, Nasu Y. Removal of organic debris from occlusal fissures: advantage of Carisolv system over sodium hypochlorite. *J Pediatr Dent* 2010; 35: 75-79
- Yamada Y, Hossain M, Suzuki N, Kinoshita JI, Nakamura Y, Matsumoto K. Removal of carious dentin by Er:YAG laser irradiation with and without Carisolv. *J Clin Laser Med Surg* 2001; 19: 127-131
- Yamada Y, Kimura Y, Hossain M, Kinoshita JI, Shimizu Y, Matsumoto K. Caries removal with Carisolv system: criteria evaluation and microleakage test. *J Clin Pediatr Dent* 2005; 30: 121-126
- Yamauchi M, Katz ER, Otsubo K, Teraoka K, Mechanic GL. Cross-linking and stereospecific structure of collagen in mineralized and nonmineralized skeletal tissues. *Connect Tiss Res* 1989; 21: 159-169
- Yazici AR, Atilla P, Ozgünaltay G, Müftüoğlu S. In vitro comparison of the efficacy of Carisolv and conventional rotary instrument in caries removal. *J Oral Rehab* 2003; 30: 1177-1182
- Yip HK, Beeley JA, Stevenson AG. Mineral content of the dentine remaining after chemomechanical caries removal. *Caries Res* 1995; 29: 111-117
- Yip HK, Stevenson AG, Beeley JA. The specificity of caries detector dyes in cavity preparation. *Br Dent J* 1994; 6: 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* 1995; 23: 197-204
- Young C, Bongenhielm U. A randomised, controlled and blinded histological and immunohistochemical investigation of Carisolv on pulp tissue. *J Dent* 2001; 29: 275-281
- Zimmer S. Kariesprophylaxe als multifaktorielle Präventionsstrategie. Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi für das Fach Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin, Humboldt-Universität zu Berlin; Charité, Campus Virchow-Klinikum, 2000
- Ziskind D, Kupietzky A, Beyth N. First-choice treatment alternatives for caries removal using the chemomechanical method. *Quintessence Int* 2005; 36: 9-14

7. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. S. Jepsen MS für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas, die Unterstützung und Hilfestellung und ebenso Herrn Prof. Dr. rer. nat. Y. Açil für die labortechnische Unterstützung, ohne die diese Arbeit sicherlich nicht zustande gekommen wäre.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. K.-H. Albers für die materielle Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. F. Härle möchte ich mich für die Möglichkeiten der Nutzung der wissenschaftlichen Laboratorien seiner Abteilung, darüber hinaus jedoch mehr noch für die großartige moralische Unterstützung und Hilfestellung in meiner Examenszeit sehr bedanken.

Auch bei Frau Otto bedanke ich mich für die große Unterstützung im Labor, bei Frau Benning für ihre unermüdlichen Bemühungen bei der Literaturrecherche und Frau Cieslak, im Medizinischen Dekanat der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, für die zuverlässigen und gewissenhaften Korrekturen.

Abschließend schulde ich all denjenigen Personen meinen herzlichen Dank, die in der Poliklinik der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, aber auch in den umliegenden freien Praxen Schleswig-Holsteins, sowie der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der städtischen Kliniken Oldenburg/Kreyenbrück unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. W. Petzel und seinem Op-Team für das fleißige Sammeln der extrahierten Zähne, die für die Versuche und Probengewinnung nötig waren.

Vielen herzlichen Dank!