Aus der

Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München Direktor: Prof. Dr. Falk Schwendicke



Bonding an Dentin – Ein experimenteller Vergleich zur Verbesserung und Konservierung der Verbundfestigkeit mithilfe natürlicher Inhaltsstoffe

> Dissertation Zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin An der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

> > Vorgelegt von Franz-Josef Schröter

> > > Aus Würzburg

> > > > Jahr 2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten:	Prof. Dr. DiplIng. Nicoleta Ilie
Zweites Gutachten:	Prof. Dr. Marioara Moldovan
Drittes Gutachten:	Priv. Doz. Dr. Felicitas Mayinger
Viertes Gutachten:	Priv. Doz. Dr. Uwe Baumert

Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	12. Mai 2025

Für Mama und Papa

Affidavit



Schröter, Franz-Josef

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Bonding an Dentin – Ein experimenteller Vergleich zur Verbesserung und Konservierung der Verbundfestigkeit mithilfe natürlicher Inhaltsstoffe

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 12. Mai 2025

Franz-Josef Schröter

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Inhaltsverzeichnis

Affida	vit	4
Inhalts	sverzeichnis	5
Abkür	zungsverzeichnis	7
Publik	ationsliste	8
Englise	chsprachige Originalarbeiten	8
Paper	1	8
Paper	П	8
1.	Ihr Beitrag zu den Veröffentlichungen	9
1.1	Beitrag zu Paper I	9
1.2	Beitrag zu Paper II	9
2.	Einleitung	10
2.1	Hintergrundinformationen	10
2.1.1	Grüntee-Extrakt	13
2.1.2	Tricalciumphosphat und Chitosan	13
2.1.3	Experimentelle Adhasive	14
2.1.4	Fragestellungen	14
2.2	Mothodik	10
2.3	Scher-Test	10
2.3.2	Pushout-Test	17
2.3.3	Fraktographische Analyse	18
2.3.4	Raster-Elektronenmikroskopie	18
2.3.5	Zellkultur und Zellviabilität	19
2.4	Statistik	20
3.	Zusammenfassung	22
3.1	Paper I	22
3.1.1	Ergebnisse	22
3.1.2	Schlussfolgerungen	24
3.2	Paper II	24
3.2.1		24
3.Z.Z	Schlussfolgerungen	25
4.	Abstract	26
4.1	Paper I	26
4.2	Paper II	26
5.	Paper I	28
6.	Paper II	29
7.	Literaturverzeichnis	41

Anhang A: Paper I	. 46
Anhang B: Paper II	. 49
Danksagung	. 54

Abkürzungsverzeichnis

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
E&R	Etch-and-Rinse
SE	Self-Etch
10-MDP	10-Methacryloyloxydecyl-Dihydrogen-Phosphat
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
CC	Cystein-Cathepsine
СНХ	Chlorhexidin
EGCG	Epigallocatechin-3-Gallat
ECG	Epicatechin-3-Gallat
GC	Gallocatechin
EC	Epicatechin
c-Faktor	Configuration-Factor
GTE	Grüntee-Extrakt
TCP	Tricalciumphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ехр	Experimentelles Adhäsiv
bis-GMA	bisphenol-A-Diglycidylmethacrylat
TEGDMA	Triethylenglycoldimethacrylat
HEMA	2-Hydroxyethyldimethacrylat
HGF	Humane Gingiva-Fibroblasten
CSE	Clearfil SE Bond
Ormocer	Organisch modifizierte Keramik
AF	Admira Fusion x-tra
mARI	modified Adhesive-Remnant-Index
FBS	Fötales Kälberserum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung
ANOVA	Einfaktorielle Varianzanalyse
MANOVA	Multivariate Varianzanalyse
η_p^2	Partielles Eta-Quadrat
m	Weibull Modul

Publikationsliste

Englischsprachige Originalarbeiten

Paper I

Schröter FJ, Moldovan M, Sarosi C, Ilie N.

Enhancing dentin bonding through new adhesives formulations with natural polyphenols, tricalcium phosphate and chitosan.

Dental Materials. 2023 Nov 21:S0109-5641(23)00477-3.

2022 Journal Impact Factor: 5,0

doi: 10.1016/j.dental.2023.11.014.

Paper II

Schröter FJ, Ilie N.

Pushout Bond Strength in Coronal Dentin: A Standardization Approach in Comparison to Shear Bond Strength.

Materials (Basel). 2023 Aug 17;16(16):5667.

2022 Journal Impact Factor: 3,4

doi: 10.3390/ma16165667.

1. Ihr Beitrag zu den Veröffentlichungen

1.1 Beitrag zu Paper I

Synthese Die experimentellen Materialien die der sowie Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) Analyse der verwendeten experimentellen Werkstoffe oblag den Koautoren Frau Professor Dr. Moldovan und Frau Dr. Sarosi. Die Administration des Projekts, das Entwerfen des Forschungskonzeptes und die Vorgabe der verwendeten Methodik sowie Bereitstellung der verwendeten Ressourcen wurde durch Frau Professor Dr. Ilie gewährleistet. Der Promovierende Franz-Josef Schröter arbeitete sich sowohl theoretisch, durch eine entsprechende Literaturrecherche, als auch praktisch, durch Übungsdurchläufe im mechanischen und biologischen Labor, in die Thematik ein, um anschließend die komplette Durchführung der mechanischen und biologischen Versuche bewerkstelligen zu können. Nach vollständiger Erhebung der notwendigen Messwerte oblag ihm die Auswertung, Analyse und Darstellung der Forschungsergebnisse in Form eines Manuskriptes, welches nach enger Absprache mit der Betreuungskommissionsvorsitzenden zur Publikation eingereicht wurde. Im Rahmen des Publikationsprozesses adressierte der Promovierende die Anmerkungen der Reviewer und führte erneut in enger Absprache mit Frau Professor Dr. Ilie Anpassungen entsprechend den Vorschlägen der Reviewer durch, was letzten Endes in der Publikation der Forschungsarbeit resultierte.

1.2 Beitrag zu Paper II

Erneut oblag die Betreuung des Projektes inklusive der Administration, Konzeptualisierung und Bereitstellung der notwendigen Ressourcen der Betreuerin Frau Professor Dr. Ilie. Nach ausgiebiger Literaturrecherche erfolgte in enger Absprache beider Autoren der Entwurf der Methodik. Die Durchführung der Experimente, Erhebung der Datensätze, Analyse und Darstellung in Form und Schrift geschah erneut durch Herrn Franz-Josef Schröter. Nach Entwurf des initialen Manuskriptes durch den Promovierenden, wurde die Forschungsarbeit in Rücksprache beider Autoren durch Korrekturen zur Publikationsreife gebracht und eingereicht. Die Adressierung der Reviews erfolgte wieder durch Herrn Schröter, der nach Rücksprache mit Frau Professor Dr. Ilie die notwendigen Anpassungen des Manuskriptes vornahm, was letztlich in der Publikation der Forschungsdaten endete.

2. Einleitung

2.1 Hintergrundinformationen

Der Verhinderung und Therapie kariöser Läsionen kommt bis heute eine große Bedeutung im klinischen Alltag eines jeden Zahnmediziners zu. Diese Tätigkeit reicht von der Prophylaxe im Rahmen einer regelmäßigen Kontrolluntersuchung mit einhergehender Zahnreinigung, über die Therapie initial kariöser Läsionen bis hin zum Ersatz teilweise erheblicher Schmelz- und Dentin-Defekte mittels Füllungstherapie oder prothetischer Überkronung. Dabei steht die Befestigung eben genannter Füllungen im Zentrum vieler Forschungsarbeiten, die sich mit der Effizienzsteigerung als auch der Verbesserung des Überlebens solcher Füllungen beschäftigen.

Erste Versuche der Haftvermittlung zwischen Füllungsmaterial und Zahnhartsubstanz wurden bereits 1955 vollzogen, als ein separater Ätz-Schritt die Haftung zum Zahnschmelz verbessern konnte, wofür damals noch eine chemische Oberflächenveränderung verantwortlich gemacht wurde [1]. Ein Jahrzehnt später wurde daraufhin elektronenmikroskopisch visualisiert, dass das flüssige Monomer in die geätzte Schmelzoberfläche penetriert, darin polymerisiert und demnach mehr einen mechanischen, statt eines chemischen, Verbundes schafft [2]. Auf Grundlage dieser Forschung wurden beginnend mit der Glycerol-Phosphat-Dimethacrylat enthaltenden ersten Generation bis heute insgesamt acht Generationen von Adhäsivsystemen entwickelt, die sich in ihrer Herangehensweise bezüglich der Haftvermittlung zur Zahnhartsubstanz unterscheiden [3].

Grob unterschieden werden sogenannte *Etch-and-Rinse-* (E&R) und *Self-Etch-*Systeme (SE). Die E&R-Systeme basieren hierbei auf den Schritten der separaten Säureätzung, dem Auftragen eines Primers und abschließend eines Adhäsivs. Eine Phosphorsäure mit einer Konzentration von 35-37% dient hierbei der vollständigen Entfernung der Schmierschicht, welche während der Bearbeitung der Zahnhartsubstanz mit rotierenden Instrumenten entsteht, Demineralisation der Zahnoberfläche und Freilegung von Kollagenfibrillen [4]. Zusätzlich werden hierbei Bakterien innerhalb des *caries-affected* Dentins abgetötet [5]. Das Auftragen eines hydrophilen Primers dient der Infiltration der durch die Säureätzung entstandenen demineralisierten, aber weiterhin hydrophilen Oberfläche und weiter das Bilden einer Brücke zwischen hydrophiler Zahnhartsubstanz und hydrophoben Schmelz-Dentin-Adhäsiv. Dieses wiederum bindet am Füllungskomposit [4]. Obwohl eine Kombination von Primer und Adhäsiv zu einem Wirkstoff, also eine Reduktion des 3-schrittigen (4. Generation) zu einem 2-schrittigen (5. Generation) Systems, mit einer geringeren Beständigkeit des Verbunds einherging [6], zeigte sich dennoch ein klarer Trend hin zu einer Reduktion der notwendigen Schritte zur Etablierung eines verlässlichen Verbunds zwischen Zahn und Komposit, was in die Entstehung der SE-Systeme mündete.

In Anlehnung an die E&R-Systeme benötigen SE-Systeme keine separate Säureätzung, sind Anwender-freundlicher, was reduzierte Anwendungsdauer durch weniger Schritte der Nutzung beinhaltet, sind weniger techniksensibel, also leichter zu handhaben, und zeigen eine geringere Inzidenz von postoperativen Hypersensibilitäten. Grundlegender Unterschied der SE-Systeme zu den E&R-Systemen besteht darin, dass sie keinen separaten Ätzschritt benötigen, um die Dentinoberfläche zu demineralisieren, da sie bereits im Vornherein saure Monomere beinhalten. Üblicherweise kommen hierbei 2-schrittige (7. Generation) oder 1-schrittige (8. Generation) Adhäsive zum Einsatz [3, 7]. Dabei demineralisieren und infiltrieren die Monomere die Zahnhartsubstanz gleichzeitig, wenn auch nicht immer zu identischem Ausmaße [8]. Weiter unterschieden wird zwischen ultra-milden (pH \geq 2,5), milden (pH \approx 2), mittelstarken (pH 1-2) und starken (pH < 1) SE-Adhäsiven, die abhängig von der Stärke ihrer Säure unterschiedlich tief mit der Zahnhartsubstanz interagieren und dabei nur die starken Säuren in der Lage sind, typische Harzausläufer, sogenannte *resin-tags*, zu bilden [7]. Neben der dadurch verursachten mikromechanischen Verankerung am Zahn, ist eine zusätzliche chemische Bindung zum Zahn, wie sie bspw. durch 10-Methacryloyloxydecyl-Dihydrogen-Phosphat (10-MDP) entsteht, in der Lage die Verbundfestigkeit zusätzlich zu stärken [9]. Hierbei wird Calcium aus dem Hydroxylapatit des Zahns gelöst, welches mit dem Phosphat des 10-MDP's (und anderen Phosphat enthaltenden Monomeren) ein stabiles Salz bildet, das in der Folge die häufig dokumentierte verbesserte Verbundfestigkeit verursacht. Hierbei zeigt sich 10-MDP als der dafür potenteste Wirkstoff [10]. Jedoch handelt es sich bei 10-MDP auch nicht um ein Wundermittel, da auch dieses anfällig für Hydrolyse-bedingte Veränderung des Verbunds zum Zahn ist [11].

Trotz der eben beschriebenen, kontinuierlichen Weiterentwicklung dentaler Adhäsivtechnik bleiben die Herausforderungen und Probleme, die ein zufriedenstellender Verbund zur Zahnhartsubstanz mit sich bringt, weiter Gegenstand der Forschung. Neben der unterschiedlichen Zusammensetzung von Zahnschmelz, der zu 93-98 gew.-% aus anorganischen Verbindungen, wie ortsabhängig bspw. Hydroxylapatit, fluoridiertes Hydroxylapatit oder Fluorapatit, zu 1,5-4 gew.-% aus Wasser und dem Rest aus organischen Material, wie Proteinen oder Lipiden, besteht, und Zahnbein (Dentin), welches demgegenüber zu 70 gew.-% aus anorganischem (größtenteils Calcium und Phosphat), 20 gew.-% aus organischem Material – vorwiegend Kollagen Typ 1 [12] – und zu den restlichen 10% aus Wasser besteht [4] sowie dem Umgang mit der Schmierschicht, welche durch rotierende Abtragung von Zahnhartsubstanz entsteht [13], spielen die Hydro- sowie Kollagenolyse innerhalb der Hybridschicht, einer Interdiffusionszone zwischen organischer Dentinmatrix und infiltrierendem Adhäsiv-Monomer [14], eine große Rolle für die Stabilität des Verbundes zwischen Füllungswerkstoff und Zahnhartsubstanz über die Lebensdauer einer Füllung hinweg [15, 16].

Ebendiese Kollagenolyse des Dentins innerhalb der Verbundzone, der eben beschriebenen Hybridschicht, wird maßgeblich durch endogene Proteinasen gesteuert [17]. Hierbei handelt es sich um insgesamt 23 bekannte, endogene Matrix-Metalloproteinasen (MMP), welche in der Lage sind Kollagen, Proteoglykane und andere Proteine der Extrazellulärmatrix zu verstoffwechseln [18] und sich zum Teil innerhalb der Extrazellulärmatrix des Zahnbeins befinden [19, 20]. Dabei handelt es sich im Wesentlichen um die im Dentin aktiven Typen MMP-2, -3, -8, -9 und -20 [19-22], neben denen sich auch Cystein-Cathepsine (CC) finden lassen, die in der Aktivierung der MMP eine Rolle spielen [23]. Diese Proteasen liegen als inaktive Proenzyme vor, bei denen das in der Prodomäne befindliche Cystein eine Brücke zum katalytischen Zink-Ion bildet und dadurch die Aktivität des Enzyms verhindert; auch bekannt als der Cysteine-Switch [24]. Wird diese Prodomäne abgespalten, sei es proteolytisch oder chemisch, werden die MMP aktiviert [18] und das Kollagen verstoffwechselt. Dies geschieht durch Hydrolyse der Peptidbindungen des Kollagens, wofür die Kollagenhelix zunächst entwunden werden muss und dafür zwei mögliche, zugrundeliegende Mechanismen diskutiert werden: bestimmte MMP, die sog. Kollagenasen, wie bspw. MMP-1, sind in der Lage die Kollagenhelix selbst zu entwinden [25], oder das C-terminale Telopeptid muss zunächst proteolytisch abgespalten werden, um den MMP das Entwinden überhaupt erst zu ermöglichen [26], was alles im Endeffekt in der Degradation der Hybridschicht mündet.

In der jüngsten Entwicklung dentaler Adhäsive sind diese MMP zentraler Gegenstand der Forschung, genauer gesagt die Blockade oder Inhibition ebendieser, um den Abbau des Kollagens und der damit einhergehenden Verschlechterung des Verbunds zwischen Dentin und Füllungswerkstoff, zu verlangsamen oder gar zu stoppen [27]. Hierbei haben sich verschiedene Herangehensweisen als nützlich erwiesen: das Auftragen bioaktiver Moleküle, wie Chlorhexidin (CHX) [28], Glutaraldehyd [29], Proanthocyanidin [30] und anderer Polyphenole [31], das Inkorporieren der MMP-Inhibitoren in die nachfolgend abgespülte Säure [32], den Primer [33] oder das Adhäsiv [34] oder aber auch dem water-wet-bonding und ethanol-wet-bonding [35]. Während CHX als der meist erforschteste MMP-Inhibitor gilt [36] und Glutaraldehyd zytotoxische Auswirkungen zeigte [37], hat die Erforschung von Catechinen, wie zum Beispiel Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG), Epicatechin-3-Gallat (ECG), Gallocatechin (GC) oder Epicatechin (EC), zunehmende Aufmerksamkeit gewonnen, da sie zum Einen das Potential der MMP-Inhibition zeigen [38] und aufgrund ihres natürlichen Ursprungs aus Camellia sinensis eine herausragende Biokompatibilität aufzuweisen scheinen [39]. Darüber hinaus ist insbesondere Teil moderner Krebsforschung [40], da dem natürlichen Polyphenol eine EGCG antiinflammatorische [41], antioxidative [42] und pro-apoptotische [43] und damit in Summe antikanzerogene Wirkung nachgesagt wird [40]. Im Zentrum der Anwendung solcher Collagen-Crosslinker und MMP-Inhibitoren steht die Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften des Dentins [44], die Verbesserung und der Erhalt der Verbundfestigkeit [45], die Stärkung der Widerstandsfähigkeit gegenüber proteolytischem Zerfall [46] bei durchgehend geringer Toxizität [47]. Ein natürliches Doping des Füllungsverbundes – ohne Nebenwirkungen.

Angesprochene Verbundfestigkeiten werden im Rahmen der Forschung dentaler Adhäsive hauptsächlich durch zwei verschiedene Testmethoden ermittelt: dem Scher-Test und dem Zugversuch. Weiter unterschieden werden diese abhängig von der Verbundoberfläche in Makro (> 3 mm²) und Mikro (< 3 mm²), wobei sich der Mikro-Zugversuch und der Makro-Scher-Test als die am häufigsten angewandten Testmethoden etabliert haben [48]. Ersterer, en Detail beschrieben durch die Academy of Dental Materials [49], macht sich der Vorteile einer effektiven Nutzung der begrenzt zur Verfügung stehenden Zahnhartsubstanz zunutze und zeigt ein überwiegend adhäsives Bruchmuster, ist jedoch aufgrund der durch die geringe Prüfkörpergröße schnell stattfindenden Dehydratation fehleranfällig und außerdem technisch anspruchsvoll [50], was sich in der Häufigkeit der prä-Testfehler, abhängig von der gebundenen Zahnhartsubstanz (Schmelz bis zu 35,4%, Dentin bis zu 18,2%), widerspiegelt [51]. Hierbei führen bereits kleinste Unregelmäßigkeiten zu prä-Testfehlern, über welche zu häufig nicht berichtet wird [52]. Daneben steht der Makro-Scher-Test, standardisiert durch die ISO Norm 29022, bei dem auf eine flach geschliffene Oberfläche ein Komposit-Aufbau in orthogonaler Ausrichtung befestigt wird [53]. Im Vergleich zum Mikro-Zugversuch ist hierbei die Klebefläche größer, der fertige Verbund bedarf keiner weiteren Manipulation durch Sägen in Sticks oder sanduhrförmiges Trimmen ebendieser und die Versuchsdurchführung ist weiterhin einfach und schnell durchführbar [48]. Jedoch ist dieser nur bedingt auf die klinische Realität übertragbar, da eine komplett plane Fläche unter klinischen Bedingungen unrealistisch erscheint. Demzufolge ist der sogenannte configurationfactor (c-Faktor), ein klinisches Maß für das Verhältnis von gebundener zu ungebundener Oberfläche einer Füllung, der mit verantwortlich für die Entstehung von Stress während der Schrumpfung durch die Lichtpolymerisation von Füllungskompositen ist [54], nur bedingt auf die in-vitro Situation anwendbar. Außerdem, der Konfiguration des Scher-Tests geschuldet, konzentriert sich eine unverhältnismäßig große Kraft im Bereich der Zugzone, welche unmittelbar dem Bereich der applizierten Scherkraft durch die Guillotine angrenzt [55, 56], was zu einer Häufung von Brüchen außerhalb der Adhäsivschicht führt, die eine exakte Kalkulation der Verbundfestigkeit nicht gestatten [57] und damit eigentlich nicht berücksichtigt werden dürften [58].

2.1.1 Grüntee-Extrakt

Allgemeinhin bekannt als ein gern getrunkenes Heißgetränk, hat die Pflanze Camellia Sinensis neben ihrem Wohlgenuss auch eine tatsächliche Wirkung. Das Extrakt der Pflanze, im Folgenden als Grüntee-Extrakt (GTE) bezeichnet, zeigt in der medizinischen Forschung angewandt unter anderem antiinflammatorische, antikanzerogene, pro-apoptotische und antioxidative Funktionen sowohl in-vitro als auch in-vivo [59-61]. Da es sich hierbei um einen natürlich vorkommenden Inhaltsstoff handelt, weist dieser zudem eine gute Biokompatibilität auf [39]. Außerdem wurde in diesem Rahmen herausgefunden, dass Bestandteile des Grüntees ebenfalls MMP inhibitorische Wirkungen haben [38], woraufhin es in die Erforschung dentaler, bioaktiver Substanzen implementiert wurde [31]. Der grüne Teil der Pflanze Camellia Sinensis enthält einen beachtlichen Anteil an Catechinen, wie EGCG, ECG, GC und EC, welche zu den pflanzlichen Polyphenolen, genauer gesagt den Flavan-3-olen aus der Gruppe der Flavonoide zählen [62]. Im Rahmen der Forschung zur Kollagenolyse und Kariesprogression wurde eine hohe Aktivität der Subtypen MMP-2, -8 und -9 gefunden [63, 64]. Infolgedessen steht unter anderem EGCG im Fokus, da es sowohl die Genexpression der Gelatinasen MMP-2 und -9 dosisabhängig inhibiert [65, 66] und damit auch ihre Aktivität deutlich reduziert [38, 67-69], was die zeitlich bedingte Degradation des Verbunds abschwächt, die Verbundfestigkeit dadurch aufrechterhält und sogar das Potential bietet, die Zytotoxizität eines dentalen Adhäsivs zu reduzieren [70]. Nebenbei sei zudem erwähnt, dass man der Kombination mehrerer Catechine, wie bspw. in einem vollkommenen GTE, eine kumulative Wirkung in der Krebsprävention nachsagt [71], was die Vermutung nahe legt, dass dies womöglich auch für dentale Adhäsive von Nutzen sein könnte.

2.1.2 Tricalciumphosphat und Chitosan

Tricalciumphosphat (TCP) ist Teil der im dentalen Feld angewandten Biomaterialien und findet aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zur chemischen Zusammensetzung des Hydroxylapatits Anwendung in der Forschung der restaurativen Zahnheilkunde [72]. Nachdem einige anorganische Füllstoffe vielversprechende Verbesserungen dentaler Adhäsive gezeigt haben [73], wird TCP gerne zur Verbesserung der Verbundfestigkeit und Remineralisation der Zahnhartsubstanz angewandt [74-76]. Die Haftvermittlung stellt im Grunde genommen einen Austausch anorganischer Substanz gegen synthetisches Harz des aufgetragenen Adhäsivs dar. Dabei werden Calciumphosphate aus der Zahnhartsubstanz herausgelöst, was Poren hinterlässt, in die im Anschluss das Adhäsiv infiltriert [77]. Während ein Vorteil von SE-Adhäsiven eigentlich darin liegt, dass sie simultan demineralisieren und infiltrieren, sodass das demineralisierte Dentin in der Theorie vollständig penetriert wird [7], gibt es Hinweise darauf, dass dies nicht immer der Fall ist [8], sodass TCP also an genau diesem Punkt ansetzen und als ein potenzielles Calciumphosphat-Depot dienen könnte, um die Achillesferse des Verbunds durch oben angesprochene Remineralisation zu bedecken. Darüber hinaus erweist sich TCP auch noch als sehr biokompatibel [78], was dem Biokompatibilitätsanspruch der hier vorliegenden Arbeit weiter zuträglich ist.

Chitosan auf der anderen Seite ist ein natürliches Biopolymer, welches durch Deacetylierung von Chitin entsteht und streng genommen ein Polyaminosaccharid ist [79]. In der modernen Zahnheilkunde gerne angewandt, fungiert es unter anderem als antimikrobieller Wirkstoff, als Wirkstofftransporter, unterstützend in der restaurativen Zahnheilkunde zur Verbesserung der Haftkraft von Glasionomerzementen oder zur Remineralisation von Zahnschmelz [80]. Eine plausible Erklärung für die antimikrobielle Wirkung [81] ist die elektrostatische Wechselwirkung der Aminogruppen des Chitosans mit negativ geladenen Bestandteilen der bakteriellen Zellwand

[82, 83]. Karies entsteht aus einem Zusammenspiel von Demineralisation der Zahnhartsubstanz und oralem Biofilm, der unter anderem das Bakterium *Streptococcus mutans* enthält [84]. *Streptococcus mutans* ist darüber hinaus auch maßgeblich an der Entstehung von Sekundärkaries, i.e. Karies am Füllungsrand, beteiligt [85], dessen Aktivität durch das Vorhandensein von Chitosan maßgeblich eingeschränkt wird [86]. Des Weiteren ist Chitosan in der Lage, vergleichbar mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA), die durch Beschleifen der Dentinoberfläche entstandene Schmierschicht durch Chelation effektiv zu entfernen [87, 88]. Darüber hinaus wird auch Chitosan als natürliches Biopolymer für seine exzellente Biokompatibilität gelobt [80, 89, 90].

Letztlich lag die Idee der Integration beider Wirkstoffe in das experimentelle Adhäsiv darin, die durch TCP mögliche Remineralisation der Zahnhartsubstanz und die antimikrobiellen sowie Schmierschicht-entfernenden Eigenschaften des Chitosans zu nutzen, um den Verbund des Adhäsivs und damit der Füllung zur Zahnhartsubstanz nachhaltig zu stärken und mögliche Mängel des Verbunds zu beseitigen.

2.1.3 Experimentelle Adhäsive

Zum Testen der Einflüsse auf Verbundfestigkeit und Zytotoxizität o.a. Inhaltsstoffe wurden insgesamt vier experimentelle Adhäsive entwickelt, deren Zusammensetzung in Tabelle 1 näher dargestellt ist.

Name	GTE	TCP + Chitosan	Sonstiges
Ехр. 1.1	9,38 gew%	-	Bis-GMA, TEGDMA, HEMA, Polyacrylsäure, Initiatoren
Exp. 1.2	-	-	Bis-GMA, TEGDMA, HEMA, Polyacrylsäure, Initiatoren
Exp. 2.1	9,38 gew%	4,7 gew%	Bis-GMA, TEGDMA, HEMA, Polyacrylsäure, Initiatoren
Exp. 2.2	-	4,7 gew%	Bis-GMA, TEGDMA, HEMA, Polyacrylsäure, Initiatoren

Tabelle 1: Chemische Zusammensetzung der verwendeten experimentellen Adhäsive entsprechend den Herstellerangaben. Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [91].

Abkürzungen: GTE = Grüntee-Extrakt, TCP = Tricalciumphosphat, bis-GMA = bisphenol-A-Diglycidylmethacrylat, TEGDMA = Triethylenglycoldimethacrylat, HEMA = 2-Hydroxyethyldimethacrylat

2.1.4 Pushout-Test

Die Ursprünge des Pushout-Tests liegen im Jahre 1970, erstmalig als Extrusionstest bezeichnet, als Stempel verschiedener Durchmesser verwendet wurden, um – in Analogie zum mastikatorischen Zyklus – zylinderförmige Aufbauten aus einer Scheibe zu pressen [92]. Seither weiterentwickelt, wird seine Anwendung zur Messung der Retention zwischen Glasfaserstiften und Wurzeldentin empfohlen [93]. Dabei sieht der Ablauf des Tests folgendermaßen aus: der

Wurzelkanal Zähne meist einwurzeliger wird analog zur endodontologischen Wurzelkanalbehandlung mit Feilen verschiedener Taper aufbereitet. Entscheidend für die Konfiguration der Kavitätenwand ist hierbei neben der Feilendicke auch die Beschaffenheit des Wurzelkanals, was Form und Krümmung des Kanals miteinschließt. Nach Aufbereitung folgt die Füllung des Wurzelkanals mit Guttapercha und nachfolgend die Versorgung durch bspw. einen Glasfaserstift. Ist der Wurzelkanal gefüllt, wird dieser entsprechend seiner Längsachse horizontal dazu gesägt, um Scheiben einer vorab definierten Dicke zu erhalten, die im Optimalfall zentral mit Wurzelfüllmaterial gefüllt sind. Diese Scheibe wird auf der Testvorrichtung fixiert und entsprechend der Zylinderform zur Seite des breiteren Durchmessers hin extrudiert. Der Punkt der maximalen Kraft, gemessen unmittelbar vor Bruch des Prüfkörpers, repräsentiert die notwendige Kraft, um den Verbund zu lösen. Die gemessene Kraft F_{Max} [N] wird durch die Verbundfläche (Mantelfläche parallelwandiger Zylinder $A = 2 \times \pi \times r \times h$) geteilt, was in der Verbundfestigkeit [MPa] resultiert [94].

Kritik erntet der Test aufgrund seiner nicht standardisierten Konfiguration, da Parameter, wie etwa der Stempeldurchmesser oder die Prüfkörperdicke, nicht einheitlich vorgegeben sind, die Ergebnisse jedoch maßgeblich beeinflussen [95]. Es existiert eine große Variation in den Test-Konfigurationen des Pushout-Tests, sodass der Ruf nach einem standardisierten Testverfahren, wie es für den Mikro-Zugversuch [49] oder Scher-Test [53] bereits existiert, groß ist. Des Weiteren ist es aufgrund der individuellen Wurzelkanalmorphologie unmöglich, einheitliche Prüfkörper herzustellen und damit gleichbleibende Testbedingungen zu schaffen [96], weshalb sich das Testverfahren bisher nicht als universelle Testmethode etabliert hat [48].

Jedoch ist der Test in puncto c-Faktor durchaus näher an der klinischen Realität als der etablierte Scher-Test. Wie bereits erwähnt, beschreibt der c-Faktor das Verhältnis von gebundener zu ungebundener Fläche einer Zahnfüllung und ist ein Maß für die Spannung, die durch die Schrumpfung während der Polymerisation eines Füllungskomposits entsteht [54]. Bei der Polymerisation, bspw. induziert durch eine Hochleistungspolymerisationslampe, zerfallen die im Komposit enthaltenen Initiatoren in energiereiche Moleküle, die mit den Doppelbindungen der funktionellen Monomere (wie z.B. bis-GMA, TEGDMA, HEMA et cetera) reagieren und diese zu Polymerketten verknüpfen. Abhängig von der Kettenlänge der unpolymerisierten Monomere findet durch die dreidimensionale Orientierung zu Polymeren eine Verdichtung des Werkstoffs statt, was im Endeffekt in einer Volumenschrumpfung resultiert. Diese sogenannte Polymerisationsschrumpfung liegt bei modernen Materialien zwischen 1-3 Vol.-%. Die durch die Schrumpfung entstehende Spannung an der Verbundfläche kann zu Rissen an der Kompositoberfläche oder Randspaltbildung an der Restaurationsgrenze führen [4]. Dabei entwickelt sich der angesprochene Schrumpfungsstress sowohl langsamer, als auch in der Summe geringer, je kleiner der c-Faktor einer solchen Restauration ist [54]. Wie bereits in anderen Arbeiten, welche näher auf das Thema c-Faktor eingehen, beschrieben, erreicht dieser bspw. einen Wert von circa 1,7 im Pushout-Test und von etwa 0,2 im Scher-Test [97]. Da ein solches Verhältnis der Oberflächen, wie es im Scher-Test der Fall ist, klinisch unmöglich zu erreichen ist, liegt der c-Faktor des Pushout-Tests deutlich näher an der klinischen Praxis, was ihn in der Theorie dazu qualifiziert, eine höhere Vorhersagekraft der realistischen Leistung dentaler Adhäsive zu haben, als der Scher-Test.

2.2 Fragestellungen

Besonderheit der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von insgesamt vier experimentellen Adhäsiven im hauseigenen Labor, inklusive aller ihrer Bestandteile. Des Weiteren wurden GTE, TCP und Chitosan vorab, d.h. während der Herstellung, in das Adhäsiv integriert, was ein vorheriges Auftragen auf die Zahnoberfläche oder das Vermischen mit vorbestehenden Adhäsivsystemen, wie es häufig in der Literatur beschrieben ist, überflüssig macht.

Zentrale Fragestellungen der ersten Publikation waren der Einfluss von GTE allein und in Kombination mit TCP und Chitosan auf die im Scher-Test gemessene Verbundfestigkeit nach 24 h sowie nach einer artifiziellen Alterung von sechs Monaten in künstlichem Speichel und bei Körpertemperatur. Außerdem wurde geprüft, ob die vorliegenden experimentellen Werkstoffe einen toxischen Effekt auf humane Gingiva-Fibroblasten (HGF) zeigen, was mithilfe einer farboptischen Messung ermittelt wurde.

Ziel der zweiten Veröffentlichung war die Entwicklung eines standardisierten sowie reproduzierbaren Pushout-Testprotokolls, um zum einen eine gleichbleibende Prüfkörper- bzw. Kavitäten-Geometrie zu schaffen und zum anderen einen möglicherweise ebenfalls geeigneten Test zur Messung der Verbundfestigkeit dentaler Adhäsive zu finden, der in seiner Konfiguration theoretisch näher an der klinischen Realität ist, als seine etablierte Konkurrenz in Scher-Test und Mikro-Zugversuch.

2.3 Methodik

Zur Prüfkörperherstellung im Rahmen beider Studien wurden extrahierte, intakte, kariesfreie, humane dritte Molaren, ergo Weisheitszähne, verwendet, welche a priori in einer 0,2% Natriumazid-Lösung bei Raumtemperatur nicht länger als drei Monate gelagert wurden. Zur Teilung der Zähne wurde eine diamantierte Säge (IsoMet, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) verwendet. Das Bonding Prozedere folgte einem strikten Protokoll: Nach Trockenlegung der Zahnoberfläche wurde der kommerzielle, selbstätzende Primer des verwendeten Goldstandard Adhäsivs CSE (Clearfil SE Bond; Kuraray Noritake Dental Inc., Kurashiki, Japan) mithilfe einer Microbrush für 20 s unter langsamen Einreibebewegung auf dem exponierten Dentin appliziert und anschließend durch sanften Luftdruck gleichmäßig verblasen, bis keine Bewegung der Flüssigkeit mehr sichtbar war. Es erfolgte analog die Applikation der Bonding-Flüssigkeit der jeweiligen Adhäsive (CSE, Exp. 1.1 - 2.2) für 20 s, das Verblasen und die abschließende Lichthärtung für 10 s mit einer Hochleistungspolymerisationslampe (Bluephase® Style, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) mit einer Intensität von 1544 ± 207 mW/cm² und einem Lichtaustrittsfenster von 10 mm Durchmesser. Bei dem im Bulk-Fill Verfahren angewandten Füllungskomposit handelte es sich um eine organisch modifizierte Keramik (Ormocer) mit geringschrumpfenden Eigenschaften und einer notwendigen Belichtungszeit von 20 s namens Admira Fusion x-tra (AF; VOCO GmbH, Cuxhaven, Deutschland), welcher entsprechend den Herstellerangaben verwendet wurde. Nach Herstellung der Prüfkörper wurden diese in künstlichem Speichel mit einem pH-Wert von 6,9 und einer Zusammensetzung aus 1,2 g Kaliumchlorid, 0,84 g Natriumchlorid, 0,26 g di-Kaliumhydrogenphosphat und 0,14 g Calciumchlorid-Dihydrat auf 1.000,0 g Wasser bei 37°C in einem Thermalofen entsprechend dem Alterungszeitraum gelagert.

2.3.1 Scher-Test

Insgesamt wurden 39 Weisheitszähne benötigt, um summa summarum 200 Scher-Test Prüfkörper – aufgeteilt in insgesamt zehn Gruppen – herzustellen. Um eine ebene Dentinoberfläche zu erhalten wurden die Zähne zunächst horizontal oberhalb des Pulpenkavums geteilt. Je nach Zahngröße wurden daraufhin beide Teile in jeweils bis zu vier Stücke gesägt, was maximal acht Fragmente pro Zahn ergab. Diese wurden anschließend mit nach oben exponiertem Dentin in einem Methacrylat-Harz (Technovit 4004, Kulzer, Hanau, Deutschland; Pulver LOT K010164; Flüssigkeit LOT K010108) eingebettet und weiter mit einer Körnung von P1200 geschliffen, um eine artifizielle Schmierschicht am exponierten Dentin zu generieren. Daraufhin folgte die Applikation der dentalen Adhäsive entsprechend dem oben beschriebenen Protokoll. Der in beiden Publikationen verwendete Versuchsaufbau orientiert sich an der ISO-Norm 29022 [53]. Diese gibt die zur Prüfkörperherstellung notwendige Klemmvorrichtung (Bonding Clamp, ISO 29022, Ultradent Products, South Jordan, UT, USA) und Matrize (Bonding Mold Insert, ISO 29022, Ultradent Products, South Jordan, UT, USA) vor. Weiterhin wurde die Matrize durch einen Schnitt zweigeteilt, um ein nach der Prüfkörperherstellung erfolgendes Entfernen der Matrize möglichst ohne Irritation des Verbunds zu gewährleisten. Im Anschluss an die Herstellung wurden die Prüfkörper unmittelbar entsprechend den obigen Angaben gelagert und nach Ablauf der Alterung in horizontaler Ausrichtung in einer universellen Prüfmaschine (Z2.5, Zwick/Roell, Ulm, Deutschland) montiert. Die Modifikation der ISO-Norm lag in der Verwendung der Guillotine, wo statt der durch die ISO-Norm vorgegebenen zentral eingekerbten Guillotine (Notched-Edge Shear-Blade, ISO 29022, Ultradent Products, South Jordan, UT, USA) eine mit geradliniger Kante verwendet wurde. Die Vorschubgeschwindigkeit betrug 0,5 mm/min und erfolgte bis zum Bruch des Prüfkörpers. Die maximale Kraft FMax [N] bei Bruch des Prüfkörpers wurde gemessen und durch die individuelle Bondingfläche eines jeden Prüfkörpers geteilt, um die Verbundfestigkeit [MPa] zu erhalten [91].

2.3.2 Pushout-Test

Zum Finden einer reproduzierbaren Herstellungsmethode wurden Zähne in vertikaler Richtung in $1 \pm 0,1$ mm dicke Scheiben geschnitten. Um eine Austrocknung der grazilen Zahnscheiben weitestgehend zu verhindern, wurden diese durchgehend in destilliertem Wasser gelagert und lediglich zur Bearbeitung und Konditionierung entnommen. Um die Kavität zu schaffen, wurden die Zahnscheiben in einer vertikalen Bohrmaschine (Degussa Dental GmbH, Hanau, Deutschland) fixiert und orthogonal zur Dentinoberfläche unter sanftem Druck und durchgehender Wasserkühlung gebohrt. Hierbei wurde sichergestellt, dass sich die Bohrung innerhalb des Dentins mit einem Abstand von > 1 mm zu den Rändern des Pulpenkavums und der Schmelz-Dentin-Grenze befindet. Zur Bohrung wurde ein parallelwandiger, diamantierter Torpedo (Komet Dental, Lemgo, Deutschland) mit einem Durchmesser von 1,4 mm und einer durchschnittlichen Korngröße von 107 µm verwendet, wodurch gleichzeitig die notwendige Schmierschicht entstanden ist. Die Kavitätenoberfläche wurde entsprechend der Formel für Mantelflächen parallelwandiger Zylinder ($A = 2 \times \pi \times r \times h$) berechnet, wobei A für die Mantelfläche, r für den Radius der Bohrung und h für die Dicke der Zahnscheibe stand. Die Dimensionen von Zahnscheibendicke und Bohrungsradius wurden entsprechend der Verbundoberflächen der Scher-Test-Prüfkörper gewählt, um einen möglichst detailgetreuen Vergleich zu ermöglichen. Im Anschluss an die Bohrung wurden die Prüfkörper entsprechend dem o.a. Protokoll konditioniert, mittels Bulk-Fill-Verfahren gefüllt, polymerisiert und für 24 h wie beschrieben gelagert. Die Testung der Prüfkörper fand ebenfalls in der universellen Prüfmaschine mit einer Vorschubgeschwindigkeit von 0,5 mm/min statt. Hierfür wurde ein stählerner Stempel mit einem Durchmesser von 1,2 mm (optisch kontrolliert mit 2,4-facher Vergrößerung) zentral auf der mit Komposit gefüllten Kavität positioniert und der Prüfkörper bis zum Bruch belastet. Die maximal gemessene Kraft F_{Max} [N] wurde durch die individuelle Verbundoberfläche A geteilt, um die Verbundfestigkeit [MPa] zu errechnen [98].

2.3.3 Fraktographische Analyse

Die fraktographische Analyse beschreibt die lichtmikroskopische Beurteilung der Bruchmuster eines nach Belastung frakturierten Prüfkörpers. Dabei wurden die Bruchränder mit einem Lichtmikroskop (Stemi 508, Carl Zeiss Mikroskopie GmbH, Göttingen, Deutschland) vergrößert, mittels Kameraaufsatz (Axiocam color 305, Carl Zeiss Mikroskopie GmbH, Göttingen, Deutschland) fotografiert und anhand der Computersoftware (AxioVision 4.8.2) analysiert. Im Scher-Test wurden hierbei die Bruchmuster a) adhäsiv, b) gemischt und c) kohäsiv unterschieden. Ein adhäsiver Bruch lag vor, wenn sich die Bruchlinie ausschließlich innerhalb der Adhäsivschicht befand; ein gemischter Bruch, wenn die Bruchlinie durch alle drei Substrate (Komposit, Adhäsiv, Zahnbein) prolongierte und zuletzt ein kohäsiver Bruch, wenn sich die Bruchlinie im Adhäsiv und einer der beiden anderen Substrate, Komposit oder Zahnbein, befand. Des Weiteren wurde der sogenannte *modified adhesive remnant index* (mARI) zurate gezogen. Hierbei wird mittels Lichtmikroskopie untersucht, an welchem Substrat (Zahnbein oder Komposit) der Verbleib von Adhäsivresten nach Bruch überwiegt. Verblieben > 50% an einer der beiden Substrate, wurde der mARI entsprechend als Komposit oder Dentin klassifiziert [91].

Im Rahmen des Pushout-Tests wurde die Lichtmikroskopie für zweierlei Zwecke angewandt. Einerseits wurde hiermit die Position des Stahlstempels a posteriori beurteilt, wobei die Position des Stempels anhand der Impression innerhalb des Komposits erkennbar war. Waren die Ränder des Stempels > 50 μ m vom Kavitätenrand entfernt, wurde die Position als zentral eingestuft, bei einem Abstand < 50 μ m als marginal und sobald diese sich um > 50 μ m überschnitten als überlappend. Zudem wurde beurteilt, ob eine Bruchlinie außerhalb der Grenzfläche zwischen Dentin und Komposit ins Dentin prolongierte. War eine solche Bruchlinie auf der Ober- und Unterseite des Prüfkörpers sichtbar, so wurde dieser mitsamt Messung als invalide klassifiziert und damit von den Messwerten ausgeschlossen [98].

2.3.4 Raster-Elektronenmikroskopie

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung diente dem Zwecke der Beurteilung der Morphologie des Verbundes zwischen Adhäsiv und Dentin. Hierzu wurden Prüfkörper entsprechend einer Sandwich-Technik produziert, wobei die Zahnkrone mittels horizontalem Schnitt oberhalb des Pulpenkavums getrennt wurde. Die beiden exponierten Dentinflächen wurden entsprechend dem o.a. Procedere konditioniert und der Füllungskomposit mittels sanften Druck zwischen beiden Zahnteilen gleichmäßig verteilt. Die Lichtpolymerisation geschah von den fünf Seiten: mesial, distal, vestibulär, oral und okklusal für jeweils 40 s. Abbildung 1 zeigt beispielhaft einen dieser in Sandwich-Technik hergestellten Prüfkörper.



Abbildung 1: Beispiel eines in Sandwich-Technik hergestellten Prüfkörpers zur elektronenmikroskopischen Analyse der Verbundmorphologie, hier in 11-facher Vergrößerung.

Nach Ablauf der dem Scher-Test entsprechenden Alterungszeiträume wurden die Prüfkörper mittels vertikalen Schnitts gesägt, um die Grenzflächen des Verbunds zu exponieren. Die Politur der Oberfläche erfolgte schrittweise in einer automatischen Poliermaschine (EXAKT Advance Technologie GmbH, Norderstedt, Deutschland) beginnend mit einer Körnung von P1200 für 1 min gefolgt von P2400 für 2 min, P4000 für 4 min und abschließend mit Politurspray einer Korngröße von 1 µm für 4 min. Nach erfolgter Politur wurden die Prüfkörper zunächst im Ultraschallbad für 5 min gereinigt, dann für 30 s in 6 mol/l konzentrierter Salzsäure demineralisiert und einer 10-minütigen Deprotonierung in einer 12% Natriumhydroxid-Lösung unterzogen. Nach Säuberung in destilliertem Wasser folgte die schrittweise Dehydrierung der Proben nach dem folgenden Protokoll: 20 min in 25% alc., 20 min in 50% alc., 30 min in 75% alc., 30 min in 95% alc. und 60 min in ≥99,8% alc.. Die Proben wurden anschließend staubgeschützt gelagert und unmittelbar vor Messung mit einer 25 nm dicken Goldschicht gesputtert. Das Elektronenmikroskop (Zeiss Supra 55 V P, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) operierte bei einer Spannung von 10 kV und die Darstellung der Verbundmorphologie erfolgte in 1.000facher Vergrößerung [91].

2.3.5 Zellkultur und Zellviabilität

Um den Einfluss der experimentellen Werkstoffe auf die Zellviabilität zu messen und damit Rückschlüsse auf die Zytotoxizität ziehen zu können, wurden die Kronen humaner Weisheitszähne horizontal in 2 mm dicke Scheiben gesägt, diese sterilisiert, unter sterilen Bedingungen optisch vermessen und mittels o.a. Protokoll konditioniert. Dabei wurde entsprechend der ISO-Norm 10993-12 [99] eine Bonding-Oberfläche von 117,8 mm² pro Milliliter des Zellkulturmediums (Dulbecco's modified eagle medium, Gibco, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) verwendet. Die fertig konditionierten Zahnscheiben wurden in der entsprechend der Bonding-Oberfläche errechneten Menge an Zellkulturmedium, inklusive einer Beimengung von 10% fötalem Kälberserum (FBS) und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung, getränkt und bei 37°C für bis zu sechs Monate gelagert. Die Eluate wurden täglich während der ersten zehn Tage sowie nach einem, drei und sechs Monaten entnommen. Nach einem, drei und sechs Monaten wurde jeweils die Elution binnen 24 h gemessen, nicht die akkumulierte Elution über diese Zeiträume hinweg. Das gesamte Vorgehen wurde doppelt durchgeführt, um die Validität der Messwerte zu erhöhen.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) inkl. 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung wurde zur Kultivierung von HGF verwendet. Die Zellkulturen wurden in T75 Zellkulturflaschen (CELLSTAR®, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmüster, Österreich) angesetzt und in einem Ofen (HERACELL 150i, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) bei feuchter Luft (37°C, 5% CO₂) bebrütet. Zellen wurden bei einer Dichte von 5.000 Zellen pro Quadratzentimeter ausgesät und das Zellkulturmedium regelmäßig in Abständen von circa 48 h gewechselt. Das Splitten geschah nach Waschen der Zellen mit Dulbecco's phosphatgepufferter Kochsalzlösung (DPBS; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) mittels Trypsin/EDTA-Lösung (0,25% Trypsin, 0,53% mM EDTA), welche durch DMEM Zugabe im Verhältnis 1:2 neutralisiert wurde. Zählung fand in einer Neubauer *improved* Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) in einer 1:1 Mischung aus Trypanblau und zellhaltigem Kulturmedium statt. Alle innerhalb der Studie verwendeten Zellen

Zur Beurteilung der Zellviabilität, bzw. der Zytotoxizität der Eluate, wurde das WST-1 Assay herangezogen. Hierbei wird das Tetrazolium-Salz enthaltende WST-1 Zellproliferationsreagenz zur Zelllösung hinzugegeben, was die mitochondrialen Dehydrogenasen der HGF zu Formazan umsetzen und damit einen Farbumschlag verursachen. Die Intensität des Farbumschlags lässt Rückschlüsse auf die Aktivität lebendiger Zellen zu und ist farboptisch messbar [100]. Hierfür wurden Zellen in 96-Well-Mikroplatten (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich) in einer Dichte von 5.000 Zellen pro Well ausgesät und für 24 h weiter bebrütet. Nach Ablauf der 24 h wurde das Medium mit 100 µl der Eluate, 100 µl Negativkontrolle (Kulturmedium) oder 100 µl Positivkontrolle (Kulturmedium mit 20% Alkoholanteil) getauscht und für weitere 24 h bebrütet. Wells ohne Zellen dienten der blanko Kontrolle. Test- und Negativkontrollgruppen wurden jeweils in Triplikaten mit je fünf Messungen getestet, Positiv- sowie Blankokontrollgruppen in Singles mit je drei Messungen. Nach Ablauf der 24 h wurden 10 µl WST-1 Zellproliferationsreagenz hinzugegeben, die optische Dichte nach zwei Stunden bei einer Wellenlänge von 450 nm und 630 nm in einem Multimodus-Mikrotiterplatten-Lesegerät (Varioskan LUX, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) gemessen und mittels Skanlt Software (Version 2.2, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) aufgezeichnet. Nach Hintergrund- und Blanko-Korrektur wurden die Viabilitätswerte berechnet, indem der Durchschnittswert der Negativkontrollgruppen als 100% Viabilitätsreferenz herangezogen wurde [91].

2.4 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 28, International Business Machines Cooperation, NY, USA) verwendet. Im Rahmen der ersten

Studie wurden alle Daten innerhalb eines Alterungszeitraums im Scher-Test zunächst auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk's Test geprüft und anschließend dem Levene's Test auf Varianzgleichheit unterzogen. Im Falle einer Inhomogenität der Varianzen wurde im Rahmen der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) zur weiteren Differenzierung der Unterschiede innerhalb einzelner Gruppen einer Alterung der Games-Howell post-hoc Test angewandt, im umgekehrten Fall Tukey's post-hoc Test bei Vorliegen einer Varianzhomogenität. Der Einfluss der artifiziellen Alterung im künstlichen Speichel wurde mithilfe des t-Tests für unabhängige Variablen ausfindig gemacht. Des Weiteren wurde eine multivariate Varianzanalyse (MANOVA) angewandt, um die Effektgröße der Faktoren GTE, TCP + Chitosan und Alterung abzuschätzen, was durch das partielle Eta-Quadrat (η_p^2) objektiviert wird [91].

Im Rahmen der zweiten Studie wurden die Messwerte analog der ersten Studie zunächst auf Normalverteilung und Homogenität der Varianzen geprüft. Zur weiteren Differenzierung der Unterschiede einzelner Gruppen innerhalb eines Tests wurde im Rahmen der ANOVA hier Dunnett's post-hoc Test angewandt. Die jeweilig korrespondierenden Gruppen beider Tests wurden mittels t-Tests für unabhängige Variablen miteinander verglichen. Ebenso wurde eine MANOVA innerhalb der Pushout-Testgruppen angewandt, um mithilfe des η_p^2 die Effektgrößen der Faktoren Adhäsiv, Stempelposition und Dentinbruch (invalide Messung) zu schätzen [98].

Außerdem wurde in beiden Studien die Weibull Analyse angewandt, um die Zuverlässigkeit der Adhäsive zu bewerten. Diese basiert auf der Weibull Verteilung, welche unter Berücksichtigung der hohen Streuung der Bruchfestigkeiten spröder Materialien - bedingt durch bspw. Inhomogenitäten im Material, wie eingeschlossenen Blasen – das Ziehen von Rückschlüssen auf die Versagenswahrscheinlichkeit entsprechender Materialien zulässt. Ausschlaggebend dabei ist auch die Größe der verwendeten Prüfkörper, da von einer ungleichen Verteilung angesprochener Inhomogenitäten innerhalb eines Materials ausgegangen wird und demnach die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins eines großen Fehlers innerhalb des Prüfkörpers umso höher ist, je größer dieser ist. Das doppelte Logarithmieren der Weibull Gleichung, welche der Berechnung der Versagenswahrscheinlichkeit, bei der ein Bruch vom größten Fehler innerhalb des Werkstoffs ausgeht, dient, erlaubt die graphische Darstellung der Daten, bei der die Steigung der Ausgleichsgeraden der Messwerte durch das Weibull Modul m widergespiegelt wird. Je höher m, desto schmaler die Verteilung der Bruchfestigkeiten und demnach, desto höher die Zuverlässigkeit des Werkstoffs. Zur Ermittlung wird eine Mindestprüfkörperanzahl von $n \ge 10$ empfohlen, wobei n > 30 nur noch wenig zur besseren Vorhersagewahrscheinlichkeit eines Bruches beiträgt. Ein in der Literatur übliches Maß zur Ermittlung des Weibull Moduls ist n = 20, was auch in den hier vorliegenden Publikationen angewandt wurde [101].

3. Zusammenfassung

In Summe beinhaltet die vorliegende Dissertationsschrift zwei wissenschaftliche Publikationen, deren Ergebnisse aus Forschungsarbeit im mechanischen sowie biologischen Labor stammen. Grundlage der Forschung war die Entwicklung von vier experimentellen, zahnärztlichen SE Adhäsiven und die Untersuchung der Parameter Verbundfestigkeit im Scher- und Pushout-Test, Frakturmuster, Verbundmorphologie und Zytotoxizität ebendieser Werkstoffe im Vergleich zu einem etablierten Goldstandard in CSE.

Bestandteil der ersten Publikation mit dem Titel "Enhancing dentin bonding through new adhesives formulations with natural polyphenols, tricalcium phosphate and chitosan" war die konkrete Synthese der vier experimentellen Materialien inklusive Prüfung der erfolgreichen Integration der natürlichen Polyphenole mittels HPLC-Analyse sowie die Beleuchtung von Verbundfestigkeit mittels Scher-Test nach 24 h und sechs Monaten Alterung (n = 20; Σ = 200), fraktographische Analyse mittels Lichtmikroskopie, Beurteilung der Verbundmorphologie mittels Elektronenmikroskopie und Testung der Zytotoxizität der Adhäsive mithilfe des WST-1 Assays nach 24 h, 48 h, 72 h, einem, drei und sechs Monaten. Für enthaltene Tabellen, siehe Anhang A. Die Arbeit dient dem Zweck der Herstellung eines zahnärztlichen SE Adhäsivs, welches natürliche Zusätze wie GTE (inkl. EGCG, ECG et cetera), TCP und Chitosan bereits im Vornherein beinhaltet, um zusätzliche Schritte des Auftragens oder Anmischens der Komponenten während des Bonding-Protokolls zu vermeiden und gleichzeitig sind natürliche Zusätze, wie eben EGCG, Bestandteil aktueller Forschung, da gezeigt wurde, dass diese das Potential besitzen die Verbundfestigkeit zahnärztlicher Adhäsive nachhaltig zu verbessern [45].

Inhalt der zweiten Publikation mit dem Titel "Pushout Bond Strength in Coronal Dentin: A Standardization Approach in Comparison to Shear Bond Strength" war der Methodenvergleich zwischen einem der allgemeinhin verbreiteten Standardtests zur Beurteilung der Verbundfestigkeit dentaler Adhäsive, i.e. dem Scher-Test, und dem sogenannten Pushout-Test, welcher bisher nicht als universelle Testmethode im Bereich der Forschung dentaler Adhäsivtechnik etabliert ist [48]. Besonderheit hierbei war, dass aufgrund mangelnder Anwendung des Pushout-Tests in der Adhäsivtechnik keine standardisierte Norm (wie etwa ISO 29022 des Scher-Tests) existierte und in diesem Rahmen ein standardisiertes Protokoll zur Prüfkörperherstellung entworfen wurde. Zum Vergleich der Tests wurden die Verbundfestigkeiten nach 24 h Alterung besagter experimenteller Adhäsive sowie CSE aus dem Scher-Test mit den Werten des Pushout-Tests verglichen (n = 20; Σ = 200). Die gebrochenen Prüfkörper wurden ebenfalls lichtmikroskopisch untersucht, um deren Frakturverhalten genauer evaluieren zu können. Für enthaltene Tabellen und Abbildungen, siehe Anhang B.

Die Ergebnisse beider Studien werden im Anschluss zusammenfassend dargestellt und die darauf basierenden Schlussfolgerungen gezogen.

3.1 Paper I

3.1.1 Ergebnisse

Nach Synthese der vier experimentellen Adhäsive wurde zunächst mittels HPLC-Analyse der Nachweis der erfolgreichen Integration der Catechine in die hergestellten Materialien Exp. 1.1

 $(15,1 \pm 0,2 \ \mu g/g)$ und Exp. 2.1 $(15,5 \pm 0,2 \ \mu g/g)$ geliefert (Tabelle 2). Nach 24-stündiger Alterung in artifiziellem Speichel und bei 37°C zeigten beide GTE-enthaltenden Adhäsive eine signifikant höhere Verbundfestigkeit im Vergleich zu ihrer ungefüllten Referenz (p < 0.05). Gleichzeitig war kein Unterschied zum Goldstandard nachweisbar (Exp. 1.1: p = 0,501; Exp. 2.1: p = 0,270). Während sich das Vorhandensein von TCP und Chitosan nicht signifikant auf die Verbundfestigkeit auswirkte (Exp. 1.1|Exp. 2.1: p = 0.999; Exp. 1.2|Exp. 2.2: p = 0.237), zeigte es eine Veränderung des Weibull Moduls: hierbei lagen die Werte von Exp. 2.1 (m = 4,0) und Exp. 2.2 (m = 4,3) deutlich über den übrigen Werten von CSE (m = 2,9), Exp. 1.1 (m = 2,1) und Exp. 1.2 (m = 1,9). Der Parameter Alterung hatte lediglich bei Exp. 2.1 einen signifikanten Einfluss auf die Verbundfestigkeit hin zu niedrigeren Haftwerten (p < 0.05), während alle anderen Gruppen davon unbeeinflusst blieben. Vergleicht man die gealterten Gruppen, so hat die Integration von GTE in die TCP und Chitosan enthaltenden Gruppen keine Auswirkung auf die Verbundfestigkeit (p = 0.816), während es ohne TCP und Chitosan eine signifikante Steigerung der Haftwerte (p < 0.816)0.05) zur Folge hat. Der Vergleich zwischen den gealterten Gruppen zeigte erneut, dass die Integration von TCP und Chitosan allein keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die gemessenen Haftwerte hat (Exp. 1.1|Exp. 2.1: p = 0,280; Exp. 1.2|Exp. 2.2: p = 0,844). Zur Übersicht der ermittelten Werte, siehe Tabelle 3. Interessanterweise führte die Alterung beim Goldstandard CSE zu einer - wenn auch nicht statistisch signifikanten - Steigerung der Verbundfestigkeiten, sodass sich CSE in dieser Hinsicht von den experimentellen Gruppen unterschied. Jedoch ließ sich das durch die Frakturmuster von CSE erklären, da dieser Werkstoff nach sechs Monaten Alterung zu 85% in Teilen außerhalb der Adhäsivschicht brach und eine konkrete Ermittlung der Haftwerte damit eigentlich nicht möglich war (vgl. Tabelle 5). Berücksichtigt man hierbei alle Messungen, die ausschließlich innerhalb der Adhäsivschicht gebrochen sind (n = 3), so führt dies zu einer Rückverschiebung hin zu statistisch gleichen Werten zwischen CSE und Exp. 1.1 (p = 0,851), Exp. 2.1 (p = 0,279) sowie Exp. 2.2 (p = 0,088) (siehe Tabelle 4). Was die Weibull Moduli nach Alterung anbelangt, so lassen sich zwei größere Unterschiede zur Ausgangssituation erkennen: zum einen zeigten lediglich CSE (m = 3,3) und Exp. 1.1 (m = 3,1) höhere Werte im Vergleich zu ihrer Messung nach 24 h (CSE: m = 2,9; Exp. 1.1: m = 2,1) und zweitens führte die Alterung zu einer deutlichen Verringerung der Weibull Moduli in den einst gut performenden Gruppen Exp. 2.1 (m = $4,0 \rightarrow 2,7$) und Exp. 2.2 (m = $4,3 \rightarrow 1,5$) (siehe Tabelle 3). Der im Rahmen der MANOVA ermittelte Einfluss der Effektgrößen zeigte mit $\eta_p^2 = 0,189$ für GTE (p < 0.05) und $\eta_p^2 = 0.037$ für die Kombination aus GTE, TCP und Chitosan (p < 0.05) einen signifikanten Einfluss, nicht aber für die Alterung (p = 0.139).

Betrachtet man die Bruchflächen der Prüfkörper, so fallen zwei Punkte deutlich ins Auge. Erstens, obwohl ein Bruch innerhalb der Adhäsivschicht mit einer Häufigkeit von insgesamt 81,5% über beide Alterungszeiträume der häufigste Bruchmodus war, brachen bei CSE nach 24 h lediglich 50% und nach sechs Monaten sogar nur 15% adhäsiv. Exkludiert man die "fehlerhaften" Bruchmuster (kohäsiv und gemischt) von der statistischen Auswertung, führt dies zu einer Reduktion der gemessenen Haftwerte (24 h: $15,9 \rightarrow 11,7$; 6 m: $19,4 \rightarrow 15,0$ MPa) von CSE. Zweitens, während die Adhäsivreste nach 24 h zu 55% überwiegend am Dentin adhärierten, sank diese Zahl nach der 6-monatigen Alterung auf lediglich 19%, wobei davon 15/19 Messungen auf das Konto von CSE gehen (vgl. Tabelle 6). Im Rahmen der elektronenmikroskopischen Darstellung der Verbundmorphologie wurde offensichtlich, dass die Ausbildung sogenannter "Resin-Tags" deutlicher beim kommerziellen Goldstandard, als bei den experimentellen Gruppen von Statten ging.

Zu guter Letzt wurde die Zytotoxizität der einzelnen Adhäsive geprüft, um deren toxisches Potential auf HGF zu quantifizieren. Hierbei wurde darauf geachtet, dasselbe Bonding-Protokoll wie bei der klinischen Anwendung der jeweiligen Adhäsive einzuhalten, um ein möglichst detailgetreues Bild über das toxische Potential der Adhäsive zu erhalten. Während die experimentellen Gruppen bei der ersten Eluatentnahme nach 24 h einen toxischen Effekt auf die HGF zeigten (Viabilität < 50%), war dies für CSE nicht der Fall (Viabilität 81%). Danach sanken die Viabilitätswerte aller Gruppen kein einziges Mal mehr unter 100%, was zeigte, dass selbst nach sechs Monaten Alterung keinerlei Bestandteile aus den Werkstoffen eluieren, die einen toxischen Effekt auf die verwendeten Zellen haben könnten (siehe Tabelle 7) [91].

3.1.2 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Publikation bestätigen, dass eine Verbesserung der Verbundfestigkeit mittels GTE erreichbar ist. Die Besonderheit liegt darin, dass dies auch erreicht wird, wenn das GTE bereits während der Herstellung des Adhäsivs darin integriert wird, was einen zusätzlichen Schritt des Auftragens in wässriger Lösung oder Vermischen mit bestehenden Systemen überflüssig macht. Während kleinere Anpassungen der vorliegenden Materialien notwendig sind, befürwortet diese Studie die künftige Integration von natürlichen Polyphenolen in moderne Adhäsivsysteme bereits bei der Herstellung, um die Verbundfestigkeit von Adhäsiven zu erhöhen und damit die Frequenz des Füllungswechsels am Patienten potenziell zu verringern [91].

3.2 Paper II

3.2.1 Ergebnisse

Um einen möglichst detailgetreuen Vergleich zwischen beiden Tests anzustellen, galt es die Unterschiede zwischen beiden Tests so gering wie möglich zu halten. Daher wurde bei dem Entwurf der Prüfkörpermorphologie des Pushout-Tests darauf geachtet, die Oberfläche des Haftverbundes in ihrer Ausdehnung möglichst exakt an die Morphologie der Scher-Test Prüfkörper anzupassen. Dies erforderte eine Dicke der vertikal geschnittenen Zahnscheiben von im Durchschnitt 1,03 (\pm 0,05) mm sowie einen Durchmesser der Kavitätenbohrung von 1,42 (\pm 0,03) mm im Mittel. Das Resultat war eine Verbundoberfläche von 4,63 (\pm 0,26) mm² für die Prüfkörper des Pushout-Tests, während die Verbundoberfläche der Scher-Test Prüfkörper, bedingt durch die ISO-Norm 29022 [53], bei 4,57 (\pm 0,13) mm² im Mittel lag. Die zur Berechnung des c-Faktors notwendige ungebundene Oberfläche der Kompositaufbauten lag bei den Prüfkörpern des Pushout-Tests bei 3,18 (\pm 0,14) mm² und bei denen des Scher-Tests bei 23,51 (\pm 1,55) mm², was in einem durchschnittlichen c-Faktor der Restaurationen von 1,5 (\pm 0,08; Pushout) und 0,20 (\pm 0,01; Scher) resultierte.

Während der Scher-Test in der Lage war signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen im Dunnett's post-hoc Test zu verdeutlichen (p < 0,05), gelang dies im Pushout-Test nicht (p = 0,367). Dort unterschieden sich die Verbundfestigkeiten der einzelnen Gruppen nicht. Im Vergleich beider Tests mittels Student's t-Test waren signifikante Unterschiede der Verbundfestigkeiten zwischen den experimentellen Adhäsiven deutlich (p < 0,05), jedoch nicht beim kommerziellen Goldstandard (p = 0,724) (vgl. Tabelle 8 und Abbildung 2). Was das Weibull Modul anbelangt, war ein genereller Trend hin zu höheren Werten im Pushout-Test feststellbar,

lediglich Exp. 2.2 erzielte im Scher-Test höhere Werte (vgl. Tabelle 8 und Abbildung 3). Hinsichtlich der mangelnden Differenzierung der einzelnen Gruppen im Pushout-Test, wurde eine Überprüfung des Tests mittels fehlerhafter Bonding Applikation angeschlossen. Dies diente dem Zweck herauszufinden, ob ein fehlerhaftes Auftragen des Adhäsivs zu einem Verlust der Haftkraft führt, um daraus wiederum Rückschlüsse ziehen zu können, ob der Pushout-Test tatsächlich die Haftkraft des Adhäsivs misst, oder lediglich Friktion durch Verkanten des spröden Materials beim Herauspressen des Füllungswerkstoffes. Hierfür wurde das experimentelle Adhäsiv Exp. 1.2 herangezogen, welches ohne das vorherige Auftragen des Primers verwendet wurde. Dies führte im Scher-Test zu einem Einbrechen der Haftkraft von 7,0 (\pm 4,1) MPa hin zu 2,1 (\pm 1,2) MPa, die gemessene Kraft im Pushout-Test blieb mit 14,9 (\pm 2,3) MPa (anstelle von 14,2 \pm 4,3 MPa) davon nahezu unbeeinflusst (vgl. Tabelle 9). Dies legte die Vermutung nahe, dass hierbei nicht die Verbundfestigkeit der Adhäsive gemessen wurde, sondern es sich bei dem gemessenen Wert eher um Friktion zwischen Kavitätenwand und Füllungswerkstoff handelte, was einen Kritikpunkt an diesem Versuchsaufbau darstellt [48].

Ein weiteres Problem, was sich während der Messungen herauskristallisierte war das zahlreiche Vorkommen von Frakturen der Prüfkörper. Dabei handelte es sich nicht um die gewollte Fraktur an der Grenzfläche zwischen Zahnbein und Füllungswerkstoff, bzw. innerhalb der Adhäsivschicht, sondern mehr um eine vollkommene Fraktur des Prüfkörpers außerhalb dieser Schichten. Hierbei kam es nicht selten vor, dass ein Prüfkörper in drei oder mehr Teile zersprungen ist. Brach ein Prüfkörper außerhalb der Grenzflächen, so wurde die Messung als invalide klassifiziert und der Prüfkörper damit von der statistischen Auswertung ausgeschlossen. Um dennoch die für die Weibull Analyse notwendigen 20 Messungen pro Werkstoff bewerkstelligen zu können, wurden insgesamt 142 Prüfkörper produziert (siehe Tabelle 10). Unter Berücksichtigung aller 142 Messungen, ergab die MANOVA lediglich für die Effektgröße Stempelposition (p < 0.05) mit $\eta_p^2 = 0.057$ einen signifikanten Einfluss, nicht aber für die Effektgrößen Adhäsiv (p = 0.263) und invalide Messung (p = 0.655).

Abschließend wurde noch die Position des Stempels lichtmikroskopisch beurteilt. Dabei zeigten sich 76% der validen Messungen (n = 100) mit einer zentralen Position des Stempels, während die verbleibenden 24% der Messungen eine marginale, i.e. < 50 μ m Abstand zum Kavitätenrand, aufwiesen (siehe Abbildung 4 und 5). Eine durchgeführte ANOVA, welche nur die optimal zentral positionierten Stempel berücksichtigte, zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Adhäsiven (*p* = 0,399) [98].

3.2.2 Schlussfolgerungen

Während die verwendeten Werkstoffe mit Ausnahme von Exp. 2.2 ein durchwegs höheres Weibull Modul im Pushout-Test aufwiesen, kann geschlussfolgert werden, dass die Messungen dieses Tests weniger anfällig für Einflüsse bedingt durch Fehler innerhalb des Materials, wie etwa Poren oder Luftblasen, sind. Dennoch ist der Pushout-Test in dieser Konfiguration nicht geeignet, um zwischen verschiedenen Werkstoffen zu differenzieren, wie es der Scher-Test in der Lage ist. Demnach sind weitere Anpassungen notwendig, wie bspw. das Präparieren konischer Kavitätenwände oder Einbetten fertiger Prüfkörper, um den Pushout-Test als geeignete Alternative zum Scher-Test zu etablieren [98].

4. Abstract

4.1 Paper I

As natural polyphenols, such as EGCG, have been shown to work as MMP-inhibitors with the potential to reduce and maybe even prevent enzymatic degradation over time leading to a longer lifetime of dental fillings, literature focused on incorporating such agents within dentin bonding [45]. Though, current literature lacks work on dental adhesives that contain such agents from scratch. The focus lays on applying MMP-inhibitors or collagen crosslinkers via aqueous solutions prior to dentin bonding or mixing them into existing systems. The objective of this study therefore lays on inventing novel experimental adhesives, that contain such natural derived agents from scratch, in order to shine light on the question of whether or not they keep their function even when incorporated in uncured resin-based adhesives while keeping acceptable cytotoxicity. In this case, four novel experimental adhesives have been formulated under laboratory conditions, that contain either green tea extract, tricalcium phosphate and chitosan or a combination of both or none. Presence of natural polyphenols was controlled with means of high-performance liquid chromatography. Bond strength of each group (n = 20) has been evaluated after 24 h and six months, while comparison was drawn to a gold standard reference adhesive resulting in a total specimen count of 200. Tested specimens underwent fractographic analysis via light microscopy and the morphology of the bond was visualized by scanning electron microscopy. Furthermore, WST-1 assay was used to determine cytotoxicity on human gingival fibroblasts of eluates extracted up to six months after bonding. Statistical differences between groups were identified by one- and three-way analysis of variances with Games-Howell's and Tukey's post-hoc tests as well as student's t-test at a confidence level of α = 0.05. Furthermore, a Weibull analysis was conducted to test the materials reliability.

The addition of green tea extract showed immediate (p < 0.05) and long-term (p < 0.05) improvements of bond strength, while performing equal to the gold standard reference when compared after 24 h (Exp. 1.1: p = 0.501; Exp. 2.1: p = 0.270). Aging has no effect on bond strength (p = 0.983) when solely incorporating green tea extract; in combination with tricalcium phosphate and chitosan, bond strength indeed is affected by aging (p < 0.05). Also, adhesive's reliability displayed in the Weibull modulus is improved by the addition of tricalcium phosphate and chitosan when measured immediately (Exp. 2.1: m = 4.0; Exp. 2.2: m = 4.3), but not after aging (Exp. 2.1: m = 2.7; Exp. 2.2: m = 1.5). Furthermore, no long-term effects on cytotoxicity were found, though an effect after 24 h of aging was visible.

In conclusion, the incorporation from scratch of natural polyphenols in uncured resin-based adhesives is possible and useful to improve and retain bond strength. When introduced into clinical practice, the incorporation of natural derived agents into the adhesive bond could prolong the lifetime of dental fillings hereafter [91].

4.2 Paper II

While the shear-test has established as one of the go-to methods to test bond strength values under laboratory conditions, its use for predicting clinical adhesion values is questionable, since the configuration-factor seems to differ largely from in-vivo dental fillings [97]. The pushout-test, a method currently applied within endodontological research to evaluate retention of fiber posts

to root canal dentin [48], is closer to clinical reality in terms of cavity configuration and therefore c-factor [97], but has not caught traction in adhesive dentistry, possibly due to the lack of a standardized manufacturing protocol for test specimens. Since specimens are usually produced by cutting the roots into discs, a consistent cavity shape throughout multiple specimens is hardly feasible [96]. Thus, the objective of this study was to develop a standardized production protocol of pushout-test specimens that assembles consistent cavities in order to enable a better comparison between specimens. Also, to see whether the pushout-test might function as an alternative to the above criticized shear-test, bond strength values of both test setups were compared with one another, and the slice thickness (1.03 \pm 0.05 mm) and cavity diameter (1.42 \pm 0.03 mm) of pushout specimens were adjusted to match the bonding area of the shear-test $(4.57 \pm 0.13 \text{ mm}^2)$ specimens as close as possible $(4.63 \pm 0.26 \text{ mm}^2)$. This resulted in a mean cfactor of 1.5 ± 0.08 for the pushout- and 0.20 ± 0.01 for the shear-specimens. Four experimental adhesives and one reference gold standard were used to produce a total of 100 specimens (n = 20) for each test setup. After assessing bond strength values, the pushout-test failed to discriminate between groups (p = 0.367), while the shear-test precisely did (p < 0.05), evaluated by Dunnett's post-hoc test. The lack of discrimination between groups within the pushout test might be due to the occurrence of friction between cavity walls and composite buildups, explained by the results of additional tests with the intended erroneous application of bonding agents on cavity walls. Furthermore, concomitant dentin fracture during testing pushout bond strength caused a high number of invalid measurements (30%), disqualifying these measurements from statistical evaluation. Though, the used materials mainly showed a higher reliability of measured values, displayed by higher Weibull moduli.

Even though the pushout-test is showing an upside in terms of cavity configuration unlike the shear-test, this specific and standardized production protocol fails to differ between groups and cannot be applied in bond strength testing, thereafter [98].

5. Paper I

Schröter FJ, Moldovan M, Sarosi C, Ilie N. Enhancing dentin bonding through new adhesives formulations with natural polyphenols, tricalcium phosphate and chitosan. Dent Mater. 2024 Feb;40(2):276-284. doi: 10.1016/j.dental.2023.11.014. Epub 2023 Nov 22. PMID: 37993295.

https://doi.org/10.1016/j.dental.2023.11.014

6. Paper II



Article

MDPI

Pushout Bond Strength in Coronal Dentin: A Standardization Approach in Comparison to Shear Bond Strength

Franz-Josef Schröter and Nicoleta Ilie *

Department of Conservative Dentistry and Periodontology, University Hospital, Ludwig-Maximilians-Universität München, Goethestr. 70, D-80336 Munich, Germany; josi.schroeter@web.de

* Correspondence: nilie@dent.med.uni-muenchen.de

Abstract: To find an alternative that is closer to clinical reality in terms of cavity geometry and configuration factor, this study investigated the pushout test on in vitro adhesive testing to coronal dentin when compared to the established shear test, both in a standardized approach. For a feasible comparison between both tests, the pushout specimen was adjusted in thickness $(1.03 \pm 0.05 \text{ mm})$ and cavity diameter $(1.42 \pm 0.03 \text{ mm})$ to receive a bonding area $(4.63 \pm 0.26 \text{ mm}^2)$ that matches that of the shear test $(4.57 \pm 0.13 \text{ mm}^2)$. Though, the configuration factor between both tests differs largely (pushout 1.5 ± 0.08 ; shear bond 0.20 ± 0.01). The bond strength of five different adhesives (n = 20) was investigated for both tests. The pushout test registered a high number of invalid measurements (30%) due to concomitant dentin fracture during testing. In contrast to the shear test, the pushout test failed to discriminate between different adhesives (p = 0.367). Both tests differed largely from each other when comparing adhesive groups. When solely looking at the valid specimens, Weibull modulus reached higher values in the pushout approach. Conclusively, the pushout test in this specific setup does not distinguish as precisely as the shear bond test between different adhesives and needs adaption to be routinely applied in adhesive dentistry.

Keywords: bond strength; shear test; pushout test; Weibull; dental adhesives; c-factor



Citation: Schröter, F.-J.; Ilie, N. Pushout Bond Strength in Coronal Dentin: A Standardization Approach in Comparison to Shear Bond Strength. *Materials* **2023**, *16*, 5667. https://doi.org/10.3390/ma16165667

Academic Editors: Josip Kranjčić and Tina Poklepovic Pericic

Received: 24 July 2023 Revised: 9 August 2023 Accepted: 12 August 2023 Published: 17 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https:// creativecommons.org/licenses/by/ 4.0/).

1. Introduction

The factors influencing in vitro bond strength results of dental adhesives involve the used substrate (bovine or human; dentin or enamel), storage condition, specimen's geometry, film thickness as well as loading condition and modulus of elasticity [1,2]. Since sound human teeth are rarely extracted, in vitro testing focuses on the usage of third molars. They are among the only teeth that are extracted in advance of eruption due to prophylactic reasons. Even though unerupted teeth appear moister when compared to erupted teeth [1], they are at least neither carious nor filled. While morphological changes with increasing tooth age do take place [3], bond strength performance appears to be unaffected by these changes [4].

Aside from the influence of the used substrate, the testing methods vary in the given results. Throughout the development of in vitro bond strength testing on tooth structure, two test methods have been established as the main setups for bond strength testing of dental adhesives, representing 83% of the reported studies in the given review: the micro-tensile and macro-shear test [5]. Depending on the bonding area, a distinction can be made between micro (<3 mm²) and macro (>3 mm²) tests [6].

Both of those two established methods come with advantages and disadvantages. Among the advantages of the micro-tensile test is obtaining numerous specimens out of one tooth, since sticks usually have a bonding area of 1 mm², instead of the >3 mm² required for macro-shear testing. Further, more adhesive failures are supposed to occur when compared to the shear test, where cohesive failures represent a mentionable problem [1].

On the other hand, fabrication of specimens for micro-tensile bond strength testing is labor intensive and technically demanding, because challenging factors in handling, such as quick dehydration of specimens, further come into place [1]. Cutting the sticks induces stress at the bonding interface, which leads to pre-testing failures during sample preparation, as indicated by the 35.4% pre-testing failures reported when bonding to enamel and 18.2% when bonding to dentin during preparation with a diamond saw [7]. Large criticism arises, as the reporting of pre-testing failures often is sparse [8], with only 30% of papers overall even mentioning pre-testing failures [2]. Further, it is important to accurately report and discern between pre-testing failures and manipulation errors, as pre-testing failures contain failures that occur before tensile testing that are not attributed to human handling, and manipulation errors occur during testing that are attributed to human manipulation [9].

When looking at the shear test, its widespread use can be explained by the plain test protocol, simple specimen preparation and efficient use of substrate, as up to eight specimens can be received out of one tooth. In comparison to the preparation of micro-tensile specimens, tooth cutting takes place prior to adhesive bonding, lowering the irritation of the bonding interface. Also, tooth pieces can be embedded in methacrylate resin in order to improve handling, while micro-tensile sticks remain free of a surrounding substance [10,11]. Meanwhile, both—shear and micro-tensile test—are criticized for the occurrence of cohesive failures, which do not allow exact calculation of bond strength values [12] and are recommended to be excluded from statistical analysis [2]. Amongst others, cohesive failures lead to the scattering of test results, which complicates the comparison between studies [13]. This scattering can be associated with alignment errors [14] and microcracks during cutting [7] in the case of the micro-tensile test, and stress concentration near the loading site due to test configuration and specimen geometry in the case of the shear test [15].

Since these two tests both have varying setups, a detailed description of the used approach or the reference to the applied ISO (International Organization for Standardization) standard needs to be provided in order to establish one generally accepted and conducted testing method for adhesive bond strength testing [2,6,8]. As an alternative testing method, an extrusion (pushout) test for dental purposes was first described in 1970, where a cylinder was pushed out of a disk of dental material in varying plunger diameters to simulate the masticatory cycle, reflecting qualities of clinical relevance [16]. An important factor of clinical relevance in such tests is represented by the configuration factor (c-factor) that describes the ratio of bonded to unbonded surface, as an approximate c-factor of 1.7 represented by the pushout approach is closer to the clinical situation than the 0.2 simulated in shear and tensile tests [17,18]. As polymerization shrinkage stress increases simultaneously with c-factor [17], a pushout approach compared to shear or tensile tests might be better suited for clinical prediction, as in vitro specimens should be subjected to polymerization shrinkage stress prior to bond strength testing [19].

Nowadays, the pushout test is not employed as a universal bond strength test and is commonly used to measure retention of fiber posts to root canal dentin [6]. In the few studies in which the test was not only used to determine the bond strength to human root dentin, it displays significantly higher bond strength values in crown dentin when compared to root dentin [20,21]. Endodontically treated roots are cut into slices of up to 2 mm thickness, exposing a small portion of filled root canal in a slightly conical form [22]. A crucial step is the central positioning of the steel plunger on the filling [23], which is used to push out the tested substrate. Critique on the pushout test arises, because of the great variability of the test setup. Variables like plunger size, testing speed, slice thickness and preparation method in terms of borehole size and taper influence results. Further, when testing root canal fillings, the calculation of the true diameter is hardly feasible as root canals are not perfectly round in shape [24]. First attempts to standardize the pushout test as a method to test adhesion to coronal dentin have been made to bovine teeth [25], yet remain to be established. On a positive note, and in contrast to the micro-tensile test, almost no stress at the bonding interface takes place during specimen production, as slices are

cut in advance of dentin bonding. Also, there is no need to demount them in any specific matrices' holder, as in shear tests.

Thus, the present work investigated the applicability of a standardized pushout test setup for adhesive dentistry in comparison to the macro-shear test and shines light on the question of whether the pushout test is equally suited to attain reliable bond strength values of dental adhesives to coronal dentin. The null hypothesis was therefore that with similar bonding surface areas, bonding procedure and test conditions, the outcome of both tests is similar.

2. Materials and Methods

Four experimental and one gold-standard self-etch adhesives (Table 1) are used to compare bond strength results of the pushout and shear test. The synthesis and exact compositions of the four experimental adhesives, namely Exp. 1.1–2.2, are addressed elsewhere (submitted paper), as this paper focuses on the comparison of both tests, rather than the influence of the adhesives' components.

Name	Composition	LOT
Exp. 1.1	bis-GMA, TEGDMA, HEMA, polyacrylic acid, initiators, green tea-extract	-
Exp. 1.2	bis-GMA, TEGDMA, HEMA, polyacrylic acid, initiators	-
Exp. 2.1	bis-GMA, TEGDMA, HEMA, polyacrylic acid, initiators, tricalcium-phosphate, chitosan, green tea-extract	-
Exp. 2.2	bis-GMA, TEGDMA, HEMA, polyacrylic acid, initiators, tricalcium-phosphate, chitosan	-
CSE	Primer: 10-MDP, HEMA, DM, initiators Bond: 10-MDP, bis-GMA, HEMA, DM, initiators	2P0372 420696
AF	ormocer, 84 wt.% Ba-Al-Si-glass	2111693

Table 1. Chemical composition of used materials as provided by the manufacturer.

Abbreviations: Exp. = experimental adhesive; CSE = Clearfil SE Bond; AF = Admira Fusion x-tra; bis-GMA = bisphenol-A-diglycidyl-methacrylate; TEGDMA = triethylene-glycol-dimethacrylate; HEMA = 2hydroxyethyldimethylacrylate; 10-MDP = 10-methacryloyloxydecyl-dihydrogenphosphate; DM = dimethylacrylate; ormocer = organically modified ceramic; Ba-Al-Si-glass = barium-aluminum-silicate-glass.

Clearfil SE Bond (CSE; Kuraray Noritake Dental Inc., Kurashiki, Japan) worked as the gold-standard reference and its primer was used for all groups. Primer and adhesive were applied with a microbrush for 20 s each, followed by gentle air drying. Any excess bonding agent was removed with a disposable paper fabric. Light curing was performed for 10 s with a light-curing unit (Bluephase®Style, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) with a light-emitting window of 10 mm diameter and an irradiance of $1544 \pm 207 \text{ mW/cm}^2$. A low shrinkage resin-based composite (RBC; Admira Fusion x-tra, AF, VOCO GmbH, Cuxhaven, Germany; LOT 2111693) was applied with gentle pressure through a ball-end plunger to ensure good alignment to dentin. Any excess material was removed, followed by light curing for 20 s.

2.1. Pushout Test Specimen Preparation

In total, 47 sound human third molars, stored in 0.2% sodium azide solution at room temperature for no more than three months, were used to produce five groups (n = 20) of test specimens. Teeth were cut with a low-speed diamond saw (IsoMet, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) in a vertical direction to produce 1 (\pm 0.1) mm thick slices. Slices were measured with a digital caliper. Tooth slices were continuously stored in distilled water to prevent dehydration of exposed dentin. Specimens were then mounted in a vertical drilling machine (Degussa Dental GmbH, Hanau, Germany) to ensure consistent, perpendicular drilling in the dentin surface. The borehole was positioned in coronal dentin, above the pulp chamber to cut dentinal tubules crosswise and with >1 mm distance to pulp chamber

and enamel. The holes were drilled with a parallel chamfer dental diamond burr (Komet Dental, Lemgo, Germany) with a diameter of 1.4 mm and a medium grain size of 107 μ m under constant water cooling. Calculation of the bonding area followed the formula for lateral surfaces of cylinders: A = 2 × π × r × h, where A is the lateral area, r the radius and h the height of the cavity. The dimensions were chosen to match the bonding area of the shear test setup. After drilling, specimens underwent bonding procedure and cavity filling. In addition to the regular specimens, seven test specimens of the adhesive Exp. 1.2 without the use of primer were produced. Specimens were then stored in artificial saliva in a thermal oven at 37 °C for 24 h.

2.2. Shear Test Specimen Preparation

A total of 20 sound human third molars were used to equally produce five groups (n = 20) of test specimens for the shear test setup. Teeth were cut horizontally to expose coronal dentin, followed by size-dependent sectioning which resulted in a maximum specimen count of eight per tooth. Pieces were embedded in methacrylate resin (Technovit 4004, Kulzer, Hanau, Germany; Powder LOT K010164; Liquid LOT K010108) in a stainlesssteel cylinder of 16 mm in diameter. Specimens were randomly allocated to each group; a standardized smear layer was produced with P1200 silicon carbide paper, and they were bonded within 24 h after cutting. Following bonding procedure, specimens were mounted in a matrix holder (Ultradent Products, South Jordan, UT, USA) with a cylindrical split mold (Ultradent Products, South Jordan, UT, USA) for RBC buildups of 2.5 mm in height and 2.4 mm in diameter of the same restorative material following ISO 29022 [26]. Calculation of the bonding area took place by measuring the buildups' diameters twice followed by calculation of a mean radius r for each specimen. Bonding area calculation then followed the formula of circle areas: $A = \pi \times r^2$. Also, seven specimens using adhesive Exp. 1.2 were produced without the usage of primer. Storing condition was equal to the pushout specimens.

2.3. Mechanical Testing Methods

The universal testing machine (Z2.5, Zwick/Roell, Ulm, Germany) operated at a crosshead speed of 0.5 mm/min until failure and was used for both test setups.

The pushout test was carried out with a round metal plunger (1.2 mm diameter) on a stainless-steel ring to enable free dislodgement of the filling. The plunger was positioned centrally on the filling and placement was controlled by $2.4 \times$ magnifying glasses. The specimen was loaded until failure, i.e., dislodgement of the filling or disruption of the specimen, and the pushout force at failure was measured. Because the test setup resulted in a frequent fracture of tooth slices as it will be shown later, additional specimens were manufactured in order to receive n = 20 specimens eligible for statistical evaluation, which resulted in a total of 142 pushout test specimens.

Shear bond strength testing followed an adaption of ISO 29022 [26] from a notchededge to a straight-edge chisel. The maximum load at fracture was measured.

Bond strength (BS) was calculated by dividing the maximum load at failure through the individual bonding area of each specimen with the following formula:

BS = F/A

where BS represents the calculated bond strength, F the maximum load at failure and A the individual bonding area.

2.4. Microscopic Analysis

Microscopic analysis was performed with a light microscope (Stemi 508, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Germany), photographed with a camera extension (Axiocam color 305, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Germany) and pictured with AxioVision 4.8.2 computer software. The plunger position was assessed based on the margins of the plunger indentation within the restorative material. Whenever plunger margins were entirely in the restorative material and more than 50 µm distant from dentin, they were classified as central (Figure 1A); when margins were <50 µm away, they were classified as margin (Figure 1B) and lastly, whenever margins intersected dentin for >50 µm (Figure 1C), they were classified as overlapping. Further, light microscopy was used to determine whether a fracture within dentin was visible. If a fracture line was visible in dentin (Figure 1C) on top and on bottom of the specimen, it was classified as invalid and therefore excluded from statistical analysis.

Figure 1. Showcase pictures of the plunger positions central (**A**), margin (**B**) and overlapping (**C**). Cavity circumference is marked by the large, dotted circle, plunger indentation by the smaller, dotted circle. Arrows indicate the visible fracture line within dentin.

2.5. Statistical Analysis

SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 28, International Business Machines Cooperation, NY, USA) was used to analyze data. The Shapiro–Wilk test was used to check for normal distribution, and Levene's test to assess equality of variances. One-way analysis of variances (ANOVA) with Dunnett's post hoc test compared groups within one test setup. Students t-test for independent variables compared each group with its corresponding group of the other test setup as well as both tests without the use of the adhesives' primer. A three-way ANOVA was used to evaluate the influence of the parameters' adhesive, plunger position and dentin fracture causing invalid measurement. Results were considered significant for p < 0.05.

Lastly, the reliability of all groups was assessed by Weibull analysis. The model describes the probability of failure for brittle materials at uniform stress with the following formula:

$$Pf = 1 - exp(-(\frac{\sigma}{\sigma_0})^m)$$

where σ is the measured bond strength, σ_0 the characteristic strength at probability of failure $P_f(\sigma_0)$ = 0.63 and m the Weibull modulus. The doubled logarithm of this expression $ln[ln(\frac{1}{1-P_f})]$ = mln(σ) – mln(σ_0) results in a straight line. The upward gradient of that line represents m. R^2 expresses the fit of variances of the observed data towards the projected ideal linear function.

2.6. Ethical Approval

No consultation obligation by the institutional ethics committee is needed for this research project. The study was approved under the project number KB 20/032.

3. Results

A total of 42 specimens were excluded from the pushout test due to observed dentin fracture after measurement. The number of valid measurements has been upgraded to 100. The mean slice thickness was 1.03 (\pm 0.05) mm, and the mean cavity diameter 1.42 (\pm 0.03) mm. The mean bonding area of the 100 valid specimens was 4.63 (\pm 0.26) mm², while the unbonded area was 3.18 (\pm 0.14) mm². Meanwhile, the mean bonding area of

the shear test specimens was 4.57 (\pm 0.13) mm² and 23.51 (\pm 1.55) mm² for the unbonded surface, respectively. Division of the bonded by the unbonded area resulted in a c-factor of 1.5 (\pm 0.08) for the pushout and 0.20 (\pm 0.01) for the shear test specimens. Table 2 displays the mean bond strength, Weibull modulus and R² values for both test setups.

Table 2. Bond strength values in MPa and Weibull modulus with 95% confidence interval in brackets, and R² values for both test setups. Superscript letters indicate significant difference within the test setup itself. Asterisk (*) indicates significant differences between the corresponding groups of each test.

	Pushout			Shear		
	BS	m	R ²	BS	m	R ²
Exp. 1.1	16.5 (15.0; 18.1) *	5.9 (4.61; 7.25)	0.82	12.6 (9.5; 15.6) ^{a,c}	2.1 (1.92; 2.25)	0.97
Exp. 1.2	14.2 (12.2; 16.2) *	3.8 (3.14; 4.45)	0.88	7.0 (5.1; 8.9) ^b	1.9 (1.80; 2.01)	0.99
Exp. 2.1	16.3 (14.4; 18.1) *	5.0 (4.26; 5.79)	0.91	12.5 (11.0; 14.1) ^a	4.0 (3.48; 4.48)	0.93
Exp. 2.2	16.5 (14.1; 18.4) *	3.5 (3.29; 3.78)	0.98	9.3 (8.1; 10.5) ^{b,c}	4.3 (3.81; 4.79)	0.94
CSE	16.5 (14.3; 18.7)	4.1 (3.62; 4.49)	0.95	15.9 (12.8; 18.9) ^a	2.9 (2.44; 3.32)	0.91

Abbreviations: BS = bond strength; m = Weibull modulus; R^2 = fit of variances to the projected ideal linear function within Weibull statistics; Exp. = experimental adhesive; CSE = Clearfil SE Bond.

The Shapiro–Wilk test confirmed normal distribution for all groups except for Exp. 1.1 (p = 0.033) within the pushout test. Data were therefore considered normally distributed. Levene's test approved equality of variances for the pushout test (p = 0.386), but not for the shear test (p < 0.001). Thus, ANOVA with Dunnett's post hoc test was used to check for significant differences within each test setup. While no differences were found in the pushout test (n = 100; p = 0.367), differences in the shear test were found (p < 0.001). When comparing the two test setups, students t-test showed significant differences between the groups Exp. 1.1 (p = 0.02), Exp. 1.2 (p < 0.001), Exp. 2.1 (p = 0.002) and Exp. 2.2 (p < 0.001), but not for CSE (p = 0.724). To visualize the differences in bond strength, the boxplot of both tests is provided (Figure 2).



Figure 2. Boxplot for the pushout test and the shear test of the bond strengths (BS) of each group.





The valid measurements (n = 100) were neither influenced by adhesive group (p = 0.858) nor plunger position (p = 0.339). Regarding the Weibull modulus, a general trend to higher values was observed in the pushout test. While Exp. 2.2 was inferior to the shear test values, all other groups surpassed the shear test values with CSE, Exp. 1.1 and Exp. 1.2 differing significantly. For the Weibull distribution, see Figure 3.



Figure 3. Weibull distribution for the pushout test (A) and the shear test (B) strength data.

The results of the Exp. 1.2 specimens without the primer are shown in Table 3. One of the seven pushout specimens was invalid during evaluation, which led to its exclusion. T-test for independent variables showed a significant difference between both tests (p < 0.001).

Table 3. Comparison of bond strength (BS) values (MPa \pm standard deviation) of Exp. 1.2 without primer. Asterisk (*) indicates significant differences between both test setups.

	n	BS
Pushout test	6	14.9 (2.3) *
Shear test	7	2.1 (1.2)

In total, 42 of 142 specimens were declared invalid due to dentin fracture during evaluation. Table 4 shows the error frequency for each group. Of all measurements (n = 142), the used adhesive (*p* = 0.263) and the occurrence of dentin fractures and therefore invalid declaration (*p* = 0.655) had no influence on bond strength, while the plunger position influenced bond strength slightly ($\eta_p^2 = 0.057$) but significantly (*p* = 0.03).

Table 4. Produced specimens in total and count of errors for each test group.

	Total	Invalid
Exp. 1.1	26	6
Exp. 1.2	28	8
Exp. 2.1	33	13
Exp. 2.2	33	13
CSE	22	2
total	142	42

The plunger position of the valid specimens (n = 100) is displayed in Figure 4A. An ANOVA with only the centered plungers also showed no significant differences within the pushout test (p = 0.399). In comparison, Figure 4B shows the plunger position for the 42 invalid specimens, where an overlap was found in 6 cases, marginal position 17 and



central position 19 times. The plunger position had no influence on bond strength values of invalid specimens (n = 42; p = 0.088).

Figure 4. Plunger positions of the valid (A) and invalid specimens (B).

4. Discussion

The aim to draw a scientifically correct comparison between a shear bond and a pushout test needed multiple requirements: Firstly, all specimens were manufactured with equal materials, inside the same laboratory and by the same operator. This renders a comparison between the two tests possible, as a comparison between different laboratories was shown to be difficult [27], since even small differences in local geometry of adhesive interface influence the bond strength results significantly [28]. Secondly, a standardized, reproducible specimen production as stipulated by the literature was conducted [2,6,8] and compared to the already standardized and recognized ISO 29022 method of the shear bond test while ultimately, similar bonded surface areas for both tests were manufactured in order to adequately compare bond strength values as well as their reliability. This resulted in cutting the teeth in vertical slices with a mean thickness of 1.03 (± 0.05) mm and by drilling with a chamfer of 1.4 mm diameter in a mean cavity of 1.42 (± 0.03) mm diameter, leading to a mean dentin bonding area of 4.63 (± 0.26) mm², comparable to the 4.57 (± 0.13) mm² area of the shear test.

As polymerization shrinkage of RBCs takes place during light curing, resulting in shrinkage stress [29], specimens for both test methods were produced using the same restorative material and curing conditions. While the used RBC was chosen, because of the low 1.24% polymerization shrinkage [30], shrinkage stress further correlates with the c-factor. The lower the c-factor, the smaller the shrinkage stress. Calculation of the c-factor resulted in a 7.5 times higher value in the pushout test setup compared to the shear test setup, which is in accordance with the results found in other studies [17]. Conclusively, one would assume that shrinkage stresses are higher in the pushout test specimen, which results in imperfect alignment of RBC to the cavity walls ultimately causing quicker failure and thus inferior bond strength values. Though, this can be rejected with the present results as it might be explained by the perfectly parallel cavity walls causing friction during dislodgement that were high enough to overshadow the disadvantages of the higher c-factor.

When addressing bonding areas, Weibull statistics cannot be overlooked, as it is used to determine the reliability of brittle materials by assigning the likelihood of failure to a numeric value, namely the Weibull modulus m. For larger areas, the probability for a critical flaw, such as pores, inclusions or microcracks, to be on the bonding interface is much higher than for smaller areas, resulting in higher bond strengths for smaller areas [31]. In order to minimize the influence of area, bonding areas of both tests closely matched each other. Though, the pushout test found mostly higher m values when compared to the shear test (Table 2), represented by the steeper upward gradient in Figure 3. Four out of five groups exceeded the shear tests' values, which means that the pushout setting is

8 of 12

less susceptible to critical flaws, such as cracks and pores, than the shear test. As nonuniform stress distribution leads to quicker failures of test specimens [2], because the crack propagates from a critical flaw on the bonding interface [31], the higher m in the pushout test might be associated with a more evenly distributed stress, as it was already shown that a homogenous stress distribution when testing glass fiber posts is attainable, revealed by finite element analysis [32]. This leads to a higher m and consequently a higher reliability of measured values in the pushout test, which might be attributed to a less technique-sensitive test protocol compared to the shear test.

As the bonding area was predetermined by the shear bond strength standard ISO 29022, geometry of the pushout test specimen was adapted in slice thickness and cavity diameter. The 1 mm dentin slice thickness was chosen for more than just the reason of matching areas: when comparing literature, slices of usually 1–2 mm thickness are used [24] and 1 mm thickness further allows for a uniform stress distribution [33]. Though, it might be too thin to withstand dentin fracture outside the bonding interface (Figure 1C), which was considered as invalid. Whilst not being considered a pre-testing failure, it can be classified as a manipulation error and is therefore excluded from statistical analysis analogous to the ADM guidelines for micro-tensile testing [9]. As 42 specimens were invalid (30%), an improvement of this test setup's reliability might be achieved by embedding the specimens in methacrylate resin, as in the shear test, to increase specimen stability. Also, conducting the test under water might help by hindering dehydration of test specimens. Still, testing of aged specimens is challenging, when an identical specimen count per group is desired in order to adequately compare results. As it is criticized in the literature that the reporting of pre-testing failures in micro-tensile testing is often missing [8], this also applies to the pushout test, as fractures outside the adhesive interface as found in the present study (Table 4) are not addressed in any reviews on the study design of pushout tests [24,34,35].

In addition to the thickness of the dentin slices, which determines the height of the cavity, the diameter of the borehole was adjusted to 1.4 mm. This led to an adjustment of the plunger diameter to 1.2 mm for two reasons: when comparing our study design with other protocols, a plunger that is 0.2 mm smaller than the diameter of posts can be used [36] and it furthermore represents 85% of the boreholes' mean diameter, which in turn should not affect bond strength values [37]. Though, as a plunger size of 70–90% of the canal diameter does not affect bond strength values and smaller strengths are found when the diameter is below 55% [37], the plunger diameter of a smaller size should be chosen to ensure perfect positioning and prevent manipulation errors, while still keeping a standardized diameter, as varying diameters can additionally alter bond strength values [38]. Regarding manipulation errors, the plunger was ideally placed centrally on the filling in order to support uniform stress distribution, which was controlled with magnifying glasses prior to testing. Afterwards, the positioning was controlled microscopically, showing that 136 of the 142 tested specimens had either a central or margin position, while a poor (overlapping) position accounted for only 4% of all measurements. Each one of them resulted in an invalid measurement due to dentin fracture (Figure 4B). Therefore, even though the applied plunger diameter is in the proper range given by the literature [37], a slightly smaller plunger might ease the positioning. The importance of good plunger alignment is also displayed in the small ($\eta_p^2 = 0.057$), though significant, influence on bond strength values, when considering all measurements, but is usually not addressed in the literature, retrospectively [22,35].

Apart from specimen geometries, another similarity between the two tests was the orientation of the dentinal tubules. Dentinal tubules run radially from the pulp chamber to the dentin surface [39]. During shear test specimen preparation, the horizontal cut above the pulp chamber intersects the tubules nearly perpendicular to their course, which results in the crosswise bonding of tubules. By cutting the tooth vertically and drilling a perpendicular hole in the slice for the pushout test, the dentinal tubules are intersected in the same manner as in the shear test. Although shear bond strength seems to be independent of dentin tubule orientation [40], equal penetration of the tubules during bonding procedure allows for a better comparison of both test methods.

37

Materials 2023, 16, 5667

Since the five adhesives did not differ from each other within the pushout setup, a difference when compared to the shear test results seems obvious. All pushout groups but CSE had significantly higher bond strength values than their corresponding shear test groups (Table 2, Figure 2), which leads to the rejection of the null hypothesis. The fact that the differences seen in the shear test do not appear in the pushout test suggests that the adhesive agent is not the decisive factor for bond strength or fracture resistance in this specific setup. Therefore, a few specimens without priming were produced to investigate the influence of flawed application of the adhesive system on bond strength (Table 3). The difference is strikingly obvious, which supports the theory of the measured values' independency from the adhesives' performance. Reasonable explanations could be that-as mentioned above-the parallel cavity wall configuration causes friction between RBC and dentin. Usually, the pushout test finds application in endodontological, laboratory trials to test the adhesion of root canal fillings and fiber posts to tooth substrate [34]. Due to the root canal treatment, the canal diameter goes from large to small, resulting in a conical shape of the cavity. Even the conical shape yields friction [37], parallel walls presumably even more. But an exact standard as to which taper needs to be applied has not yet been established, as taper varies largely due to the root canal treatment method, including a taper of 0% [24]. Furthermore, the softer gutta-percha shows lower bond strength (5.86 \pm 1.22 MPa) when compared to epoxy resin cones (17.23 \pm 4.53 MPa; 16.16 \pm 4.73 MPa) and deforms due to compressive stress. Contrarily, stiffer core materials are more resistant to deformation and allow a more linear load profile until dislodgement, resulting in higher bond strength values for stiffer materials that lay in the same range of the bond strengths we found for our materials (Table 2) [37]. This linear load profile might also result in a higher susceptibility to friction, explained by the similar results of all evaluated groups throughout the pushout test.

Summarized, even though the pushout test is closer to reality in terms of c-factor and cavity configuration, it is inferior to the shear test in discerning bond strengths of different adhesives in this specific, standardized setup in vitro. Aside from the perfectly parallel cavity walls, the predetermined bonding area by the shear test as well as the high occurrence of invalid measurements and the slightly too large plunger can be considered as limitations within this study and might influence results, when being changed. Thus, conical cavity walls, alteration in specimen geometry (e.g., thickness, drilling diameter), embedding of specimens in methacrylate resin and testing under water might change the pushout test's outcome. Also, the testing of aged specimens might be helpful to its long-term applicability. Though, materials are not as susceptible to inherent flaws as in the shear test, shown by the mainly higher Weibull modulus, leading to a higher reliability of measured values in this setup. While more conical cavity walls might help with the problem of friction, the question remains whether it could be better to discern between adhesive groups than the established methods. Lastly, as demanded for the micro-tensile test, pre-testing and manipulation errors within the pushout test must also be accurately reported.

5. Conclusions

Within the limitations of the present study, it suggests that the standardized pushout test in this specific setup is inferior to the shear test in measuring adhesives' bond strength values but is less prone to inherent flaws explained by higher Weibull moduli. Further adjustments are necessary in order to routinely apply the pushout test to adhesive dentistry, including the need to accurately report pre-testing failures and manipulation errors.

Author Contributions: F.-J.S.: Investigation, writing—original draft preparation, formal analysis, visualization; N.I.: Conceptualization, methodology, resources, data curation, writing—review and editing, visualization, supervision, project administration. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Informed Consent Statement: Not applicable.

10 of 12

Data Availability Statement: The raw data required to reproduce these findings are available upon request.

Acknowledgments: The authors appreciate VOCO, Germany, for the donation of the used ormocer.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- 1. Pashley, D.H.; Sano, H.; Ciucchi, B.; Yoshiyama, M.; Carvalho, R.M. Adhesion testing of dentin bonding agents: A review. *Dent. Mater.* **1995**, *11*, 117–125. [CrossRef] [PubMed]
- Scherrer, S.S.; Cesar, P.F.; Swain, M.V. Direct comparison of the bond strength results of the different test methods: A critical literature review. Dent. Mater. 2010, 26, e78–e93. [CrossRef] [PubMed]
- Murray, P.E.; Stanley, H.R.; Matthews, J.B.; Sloan, A.J.; Smith, A.J. Age-related odontometric changes of human teeth. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 2002, 93, 474–482. [CrossRef] [PubMed]
- 4. Oliveira, G.C.; Oliveira, G.M.; Ritter, A.V.; Heymann, H.O.; Swift, E.J.; Yamauchi, M. Influence of tooth age and etching time on the microtensile bond strengths of adhesive systems to dentin. *J. Adhes. Dent.* **2012**, *14*, 229–234. [CrossRef] [PubMed]
- De Munck, J.; Mine, A.; Poitevin, A.; Van Ende, A.; Cardoso, M.V.; Van Landuyt, K.L.; Peumans, M.; Van Meerbeek, B. Metaanalytical review of parameters involved in dentin bonding. J. Dent. Res. 2012, 91, 351–357. [CrossRef]
- Salz, U.; Bock, T. Testing adhesion of direct restoratives to dental hard tissue—A review. J. Adhes. Dent. 2010, 12, 343–371. [CrossRef]
- Sadek, F.T.; Monticelli, F.; Muench, A.; Ferrari, M.; Cardoso, P.E.C. A novel method to obtain microtensile specimens minimizing cut flaws. J. Biomed. Mater. Res. Part. B Appl. Biomater. 2006, 78B, 7–14. [CrossRef]
- Armstrong, S.; Geraldeli, S.; Maia, R.; Raposo, L.H.; Soares, C.J.; Yamagawa, J. Adhesion to tooth structure: A critical review of "micro" bond strength test methods. Dent. Mater. 2010, 26, e50–e62. [CrossRef]
- Armstrong, S.; Breschi, L.; Özcan, M.; Pfefferkorn, F.; Ferrari, M.; Van Meerbeek, B. Academy of Dental Materials guidance on in vitro testing of dental composite bonding effectiveness to dentin/enamel using micro-tensile bond strength (μTBS) approach. Dent. Mater. 2017, 33, 133–143. [CrossRef]
- McDonough, W.G.; Antonucci, J.M.; He, J.; Shimada, Y.; Chiang, M.Y.M.; Schumacher, G.E.; Schultheisz, C.R. A microshear test to measure bond strengths of dentin–polymer interfaces. *Biomaterials* 2002, 23, 3603–3608. [CrossRef]
- Beck, F.; Ilie, N. Antioxidants and Collagen-Crosslinking: Benefit on Bond Strength and Clinical Applicability. *Materials* 2020, 13, 5483. [CrossRef]
- Versluis, A.; Tantbirojn, D.; Douglas, W.H. Why do Shear Bond Tests Pull Out Dentin? J. Dent. Res. 1997, 76, 1298–1307. [CrossRef] [PubMed]
- Van Noort, R.; Noroozi, S.; Howard, I.C.; Cardew, G. A critique of bond strength measurements. J. Dent. 1989, 17, 61–67. [CrossRef] [PubMed]
- 14. Cho, B.H.; Dickens, S.H. Effects of the acetone content of single solution dentin bonding agents on the adhesive layer thickness and the microtensile bond strength. *Dent. Mater.* 2004, 20, 107–115. [CrossRef] [PubMed]
- DeHoff, P.H.; Anusavice, K.J.; Wang, Z. Three-dimensional finite element analysis of the shear bond test. *Dent. Mater.* 1995, 11, 126–131. [CrossRef]
- 16. Roydhouse, R.H. Punch-Shear Test for Dental Purposes. J. Dent. Res. 1970, 49, 131–136. [CrossRef]
- Feilzer, A.J.; De Gee, A.J.; Davidson, C.L. Setting Stress in Composite Resin in Relation to Configuration of the Restoration. J. Dent. Res. 1987, 66, 1636–1639. [CrossRef]
- Frankenberger, R.; Krämer, N.; Oberschachtsiek, H.; Petschelt, A. Dentin bond strength and marginal adaption after NaOCl pre-treatment. Oper. Dent. 2000, 25, 40–45.
- 19. da cunha Mello, F.S.; Feilzer, A.J.; de Gee, A.J.; Davidson, C.L. Sealing ability of eight resin bonding systems in a Class II restoration after mechanical fatiguing. *Dent. Mater.* **1997**, *13*, 372–376. [CrossRef]
- Kurtz, J.S.; Perdigão, J.; Geraldeli, S.; Hodges, J.S.; Bowles, W.R. Bond strengths of tooth-colored posts, effect of sealer, dentin adhesive, and root region. Am. J. Dent. 2003, 16, 31a–36a.
- 21. Marques de Melo, R.; Galhano, G.; Barbosa, S.H.; Valandro, L.F.; Pavanelli, C.A.; Bottino, M.A. Effect of adhesive system type and tooth region on the bond strength to dentin. *J. Adhes. Dent.* **2008**, *10*, 127–133. [PubMed]
- Zicari, F.; Couthino, E.; De Munck, J.; Poitevin, A.; Scotti, R.; Naert, I.; Van Meerbeek, B. Bonding effectiveness and sealing ability of fiber-post bonding. *Dent. Mater.* 2008, 24, 967–977. [CrossRef] [PubMed]
- Castellan, C.S.; Santos-Filho, P.C.; Soares, P.V.; Soares, C.J.; Cardoso, P.E. Measuring bond strength between fiber post and root dentin: A comparison of different tests. J. Adhes. Dent. 2010, 12, 477–485. [CrossRef] [PubMed]
- Brichko, J.; Burrow, M.F.; Parashos, P. Design Variability of the Push-out Bond Test in Endodontic Research: A Systematic Review. J. Endod. 2018, 44, 1237–1245. [CrossRef]
- Borges, B.C.; Souza-Junior, E.J.; da Costa Gde, F.; Pinheiro, I.V.; Sinhoreti, M.A.; Braz, R.; Montes, M.A. Effect of dentin pre-treatment with a casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) paste on dentin bond strength in tridimensional cavities. *Acta Odontol. Scand.* 2013, *71*, 271–277. [CrossRef]

Materials 2023, 16, 5667

- ISO 29022; Dentistry—Adhesion—Notched-Edge Shear Bond Strength Test. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2013.
- 27. Sudsangiam, S.; van Noort, R. Do dentin bond strength tests serve a useful purpose? J. Adhes. Dent. 1999, 1, 57–67.
- Van Noort, R.; Cardew, G.E.; Howard, I.C.; Noroozi, S. The effect of local interfacial geometry on the measurement of the tensile bond strength to dentin. J. Dent. Res. 1991, 70, 889–893. [CrossRef]
- Ilie, N.; Kunzelmann, K.H.; Hickel, R. Evaluation of micro-tensile bond strengths of composite materials in comparison to their polymerization shrinkage. *Dent. Mater.* 2006, 22, 593–601. [CrossRef]
- Rizzante, F.A.P.; Duque, J.A.; Duarte, M.A.H.; Mondelli, R.F.L.; Mendonça, G.; Ishikiriama, S.K. Polymerization shrinkage, microhardness and depth of cure of bulk fill resin composites. *Dent. Mater. J.* 2019, 38, 403–410. [CrossRef]
- 31. Quinn, J.B.; Quinn, G.D. A practical and systematic review of Weibull statistics for reporting strengths of dental materials. *Dent. Mater.* **2010**, *26*, 135–147. [CrossRef]
- Soares, C.J.; Santana, F.R.; Castro, C.G.; Santos-Filho, P.C.; Soares, P.V.; Qian, F.; Armstrong, S.R. Finite element analysis and bond strength of a glass post to intraradicular dentin: Comparison between microtensile and push-out tests. *Dent. Mater.* 2008, 24, 1405–1411. [CrossRef]
- Goracci, C.; Tavares, A.U.; Fabianelli, A.; Monticelli, F.; Raffaelli, O.; Cardoso, P.C.; Tay, F.; Ferrari, M. The adhesion between fiber posts and root canal walls: Comparison between microtensile and push-out bond strength measurements. *Eur. J. Oral Sci.* 2004, 112, 353–361. [CrossRef]
- Collares, F.M.; Portella, F.F.; Rodrigues, S.B.; Celeste, R.K.; Leitune, V.C.B.; Samuel, S.M.W. The influence of methodological variables on the push-out resistance to dislodgement of root filling materials: A meta-regression analysis. *Int. Endod. J.* 2016, 49, 836–849. [CrossRef] [PubMed]
- 35. Goracci, C.; Grandini, S.; Bossù, M.; Bertelli, E.; Ferrari, M. Laboratory assessment of the retentive potential of adhesive posts: A review. J. Dent. 2007, 35, 827–835. [CrossRef]
- 36. Rathke, A.; Frehse, H.; Muche, R.; Haller, B. Durability of fiber post-to-composite bonds achieved by physical vapor deposition and tribochemical silica coating. J. Adhes. Dent. 2014, 16, 559–565. [CrossRef]
- Pane, E.S.; Palamara, J.E.; Messer, H.H. Critical evaluation of the push-out test for root canal filling materials. J. Endod. 2013, 39, 669–673. [CrossRef] [PubMed]
- Nagas, E.; Uyanik, O.; Durmaz, V.; Cehreli, Z.C. Effect of plunger diameter on the push-out bond values of different root filling materials. Int. Endod. J. 2011, 44, 950–955. [CrossRef]
- 39. Linde, A.; Goldberg, M. Dentinogenesis. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 1993, 4, 679–728. [CrossRef] [PubMed]
- 40. Asande Adebayo, O.; Francis Burrow, M.; John Tyas, M. Bonding of one-step and two-step self-etching primer adhesives to dentin with different tubule orientations. *Acta Odontol. Scand.* **2008**, *66*, 159–168. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Dieser Abschnitt ist entnommen aus:

Schröter FJ, Ilie N. Pushout Bond Strength in Coronal Dentin: A Standardization Approach in Comparison to Shear Bond Strength. Materials (Basel). 2023 Aug 17;16(16):5667. doi: 10.3390/ma16165667.

Veröffentlicht unter der Creative Commons Lizenz CC BY 4.0.

7. Literaturverzeichnis

- 1. Buonocore, M.G., A Simple Method of Increasing the Adhesion of Acrylic Filling Materials to Enamel Surfaces. Journal of Dental Research, 1955. **34**(6): p. 849-853.
- 2. Gwinnett, A.J. and A. Matsui, *A study of enamel adhesives: The physical relationship between enamel and adhesive.* Archives of Oral Biology, 1967. **12**(12): p. 1615-IN46.
- 3. Van Meerbeek, B., et al., *From Buonocore's Pioneering Acid-Etch Technique to Self-Adhering Restoratives. A Status Perspective of Rapidly Advancing Dental Adhesive Technology.* J Adhes Dent, 2020. **22**(1): p. 7-34.
- 4. Hellwig, E., et al., *Einführung in die Zahnerhaltung*. 7 ed. 2018, Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag.
- 5. Mertz-Fairhurst, E.J., et al., *Ultraconservative and cariostatic sealed restorations: results at year 10.* J Am Dent Assoc, 1998. **129**(1): p. 55-66.
- 6. De Munck, J., et al., A Critical Review of the Durability of Adhesion to Tooth Tissue: Methods and Results. Journal of Dental Research, 2005. **84**(2): p. 118-132.
- 7. Van Meerbeek, B., et al., *State of the art of self-etch adhesives.* Dental Materials, 2011. **27**(1): p. 17-28.
- 8. Carvalho, R.M., et al., *A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives.* Biomaterials, 2005. **26**(9): p. 1035-42.
- 9. Yoshida, Y., et al., *Comparative Study on Adhesive Performance of Functional Monomers.* Journal of Dental Research, 2004. **83**(6): p. 454-458.
- 10. Yoshihara, K., et al., *Etching Efficacy of Self-Etching Functional Monomers*. Journal of Dental Research, 2018. **97**(9): p. 1010-1016.
- 11. Aida, M., et al., *Degradation-stage Effect of Self-etching Primer on Dentin Bond Durability.* Journal of Dental Research, 2009. **88**(5): p. 443-448.
- 12. Linde, A. and M. Goldberg, *Dentinogenesis*. Crit Rev Oral Biol Med, 1993. **4**(5): p. 679-728.
- 13. Pashley, D.H., *Smear layer: overview of structure and function.* Proc Finn Dent Soc, 1992. **88 Suppl 1**: p. 215-24.
- 14. Nakabayashi, N., K. Kojima, and E. Masuhara, *The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates.* Journal of Biomedical Materials Research, 1982. **16**(3): p. 265-273.
- 15. Hashimoto, M., et al., *Ten-years degradation of resin–dentin bonds.* European Journal of Oral Sciences, 2010. **118**(4): p. 404-410.
- 16. Pashley, D.H., et al., *Collagen degradation by host-derived enzymes during aging.* J Dent Res, 2004. **83**(3): p. 216-21.
- 17. Breschi, L., et al., *Dental adhesion review: Aging and stability of the bonded interface.* Dental Materials, 2008. **24**(1): p. 90-101.
- 18. Visse, R. and H. Nagase, *Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases.* Circulation Research, 2003. **92**(8): p. 827-839.
- 19. Mazzoni, A., et al., *Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin.* J Dent Res, 2007. **86**(5): p. 436-40.
- 20. Mazzoni, A., et al., *Immunohistochemical and biochemical assay of MMP-3 in human dentine*. J Dent, 2011. **39**(3): p. 231-7.
- 21. Sulkala, M., et al., *Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin.* Archives of Oral Biology, 2007. **52**(2): p. 121-127.
- 22. Sulkala, M., et al., *The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth.* J Dent Res, 2002. **81**(9): p. 603-7.

- 23. Tersariol, I.L., et al., *Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex.* J Endod, 2010. **36**(3): p. 475-81.
- 24. Van Wart, H.E. and H. Birkedal-Hansen, *The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(14): p. 5578-82.
- 25. Chung, L., et al., Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis. Embo j, 2004. **23**(15): p. 3020-30.
- 26. Perumal, S., O. Antipova, and J.P. Orgel, *Collagen fibril architecture, domain organization, and triple-helical conformation govern its proteolysis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 2824-9.
- Tjäderhane, L., et al., Optimizing dentin bond durability: Control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. Dental Materials, 2013. 29(1): p. 116-135.
- 28. Breschi, L., et al., *Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: A 2-year in vitro study.* Dental Materials, 2010. **26**(4): p. 320-325.
- 29. Parise Gré, C., et al., *Do collagen cross-linkers improve dentin's bonding receptiveness?* Dental Materials, 2018. **34**(11): p. 1679-1689.
- 30. Liu, Y., V. Dusevich, and Y. Wang, *Proanthocyanidins Rapidly Stabilize the Demineralized Dentin Layer.* Journal of Dental Research, 2013. **92**(8): p. 746-752.
- 31. Kharouf, N., Y. Haikel, and V. Ball, *Polyphenols in Dental Applications*. Bioengineering (Basel, Switzerland), 2020. **7**(3): p. 72.
- Stanislawczuk, R., A. Reis, and A.D. Loguercio, A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin-dentin interfaces. Journal of Dentistry, 2011. 39(1): p. 40-47.
- 33. De Munck, J., et al., *Inhibition of Enzymatic Degradation of Adhesive-Dentin Interfaces.* Journal of Dental Research, 2009. **88**(12): p. 1101-1106.
- 34. De Munck, J., et al., *Enzymatic degradation of adhesive–dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives*. European Journal of Oral Sciences, 2010. **118**(5): p. 494-501.
- 35. Sadek, F.T., et al., *Ethanol Wet-bonding Challenges Current Anti-degradation Strategy*. Journal of Dental Research, 2010. **89**(12): p. 1499-1504.
- 36. Montagner, A.F., et al., *MMP Inhibitors on Dentin Stability: A Systematic Review and Meta-analysis.* Journal of Dental Research, 2014. **93**(8): p. 733-743.
- 37. Hass, V., et al., *Collagen cross-linkers on dentin bonding: Stability of the adhesive interfaces, degree of conversion of the adhesive, cytotoxicity and in situ MMP inhibition.* Dental Materials, 2016. **32**(6): p. 732-741.
- 38. Demeule, M., et al., *Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 2000. **1478**(1): p. 51-60.
- 39. Chengelis, C.P., et al., 28-Day oral (gavage) toxicity studies of green tea catechins prepared for beverages in rats. Food and Chemical Toxicology, 2008. **46**(3): p. 978-989.
- 40. Almatroodi, S.A., et al., *Potential Therapeutic Targets of Epigallocatechin Gallate* (EGCG), the Most Abundant Catechin in Green Tea, and Its Role in the Therapy of Various Types of Cancer. Molecules, 2020. **25**(14): p. 3146.
- Lee, I.T., et al., Protective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate against TNF-α-induced lung inflammation via ROS-dependent ICAM-1 inhibition. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2013. 24(1): p. 124-136.
- 42. Shi, X., et al., Antioxidant properties of (-)-epicatechin-3-gallate and its inhibition of Cr(VI)induced DNA damage and Cr(IV)- or TPA-stimulated NF-kappaB activation. Mol Cell Biochem, 2000. **206**(1-2): p. 125-32.

- Zhang, Y., et al., Epigallocatechin-3-gallate induces the apoptosis of hepatocellular carcinoma LM6 cells but not non-cancerous liver cells. Int J Mol Med, 2015. 35(1): p. 117-24.
- 44. Bedran-Russo, A.K., et al., *Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications.* Dent Mater, 2014. **30**(1): p. 62-76.
- 45. Hardan, L., et al., *Effect of Collagen Crosslinkers on Dentin Bond Strength of Adhesive Systems: A Systematic Review and Meta-Analysis.* Cells, 2022. **11**(15): p. 2417.
- 46. Hiraishi, N., et al., *In vitro evaluation of plant-derived agents to preserve dentin collagen.* Dental Materials, 2013. **29**(10): p. 1048-1054.
- 47. Han, B., et al., *Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices.* Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2003. **65A**(1): p. 118-124.
- 48. Salz, U. and T. Bock, *Testing adhesion of direct restoratives to dental hard tissue a review.* J Adhes Dent, 2010. **12**(5): p. 343-71.
- Armstrong, S., et al., Academy of Dental Materials guidance on in vitro testing of dental composite bonding effectiveness to dentin/enamel using micro-tensile bond strength (μTBS) approach. Dental Materials, 2017. 33(2): p. 133-143.
- 50. Pashley, D.H., et al., *Adhesion testing of dentin bonding agents: a review.* Dent Mater, 1995. **11**(2): p. 117-25.
- 51. Sadek, F.T., et al., *A novel method to obtain microtensile specimens minimizing cut flaws.* Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2006. **78B**(1): p. 7-14.
- 52. Armstrong, S., et al., Adhesion to tooth structure: a critical review of "micro" bond strength test methods. Dent Mater, 2010. **26**(2): p. e50-62.
- 53. International Organization for Standardization, *ISO* 29022:2013 *Dentistry Adhesion* — *Notched-edge shear bond strength test*. Geneva: ISO; 2013.
- 54. Feilzer, A.J., A.J. De Gee, and C.L. Davidson, *Setting Stress in Composite Resin in Relation to Configuration of the Restoration.* Journal of Dental Research, 1987. **66**(11): p. 1636-1639.
- 55. DeHoff, P.H., K.J. Anusavice, and Z. Wang, *Three-dimensional finite element analysis of the shear bond test.* Dent Mater, 1995. **11**(2): p. 126-31.
- 56. Van Noort, R., et al., *A critique of bond strength measurements.* J Dent, 1989. **17**(2): p. 61-7.
- 57. Versluis, A., D. Tantbirojn, and W.H. Douglas, *Why do Shear Bond Tests Pull Out Dentin?* Journal of Dental Research, 1997. **76**(6): p. 1298-1307.
- Scherrer, S.S., P.F. Cesar, and M.V. Swain, *Direct comparison of the bond strength results of the different test methods: A critical literature review.* Dental Materials, 2010.
 26(2): p. e78-e93.
- 59. Hou, Z., et al., *Effects of tea polyphenols on signal transduction pathways related to cancer chemoprevention.* Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2004. **555**(1): p. 3-19.
- 60. Surh, Y.J., *Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 768-80.
- 61. Thangapazham, R.L., et al., *Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo.* Cancer Lett, 2007. **245**(1-2): p. 232-41.
- Ashihara, H., et al., Distribution and biosynthesis of flavan-3-ols in Camellia sinensis seedlings and expression of genes encoding biosynthetic enzymes. Phytochemistry, 2010. 71(5): p. 559-566.
- 63. Tjäderhane, L., et al., *The Activation and Function of Host Matrix Metalloproteinases in Dentin Matrix Breakdown in Caries Lesions.* Journal of Dental Research, 1998. **77**(8): p. 1622-1629.

- 64. Mazzoni, A., et al., *MMP Activity in the Hybrid Layer Detected with in situ Zymography.* Journal of Dental Research, 2012. **91**(5): p. 467-472.
- 65. Koh, Y.W., et al., Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits HGF-induced progression in oral cavity cancer through suppression of HGF/c-Met. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2011. **22**(11): p. 1074-1083.
- 66. Yun, J.H., et al., *Inhibitory effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate on the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts.* J Periodontal Res, 2004. **39**(5): p. 300-7.
- Alhijji, S., et al., Release and MMP-9 Inhibition Assessment of Dental Adhesive Modified with EGCG-Encapsulated Halloysite Nanotubes. Nanomaterials (Basel), 2023. 13(6): p. 999.
- Kim-Park, W.K., et al., Green tea catechin inhibits the activity and neutrophil release of Matrix Metalloproteinase-9. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 2016. 6(4): p. 343-346.
- 69. Chowdhury, A., et al., *Inhibition of pro-/active MMP-2 by green tea catechins and prediction of their interaction by molecular docking studies.* Molecular and Cellular Biochemistry, 2017. **427**(1): p. 111-122.
- 70. Fonseca, B.M., et al., *Mechanical-physicochemical properties and biocompatibility of catechin-incorporated adhesive resins.* J Appl Oral Sci, 2019. **27**: p. e20180111.
- 71. Suganuma, M., et al., Synergistic effects of (--)-epigallocatechin gallate with (--)epicatechin, sulindac, or tamoxifen on cancer-preventive activity in the human lung cancer cell line PC-9. Cancer Res, 1999. **59**(1): p. 44-7.
- 72. Dorozhkin, S.V., *Calcium orthophosphates in dentistry.* J Mater Sci Mater Med, 2013. **24**(6): p. 1335-63.
- 73. Farooq, I., et al., *Synergistic Effect of Bioactive Inorganic Fillers in Enhancing Properties* of Dentin Adhesives-A Review. Polymers (Basel), 2021. **13**(13): p. 2169.
- 74. Zhou, W., et al., *Modifying Adhesive Materials to Improve the Longevity of Resinous Restorations*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(3): p. 723.
- 75. Garcia, I.M., et al., *Influence of Different Calcium Phosphates on an Experimental Adhesive Resin.* J Adhes Dent, 2017. **19**(5): p. 379-384.
- 76. AlRefeai, M.H., et al., *Application of* β *-Tricalcium Phosphate in Adhesive Dentin Bonding.* Polymers (Basel), 2021. **13**(17): p. 2855.
- 77. Van Meerbeek, B., et al., *Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges.* Oper Dent, 2003. **28**(3): p. 215-35.
- 78. Mangano, C., et al., *A Human Clinical, Histological, Histomorphometrical, and Radiographical Study on Biphasic HA-Beta-TCP 30/70 in Maxillary Sinus Augmentation.* Clin Implant Dent Relat Res, 2015. **17**(3): p. 610-8.
- 79. Domard, A., *A perspective on 30 years research on chitin and chitosan.* Carbohydrate Polymers, 2011. **84**(2): p. 696-703.
- 80. Fakhri, E., et al., *Chitosan biomaterials application in dentistry*. Int J Biol Macromol, 2020. **162**: p. 956-974.
- 81. Arancibia, R., et al., *Effects of chitosan particles in periodontal pathogens and gingival fibroblasts.* J Dent Res, 2013. **92**(8): p. 740-5.
- 82. Khattak, S., et al., *Applications of cellulose and chitin/chitosan derivatives and composites as antibacterial materials: current state and perspectives.* Appl Microbiol Biotechnol, 2019. **103**(5): p. 1989-2006.
- 83. Kong, M., et al., *Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review.* Int J Food Microbiol, 2010. **144**(1): p. 51-63.
- 84. Pitts, N.B., et al., *Dental caries*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17030.
- 85. Mo, S.S., et al., *The microfloral analysis of secondary caries biofilm around Class I and Class II composite and amalgam fillings.* BMC Infect Dis, 2010. **10**: p. 241.

- 86. Gu, L.S., et al., *Chitosan-Based Extrafibrillar Demineralization for Dentin Bonding.* Journal of Dental Research, 2018. **98**(2): p. 186-193.
- 87. Silva, P.V., et al., *Chitosan: a new solution for removal of smear layer after root canal instrumentation.* Int Endod J, 2013. **46**(4): p. 332-8.
- 88. Penumaka, R., et al., *Scanning electron microscopy evaluation of chitosan and carboxymethyl chitosan as retrograde smear layer removing agents.* Journal of Conservative Dentistry and Endodontics, 2019. **22**(6): p. 573-577.
- 89. Singh, R., K. Shitiz, and A. Singh, *Chitin and chitosan: biopolymers for wound management.* International Wound Journal, 2017. **14**(6): p. 1276-1289.
- 90. Kean, T. and M. Thanou, *Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2010. **62**(1): p. 3-11.
- 91. Schröter, F.J., et al., *Enhancing dentin bonding through new adhesives formulations with natural polyphenols, tricalcium phosphate and chitosan.* Dent Mater, 2023: p. 276-284.
- 92. Roydhouse, R.H., *Punch-Shear Test for Dental Purposes.* Journal of Dental Research, 1970. **49**(1): p. 131-136.
- Goracci, C., et al., The adhesion between fiber posts and root canal walls: comparison between microtensile and push-out bond strength measurements. European Journal of Oral Sciences, 2004. 112(4): p. 353-361.
- Zicari, F., et al., Bonding effectiveness and sealing ability of fiber-post bonding. Dent Mater, 2008. 24(7): p. 967-77.
- Chen, W.-P., et al., *Limitations of Push-out Test in Bond Strength Measurement*. Journal of Endodontics, 2013. 39(2): p. 283-287.
- Brichko, J., M.F. Burrow, and P. Parashos, Design Variability of the Push-out Bond Test in Endodontic Research: A Systematic Review. J Endod, 2018. 44(8): p. 1237-1245.
- 97. Frankenberger, R., et al., *Dentin bond strength and marginal adaption after NaOCI pretreatment.* Oper Dent, 2000. **25**(1): p. 40-5.
- 98. Schröter, F.J. and N. Ilie, *Pushout Bond Strength in Coronal Dentin: A Standardization Approach in Comparison to Shear Bond Strength.* Materials (Basel), 2023. **16**(16): p. 5667.
- 99. International Organization for Standardization, *ISO* 10993-12:2012 *Biological evaluation of medical devices Sample preparation and reference materials*. Geneva: ISO; 2012.
- 100. Sigma-Aldrich. *Protokollleitfaden: WST-1-Assay für die Zellproliferation und Viabilität.* [cited 19th May 2024]; Available from: <u>https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-reagent-wst-1.</u>
- 101. Quinn, J.B. and G.D. Quinn, *A practical and systematic review of Weibull statistics for reporting strengths of dental materials.* Dental Materials, 2010. **26**(2): p. 135-147.

Anhang A: Paper I

GTE	Exp. 1.1	Exp. 2.1	Exp. 1.2
[mg/g]	[µg/g]	[µg/g]	[µg/g]
4,59 ± 0,21	15,13 ± 0,16	15,51 ± 0,18	0
36,67 ± 0,31	3,79 ± 0,23	3,81 ± 0,22	0
8,44 ± 0,23	1,98 ± 0,12	2,15 ± 0,17	0
1,14 ± 0,13	2,55 ± 0,17	2,85 ± 0,18	0
1,41 ± 0,14	0,63 ± 0,10	0,77 ± 0,14	0
0,04 ± 0,16	0	0	0
0,28 ± 0,10	0	0	0
	GTE[mg/g] $4,59 \pm 0,21$ $36,67 \pm 0,31$ $8,44 \pm 0,23$ $1,14 \pm 0,13$ $1,41 \pm 0,14$ $0,04 \pm 0,16$ $0,28 \pm 0,10$	GTEExp. 1.1[mg/g][μ g/g]4,59 ± 0,2115,13 ± 0,1636,67 ± 0,313,79 ± 0,238,44 ± 0,231,98 ± 0,121,14 ± 0,132,55 ± 0,171,41 ± 0,140,63 ± 0,100,04 ± 0,1600,28 ± 0,100	GTEExp. 1.1Exp. 2.1[mg/g][µg/g][µg/g] $4,59 \pm 0,21$ $15,13 \pm 0,16$ $15,51 \pm 0,18$ $36,67 \pm 0,31$ $3,79 \pm 0,23$ $3,81 \pm 0,22$ $8,44 \pm 0,23$ $1,98 \pm 0,12$ $2,15 \pm 0,17$ $1,14 \pm 0,13$ $2,55 \pm 0,17$ $2,85 \pm 0,18$ $1,41 \pm 0,14$ $0,63 \pm 0,10$ $0,77 \pm 0,14$ $0,04 \pm 0,16$ 0 0

Tabelle 2: Polyphenol-Gehalt des Grüntee Extrakts (GTE) und der experimentellen Adhäsive Exp. 1.1, Exp. 2.1 und Exp. 1.2 (Durchschnitt ± Standardabweichung).

Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an: [91]

Tabelle 3: Scher-Verbundfestigkeit (SBS) in MPa (Durchschnitt \pm Standardabweichung), Weibull Modul (*m*) mit 95% Konfidenzintervall in Klammern sowie R²-Werte der beiden Alterungszeiträume. Die hochgestellten Buchstaben beschreiben signifikante Unterschiede innerhalb eines Alterungszeitraums, der Stern (*) bezeichnet Unterschiede zwischen den Alterungszeiträumen.

Gruppe	Alterung	SBS	m	R ²
Ехр. 1.1	24 h	12,6 ± 6,6 ^{a, c}	2,1 (1,9; 2,3)	0,97
	6 m	12,5 ± 4,5 ^b	3,1 (2,7; 3,4)	0,95
Ехр. 1.2	24 h	7,0 ± 4,1 ^b	1,9 (1,8; 2,0)	0,99
	6 m	6,9 ± 4,1 ^c	1,5 (1,4; 1,7)	0,96
Ехр. 2.1	24 h	12,5 ± 3,3 ^a	4,0 (3,5; 4,5)	0,93
	6 m	9,8 ± 4,1 ^{b, c, *}	2,7 (2,3; 3,0)	0,92
Ехр. 2.2	24 h	9,3 ± 2,6 ^{b, c}	4,3 (3,8; 4,8)	0,94
	6 m	8,3 ± 3,5 °	1,5 (1,2; 1,8)	0,83
CSE	24 h	15,9 ± 6,5 ª	2,9 (2,4; 3,3)	0,91
	6 m	19,4 ± 5,4 ª	3,3 (2,8; 3,9)	0,90

Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an: [91]

Gruppe	Alterung	n	SBS
Exp. 1.1	24 h	17	11,9 ± 6,9 ª
	6 m	19	12,4 ± 4,6 ª
Ехр. 1.2	24 h	18	6,3 ± 3,4 ^b
	6 m	20	6,9 ± 4,1 ^b
Ехр. 2.1	24 h	16	11,8 ± 3,4 ª
	6 m	20	9,8 ± 4,1 ^{a, b}
Ехр. 2.2	24 h	20	9,3 ± 2,6 ª
	6 m	20	8,3 ± 3,5 ^{b, c}
CSE	24 h	10	11,7 ± 3,6 ª
	6 m	3	15,0 ± 8,8 ^{a, c}

Tabelle 4: Scher-Verbundfestigkeiten (SBS) in MPa (Durchschnitt \pm Standardabweichung) und Stückzahl pro Gruppe (*n*) der ausschließlich adhäsiv gebrochenen Prüfkörper. Hochgestellte Buchstaben signalisieren signifikante Unterschiede innerhalb eines Alterungszeitraums.

Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an: [91]

Tabelle 5: Frakturmodi	der getesteten	Prüfkörper nach 24 h und	I 6 Monaten Alterung bei n = 20.
------------------------	----------------	--------------------------	----------------------------------

Gruppe	Alterung	Frakturmodus			
		Adhäsiv	Gemischt	Kohäsiv Dentin	Kohäsiv Komposit
Ехр. 1.1	24 h	17	0	3	0
	6 m	19	0	1	0
Ехр. 1.2	24 h	18	1	1	0
	6 m	20	0	0	0
Ехр. 2.1	24 h	16	0	4	0
	6 m	20	0	0	0
Ехр. 2.2	24 h	20	0	0	0
	6 m	20	0	0	0
CSE	24 h	10	5	4	1
	6 m	3	14	3	0

Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an: [91]

Gruppe	Alterung	Verbleib der Adhäsivschicht		
		Dentin	Komposit	
Ехр. 1.1	24 h	11	9	
	6 m	1	19	
Ехр. 1.2	24 h	2	18	
	6 m	1	19	
Exp. 2.1	24 h	14	6	
	6 m	0	20	
Ехр. 2.2	24 h	15	5	
	6 m	2	18	
CSE	24 h	13	7	
	6 m	15	5	

Tabelle 6: Modified adhesive remnant index (mARI) der getesteten Prüfkörper nach 24 h und 6 Monaten Alterung bei n = 20.

Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an: [91]

Tabelle 7: Zell Viabilität aller Adhäsive in % von der Negativkontrolle (NK; Durchschnitt \pm Standardabweichung), sortiert nach Zeitpunkt der Eluatentnahme (h = Stunden, d = Tage, m = Monate).

Gruppe	Alterung						
	24 h	48 h	72 h	10 d	30 d	3 m	6 m
Ехр. 1.1	47,9	103,5	124,9	116,9	110,4	110,7	119,5
	±15,3	±16,1	±17,5	±12,0	±12,6	±15,0	±10,7
Exp. 1.2	50,0	108,9	118,7	105,7	101,7	105,1	102,8
	±19,0	±7,7	±16,6	±10,5	±8,9	±7,8	±8,3
Exp. 2.1	39,9	105,9	122,5	108,3	106,9	104,8	111,9
	±17,2	±9,7	±13,6	±8,1	±9,7	±7,2	±11,2
Ехр. 2.2	40,4	103,9	113,8	104,5	108,7	107,6	110,3
	±19,6	±12,0	±11,5	±9,4	±10,6	±12,0	±9,4
CSE	81,4	99,3	110,9	122,6	109,2	114,2	123,0
	±24,0	±12,3	±11,6	±16,3	±11,0	±12,5	±15,4
NK	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	±11,9	±10,3	±9,6	±6,5	±6,7	±6,9	±6,9

Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an: [91]

Anhang B: Paper II

Tabelle 8: Verbundfestigkeiten (BS) in MPa (Durchschnitt \pm Standardabweichung), Weibull Module (*m*) mit 95% Konfidenzintervallen in Klammern sowie R² Werte beider Testmethoden. Hochgestellte Buchstaben beschreiben signifikante Unterschiede innerhalb eines Tests, Sterne (*) beschreiben signifikante Unterschiede zwischen den Tests der jeweiligen Gruppen.

Pushout-Test			Scher-Test			
Gruppe	BS	m	R ²	BS	m	R ²
Ехр. 1.1	16,5	5,9	0,82	12,6	2,1	0,97
	(3,3) *	(4,61; 7,25)		(6,6) ^{a, c}	(1,92; 2,25)	
Ехр. 1.2	14,2	3,8	0,88	7,0	1,9	0,99
	(4,3) *	(3,14; 4,45)		(4,1) ^b	(1,80; 2,01)	
Ехр. 2.1	16,3	5,0	0,91	12,5	4,0	0,93
	(4,0) *	(4,26; 5,79)		(3,3) ^a	(3,48; 4,48)	
Ехр. 2.2	16,5	3,5	0,98	9,3	4,3	0,94
	(5,1) *	(3,29; 3,78)		(2,6) ^{b, c}	(3,81; 4,79)	
CSE	16,5	4,1	0,95	15,9	2,9	0,91
	(4,7)	(3,62; 4,49)		(6,5) ^a	(2,44; 3,32)	

Quelle: Schröter FJ, Ilie N. Materials 2023, 16(16), 5667. doi: 10.3390/ma16165667. Lizenz: CC BY 4.0.

Tabelle 9: Vergleich der Verbundfestigkeit (BS) in MPa (Durchschnitt ± Standardabweichung) des experimentellen Adhäsivs Exp. 1.2 ohne Verwendung des Primers. Der Stern (*) symbolisiert einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Testmethoden.

Testmethode	n	BS
Pushout-Test	6	14,9 (2,3) *
Scher-Test	7	2,1 (1,2)

Gruppe	Summe	Invalide Messungen
Exp. 1.1	26	6
Ехр. 1.2	28	8
Exp. 2.1	33	13
Exp. 2.2	33	13
CSE	22	2
Summe	142	42

Tabelle 10: In Summe hergestellte Prüfkörper und Anzahl invalider Messungen aufgrund Fraktur außerhalb der Grenzschicht pro Gruppe.

Quelle: Schröter FJ, Ilie N. Materials 2023, 16(16), 5667. doi: 10.3390/ma16165667. Lizenz: CC BY 4.0.



Abbildung 2: Boxplots der Verbundfestigkeiten (BS) des Pushout- und Scher-Tests der Adhäsive Exp. 1.1, Exp. 1.2, Exp. 2.1, Exp. 2.2 und CSE.



Abbildung 3: Weibull-Verteilung des Pushout- (A) und Scher-Tests (B) der Adhäsive Exp. 1.1, Exp. 1.2, Exp. 2.1, Exp. 2.2 und CSE.



Abbildung 4: Stempelpositionen der validen (A) und invaliden (B) Prüfkörper der Adhäsive Exp. 1.1, Exp. 1.2, Exp. 2.1, Exp. 2.2 und CSE.



Abbildung 5: Beispielbilder der Stempelpositionen zentral (A), marginal (B) und überlappend (C). Kavitätenränder sind durch den großen Kreis markiert, Stempelimpressionen durch den kleinen Kreis. Die Pfeile markieren sichtbare Frakturlinien innerhalb des Dentins.

Danksagung

In erster Linie möchte ich Frau Professor Dr. Nicoleta Ilie für das Überlassen des Themas sowie die exzellente Betreuung und Unterstützung über den gesamten Verlauf meiner Promotion hinweg danken. Die hilfreichen Diskussionen in regelmäßigen Seminaren, gründlichen und konstruktiven Korrekturen meiner Manuskripte und allem voran die zuverlässige und gute Beantwortung meiner Fragen haben mir immer sehr geholfen. Sie haben den Grundstein meiner wissenschaftlichen Laufbahn gelegt, auf den ich ein Leben lang zurückgreifen kann. Vielen Dank.

Außerordentlicher Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich zu dem Menschen gemacht hat, der ich heute bin. Ihr habt mir diesen Lebensweg überhaupt erst ermöglicht und mich dabei durchwegs ohne Wenn und Aber unterstützt. Sämtliche Höhen und Tiefen habe ich durch eure Hilfe meistern können, während ihr mir immer mit Rat und Tat zur Seite standet. Danke, diese Arbeit ist für euch, Mama und Papa.

Nicht unerwähnt möchte ich meine bessere Hälfte lassen, die mir durch ihre liebevolle Art immer wieder die Kraft gegeben hat, weiterzumachen, auch wenn Lust und Motivation mich verlassen hatten. Danke dir, mein Schatz.

Zu guter Letzt gilt mein Dank all denjenigen, die mich auf meinem Weg hierhin unterstützt haben. Danke für die Hilfe, die ich während des Studiums und der etlichen Stunden im Labor, der Auswertung und Analyse meiner Daten erfahren habe.