

Aus der Abteilung für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie  
des CharitéCentrums 3 für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Effekte unterschiedlicher Kalziumkonzentrationen  
in wässrigen Lösungen auf demineralisierte bovine  
Zahnhartsubstanzen *in vitro***

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Barbara Exeli-Knoflach  
aus Klagenfurt/Österreich

Gutachter:

1. Prof. Dr. A. M. Kielbassa
2. Prof. Dr. R. Haak
3. Prof. Dr. E. Hellwig

Datum der Promotion:08.04.2011

Meinem Mann und  
meiner Familie  
gewidmet.

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	<b>2</b>
2.1	Zahnschmelz.....	2
2.1.1	Chemische Struktur.....	2
2.1.2	Histologischer Aufbau .....	3
2.2	Dentin .....	3
2.2.1	Chemische Struktur.....	4
2.2.2	Histologischer Aufbau .....	4
2.3	Kariesentstehung .....	5
2.3.1	Mikroorganismen .....	5
2.4.2	Wirt .....	6
2.4.3	Speichel .....	6
2.4.4	Substrat und Zeit.....	8
2.4.5	Histologie der Schmelz- und Dentinkaries .....	9
2.5	Chemische Reaktionen zwischen HAP und dem Speichel.....	10
2.5.1	Sättigung einer Lösung .....	10
2.5.2	Einfluss des pH-Wertes auf die Sättigung einer Lösung .....	11
2.5.3	Demineralisation .....	11
2.5.4	Remineralisation .....	13
2.5.4.1	Remineralisationslösung nach Buskes <i>et al.</i> .....	13
<b>3</b>	<b>Ziel der Arbeit und Arbeitshypothese</b> .....	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methode</b> .....	<b>16</b>
4.1	Herstellung der Schmelzproben.....	16
4.2	Demineralisation der Schmelzproben .....	17
4.3	Herstellung der Dentinproben .....	18
4.4	Demineralisation der Dentinproben.....	19
4.5	Herstellung der Versuchslösungen .....	19
4.5.1	Wässrige Lösung mit unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen.....	20
4.5.2	Remineralisationslösung .....	21
4.5.3	Analyse der Kalzium- und Phosphatkonzentrationen.....	21
4.6	Durchführung der Versuche .....	22
4.7	Probenvorbereitung für die transversale Mikroradiografie.....	23

---

4.8	Prinzip der transversalen Mikroradiografie.....	24
4.9	Herstellung der Mikroradiogramme.....	25
4.10	Mikroradiografische Auswertung.....	25
4.10.1	Vorbereitungen zur mikroradiografischen Auswertung.....	25
4.10.2	Bestimmung des Mineralverlustes der Schmelz- und Dentinproben.....	26
4.10.3	Bestimmung der Läsionstiefe der Schmelz- und Dentinproben.....	27
4.10.4	Struktureller Aufbau der Schmelz- und Dentinproben.....	28
4.11	Statistische Auswertung.....	29
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
5.1	Sättigungsberechnung.....	30
5.2	Quantitative Auswertung der Schmelzproben.....	31
5.2.1	Mineralverlust der Schmelzproben.....	31
5.2.2	Veränderung des Mineralgehaltes der Schmelzproben.....	34
5.2.3	Läsionstiefe der Schmelzproben.....	37
5.2.4	Veränderung der Läsionstiefe der Schmelzproben.....	38
5.3	Qualitative Auswertung.....	39
5.3.1	Struktureller Aufbau der Schmelzläsionen.....	39
5.5	Quantitative Auswertung der Dentinproben.....	42
5.5.1	Mineralverlust der Dentinproben.....	42
5.5.2	Veränderung des Mineralgehaltes der Dentinproben.....	45
5.5.3	Läsionstiefe der Dentinproben.....	48
5.5.4	Veränderung der Läsionstiefe der Dentinproben.....	49
5.6	Qualitative Auswertung der Dentinproben.....	50
5.6.1	Struktureller Aufbau der Dentinläsionen.....	50
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>54</b>
6.1	Diskussion von Material und Methode.....	54
6.1.1	Bovine Zahnhartsubstanzen.....	54
6.1.2	Vorbereitung der Proben.....	54
6.1.3	Transversale Mikroradiografie.....	55
6.2	Diskussion der Ergebnisse.....	55
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerungen.....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>64</b>
<b>9</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>65</b>

---

<b>10 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>66</b>
<b>11 Anhang.....</b>	<b>70</b>
11.1 Abkürzungsverzeichnis .....	70
11.2 Liste der verwendeten Materialien .....	72
11.3 Danksagung.....	74
11.4 Lebenslauf .....	75
11.5 Eidesstattliche Erklärung.....	76

## 1 Einleitung

Karies ist eine Erkrankung der Zahnhartsubstanz. In den Anfängen der Kariesbehandlung galt als Mittel der Wahl die invasive Therapie, bei der die kariöse Zahnhartsubstanz entfernt und der Defekt mit diversen Materialien gefüllt wurde. Aufgrund der in den letzten Jahrzehnten erworbenen Erkenntnisse über die Ätiologie und Pathogenese der Karies und dem Einsatz von nicht-invasiver und minimal-invasiver Karietherapie (Ernährungslenkung, Fluoridierung, Mundhygiene) wird heute ein deutlicher Kariesrückgang verzeichnet (vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie). Die rein invasive Form der Therapie gerät dabei immer mehr in den Hintergrund. Initiale Zahnhartsubstanzläsionen besitzen unter bestimmten Voraussetzungen die Fähigkeit, über einen langen Zeitraum zu remineralisieren [Arends *et al.* 1986]. Es existieren bereits zahlreiche In-vitro-Untersuchungen über die Remineralisation von demineralisierten Zahnhartsubstanzen [Lynch *et al.* 2007; Hara *et al.* 2008; Exterkate *et al.* 1993; Tschoppe *et al.* 2009]. Die Remineralisationslösung nach Buskes *et al.* (nachfolgend als BUSKES-Lösung bezeichnet) wird seit ihrer Entwicklung im Jahr 1985 häufig als Positivkontrolle in Studien zur Remineralisation von Zahnhartsubstanzläsionen verwendet [Buskes *et al.* 1985]. Als Puffer besitzt die BUSKES-Lösung HEPES (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure), die für menschliches Gewebe toxisch ist [Zigler *et al.* 1985]. Aus diesem Grund ist der Anwendungsbereich dieser Remineralisationslösung auf In-vitro-Studien beschränkt. Die Erkenntnisse, die in diesem Zusammenhang im Rahmen von In-vitro-Untersuchungen gewonnen werden, sind jedoch kritisch zu betrachten, da eine klinische Situation oftmals nur unzureichend *in vitro* simuliert werden kann. Hauptverantwortlich dafür sind Speichel und Plaque, die sowohl einen starken Einfluss auf die Diffusion und Konzentration der Ionen als auch auf die Sättigung hinsichtlich zahlreicher Kalzium-Phosphat-Komplexe ausüben können [König 1987].

In einer In-vitro-Studie, die die Remineralisationswirkung modifizierter Speichelersatzmittel (Saliva natura<sup>®</sup>-Lösungen) auf demineralisiertes bovines Dentin untersuchte, wurde ein Phosphatpuffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 1:2) eingesetzt [Tschoppe *et al.* 2009]. Dieser hielt den pH-Wert der Versuchslösungen bei 6,3 konstant. Der Phosphatpuffer stellt einen möglichen HEPES-Ersatz dar. Ausgehend von dieser Erkenntnis könnte eine zur BUSKES-Lösung vergleichbare Remineralisationslösung für den Einsatz bei In-vivo-Untersuchungen entwickelt werden.

Das Ziel dieser Studie war, die Remineralisationseigenschaft verschiedener Kalziumkonzentrationen in wässrigen Lösungen mit Phosphatpuffer im Vergleich zur BUSKES-Lösung an demineralisierten Zahnhartsubstanzen *in vitro* zu untersuchen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Zahnschmelz

Zahnschmelz bildet die äußerste Schicht der Zahnkrone und schützt das darunterliegende Dentin sowie die von Dentin umgebene Pulpa. Ausgereifter Zahnschmelz, der über keine zellulären Reparaturmechanismen verfügt, ist die härteste und am stärksten mineralisierte Substanz des menschlichen Körpers. Die Härte liegt zwischen 365 - 396 KHN (Knoop-hardness numbers) [Sauerwein 1974].

#### 2.1.1 Chemische Struktur

Der Zahnschmelz besteht zu 93 bis 98 Gewichtsprozent (Gew%) aus anorganischem Material [Le Geros *et al.* 1991]. Der anorganische Schmelzanteil setzt sich hauptsächlich aus Kalzium, Phosphat und geringen Mengen an Karbonat, Magnesium, Natrium sowie Chlor zusammen. Das Kalzium-Phosphat-Verhältnis des Zahnschmelzes beträgt im Mittel 1:1,6. Kalzium-Phosphat-Verbindungen liegen meist in ihrer stabilsten und energieärmsten Form, dem Hydroxylapatit (HAP), vor. Reines, stöchiometrisches Hydroxylapatit  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  kommt unter biologischen Bedingungen nicht vor [Dorozhkin *et al.* 2002]. Das HAP des Zahnschmelzes wird als nicht stöchiometrische Verbindung betrachtet, da dessen Hydroxylgruppen (OH) zum Teil durch Fluorid, Karbonat, Chlorid und anderen Ionen substituiert werden können [Nikiforuk *et al.* 1985]. Hierdurch ändern sich wichtige Eigenschaften des Zahnschmelzes, wie die Löslichkeit, Größe und Stabilität der Kristalle. Karboniertes Apatit ist weniger stabil und löslicher als HAP [Heslop *et al.* 2005], wohingegen Fluorapatit die stabilste Form des Apatits gegen Säureangriffe darstellt [Le Geros *et al.* 1991]. Im Zahnschmelz kommen neben dem HAP auch andere Kalzium-Phosphat-Verbindungen wie amorphes Kalziumphosphat (AKP), Dikalziumphosphatdihydrat (DKPD, Brushit) und Oktakalziumphosphat (OKP) vor. OKP und DKPD sind Vorstufen des HAP, wobei OKP  $[\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}]$  eine direkte Vorstufe des HAP ist und DKPD  $[\text{CaHPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}]$  durch Transformationsvorgänge über die Zwischenstufe OKP in HAP umgewandelt wird [Johnsson *et al.* 1992; Driessens *et al.* 1990; Dorozhkin *et al.* 2002].

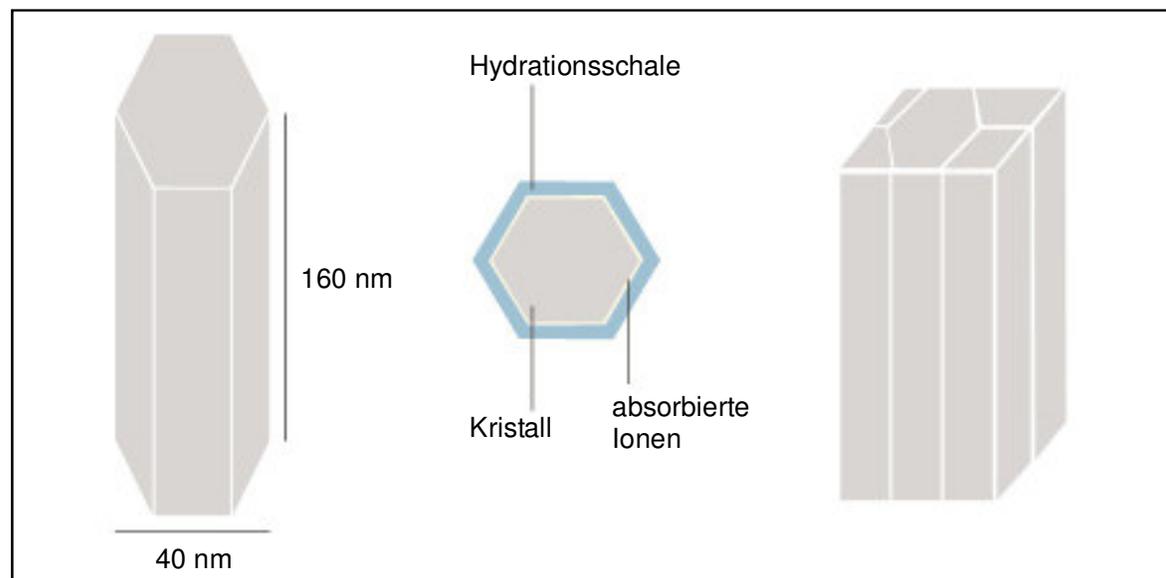
Den zweitgrößten Anteil des Zahnschmelzes bildet Wasser mit 3 Gew% [Sauerwein 1974]. Drei Viertel des Wassers ist in Form einer Hydratationsschale an die Apatitkristalle gebunden. Das verbleibende Viertel des Wassergehaltes ist frei in der organischen Materie verfügbar [Schröder *et al.* 1987]. Das im Zahnschmelz befindliche Wasser spielt eine wichtige Rolle bei der De- und Remineralisation von Apatitkristallen. Der Zahnschmelz wirkt bei Flüssigkeitsbewegungen, die unter anderem durch Erwärmung oder Feuchtigkeitzufuhr entstehen, als Molekularsieb, bei dem Ionen

sowohl in die Apatitkristalle eingebaut, als auch aus diesen herausgelöst werden können [Dibdin *et al.* 1972; Le Geros *et al.* 1991].

Der übrige Teil des Zahnschmelzes besteht aus organischem Material, das sich aus Proteinen (ca. 58 %), Lipiden (ca. 40 %), Spuren von Kohlenhydraten, Zitrat und Laktat zusammensetzt [Schröder *et al.* 1987].

### 2.1.2 Histologischer Aufbau

Apatitkristalle mit einem hexagonalen Querschnitt stellen die kleinsten anorganischen Bausteine des Zahnschmelzes dar (Abb. 1). Sie sind durchschnittlich 160 nm lang, 40 nm breit und 20 - 30 nm dick [Schumacher *et al.* 1989]. Jeder Kristall besitzt eine Hydratationsschale (Abb. 1), die aus adsorbierten Ionen, Proteinen, Lipiden und Wasser besteht. Jeweils 100 dieser Apatitkristalle liegen im Querschnitt zusammen und bilden ein Schmelzprisma. Die Prismen sind von einer interprismatischen Substanz umgeben, die sich aus ungeordneten und beinahe senkrecht zur Prismenachse liegenden Apatitkristallen zusammensetzt [Ten Cate *et al.* 1985].



**Abb. 1** Schematische Darstellung eines HAP-Kristalls (links); Anordnung dieser in den Schmelzprismen (rechts) in Anlehnung an Schröder [Schröder *et al.* 1987].

## 2.2 Dentin

Der Hauptbestandteil des humanen Zahnes ist Dentin. Es umgibt die Zahnpulpa und bildet mit dieser eine funktionelle Einheit. Die Dentinschicht wird im koronalen Bereich

von Zahnschmelz und im Wurzelbereich von Zahnzement bedeckt. Im Vergleich zu Schmelz ist Dentin weniger mineralisiert und kann mittels der Odontoblasten, die sich in der Peripherie der Zahnpulpa befinden, lebenslang gebildet werden. Das während der Zahnentwicklung produzierte Dentin wird als Primärdentin bezeichnet. Regulär nach Abschluss des Wurzelwachstums gebildetes Dentin wird Sekundärdentin genannt. Die Entstehung von Tertiärdentin erfolgt lokal durch auftretende Reize (Trauma, Erosion, Karies, iatrogene Schäden) [Ten Cate *et al.* 1985].

### 2.2.1 Chemische Struktur

Die chemische Zusammensetzung des Dentins ist der von Knochen sehr ähnlich. Dentin besteht zu 70 Gew% aus anorganischem Material, das sich hauptsächlich aus Kalzium und Phosphat mit geringen Mengen an Magnesium, Karbonat, Fluorid und anderen Spurenelementen zusammensetzt [Schröder *et al.* 1987]. Das Kalzium-Phosphat-Verhältnis von Dentin beträgt im Mittel 1:1,6 [Dorozhkin *et al.* 2002]. Wie im Zahnschmelz liegen die Kalzium-Phosphat-Verbindungen hauptsächlich als nicht stöchiometrisches HAP vor (siehe Abschnitt 2.1.1 „Chemische Struktur“). Die Kristalle sind kleiner und dünner als die Apatitkristalle des Schmelzes (64 nm lang, 4 nm breit und dick) und nicht in Prismenform angeordnet, sondern liegen dicht gepackt aneinander [Schumacher *et al.* 1989].

Dentin besteht darüber hinaus zu 20 Gew% aus organischer Matrix und zu 10 Gew% aus Wasser. Den Hauptbestandteil des organischen Materials (80 - 90 %) bildet Kollagen Typ 1, die verbleibenden 8 - 9 % bestehen aus nichtkollagener Grundsubstanz und Matrixproteinen, die eine entscheidende Rolle bei der Dentinogenese und Remineralisation spielen [Arnold 2006; Bertassoni *et al.* 2009; Ten Cate 2008].

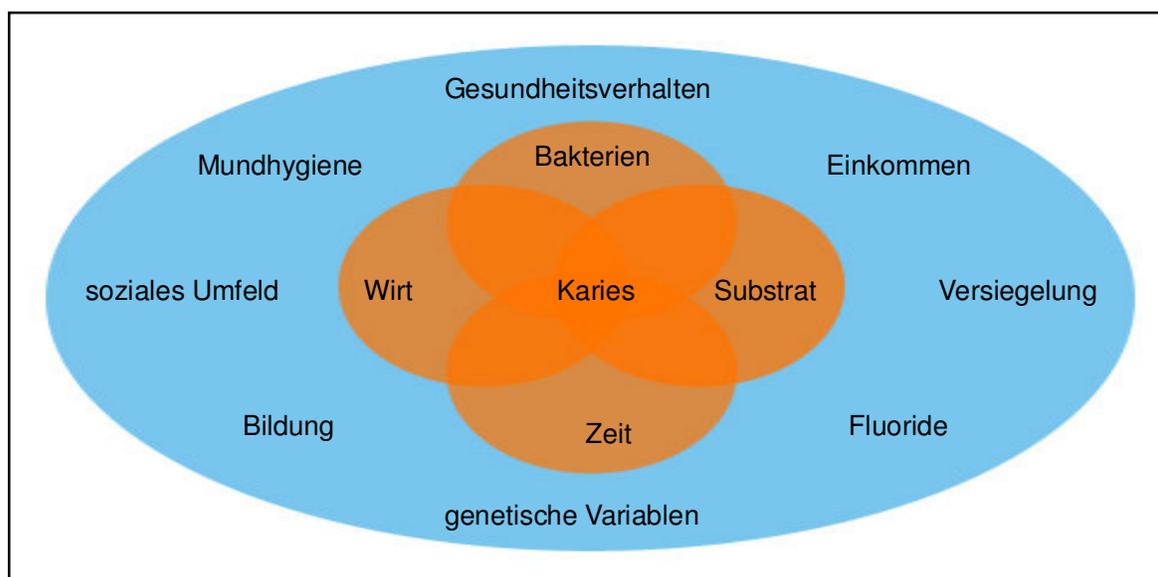
### 2.2.2 Histologischer Aufbau

Dentin wird von Dentinkanälen durchzogen. Diese beinhalten Odontoblastenfortsätze, die mit Dentinliquor umspült werden. Die Durchmesser und Volumina der Dentinkanäle nehmen von der Pulpa Richtung Schmelz-Dentin-Grenze ab. Im pulpanahen Dentin werden 80 % des Gesamtquerschnittes aus den Lumen der Dentinkanäle gebildet. Dieser Wert sinkt zur Schmelz-Dentin-Grenze hin auf 4 % ab [Ten Cate *et al.* 1985]. Die Dentinkanäle werden von peritubulärem Dentin ausgekleidet, das die am stärksten mineralisierte Struktur im Dentin darstellt [Takuma *et al.* 1960]. Eine Trennung der Dentinkanäle wird durch intertubuläres Dentin erreicht. Intertubuläres Dentin ist weniger mineralisiert als peritubuläres und besteht zu 50 % aus kollagenem Flechtwerk [Schröder *et al.* 1987].

## 2.3 Kariesentstehung

Karies ist ein lokalisierter pathologischer Vorgang bakteriellen Ursprungs, der mit einer fortschreitenden Demineralisation der Zahnhartsubstanz einhergeht und schließlich zu einer Kavitätenbildung führt [Baume 1962].

Unter den zahlreichen Theorien zur Ätiologie der Karies hat sich die chemoparasitäre von Miller durchgesetzt [Miller 1898]. Diese Theorie wurde von weiteren Autoren verifiziert und erweitert [Orland *et al.* 1954; Orland *et al.* 1955; Keyes 1962]. Die Tetrade von König hat sich dabei allgemein etabliert [König 1971]. Diese besagt, dass die Zerstörung von Zahnhartsubstanz (Wirt) durch die Einwirkung organischer Säuren über einen längeren Zeitraum erfolgt. Diese Säuren entstehen beim Abbau von niedermolekularen Kohlehydraten (Substrat) und werden von kariogenen Mikroorganismen in der Mundhöhle ausgeschieden. Neben den vier Hauptfaktoren spielen bei der Kariesentstehung zahlreiche sekundäre Einflüsse wie Immunabwehr, genetische und sozioökonomische sowie verhaltensbezogene Faktoren eine Rolle (Abb. 2).



**Abb. 2** Tetrade der Kariesätiologie in Anlehnung an König [König 1971].

### 2.3.1 Mikroorganismen

Die Mikroorganismen der Mundhöhle sind in einer dreidimensional strukturierten und dicht verfilzten Plaque organisiert, die fest an der Zahnoberfläche haftet. Die Plaque setzt sich aus Bakterien (60 - 70 %) und einer Matrix zusammen und ist das Produkt bakterieller Kolonisierung und Proliferation. Die Matrix bildet sich aus

Speichelbestandteilen, bakteriellen Stoffwechselprodukten und Nahrungsresten [Marsh *et al.* 2003]. Die bakterielle Zusammensetzung der Plaque variiert je nach Alter. Die ursprünglich vorwiegend aus aeroben, grampositiven Mikroorganismen bestehende Plaque wird im Zeitablauf von anaeroben, gramnegativen Bakterien durchsetzt [Marsh *et al.* 1994]. Die Bestandteile der Matrix variieren in Abhängigkeit von der Speichelzusammensetzung, Ernährung und Syntheseleistung kariogener Mikroorganismen [Klimm 1997]. In der Mundhöhle befinden sich über 700 unterschiedliche Spezies von Mikroorganismen [Aas *et al.* 2005]. Dabei spielen vor allem Spezies der Streptokokken, Laktobazillen und Aktinomyzeten eine wichtige Rolle bei der Demineralisation von Zahnhartsubstanz [Marsh *et al.* 1994]. Die kariogene Wirkung der Plaquebakterien besteht in ihrer Fähigkeit, mittels Glykolyse Monosaccharide (Glukose, Fruktose, Laktose, Maltose), die direkt aufgenommen oder durch Saccharosespaltung entstehen, abzubauen. Als Stoffwechselendprodukt werden organische Säuren (z. B. Milchsäure, Essigsäure), die den pH-Wert in der Plaque senken, ausgeschieden [Carlsson *et al.* 1974].

#### 2.4.2 Wirt

Anomalien der Zahnhartsubstanz, Zahnfehlstellungen sowie Defekte der Zahnoberflächen erhöhen die Plaqueretention und begünstigen die Entstehung einer Karies.

#### 2.4.3 Speichel

Der Speichel nimmt einen hohen Stellenwert in der Kariesentstehung und der Prävention ein. Dies wurde von Sreebny treffend charakterisiert: „Speichel ist Aqua vitae der Mundhöhle“ [Sreebny *et al.* 1989].

Speichel wird von drei großen, paarigen und einer Vielzahl von kleinen Speicheldrüsen gebildet und sezerniert. Er umspült die Mundhöhle und bedeckt diese mit einem 10 - 100 µm dicken Film [Fejerskov *et al.* 2008].

Der von den Drüsen sezernierte Gesamtspeichel wird in Ruhespeichel und Reizspeichel eingeteilt (Tab. I). Der Ruhespeichel wird permanent ohne Stimulation produziert und unterliegt im Tagesverlauf einem zirkadianen Rhythmus mit einem Maximum an Sekretion am Nachmittag und einem Minimum während der Nachtruhe [Dawes *et al.* 1972]. Unter Reizspeichel versteht man jenen Speichel, der durch Stimulationen der Drüsen, wie Kautätigkeit, Geschmacks- und Geruchsreize, ausgeschieden wird [Edgar *et al.* 1990].

**Tabelle I:** Sekretionsrate, pH-Wert von Speichel [Klimm 1997; Driessens *et al.* 1990]

Parameter	Ruhespeichel	Reizspeichel
Sekretionsrate ml/min	0,25 - 0,35	1,00 - 2,00
pH-Wert	6,00 - 7,5	

Der Gesamtspeichel besteht zu 99,5 % aus Wasser und zu 0,5 % aus anorganischen und organischen Bestandteilen (Tab. II; Tab. III). Seine Zusammensetzung hängt von verschiedenen Faktoren, wie, der Sekretionsrate, Stimulationsdauer, Funktion der Drüsen und dem Stimulationsgrad ab [Whelton 1990].

**Tabelle II:** anorganische Bestandteile des Speichels und der Plaque [König 1987]

anorganische Anteile	Speichel in mmol/l	Plaque* in mmol/l
Phosphat	5,40	14,20
Kalzium	1,45	6,50
Natrium	13,00	35,00
Kalium	20,00	61,00
Magnesium	0,41	3,70

**Tabelle III:** organische Bestandteile des Speichels [Klimm 1997]

Organische Inhaltstoffe	Beispiele
biologisch aktive Proteine und Aminoverbindungen	$\alpha$ -Amylase, Maltase, Glykoproteine (Muzine), Histamin, Harnstoff, Prolin-reiche Proteine
Fette	Lipide. Lipoide
Säuren	Laktat (Milchsäure). Ziträt. Harnsäure
Hormone	Östrogene. Proaesteron
Vitamine	C. B1. B2. B12
Abwehrfaktoren	unspezifische: Lysozym, Lactoferrin, Lactoperoxidase, neutrale Granulozyten spezifische: Immunglobuline IgA, IgGA

Der Speichel besitzt eine Reihe von kariespräventiven Funktionen (Tab. IV). Eine davon ist die remineralisierende Wirkung des Speichels auf die Zahnhartsubstanz, da dieser als lösliche Phase des HAP betrachtet wird und unter physiologischen Bedingungen

(pH > 5.5) eine übersättigte Lösung (siehe Abschnitt 2.5.4 „Remineralisation“) in Bezug auf HAP darstellt [Larson *et al.* 2003; Edgar 1990].

Eine weitere Funktion des Speichels ist seine Pufferwirkung (Tab. IV). Die drei Puffersysteme des Speichels sind der Bikarbonat-, der Phosphat- und der Proteinpuffer. Während der Säurebildungsphase der Mikroorganismen spielt vor allem der Bikarbonatpuffer eine wichtige Rolle. Bikarbonat wird vermehrt während der Kauaktivität von den Speicheldrüsen sezerniert. Dieses diffundiert durch die Plaque und neutralisiert die produzierten organischen Säuren. Als Folge steigt der pH-Wert in der Plaque [Klimm 1997].

**Tabelle IV:** Funktionen des Speichels

<b>Funktion</b>	<b>beteiligte Speichelkomponenten</b>
Spülfunktion	Gesamtspeichel
Pufferfunktion	Bikarbonat-, Phosphat- und Proteinpuffer
(Re-)Mineralisation	Phosphat, Kalzium, Fluorid
Beschichtung	Glykoproteine, Muzine, Prolin-reiche Proteine
antibakterielle Wirkung	Immunglobuline, Lysozym, Laktoferrin, Laktoperoxidase, neutrale Granulozyten
Andauung von Nahrung	$\alpha$ -Amylase, Proteasen

#### 2.4.4 Substrat und Zeit

Ob ein kohlenhydrathaltiges, mikrobiell abbaufähiges Nahrungsmittel Karies verursachen kann, hängt von dem kariogenen Potenzial und der kariogenen Wirksamkeit ab [Maiwald 2000].

Das kariogene Potenzial wird durch die chemischen Eigenschaften des Substrates bestimmt. Mikroorganismen der Plaque gewinnen ihre Energie durch den Abbau von niedermolekularer Kohlenhydrate (Mono- und Disaccharide) [Neff 1967]. Hierbei spielt Saccharose (Zucker) eine bedeutende Rolle [Lilienthal *et al.* 1953]. Sie diffundiert leicht durch die Plaque und wird von den Mikroorganismen in zwei Monosaccharide (Glukose, Fruktose) gespalten und abgebaut (siehe 2.3.1 „Mikroorganismen“). Die durch die Spaltung der Saccharose frei werdende Energie wird von den Bakterien genutzt. Bei der Beurteilung des kariogenen Potenzials eines Substrates ist zusätzlich die Klebrigkeit eines Nahrungsmittels von Bedeutung. Die Vipeholm-Studie zeigt eindeutig, dass der Karieszuwachs nach der Einnahme von klebrigen Nahrungsmitteln (Toffees) signifikant höher ist als nach der Aufnahme von gelöstem Zucker [Gustafsson *et al.* 1954].

Die kariogene Wirksamkeit von niedermolekularen Kohlenhydraten hängt vom Zeitpunkt, der Häufigkeit, der Menge und der bereits dargestellten Wirtsfaktoren

(Speichel, Zähne und Mundhygiene) ab. Eine vermehrte Zuckeraufnahme zwischen den Hauptmahlzeiten, bei gleichzeitigem Vorhandensein von Plaque, führt zu einem erhöhten Kariesrisiko [Gustafsson *et al.* 1954].

#### 2.4.5 Histologie der Schmelz- und Dentinkaries

In polarisationsmikroskopischen Untersuchungen von Längsschnitten kariöser Schmelzläsionen werden histologisch vier Zonen unterschieden. In der innersten Schicht der Schmelzläsion, der transluzenten Zone, beträgt das Porenvolumen ca. 1,0 %, wohingegen das von gesundem Zahnschmelz bei ca. 0,1 % liegt. Dieses erhöhte Porenvolumen entsteht aus einem Mineralverlust (Demineralisation) von ca. 1,2 Volumenprozent (Vol%). Die sich nach außen an die transluzente Zone anschließende Schicht wird als dunkle Zone bezeichnet. Sie besitzt eine kegelförmige Gestalt, ihr Porenvolumen liegt bei ca. 2 - 4 % und der Mineralverlust bei ca. 6 Vol%. Nach außen an die dunkle Zone angrenzend befindet sich der Läsionskörper. Hierbei handelt es sich um das am stärksten demineralisierte Areal mit dem größten Porenvolumen. Dieses nimmt von der Peripherie (ca. 5 %) in Richtung Zentrum (ca. 25 %) zu. Der Mineralverlust beträgt ca. 33 Vol%. Die äußerste Zone ist die etwa 30 µm dicke „pseudointakte“ Oberflächenschicht. Die Bezeichnung „pseudointakt“ beschreibt den Umstand, dass die Oberflächenschicht unter dem Lichtmikroskop, trotz eines Mineralverlustes von ca. 11,5 Vol%, intakt erscheint. Das Porenvolumen der Oberflächenschicht liegt bei ca. 5 % [Klimm 1997; Hallsworth *et al.* 1972].

Kariöse Dentinläsionen werden in polarisationsmikroskopischen Untersuchungen von Dünnschnitten histologisch in fünf Zonen eingeteilt. Die äußere an den Zahnschmelz angrenzende Schicht weist bereits eine Demineralisation des Dentins auf. Beim Fortschreiten der Läsion kommt es zu einer Penetration der Mikroorganismen aus der Schmelzregion in die Dentinkanäle. Nach innen schließt sich die tote Dentinzone an, die aus zerfallenen und verflüssigten Dentinbestandteilen sowie Mikroorganismen samt deren Stoffwechselprodukten besteht. Angrenzend an diese Zone folgt eine aus sklerotischem Dentin bestehende Schicht. Die Bildung dieser Zone wird bereits in einem frühen Stadium der Schmelzkaries als Schutzmechanismus von der Pulpa-Dentin-Einheit initiiert. Durch intra- und peritubuläre Mineralisation der Odontoblasten bildet sich ein dichter Verschluss der Dentinkanäle. Zur Pulpa hin schließt sich eine Schicht mit gesundem Dentin an. Das an der Pulpa-Dentin-Grenze vorhandene Tertiärdentin wird in einem frühen Stadium der Schmelzkaries lokal angelagert. Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte regen die Odontoblasten zur Bildung des Tertiärdentins an, das einen weiteren Schutzmechanismus der Pulpa-Dentin-Einheit darstellt [Klimm 1997; Fejerskov *et al.* 2008; Sauerwein 1974].

## 2.5 Chemische Reaktionen zwischen HAP und dem Speichel

### 2.5.1 Sättigung einer Lösung

Die Löslichkeit von HAP und anderen Kalzium-Phosphat-Verbindungen (DKPD, OKP) in einer Flüssigkeit wird durch die Sättigung der Lösung bestimmt. Sie wird von dem Löslichkeitsprodukt (LP) des jeweiligen Apatitkristalles und dem Ionenprodukt (IP) der freien Ionen in der Lösung definiert.

Das LP ist das Produkt der Ionenkonzentrationen in der gesättigten Lösung. Es beträgt für reines HAP ( $LP_{HA}$ ) bei 37 °C  $7,94 \times 10^{-60} \text{ mol}^9/\text{l}^9$ . OKP ( $2,57 \times 10^{-12} \text{ mol}^9/\text{l}^9$ ) und DKPD ( $2,2 \times 10^{-7} \text{ mol}^9/\text{l}^9$ ) weisen diesbezüglich einen niedrigeren Wert auf [Ten Cate *et al.* 1978]. Da das HAP des Zahnschmelzes als nicht stöchiometrische Verbindung betrachtet wird (siehe Abschnitt 2.1.1 „chemische Struktur“), ist die genaue Bestimmung des LP der Zahnhartsubstanzkristalle schwierig, liegt aber unter dem von HAP [Fejerskov *et al.* 2008].

Das IP ist das Produkt der Stoffmengenkonzentrationen aller in einem Medium durch elektrolytische Dissoziation gelöster Ionen. Löst sich zum Beispiel die Hälfte eines HAP-Kristalls in einer Flüssigkeit auf, gehen fünf Kalzium-, drei Phosphat- und ein Hydroxylion in Lösung (Abb. 3). Das für diese Lösung entsprechende IP wird durch Multiplikation der einzelnen Ionenkonzentrationen errechnet.



**Abb. 3** Auflösung eines halben HAP-Kristalls in einer ungesättigten Lösung.

Eine Lösung wird als gesättigt in Bezug auf HAP bezeichnet, wenn das IP der Lösung und das  $LP_{HA}$  gleich sind ( $IP = LP_{HA}$ ). In diesem Fall besteht ein Gleichgewicht zwischen den in Lösung gehenden und an HAP bindenden Ionen. Es liegt demzufolge ein Gleichgewicht zwischen De- und Remineralisation vor. Ist das IP kleiner als das  $LP_{HA}$  ( $IP < LP_{HA}$ ), wird von einer ungesättigten Lösung in Bezug auf HAP gesprochen. Das Gleichgewicht ist in diesem Fall in Richtung der Demineralisation verschoben. Ist das IP größer als das  $LP_{HA}$  ( $IP > LP_{HA}$ ), liegt eine übersättigte Lösung vor und es findet eine Remineralisation des HAP statt [Klimm 1997].

### 2.5.2 Einfluss des pH-Wertes auf die Sättigung einer Lösung

Der in einer Lösung vorherrschende pH hat einen Einfluss auf die Löslichkeit der sich darin befindenden Apatitkristalle. Wird einer gesättigten Lösung Säure hinzugefügt, binden die Phosphat- und Hydroxylionen an die aus der Säure frei werdenden Wasserstoffionen. Dadurch entstehen Hydrogen- und Dihydrogenphosphate sowie Wasser (Abb. 4). Die Konzentration an freien Phosphat- und Hydroxylionen in der Lösung sinkt folglich und das IP wird gegenüber dem  $LP_{HA}$  kleiner. Die ursprünglich gesättigte Lösung ist nunmehr ungesättigt [König 1987].



**Abb. 4** Zugabe von Säure in eine gesättigte Lösung.

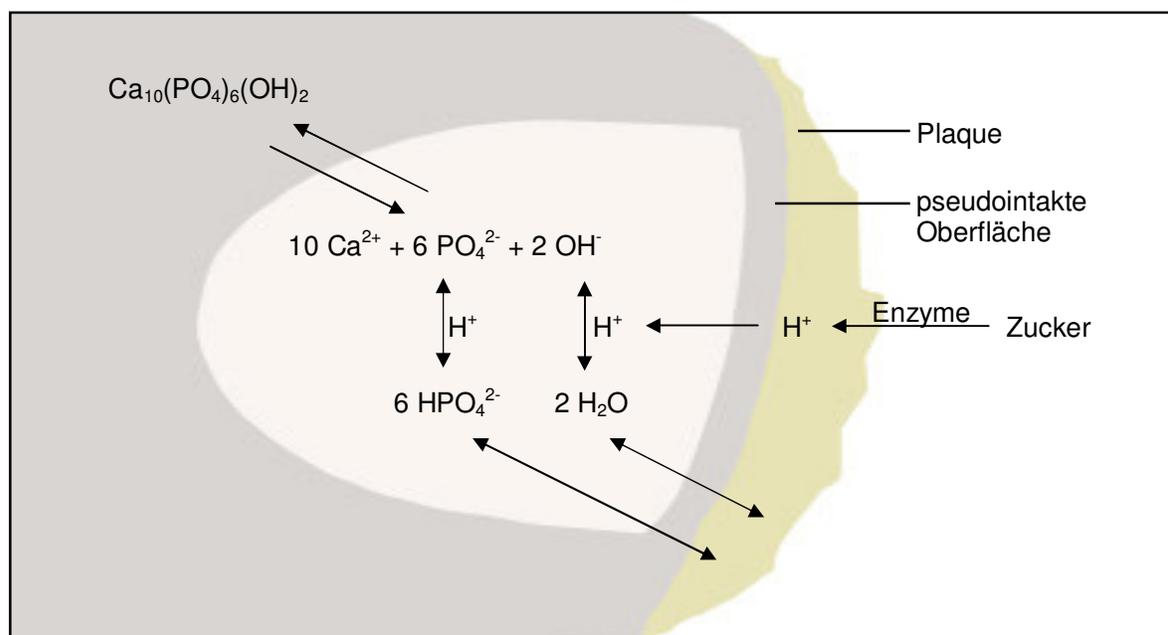
Nimmt der pH derselben gesättigten Lösung zu, wird entsprechend auch das IP größer als das  $LP_{HA}$  und es entsteht eine übersättigte Lösung. Grundsätzlich erhöht sich die Löslichkeit von Apatit um ein Zehnfaches pro reduzierter Einheit des pH-Wertes [Fejerskov *et al.* 2008]. Als kritischer pH einer Lösung wird jener Wert bezeichnet, bei dem eine Lösung noch in gesättigter Form vorliegt. Dieser Wert liegt für Speichel bei 5,5 [Larson *et al.* 2003].

### 2.5.3 Demineralisation

Da die Plaque (siehe Abschnitt 2.4.1 „Mikroorganismen“), welche die Zahnhartsubstanz umgibt, meist den direkten Kontakt zwischen dem Speichel und den Apatitkristallen verhindert, spielt sie eine große Rolle bei der De- und Remineralisation. Die Konzentrationen der sich in der Plaque befindlichen Kalzium- und Phosphationen sind um ein Zwei- bis Dreifaches höher als im Speichel (Tab. II). Die extrazelluläre Plaqueflüssigkeit wäre somit in Bezug auf HAP deutlich übersättigt. Allerdings ist durch die organischen Säuren, die bei metabolischen Aktivitäten der Mikroorganismen produziert werden (siehe Abschnitt 2.4.1 „Mikroorganismen“), der pH-Wert (5,29) im Vergleich zu Speichel häufig niedriger und dementsprechend die Sättigung geringer. Allgemein gilt, dass, je mehr organische Säure produziert wird, desto ungesättigter ist die zahnumgebende Plaqueflüssigkeit [Magolis *et al.* 1992].

Zwischen dem IP der gelösten Ionen und dem  $LP_{HA}$  in der Flüssigkeit der Hydratationsschale (siehe Abschnitt 2.1.1 „chemische Struktur“), die an die Apatitkristalle gebunden ist, herrscht ein Gleichgewicht. Kommt es zu einem Säureanstieg, binden sich die aus der Säure frei gewordenen Wasserstoffionen an Phosphat-, Hydroxyl- und andere Ionen der Hydratationsschale. Damit einher geht ein Abfall der Ionenkonzentration (Abb. 5). Da nun das IP der freien Ionen kleiner als das  $LP_{HA}$  ist, liegt eine ungesättigte Lösung vor. Ein erneutes Gleichgewicht zwischen IP und  $LP_{HA}$  wird hergestellt, indem Ionen aus dem Apatitkristallgitter in Lösung gehen (Demineralisation; Abb. 5) [Fejerskov *et al.* 2008].

Die Säuren diffundieren nun entlang eines Konzentrationsgradienten in die Tiefe der Zahnhartsubstanz, wo sie anschließend dissoziieren (Abb. 5). Als Diffusionswege dienen die Hydratationsschalen der interprismatischen Schmelzkristalle. Die aus den Apatitkristallen gelösten Ionen diffundieren entlang eines Konzentrationsgradienten bis zur Schmelzoberfläche und Plaque (Abb. 5). Im Bereich der Schmelzoberfläche verringert sich die Diffusionsgeschwindigkeit, da der Diffusionsgradient zur Plaque und zum Speichel gering ist. Kalzium-, Phosphat- und andere Ionen repräzipitieren und lagern sich in geschädigte Kristalle ein (siehe Abschnitt 2.5.4 „Remineralisation“). An der Schmelzoberfläche entsteht dadurch eine pseudointakte Oberfläche (siehe Abschnitt 2.4.4 „Histologie der Schmelzkaries“) [Fejerskov *et al.* 2008; König 1987].



**Abb. 5** Vereinfachte Darstellung der chemischen Vorgänge bei der Entstehung der Schmelzkaries in Anlehnung an König [König 1987].

#### 2.5.4 Remineralisation

Initiale Zahnhartsubstanzläsionen besitzen die Fähigkeit, über einen langen Zeitraum zu remineralisieren [Arends *et al.* 1986; Featherstone 2009]. Ein Apatitkristallwachstum findet nur in einer übersättigten Lösung in Bezug auf HAP statt. Sie wird durch das Hinzufügen von Kalzium und Phosphat bis zur Übersättigung und/oder durch Erhöhung des pH-Wertes erreicht [Fejerskov *et al.* 2008; Driessens *et al.* 1990; Hara *et al.* 2008]. Die Ionen aus der nun an HAP übersättigten Lösung präzipitieren und werden in die defekten Apatitkristallgitter eingebaut. Die neuen Kristallbereiche sind sehr klein und besitzen noch viele Defekte in ihren Kristallgitterstrukturen. Dementsprechend sind sie noch sehr anfällig für eine Demineralisation. Im Laufe der Zeit werden durch eine weitere Remineralisation die Defekte geringer und die Kristalle dichter gepackt. Dadurch können die Kristallbereiche bis zu ihrer ursprünglichen Größe heranwachsen [Featherstone 2000]. Eine Neubildung von Apatitkristallen ist bei der Remineralisation der Zahnhartsubstanzläsionen nicht wahrscheinlich [Fejerskov *et al.* 2008]. Durch die Integration von Fluoridionen aus der Lösung in die Apatitkristalle (siehe Abschnitt 2.1.1 „chemische Struktur“) entstehen größere, säureresistentere Kristallite [Silverstone *et al.* 1988].

Für das Remineralisationsmuster eines Defektes spielt die ursprüngliche Mineralverteilung innerhalb der Läsion eine wichtige Rolle. Besitzt sie eine pseudointakte Oberfläche mit einem hohen Mineralanteil (siehe Abschnitt 2.4.4 „Histologie der Schmelz- und Dentinkaries“), findet die Remineralisation vermehrt in diesem Bereich statt. Dieser erhöhte Mineralgehalt in der Oberflächenschicht schützt auf der einen Seite den Läsionskörper vor einer weiteren Demineralisation, wirkt aber andererseits als Barriere gegen eine fortschreitende Remineralisation der tiefen Läsion. Die Remineralisation von fortgeschrittenen Läsionen ohne oder mit einer dünnen pseudointakten Oberfläche mit geringem Mineralanteil beginnt in der Tiefe des Defektes, da Kalzium-, Phosphat-Fluorid- und andere Ionen, die im Speichel gelöst sind, leichter in den Läsionskörper diffundieren können [Kawasaki *et al.* 2000, Fejerskov *et al.* 2008].

##### 2.5.4.1 Remineralisationslösung nach Buskes *et al.*

Das Kalzium-Phosphat-Verhältnis der BUSKES-Lösung beträgt 1:0,6 bei einer Kalziumkonzentration von 1,5 mM und einer Phosphatkonzentration von 0,9 mM (Tab. VI). Der pH-Wert der Remineralisationslösung liegt bei 7,0 und als Puffer wird HEPES (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure) zugegeben [Buskes *et al.* 1985].

**Tabelle VI:** Zusammensetzung der Remineralisationslösung [Buskes *et al.* 1985]

<b>Stoffe</b>	<b>Konzentrationen</b>
	<b>mM</b>
Kalziumdichlorid-2-hydrat ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )	1,50
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0,90
HEPES (1M) *	19,00
Aqua destillata ad 1 l	

\*Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure

Untersuchungen an menschlichen Zellkulturen ergaben, dass der zu den Nährmedien beigefügte Puffer [HEPES (25 mM)] bei der Exposition mit Tageslicht zu einer zehnfach höheren Produktion von Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) führte als Nährmedien ohne HEPES [Zigler *et al.* 1985; Spierenburg *et al.* 1984]. Die Menge des entstandenen  $\text{H}_2\text{O}_2$  war direkt von dem Grad der Lichtexposition abhängig.  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist ein Stoffwechselgift und kann DNA (Mutation), Proteine (Denaturierung, Enzymaktivierung) und Lipide (Zerstörung der Zellmembrane) schädigen. Aus diesem Grund bleibt der Anwendungsbereich der BUSKES-Lösung auf In-vitro-Studien begrenzt.

### 3 Ziel der Arbeit und Arbeitshypothese

Die von Buskes *et al.* beschriebene Remineralisationslösung dient bei In-vitro-Untersuchungen häufig als Standardlösung zur positiven Kontrolle der Remineralisation von demineralisierter Zahnhartsubstanz. Das Kalzium-Phosphat-Verhältnis der BUSKES-Lösung (Verhältnis 1:0,6) weicht von dem humaner, anorganischer Zahnhartsubstanz (Verhältnis 1:1,6) ab [Dorozhkin *et al.* 2002]. Aufgrund des für menschliches Gewebe toxischen Zusatzstoffes HEPES (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure; Puffer) eignet sich die BUSKES-Lösung nicht für In-vivo-Studien [Zigler *et al.* 1985]. In einer In-vitro-Studie, die die Remineralisationswirkung modifizierter Speichelersatzmittel (Saliva natura<sup>®</sup>-Lösungen; Kalzium-Phosphat-Verhältnis 1:1,6) auf demineralisiertes, bovines Dentin untersuchte, wurde ein Phosphatpuffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 1:2), der den pH-Wert einer Lösung bei 6,3 konstant hielt, eingesetzt [Tschoppe *et al.* 2009]. Dieser Phosphatpuffer stellt einen möglichen HEPES-Ersatz dar.

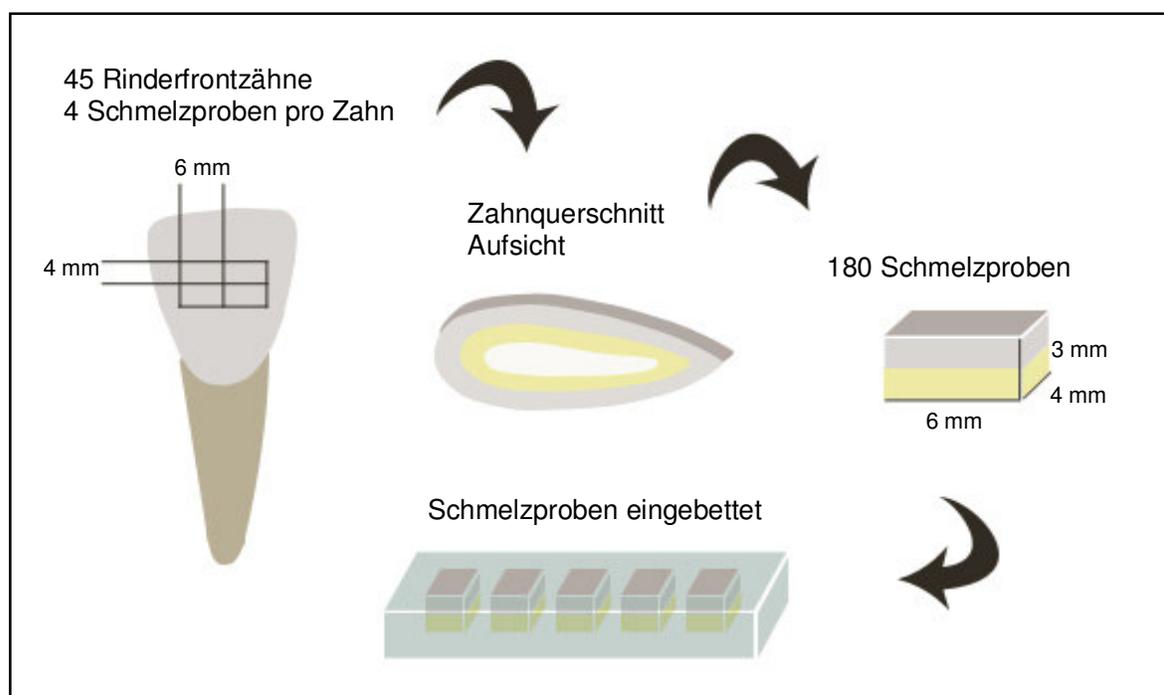
Das Ziel dieser Studie war, die Remineralisationseigenschaft von sieben wässrigen Versuchslösungen mit Phosphatpuffer, die sich hinsichtlich ihrer Kalziumkonzentrationen und Sättigungen (HAP, OKP, DKPD) voneinander unterschieden, und einer BUSKES-Lösung, mit einem an die wässrigen Lösungen angepassten pH-Wert (pH 6,3), zu untersuchen. Als Referenzlösung diente die BUSKES-Lösung (pH 7,0), als Positivkontrolle die modifizierte BUSKES-Lösung (pH 6,3) und als Negativkontrolle eine wässrige Lösung ohne Kalzium. Dabei wurden demineralisierte, bovine Zahnhartsubstanzproben (Schmelz und Dentin) für zwei und fünf Wochen in den jeweiligen Lösungen gelagert. Jeder demineralisierte sowie zwei- und fünfwöchig remineralisierte Probenbereich wurde mit der transversalen Mikroradiografie auf die Parameter Mineralverlust und Läsionstiefe untersucht. Anschließend erfolgte die Ermittlung der Veränderungen von Mineralverlust und Läsionstiefe im Vergleich zu den Ausgangswerten nach Demineralisation. Um detaillierte Erkenntnisse über die Verteilung des Mineralgehaltes innerhalb der jeweiligen Läsion zu gewinnen, wurde der Mineralverlust in dem äußeren sowie dem verbleibenden inneren Bereich jeder Läsion zusätzlich analysiert.

Die in dieser Studie zu überprüfende Nullhypothese besagte, dass eine ansteigende Kalziumkonzentration und die daraus hervorgehende Sättigungsänderung (HAP, OKP, DKPD) in den Lösungen keinen signifikant unterschiedlichen Einfluss auf die Remineralisation demineralisierter, boviner Zahnhartsubstanzen (Schmelz und Dentin) hat. Als Arbeitshypothese wurde in der vorliegenden Studie angenommen, dass eine Anpassung der Kalziumkonzentration an das von humaner Zahnhartsubstanz zu einer signifikant höheren Remineralisation als bei der Referenzgruppe führt.

## 4 Material und Methode

### 4.1 Herstellung der Schmelzproben

Für die Herstellung der Schmelzproben wurden 45 bleibende Rinderfrontzähne verwendet (Abb. 6). Diese wurden von frisch geschlachteten Rindern extrahiert und nach vorsichtiger Säuberung bis zum Versuchsbeginn in 0,9%iger Kochsalzlösung (Natriumchlorid 0,9 % Fresenius Spüllösung; Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) bei 37 °C im Wärmeschrank (Venticell 404; MMM Medcenter, Planegg, Deutschland) gelagert. Unter ständiger Wasserkühlung wurden aus den Labialflächen der Rinderfrontzähne jeweils vier Schmelzproben ( $6 \times 4 \times 3 \text{ mm}^3$ ) herauspräpariert (Bandsäge Exakt 300cl; Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland). Anschließend wurden jeweils fünf der insgesamt 180 Proben mithilfe einer Silikonform in Kunstharz (Technovit 4071; Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland) eingebettet. Die Schmelzoberflächen blieben frei von Kunstharz.



**Abb. 6** Schematische Darstellung der Schmelzprobenherstellung.

Die Standardisierung und Politur der Oberflächen erfolgte unter geringem Substanzabtrag (ca. 200  $\mu\text{m}$ ) mittels einer Poliermaschine (Labo Pol25; Struers, Willich, Deutschland) bei 300 U/min mit Schleifpapier aufsteigender Körnung (Körnung 1200, 2500, 4000; Exakt Apparatebau). Auf den vorbehandelten Flächen

wurden jeweils zwei voneinander getrennte Bereiche mit einer Nagellackschicht (Express Finish Laquer; Maybelline Jade, New York, USA) abgedeckt (Abb. 7). Die so geschützten Areale dienten später zur Kontrolle der gesunden Schmelzoberfläche. Auf jeder Probe verblieben drei ungeschützte Bereiche. Während der gesamten Untersuchung erfolgte zwischen den einzelnen Arbeitsschritten eine Lagerung der Proben in Aqua destillata.

#### 4.2 Demineralisation der Schmelzproben

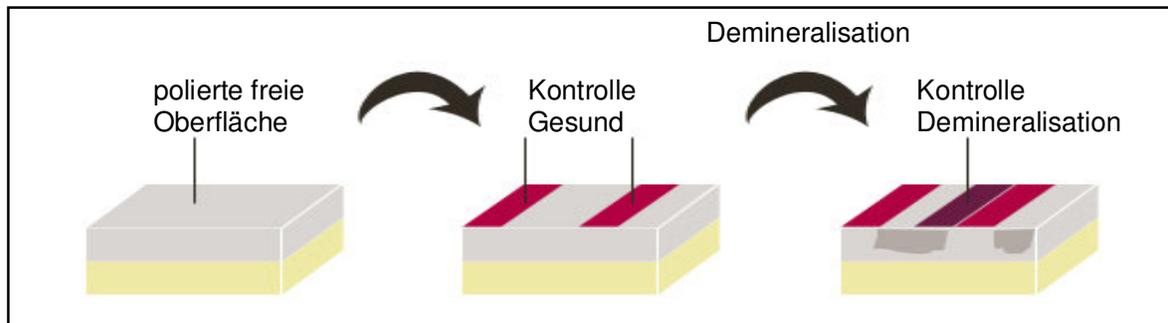
Die Schmelzproben wurden bei 37 °C im Wärmeschrank (Venticell 404; MMM Medcenter) für 19 Tage in einer Demineralisationslösung mit konstantem pH-Wert gelagert (Tab. VII; Abb. 7). Täglich erfolgte eine Kontrolle des pH-Wertes der Lösung mithilfe eines pH-Meters (GMH 3510; Greisinger Electronic, Regenstauf, Deutschland). Gemessene Abweichungen vom Sollwert (pH = 4,95) wurden mit Kaliumhydroxid (1 M; Merck, Darmstadt, Deutschland) oder Salzsäure (0,1 M; Merck) korrigiert.

**Tabelle VII:** Zusammensetzung der Demineralisationslösung für Schmelz [Buskes *et al.* 1985]

Inhaltsstoffe	Ansatz	Konzentration	Menge	
		in mmol/l	in g	in ml
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	1 l	3,000	0,441	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 l	3,000	0,408	
MHDP *	1 l	0,006	0,001	
Eisessig (CH <sub>3</sub> COOH 100 %)	1 l	50,000	3,002	
Kalilauge ** ad pH 4,95 (28,055 g/50 ml H <sub>2</sub> O )	1 l			4,5
Aqua dest.	1 l			1000,0

\*MHDP (Methylenediphosphonsäure); \*\*KOH 10 M; alle Chemikalien von Merck

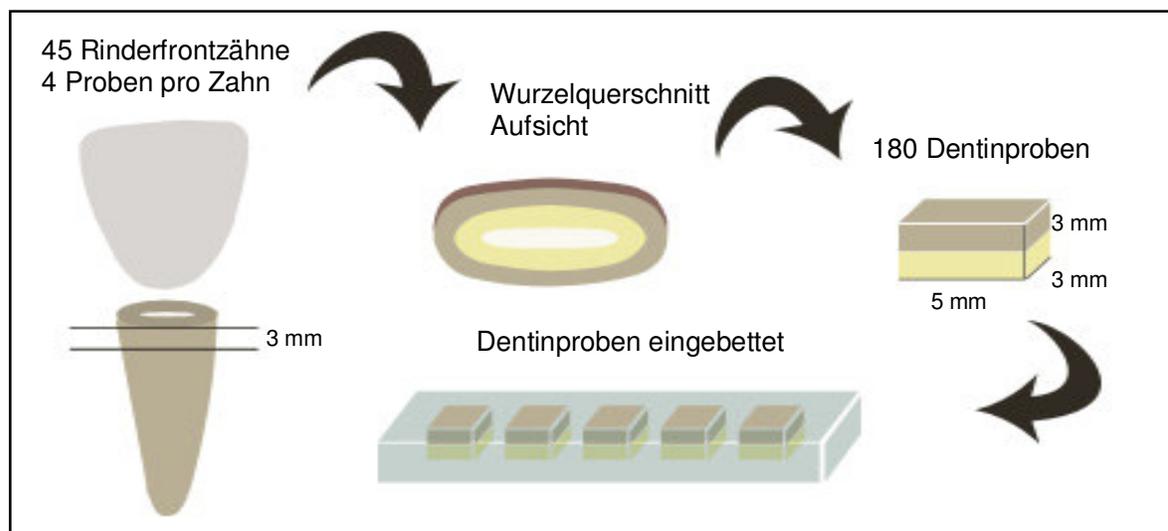
Am Ende der Demineralisation wiesen somit die Proben an den freien Schmelzoberflächen künstliche, initiale Schmelzläsionen auf. Die Kontrolle der Läsionstiefe erfolgte mittels transversaler Mikroradiografie (siehe Abschnitt 4.8 „Prinzip der transversalen Mikroradiografie“). Im Anschluss wurde ein Drittel der demineralisierten Schmelzoberfläche, wie unter Punkt 4.1 „Herstellung der Schmelzproben“ beschrieben, mit Nagellack (Express Finish Laquer; Maybelline Jade) abgedeckt (Abb. 7). Dieser Bereich diente zur Kontrolle der Demineralisation.



**Abb. 7** Demineralisation von jeweils 180 Schmelz- und Dentinproben. Die Abdeckungen der Areale mittels Nagellack wurden als rote und weinrote Flächen dargestellt.

### 4.3 Herstellung der Dentinproben

45 bleibende Rinderfrontzähne wurden wie im Abschnitt 4.1 „Herstellung der Schmelzproben“ beschrieben, extrahiert und gesäubert. Die Zahnkronen der Rinderzähne wurden unter ständiger Wasserkühlung entfernt. Von den verbleibenden Wurzeln wurde jeweils eine 3 mm dicke zervikale Scheibe abgetrennt. Aus dieser wurden anschließend mit einer Bandsäge (Exakt 300cl; Exakt Apparatebau) unter ständiger Wasserkühlung vier Wurzelblöcke ( $5 \times 3 \times 3 \text{ mm}^3$ ) präpariert (Abb. 8). Die Einbettung der 180 Dentinproben in Kunstharz, die Politur der Oberfläche und die Abdeckung zweier Bereiche (Kontrolle Gesund; Abb. 7) erfolgte analog zu den Ausführungen in Abschnitt 4.1 „Herstellung der Schmelzproben“. Mittels der Politur wurde die Zementschicht entfernt und die Dentinoberfläche standardisiert.



**Abb. 8** Schematische Darstellung der Dentinprobenherstellung.

#### 4.4 Demineralisation der Dentinproben

Die Demineralisation erfolgte mithilfe einer Demineralisationslösung (pH = 5,0; Tab. VIII), in der die Proben für sechs Tage bei 37 °C im Wärmeschrank (Venticell 404; MMM Medcenter) gelagert wurden.

**Tabelle VIII:** Zusammensetzung der modifizierten Demineralisationslösung für Dentin [Tschoppe *et al.* 2009]

Inhaltsstoffe	Ansatz	Konzentration		Menge	
		in mmol/l	in mg	in ml	
Fluorid Standardlösung	1 l	0,0001		0,11	
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	1 l	2,2000	323,32		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 l	2,2000	300,00		
CH <sub>3</sub> COOH	1 l	50,0000		2,86	
KOH * ad pH 4,95 (28,055 g/50 ml H <sub>2</sub> O )	1 l			4,60	
Aqua dest	1 l			1000,00	

\* KOH 10 M; alle Chemikalien von Merck

Die Kontrolle und die Korrektur des pH-Wertes, die Messung der Läsionstiefe sowie die Abdeckung eines demineralisierten Dentinoberflächenbereiches erfolgte, wie im Abschnitt 4.2 „Demineralisation von Schmelzproben“, beschrieben (Abb. 7).

#### 4.5 Herstellung der Versuchslösungen

Im Rahmen der Untersuchung wurden acht wässrige Lösungen (pH 6,3; Lösungen 1 bis 8) sowie eine originale BUSKES-Lösung (pH 7,00; B1) und eine modifizierte BUSKES-Lösung (pH 6,3; B2) hergestellt [Buskes *et al.* 1985]. Vor dem Anmischen der zehn Versuchslösungen wurden die Kalziumkonzentrationen der acht wässrigen Lösungen festgelegt (Tab. X), wobei die der zwei BUSKES-Lösungen nicht verändert wurden (Tab. XI). Anschließend erfolgte bei bekannten pH-Werten und Ionenkonzentrationen die Ermittlung der Sättigung aller zehn Lösungen hinsichtlich OKP, DKPD und HAP mithilfe der Software nach Shellis (Tab. IX, X, XI) [Shellis 1988].

**Tabelle IX:** Sättigungsberechnung aller Lösungen bezüglich einer wässrigen Lösung

Lsg.	Basis	pH	Ca* mM	PO* mM	K* mM	HEPES* mM	Cl* mM	Na* mM	HAP	OKP	DKPD	
1		4,70	--	--	--	--	151,30		--	--	--	
2			--			--	151,30		--	--	--	
3	NaCl**		0,53			--	152,36		3,15	0,83	0,51	
4		6,30	1,05	5,04	6,72	--	153,40	151,30	4,59	1,17	0,71	
5			1,58			--	154,46		5,74	1,43	0,87	
6			2,10			--	155,50		6,70	1,64	1,00	
7			2,63			--	156,56		7,57	1,83	1,12	
8			3,15			--	157,60		8,34	1,99	1,21	
B1		Aqua dest.	7,00	1,50	0,90	0,90	19,00	3,00	--	14,27	2,46	0,95
B2			6,30							5,39	1,21	0,62

\* gesamt; \*\* 0,9%ige Kochsalzlösung (Natriumchlorid 0,9 %; Fresenius); Lsg. = Lösungen

#### 4.5.1 Wässrige Lösung mit unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen

Für die Herstellung der acht wässrigen Lösungen wurden die einzelnen Lösungsbestandteile mit der entsprechenden Menge 0,9%iger Kochsalzlösung (Natriumchlorid 0,9 % Fresenius Spüllösung; Fresenius) über einen Zeitraum von 12 Stunden bei 700 U/min zu einer homogenen Flüssigkeit verrührt (IKA-Kombimag RCT; Jahnke & Kunkel, Staufen, Deutschland; Tab. X).

**Tabelle X:** Zusammensetzungen und Konzentrationen der wässrigen Lösungen (je 1 l Ansatz)

Lsg.	CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O in mg/l	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * in mg/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in mg/l	Ca : PO <sub>4</sub>	pH	Basislösung
1	--	--	--	--	4,70	
2	--			nur PO <sub>4</sub>		
3	77,18			1:9,7		Methyl-4- hydroxybenzoat 1 g/l
4	154,35			1:4,9		
5	231,53	292,32	456,96	1:3,2	6,30	Propyl-4- hydroxybenzoat 0,2 g/l
6	308,70			1:2,4		
7	385,88			1:9,9		
8	463,05			1:1,6		

\* Dikaliumhydrogenphosphat (Merck); alle Chemikalien von Merck; Lsg. = Lösungen

#### 4.5.2 Remineralisationslösung

Die erste Remineralisationslösung diente als Referenz (Tab XI; B1) [Buskes *et al.* 1985]. Die zweite Lösung als Positivkontrolle sie unterschied sich durch ihren pH-Wert, der an den der wässrigen Lösungen angeglichen wurde (Tab XI; B2).

**Tabelle XI:** Zusammensetzung der Remineralisationslösung [Buskes *et al.* 1985] (je 1 l Ansatz)

Lsg.	CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O in mg/l	HEPES (1 M)* in ml/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in mg/l	Ca : PO <sub>4</sub>	pH	Basislösung
B1	221,0	19,0	122,4	1:0,6	7,0	Aqua dest. ad 1 l
B2	221,0	19,0	122,4	1:0,6	6,3	

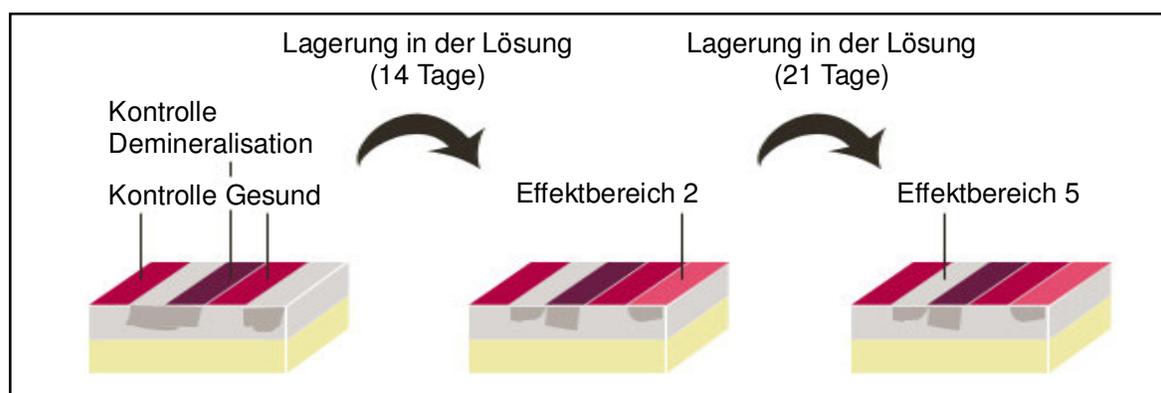
\* HEPES Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure, \*\*10% Salzsäure; Chemikalien von Merck; Lsg. = Lösungen

#### 4.5.3 Analyse der Kalzium- und Phosphatkonzentrationen

Um mögliche Ausfällungen von Kristallen in den Versuchslösungen und die daraus hervorgehenden Änderungen der Sättigungen zu berücksichtigen, wurden die Kalzium-, Kalium-, Chlorid- und Phosphatmengen der Versuchslösungen analysiert. Etwaige ungelöste Partikel wurden bei 60000 U/min mittels einer Zentrifuge (Ultrazentrifuge L 70; Beckmann, München, Deutschland) entfernt. Für die Kalzium- und Kaliumbestimmung wurde die Methode der optischen Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP OES Optima 2100 DV; Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland) angewendet. Vor jeder Messung wurden dabei je 15 ml der jeweiligen Versuchslösung mit 0,2 ml Salpetersäure (Salpetersäure 65 %; Merck) angesäuert und durch einen 0,2 µm Spritzenfilter (CME-Spritzenfilter; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) filtriert. Die Phosphat- und Chloridmengen wurden mittels der Anionenchromatografie (761 Compact IC; Metrohm, Filderstadt, Deutschland) bestimmt. Anders als bei der Bestimmung der Kalzium- und Kaliumwerte erfolgte bei dieser Messung eine Beimengung von 0,3 ml Natriumkarbonat/-hydrogenkarbonat-Eluent (Natriumkarbonat 3,3 M; Merck; Natriumhydrogenkarbonat 1 M; Merck) zu den Versuchslösungen. Die Filterung wurde ebenfalls mit einem 0,2 µm Spritzenfilter (CME-Spritzenfilter; Carl Roth) vorgenommen. Alle Messungen wurden zweimal durchgeführt. Anschließend erfolgte anhand der Mittelwerte aus den beiden Messresultaten die Bestimmung der Sättigungen aller zehn Lösungen hinsichtlich OKP, DKPD und HAP mittels der Software nach Shellis (Tab. XIII a, Tab. XIII b) [Shellis 1988].

#### 4.6 Durchführung der Versuche

Die Proben wiesen vor Versuchsbeginn drei mit Nagellack abgedeckte Bereiche (zweimal Kontrolle Gesund, eine Kontrolle Demineralisation) auf (Abb. 9). Die je 180 Schmelz- und Dentinproben wurden randomisiert auf zehn Gruppen, bestehend aus je 18 Proben, verteilt. Jeder Gruppe wurde jeweils eine der unter Abschnitt 4.5 „Herstellung der Versuchslösungen“ beschriebenen Versuchslösungen zugeordnet. Anschließend erfolgte eine vierzehntägige Lagerung bei 37 °C in Kunststoffbehältern mit jeweils 200 ml Lösung. Die Proben waren dabei vollständig mit Flüssigkeit bedeckt. Die Kontrolle des pH-Wertes während des Versuches erfolgte alle 24 Stunden mittels eines pH-Meters (GMH 3510; Greisinger). PH-Wert-Abweichungen der Lösungen, von einem vor dem Versuchsbeginn definierten Sollwert (Tab. X, XI), wurden mit Kaliumhydroxid (1 M; Merck) nach unten und Salzsäure (Merck) nach oben korrigiert. Jeden Tag wurden die Proben mit Aqua destillata abgespült und die Behälter mit neuer Lösung befüllt. Nach der vierzehntägigen Lagerung erfolgte eine Abdeckung jeweils einer Hälfte der verbliebenen, freiliegenden Schmelz- und Dentinoberflächen mit Nagellack (Express Finish Laquer; Maybelline Jade; Effektbereich 2; Abb. 9). Danach wurden die Proben für weitere 21 Tage in den jeweiligen Lösungen gelagert. Der letzte freie Oberflächenbereich wurde bei Versuchsende als Effektbereich 5 bezeichnet (Abb. 9).

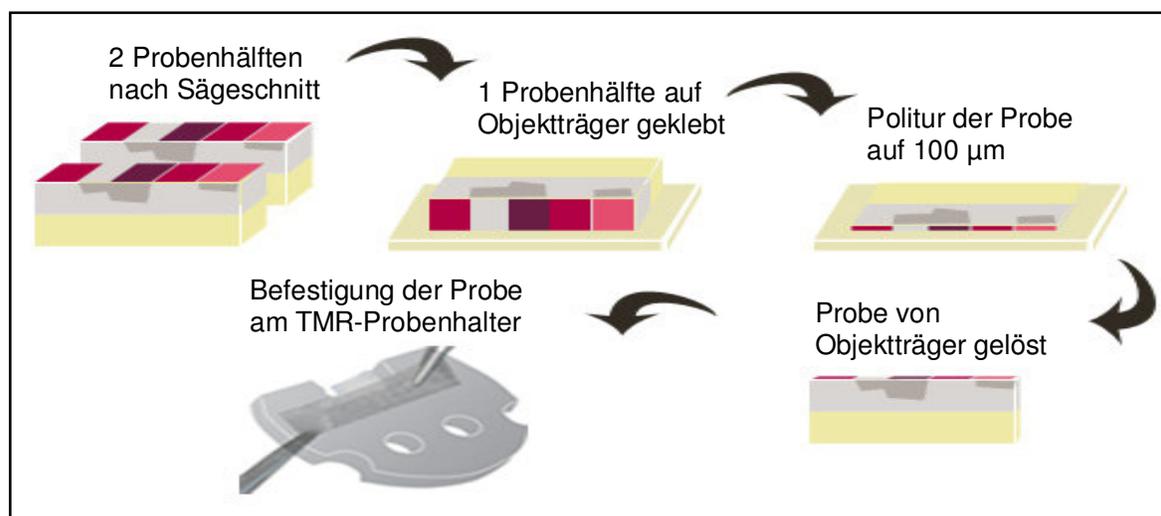


**Abb. 9** Schematische Darstellung des Versuches. Die Abdeckungen der Areale mittels Nagellack wurden als rote, weinrote und rosarote Flächen dargestellt.

Nach Abschluss der Versuche wurden die Proben mit destilliertem Wasser abgespült und in Aqua destillata aufbewahrt. Vor den weiteren Untersuchungsschritten erfolgte durch den Studienleiter eine Verblindung aller Gruppen für den Untersucher.

#### 4.7 Probenvorbereitung für die transversale Mikroradiografie

Nach Beendigung der In-vitro-Exposition wurden die Proben mit einer Bandsäge (Exakt 300cl; Exakt Apparatebau) senkrecht zur Schmelz- und Dentinoberfläche halbiert und die rauen Schnittflächen mit Schleifpapier aufsteigender Körnung (Körnung 2400, 4000) poliert (Abb. 10). Die polierten Schnittflächen wurden mittels Sekundenkleber (Instant Fix; Henry Schein, Meville, USA) auf einem Plexiglasobjektträger (Diaplug; Oststeinbeck, Deutschland) befestigt (Abb. 10). Unter ständiger Wasserkühlung erfolgte anschließend mit einer diamantierten Bandsäge (200  $\mu\text{m}$ ) die Herstellung von 300  $\mu\text{m}$  dicken planparallelen Schnitten. Die Vorschubkraft des Probenstisches betrug 50 g und die Schnittgeschwindigkeit der Säge war auf 200 U/min eingestellt. In Anlehnung an frühere Studien [Kielbassa *et al.* 2005; Tschoppe *et al.* 2007] erfolgte anhand einer mit gewässertem Schleifpapier (Körnung 1200, 2500, 4000) bestückten Mikroschleifapparatur (Exakt Mikroschleifsystem 400 CS; Exakt Apparatebau) die endgültige Parallelisierung und Glättung der Proben. Die Schliffdicke der Proben, die mit einem digitalen Mikrometer (Digimatic Bügelmessschraube; Mitutoyo, Kawasaki, Japan) überprüft wurden, betrug 98 - 102  $\mu\text{m}$  (Abb. 10). Die hergestellten Dünnschliffe wurden mit einem Skalpell (Feather, Osaka, Japan) aus dem umgebenden Technovit-Kunststoff und dem Objektträger gelöst und mit einem Klebestreifen (Leukofix; BSN medical, Hamburg, Deutschland) auf einem transversalen Mikroradiografie-Probenhalter (TMR-Probenhalter; Charité CFM Facility Management, Berlin, Deutschland) fixiert (Abb. 10).

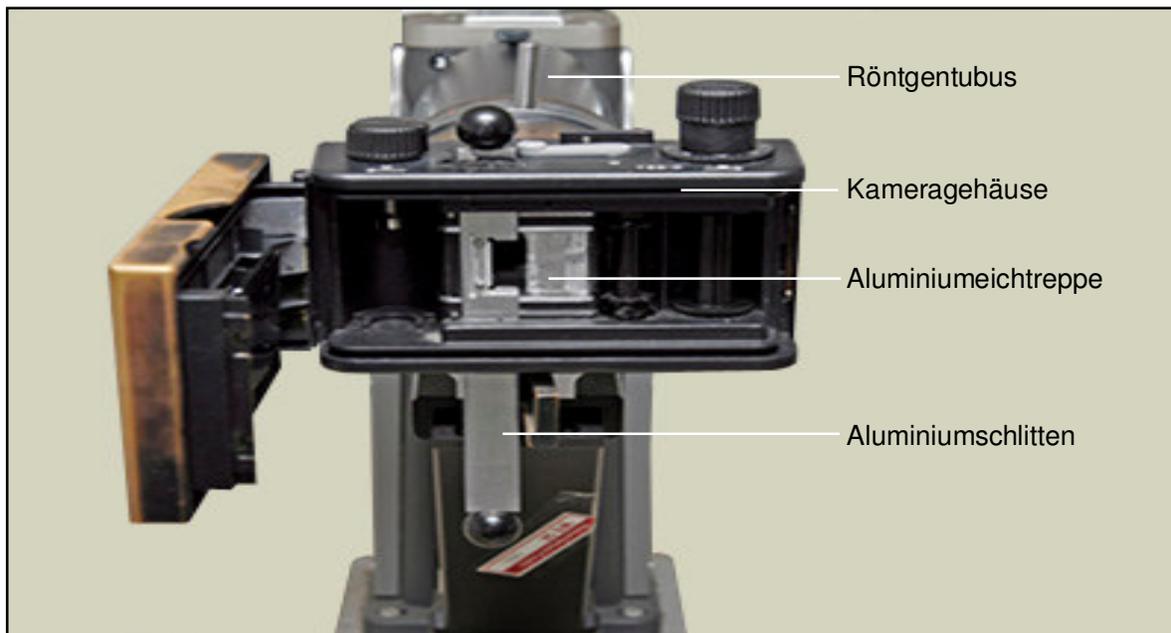


**Abb. 10** Vorbereitung der Schmelzproben für die transversale Mikroradiografie. Die Abdeckungen der Areale mittels Nagellack wurden als rote, weinrote und rosarote Flächen dargestellt.

Die Lagerung des Probenhalters mit den darauf befestigten Dünnschliffen erfolgte bis zur Durchführung der transversalen Mikroradiografie in Aqua destillata.

#### 4.8 Prinzip der transversalen Mikroradiografie

Die transversale Mikroradiografie stellte eine nicht destruktive Methode dar, mit deren Hilfe der Mineralverlust (in Vol.%  $\times \mu\text{m}$ ) und die Läsionstiefe (in  $\mu\text{m}$ ) einer Probe bestimmt werden konnten.



**Abb. 11** Röntgentubus mit Kameragehäuse.

Die Apparatur bestand aus einem linsenlosen Fotoapparatgehäuse, welches mit der Objektivseite an den Röntgentubus gekoppelt war, einem Röntgentubus und einem Röntngenerator (PW 1730/10; Philips, Eindhoven, Niederlande; Abb. 11). In dem Gehäuse der Kamera war auf Filmhöhe eine Aluminiumeichtreppe für transversale Mikroradiogramme montiert, die zur Kalibrierung des Computers für die mikroradiografische Auswertung diente (Abb. 11). Die Aluminiumeichtreppe bestand aus zehn Stufen unterschiedlicher Schichtstärken, die am Röntgenfilm als Abfolge verschiedener Grauwerte dargestellt wurden. Der Strahlenabschwächungskoeffizient der Aluminiumeichtreppe entsprach dem von Hydroxylapatit. Dadurch konnte jedem Grauwert im Mikroradiogramm ein eindeutiger Mineralgehalt zugeordnet werden. Rechts neben der Aluminiumtreppe war eine Aluminiumschlitten zur Aufnahme und

Fixierung des TMR-Probenhalters angebracht (Abb. 11). Damit befanden sich alle Proben während der mikroradiografischen Aufnahme in der gleichen Position zur Aluminiumeichtreppe. Der Aluminiumschlitten konnte bei geschlossenem Kameragehäuse herausgezogen und der Probenhalter gewechselt werden. Die Röntgenstrahlen wurden in einer vertikal montierten Röntgenröhre von einer Kupferanode mit Nickelfilterung emittiert. Diese durchdrangen die Proben parallel zur behandelten Oberfläche und senkrecht zur Schnittebene. Neben der Probe wurde auf jedem Röntgenbild die Aluminiumeichtreppe abgebildet.

#### **4.9 Herstellung der Mikroradiogramme**

Ein hochempfindlicher, hochauflösender, holografischer Spezialfilm (Fuji fine grain positive film 71337; FUJIFILM, Düsseldorf, Deutschland), der in einer lichtundurchlässigen Kassette auf eine handelsübliche Filmrolle manuell aufgespult wurde, diente zur Erstellung der Mikroradiografie. Nach dem Einlegen der Filmrolle und dem Schließen des Kameragehäuses wurde ein TMR-Probenhalter samt Dünnschliff mithilfe des Aluminiumschlittens in das Kameragehäuse eingeschoben. Die Probenoberfläche wurde dabei parallel zum Film ausgerichtet. Die mikroradiografische Untersuchung der Schmelzproben erfolgte, nach vorangegangener Trocknung der Proben, bei einer Röhrenspannung von 20 kV, einem Röhrenstrom von 20 mA und einer Belichtungszeit von 5 Sekunden. Zur Vermeidung einer Schrumpfung der Dentinproben wurden diese vor der Untersuchung mit Ethylenglykol benetzt (Ethylenglycol 99 %; Sigma, Steinheim, Deutschland) [Ruben *et al.* 1993]. Die Aufnahmen der Dentinproben erfolgten bei einer Röhrenspannung von 20 kV, einem Röhrenstrom von 10 mA und einer Belichtungszeit von 5 Sekunden. Nach jeder Aufnahme wurde der Film bei geschlossenem Kameragehäuse weitergedreht und die untersuchte Probe in Aqua destillata gelagert.

#### **4.10 Mikroradiografische Auswertung**

##### **4.10.1 Vorbereitungen zur mikroradiografischen Auswertung**

Nach der Entwicklung der mikroradiografischen Filme erfolgte anhand eines Durchlichtmikroskops (Durchlichtmikroskop Axioskop 2; Zeiss, Oberkochen, Deutschland) eine 16fache Vergrößerung der Bilder. Diese wurden mittels einer an das Mikroskop angeschlossenen Videokamera (CCD-Videokamera Modul XC 77CE; Sony, Tokio, Japan) digitalisiert und auf einen Computer übertragen. Mithilfe einer speziellen Transversal Micro Radiography Software (TMR für Windows, Version 2.0.27.2;

Inspektor Research System BV, Amsterdam, Niederlande) erfolgte anschließend eine densitometrische Berechnung des Mineralverlustes und der Läsionstiefe aller Proben. Nachdem eine Adjustierung der Lichtintensität des Mikroskops an jedem Probenbild im gesunden Bereich vorgenommen wurde, erfolgte eine optische Abtastung der einzelnen Stufen der Aluminiumeichtreppe. Anschließend wurden die vier verschiedenen Bereiche „Kontrolle Gesund“, „Kontrolle Demineralisation“, „Effektbereich 2“ und „Effektbereich 5“ jeder Probe erfasst. Die Berechnung des Mineralgehaltes (Vol %) als Funktion der Probentiefe erfolgte durch den Vergleich der im Computerprogramm gespeicherten Daten jeder Stufe der Eichtreppe (Dicke, Röntgenabsorption und Grauwerte) mit den Graustufen eines jeden Probenbereiches im digitalisierten Mikroradiogramm. Zusätzlich wurde der gesamte Mineralverlust ( $\text{Vol.}\% \times \mu\text{m}$ ) einer Probe durch die Integration der Läsionstiefe ( $\mu\text{m}$ ) und des Mineralgehaltes (Vol.%) ermittelt.

#### 4.10.2 Bestimmung des Mineralverlustes der Schmelz- und Dentinproben

Mittels der TMR-Software (TMR für Windows, Version 2.0.27.2; Inspektor Research System BV) erfolgte die Berechnung des gesamten Mineralverlustes des gesunden, demineralisierten ( $\Delta Z_{\text{Demin}}$ ), zwei- ( $\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$ ) und fünfwohlig ( $\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$ ) remineralisierten Bereiches jeder Probe. Dabei wurde zur Korrektur des projektionsbedingten Messfehlers, der bei der Bestimmung des Mineralverlustes der Probenoberflächen „Kontrolle Demineralisation“, „Effektbereich 2“ und „Effektbereich 5“ auftrat, jeweils der Wert für den Mineralverlust des gesunden Bereiches abgezogen (Tab. XII). Die Predictive Analysis Software (PASW Statistics 18; Version 18.0.0; SPSS, München, Deutschland) errechnete zusätzlich die Veränderungen des Mineralgehaltes nach einer zwei- ( $\Delta \Delta Z_{\text{Effekt 2}}$ ) und fünfwohigen ( $\Delta \Delta Z_{\text{Effekt 5}}$ ) Remineralisation im Vergleich zu den Ausgangswerten der Demineralisation (Tab. XII). Diese wurden grafisch dargestellt (siehe Abschnitt 5.2.2 „Veränderungen des Mineralgehaltes der Schmelzproben“). Neben der Erfassung des gesamten Läsionsbereiches erfolgte eine getrennte Auswertung für den äußeren und inneren Anteil der Läsion jeder Probe [Kielbassa *et al.* 2005]; (Tab. XII). Der äußere Anteil der Läsion wurde als Bereich zwischen dem vom TMR-Programm definierten Anfang der Probenoberfläche (bei 20 Vol.%) sowie dem halben Abstand zwischen dem Punkt ( $P_{\text{OS}}$ ) mit dem höchsten Mineralgehalt innerhalb der pseudointakten Oberflächenschicht (OS) und dem Punkt ( $P_{\text{LK}}$ ) mit dem geringsten Mineralgehalt im Bereich des Läsionskörpers (LK) auf dem Mittelwertgraphen aller demineralisierten Proben bestimmt [ $(P_{\text{LK}} - P_{\text{OS}}) / 2 + P_{\text{OS}}$ ; Abb. 12].

**Tabelle XII:** Untersuchungsgrößen der mikroradiografischen Auswertung: Mineralverlust, Veränderung des Mineralverlustes, Läsionstiefe und Veränderung der Läsionstiefe

	gesamte Läsion	äußerer Läsionsanteil	innerer Läsionsanteil
<b>Mineralverlust (Vol.% × μm)</b>			
Demineralisation (Mineralverlust nach Demineralisation minus Mineralverlust gesund)	$\Delta Z_{\text{Demin}}$	$\Delta Z_{\text{Demin}}$	$\Delta Z_{\text{Demin}}$
Remineralisation 2 Wochen (Mineralverlust nach 2 Wochen minus Mineralverlust gesund)	$\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$	$\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$	$\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$
Remineralisation 5 Wochen (Mineralverlust nach 5 Wochen minus Mineralverlust gesund)	$\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$	$\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$	$\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$
<b>Veränderung Mineralverlust (Vol.% × μm)</b>			
Remineralisation 2 Wochen - Demineralisation	$\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$	$\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$	$\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$
Remineralisation 5 Wochen - Demineralisation	$\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$	$\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$	$\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$
<b>Läsionstiefe (μm)</b>			
Demineralisation (Läsionstiefe nach Demineralisation minus Läsionstiefe gesund)	$LT_{\text{Demin}}$	--	--
Remineralisation 2 Wochen (Läsionstiefe nach 2 Wochen minus Läsionstiefe gesund)	$LT_{\text{Effekt 2}}$	--	--
Remineralisation 5 Wochen (Läsionstiefe nach 5 Wochen minus Läsionstiefe gesund)	$LT_{\text{Effekt 5}}$	--	--
<b>Veränderung der Läsionstiefe (μm)</b>			
Remineralisation 2 Wochen - Demineralisation	$\Delta LT_{\text{Effekt 2}}$	--	--
Remineralisation 5 Wochen - Demineralisation	$\Delta LT_{\text{Effekt 5}}$	--	--

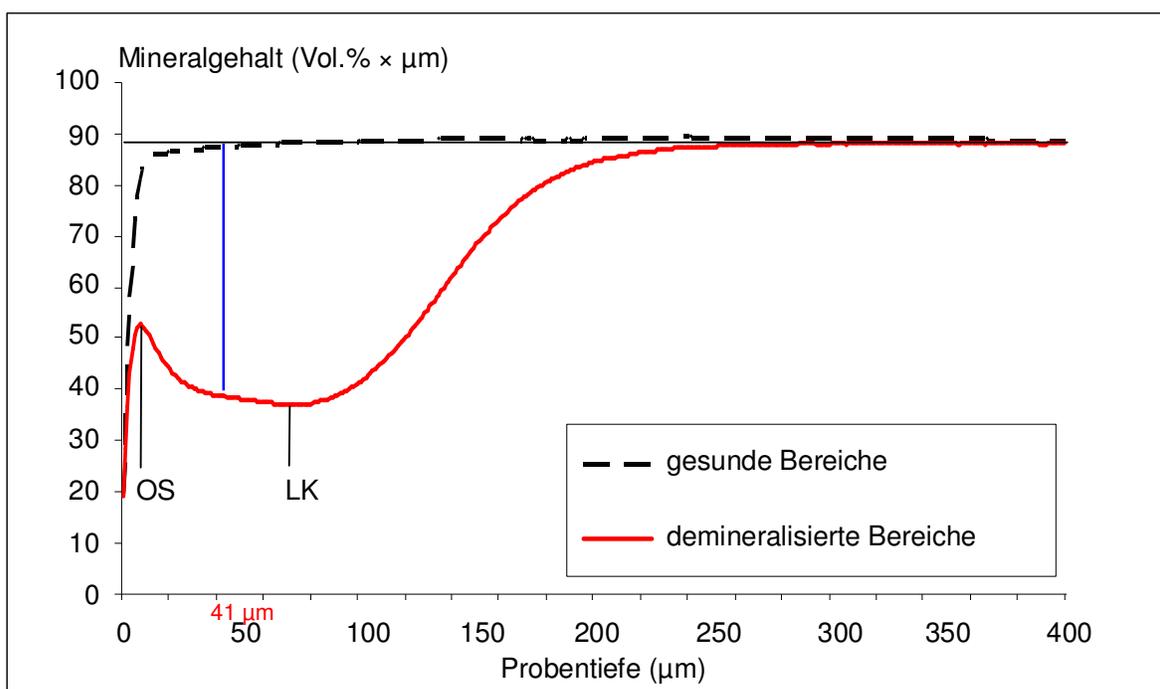
#### 4.10.3 Bestimmung der Läsionstiefe der Schmelz- und Dentinproben

Die Läsionstiefe der Schmelzproben wurde vom TMR-Programm als Distanz zwischen der Oberfläche (bei 20 Vol.%) und einem Punkt, der 95 % Mineraleichte des gesunden Schmelzes aufwies, definiert. Die Einstellung des TMR-Programmes auf einen Mineralgehalt von 87 Vol.% bei bovinen Zahnschmelz erfolgte vor der Durchführung der Messung. Die Läsionstiefe der Dentinproben wurde als Abstand zwischen der Oberfläche (20 Vol.%) und einem zu 70 % mineralisierten Punkt im gesunden Dentin festgelegt. Im TMR-Programm wurde ein Mineralgehalt von 50 Vol.% für gesundes bovines Dentin voreingestellt. Mithilfe der TMR-Software erfolgte die Ermittlung der Läsionstiefen der gesunden, demineralisierten ( $LT_{\text{Demin}}$ ) sowie der zwei- ( $LT_{\text{Effekt 2}}$ ) und

fünfwöchig ( $LT_{\text{Effekt 5}}$ ) remineralisierten Bereiche (Tab. XII). Die gemessenen Werte wurden um den projektionsbedingten Fehlerwert der Läsionstiefe im gesunden Bereich korrigiert. Darüber hinaus stellte die Predictive Analysis Software (PASW Statistics 18; Version 18.0.0; SPSS) die Veränderung der Läsionstiefe nach zwei- ( $\Delta LT_{\text{Effekt 2}}$ ) und nach fünfwöchiger ( $\Delta LT_{\text{Effekt 5}}$ ) Remineralisation im Vergleich zur Demineralisation dar (Tab. XII).

#### 4.10.4 Struktureller Aufbau der Schmelz- und Dentinproben

Jeder gescannte Bereich einer Probe wurde mittels der TMR-Software (TMR für Windows, Version 2.0.27.2; Inspektor Research System BV) als Kurve in einem Diagramm dargestellt. Der Mineralgehalt (y-Achse) wurde gegen die Läsionstiefe (x-Achse) im Graphen aufgetragen. Anschließend folgte eine Übertragung aller Koordinaten der Kurven in ein Textdokument und eine Tabellenkalkulationssoftware (Office Excel 2003; Microsoft Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland). Die Daten wurden für die Erstellung von Mittelwertgraphen zusammengefasst.



**Abb. 12** Mittelwertgraphen aller gesunden und demineralisierten Probenbereiche. Die Fläche links vor der blauen Linie stellt die äußere Läsion dar, die Fläche rechts davon die innere Läsion. Die Abkürzung OS bedeutet pseudointakte Oberflächenschicht und LK Läsionskörper.

In dem Diagramm des Mittelwertgraphen der Demineralisation stellt die Fläche zwischen den gesunden und demineralisierten Proben ein Maß für den mittleren Mineralverlust dar (Abb. 12). Auch das typische Bild einer initialen Läsion mit ihrer pseudointakten Oberflächenschicht (OS) und dem Läsionskörper (LK) ist in Abbildung 12 erkennbar [Buskes *et al.* 1985; Arends *et al.* 1997]. Zusätzlich wurden Mittelwertgraphen für die Daten der zwei- und fünfwöchiger Remineralisation erstellt.

#### **4.11 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde mithilfe der Predictive Analysis Software (PASW Statistics 18; Version 18.0.0; SPSS) durchgeführt. Alle Variablen wurden auf Normalverteilung hin untersucht (Kolmogorov-Smirnov-Test) und einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen. Der Vergleich der Gruppen untereinander erfolgte bei einer ermittelten Signifikanz mit dem Post-hoc-Test nach Tukey. Der Vergleich innerhalb einer Gruppe erfolgte mit dem *t*-Test für gepaarte Stichproben. Das Signifikanzniveau wurde bei allen Tests mit 5 % festgelegt. Eine Entblindung der Gruppen durch den Studienleiter erfolgte nach Abschluss der statistischen Auswertung.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Sättigungsberechnung

Alle Versuchslösungen, die Kalzium und Phosphat enthielten, waren in Bezug auf HAP übersättigt, wobei die Lösung B1 (BUSKES-Lösung) die höchste Übersättigung aller Lösungen aufwies (Tab. XIII a). Die Übersättigung an HAP in den wässrigen Lösungen (Lösungen 3 bis 8) nahm mit zunehmender Kalziumkonzentration zu (Tab. XIII a, XIII b). Die Lösung 3, welche die geringste Kalziumkonzentration aufweist, war bezüglich HAP übersättigt, bezogen auf OKP und DKPD lag sie jedoch ungesättigt vor (Tab. XIII a). In Bezug auf HAP und OKP herrschte eine Übersättigung in den Lösungen 4, 5 und B2 (BUSKES-Lösung mit einem an die wässrigen Lösungen angeglichenen pH-Wert). Hinsichtlich DKPD waren diese Lösungen ungesättigt (Tab. XIII a). Die wässrigen Lösungen 6, 7, 8 und B1 waren in Bezug auf die zwei Kalzium-Phosphat-Verbindungen HAP und OKP übersättigt. Die Lösungen 6 und B1 lagen bezogen auf OKPD gesättigt vor, wohingegen die Lösungen 7 und 8 bezüglich DKPD übersättigt waren (Tab. XIII a). Sowohl die Mengenangaben als auch die neu berechneten Sättigungen wiesen kaum Abweichungen zu den vor der Herstellung der Versuchslösungen ermittelten Werten auf. Somit kam es zu keiner Bodensatzbildung in den Versuchslösungen; die pH-Werte blieben über den gesamten Versuchszeitraum stabil (Tab. XIII a, XIII b).

**Tabelle XIII a:** Sättigungsberechnung aller Lösungen bezüglich einer wässrigen Lösung

Lsg.	Basis	pH	HAP	OKP	DKPD	HAP**	OKP**	DKPD**
1		4,70	--	--	--	--	--	--
2			--	--	--	--	--	--
3			3,03	0,80	0,49	3,15	0,83	0,51
4	NaCl*		4,57	1,16	0,71	4,59	1,17	0,71
5		6,30	5,67	1,41	0,86	5,74	1,43	0,87
6			6,60	1,61	0,98	6,70	1,64	1,00
7			7,34	1,77	1,07	7,57	1,83	1,12
8			8,24	1,96	1,19	8,34	1,99	1,21
B1	Aqua	7,00	15,98	2,72	1,05	14,27	2,46	0,95
B2	dest.	6,30	5,39	1,20	0,61	5,39	1,21	0,62

\* 0,9%ige Kochsalzlösung; \*\* Sättigungen aus Abschnitt 4.5 „Herstellung der Versuchslösungen“; Lsg. = Lösungen

**Tabelle XIII b:** Konzentrationen aller Versuchslösungen

Lsg.	Ca		PO		K		Cl		Ca*	PO*	K*	Cl*
	mM		mM		mM		mM					
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD				
1	--	--	--	--	0,03	0,00	152,40	0,12	--	--	--	151,30
2	--	--	4,96	0,04	6,96	0,04	152,23	0,84	--	--	--	151,30
3	0,50	0,00	4,97	0,04	6,85	0,07	153,86	0,00	0,53	--	--	152,36
4	1,05	0,00	4,99	0,00	6,83	0,07	154,55	0,30	1,05	--	--	153,40
5	1,57	0,04	4,91	0,01	6,69	0,20	155,51	0,26	1,58	5,04	6,72	154,46
6	2,10	0,04	4,81	0,04	6,80	0,02	156,32	0,46	2,10	--	--	155,50
7	2,57	0,00	4,76	0,03	6,83	0,04	157,62	0,22	2,63	--	--	156,56
8	3,17	0,02	4,79	0,00	6,89	0,09	158,62	0,72	3,15	--	--	157,60
B1	1,62	0,02	0,86	0,01	0,92	0,02	2,96	0,02	1,50	0,90	0,90	3,00
B2	1,62	0,00	0,87	0,01	0,91	0,00	2,97	0,03	--	--	--	--

\* Konzentrationen aus Abschnitt 4.5 „Herstellung der Versuchslösungen“; Lsg. = Lösungen; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung

## 5.2 Quantitative Auswertung der Schmelzproben

Alle errechneten Messgrößen (siehe Abschnitt 5.2 „Quantitative Auswertung der Schmelzproben“) der einzelnen Proben in den jeweiligen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $p > 0,05$ ; Kolmogorow-Smirnow-Test).

### 5.2.1 Mineralverlust der Schmelzproben

Die Mineralverluste nach der Demineralisation ( $\Delta Z_{\text{Demin}}$ ) aller 180 Schmelzproben unterschieden sich nicht signifikant ( $p = 0,959$ ; ANOVA) voneinander. Der Mittelwert des  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  Wertes betrug 6584 Vol.% bei einem 95 %-Konfidenzintervall von 6346 - 6822. Die Messergebnisse aller Mineralverluste und ihrer zugehörigen Konfidenzintervalle der Demineralisation (Ausgangswerte), nach einer zwei- ( $\Delta Z_{\text{Effekt } 2}$ ) und fünfwoöchigen ( $\Delta Z_{\text{Effekt } 5}$ ) Lagerung in den jeweiligen Lösungen (siehe Abschnitt 4.5 „Herstellung der Versuchslösungen“), sind in den Tabellen XIV, XV und XVI dargestellt.

#### Mineralverlust der gesamten Läsion

Nach einer zwei- und fünfwoöchigen Lagerung der Proben in Lösung 2 unterschieden sich die Werte des effektiven Mineralverlustes ( $\Delta Z_{\text{Effekt}}$ ) nicht signifikant von dem  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  Wert ( $p > 0,05$ ;  $t$ -Test bei gepaarten Stichproben; Tab. XIV). Bei den restlichen Proben

war sowohl nach zwei als auch nach fünf Wochen der Lagerung in den jeweiligen Lösungen ein signifikanter Unterschied zu dem entsprechenden  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  Wert erkennbar ( $p < 0,05$ ; Tab. XIV). Verglichen mit den zugehörigen  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  Werten verursachte die Lösung 1 (Negativkontrolle) eine signifikante Zunahme von  $\Delta Z_{\text{Effekt } 2+5}$  ( $p < 0,001$ ), wohingegen die Lösungen 3 bis 8, B1 (Referenzlösung) und B2 zu einer signifikanten Abnahme von  $\Delta Z_{\text{Effekt } 2+5}$  führten ( $p < 0,05$ ; Tab. XIV).

**Tabelle XIV:** Mittelwerte und Konfidenzintervalle der Mineralverluste ( $\text{Vol}\% \times \mu\text{m}$ ) nach Demineralisation ( $\Delta Z_{\text{Demin}}$ ) und Lagerung in den einzelnen Lösungen nach zwei ( $\Delta Z_{\text{Effekt } 2}$ ) und fünf ( $\Delta Z_{\text{Effekt } 5}$ ) Wochen

Mineralverlust Schmelz ( $\text{Vol}\% \times \mu\text{m}$ )									
Lsg.	$\Delta Z_{\text{Demin}}$			$\Delta Z_{\text{Effekt } 2}$			$\Delta Z_{\text{Effekt } 5}$		
	MW	KI 95 %	p	MW	KI 95 %	p	MW	KI 95 %	p
1	6854	5946;7762	<0,001	9277	8011;10544	<0,001	12665	11349;13981	<0,001
2	6352	5483;7221	0,680	6260	5303;7216	0,680	7264	6011;8518	0,190
3	6581	5843;7319	0,002	5778	5090;6466	0,002	4039	3318;4759	<0,001
4	7050	6271;7829	<0,001	4771	3904;5638	<0,001	2656	1946;3365	<0,001
5	6389	5579;7198	<0,001	3762	2981;4544	<0,001	1534	1067;2002	<0,001
6	6475	5521;7428	<0,001	3168	2559;3777	<0,001	1298	967;1629	<0,001
7	6394	5480;7309	<0,001	3450	2520;4381	<0,001	1349	881;1816	<0,001
8	6633	5929;7337	<0,001	2931	2333;3529	<0,001	1624	1103;2146	<0,001
B1	6686	5822;7549	<0,001	2768	2020;3516	<0,001	1274	1056;1491	<0,001
B2	6424	5835;7013	<0,001	4805	4113;5497	<0,001	3271	2513;4029	<0,001

Signifikante Unterschiede zwischen  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  und  $\Delta Z_{\text{Effekt } 2+5}$  sind mit p-Werten ( $p < 0,05$ ; t-Test bei gepaarten Stichproben) gekennzeichnet; MW = Mittelwert; KI = Konfidenzintervall; Lsg. = Lösung

#### Mineralverlust des äußeren Läsionsanteiles

In den äußeren  $41 \mu\text{m}$  (KI 39; 42;  $p = 0,434$ ; ANOVA) der Läsionen der Proben, die in der Lösung 1 gelagert waren, nahm der  $\Delta Z_{\text{Effekt } 2+5}$  Wert im Vergleich zu dem  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  Wert signifikant zu ( $p < 0,001$ ; t-Test bei gepaarten Stichproben; Tab. XV). Die Lösungen 4 bis 8 und B1 führten zu einer signifikanten Reduktion der  $\Delta Z_{\text{Effekt } 2+5}$  Werte der Proben gegenüber dem korrespondierenden  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  Wert ( $p < 0,05$ ; Tab. XV). Kein signifikanter Unterschied war zwischen den jeweiligen  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  Werten und den  $\Delta Z_{\text{Effekt } 2}$  Werten der Proben in den Lösungen 2 und 3 nachweisbar ( $p = 0,377$ ; Tab. XV). Allerdings wurde hier, verglichen mit den Ausgangswerten, eine signifikante Zunahme

von  $\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$  festgestellt ( $p = 0,022$ ; Tab. XV). Die Lösung B2 bewirkte bei den demineralisierten Läsionen der Proben eine signifikante Abnahme von  $\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$  ( $p = 0,003$ ; Tab. XV), wobei sich im Gegensatz dazu der  $\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$  Wert nicht signifikant von dem  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  Wert unterschied ( $p = 0,098$ ; Tab. XV).

**Tabelle XV:** Mittelwerte und Konfidenzintervalle der Mineralverluste (Vol%  $\times$   $\mu\text{m}$ ) der äußeren Läsionsanteile nach Demineralisation ( $\Delta Z_{\text{Demin}}$ ) und Lagerung in den einzelnen Lösungen nach zwei ( $\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$ ) und fünf ( $\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$ ) Wochen

Mineralverlust äußerer Läsionsanteil Schmelz (Vol% $\times$ $\mu\text{m}$ )									
Lsg.	$\Delta Z_{\text{Demin}}$			$\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$			$\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$		
	MW	KI 95 %	MW	KI 95 %	p	MW	KI 95 %	p	
1	1665	1364;1967	2891	2323;3458	<0,001	3439	2971;3907	<0,001	
2	1370	1173;1567	1335	1120;1551	0,377	1647	1306;1987	0,022	
3	1584	1359;1809	1535	1308;1762	0,050	1374	1127;1621	<0,001	
4	1763	1490;2035	1577	1303;1851	<0,001	1444	1153;1735	0,003	
5	1561	1288;1835	1472	1188;1756	<0,001	1017	673;1361	<0,001	
6	1529	1213;1846	1314	1082;1546	0,006	841	623;1059	<0,001	
7	1522	1277;1768	1327	1023;1631	0,019	692	507;877	<0,001	
8	1568	1315;1821	1330	1070;1590	0,006	968	664;1273	<0,001	
B1	1655	1358;1952	1360	998;1721	0,002	537	358;716	<0,001	
B2	1507	1264;1750	1390	1144;1636	0,003	1358	1064;1651	0,098	

Signifikante Unterschiede zwischen  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  und  $\Delta Z_{\text{Effekt 2+5}}$  sind mit p-Werten ( $p < 0,05$ ; t-Test bei gepaarten Stichproben) gekennzeichnet; MW = Mittelwert; KI = Konfidenzintervall; Lsg. = Lösung

#### Mineralverlust des inneren Läsionsanteiles

Der  $\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$  Wert des inneren Läsionsbereiches (von 41  $\mu\text{m}$  bis 168  $\mu\text{m}$ ; KI 165; 172;  $p = 0,947$ ; ANOVA) der Proben in Lösung 2 zeigte keinen signifikanten Unterschied zu dem  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  Wert ( $p = 0,770$ ; t-Test bei gepaarten Stichproben; Tab. XVI). Demgegenüber nahm der  $\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$  Wert im Vergleich zum  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  Wert signifikant zu ( $p = 0,031$ ; Tab. XVI). Die  $\Delta Z_{\text{Effekt 2+5}}$  Werte der restlichen Gruppen unterscheidet sich signifikant von dem jeweiligen  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  Wert ( $p < 0,05$ ; Tab. XVI). Hinsichtlich des  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  Wertes verursachte die Lösung 1 eine signifikante Zunahme von  $\Delta Z_{\text{Effekt 2+5}}$  ( $p < 0,05$ ; Tab. XVI), wohingegen die Lösungen 3 bis 8, B1 und B2 zu einer signifikanten Reduktion von  $\Delta Z_{\text{Effekt 2+5}}$  führten ( $p < 0,05$ ; Tab. XVI).

**Tabelle XVI:** Mittelwerte und Konfidenzintervalle der Mineralverluste (Vol% × μm) der inneren Läsionsanteile nach Demineralisation ( $\Delta Z_{\text{Demin}}$ ) und Lagerung in den einzelnen Lösungen nach zwei ( $\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$ ) und fünf ( $\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$ ) Wochen

Mineralverlust innerer Läsionsanteil Schmelz (Vol% × μm)								
Lsg.	$\Delta Z_{\text{Demin}}$		$\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$		$\Delta Z_{\text{Demin}} / \Delta Z_{\text{Effekt 2}}$	$\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$		$\Delta Z_{\text{Demin}} / \Delta Z_{\text{Effekt 5}}$
	MW	KI 95 %	MW	KI 95 %	p	MW	KI 95 %	p
1	5189	4539;5839	6387	5497;7276	0,001	9226	8188;10265	<0,001
2	4982	4206;5758	4924	4065;5784	0,770	5618	4590;6645	0,031
3	4997	4419;5574	4243	3704;4782	0,002	2665	2091;3238	<0,001
4	5287	4753;5822	3194	2554;3835	<0,001	1212	751;1673	<0,001
5	4828	4249;5406	2291	1703;2878	<0,001	518	347;689	<0,001
6	4946	4257;5634	1855	1368;2341	<0,001	457	293;621	<0,001
7	4872	4122;5623	2123	1426;2820	<0,001	657	300;1013	<0,001
8	5065	4564;5566	1601	1214;1988	<0,001	656	391;921	<0,001
B1	5031	4446;5616	1408	971;1845	<0,001	737	605;869	<0,001
B2	4917	4500;5334	3415	2913;3916	<0,001	1913	1369;2457	<0,001

Signifikante Unterschiede zwischen  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  und  $\Delta Z_{\text{Effekt 2 + 5}}$  sind mit p-Werten ( $p < 0,05$ ; t-Test bei gepaarten Stichproben) gekennzeichnet; MW = Mittelwert; KI = Konfidenzintervall; Lsg. = Lösung

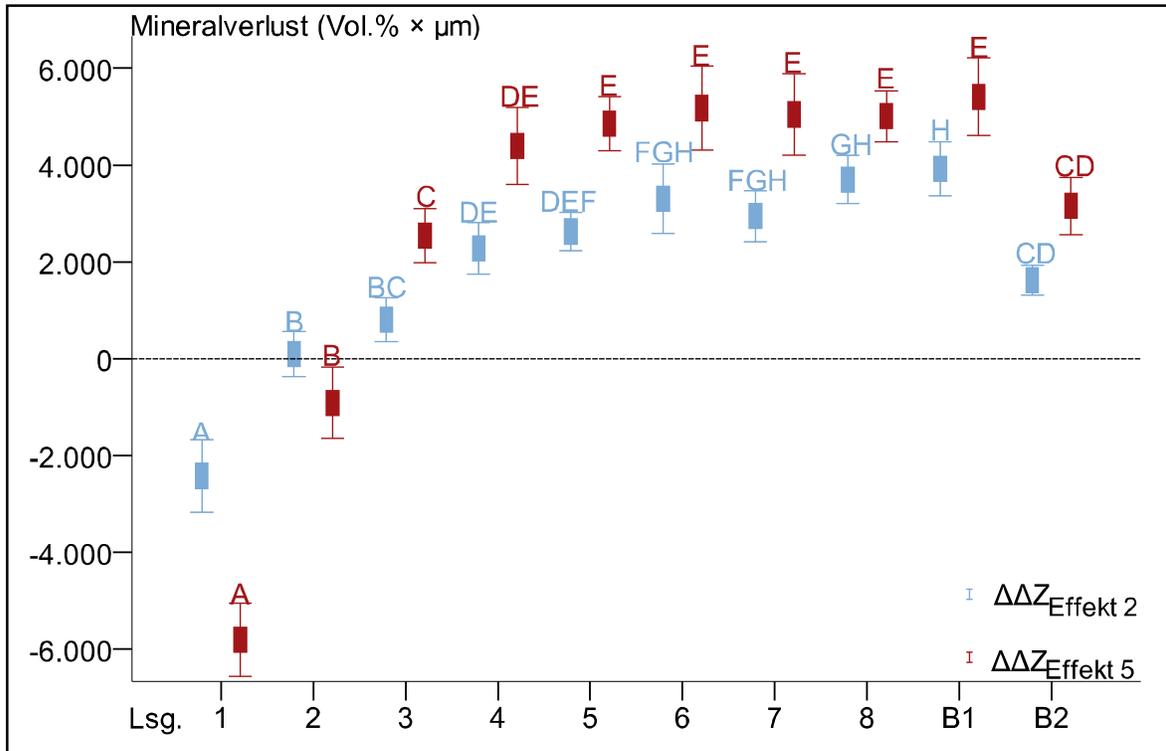
### 5.2.2 Veränderung des Mineralgehaltes der Schmelzproben

In diesem Abschnitt wurde der absolute Mineralverlust ( $\Delta \Delta Z_{\text{Effekt}}$ ) der Schmelzproben nach ihrer zwei- ( $\Delta \Delta Z_{\text{Effekt 2}}$ ) und fünföchigen ( $\Delta \Delta Z_{\text{Effekt 5}}$ ) Lagerung in den unterschiedlichen Lösungen miteinander verglichen.

#### Veränderung des Mineralgehaltes der gesamten Läsion

Die in Lösung 1 gelagerten Schmelzproben wiesen eine signifikante Zunahme von  $\Delta \Delta Z_{\text{Effekt 2 + 5}}$  gegenüber dem  $\Delta \Delta Z_{\text{Effekt 2 + 5}}$  Wert der Proben aus Lösung 2 und dem  $\Delta \Delta Z_{\text{Effekt 2}}$  Wert der Proben aus Lösung 3 auf ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Tukey Post-hoc-Test; Abb. 13). Der  $\Delta \Delta Z_{\text{Effekt 2 + 5}}$  Wert der Proben 2 und der  $\Delta \Delta Z_{\text{Effekt 2}}$  Wert der Proben 3 war signifikant höher als die  $\Delta \Delta Z_{\text{Effekt}}$  Werte der restlichen Probengruppen in den jeweiligen Lösungen ( $p < 0,05$ ; Abb. 13). Die Lösungen 4, 5 und B2 führten zu einer signifikant geringeren Abnahme von  $\Delta \Delta Z_{\text{Effekt 2}}$  als die Lösungen 6, 7, 8 und B1 ( $p < 0,05$ ; Abb. 13). Die Proben in den Lösungen 6, 7, 8 und B1 verzeichneten eine signifikant höhere

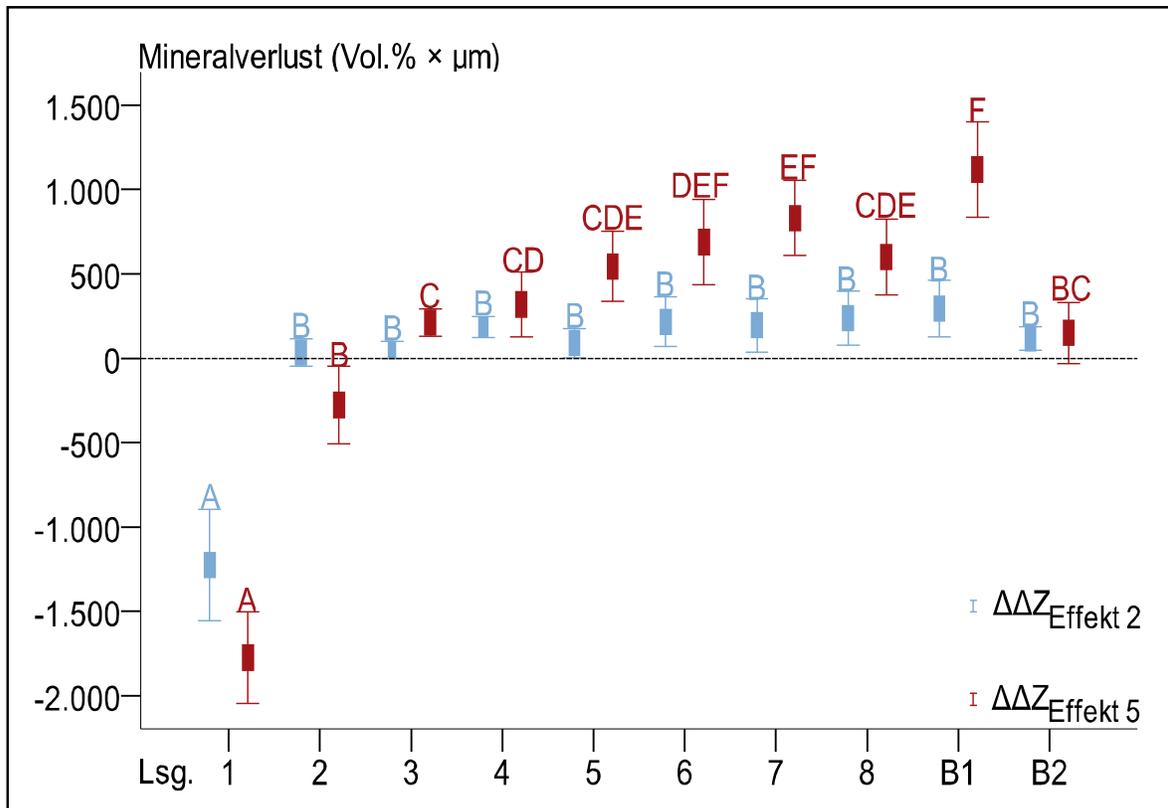
Reduktion von  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$  gegenüber den Proben in den Lösungen 3, 4, 5 und B2 ( $p < 0,05$ ; Abb. 13).



**Abb. 13** Absoluter Mineralverlust ( $\Delta\Delta Z$ , Vol.% × μm) nach der zwei- ( $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$ ) und fünfwöchigen ( $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$ ) Lagerung der demineralisierten Schmelzproben in den einzelnen Lösungen. Negative Werte stehen für eine Zunahme des Mineralverlustes, positive Werte für eine Abnahme. Gruppen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Tukey Post-hoc-Test).

#### Veränderung des Mineralgehaltes des äußeren Läsionsanteiles

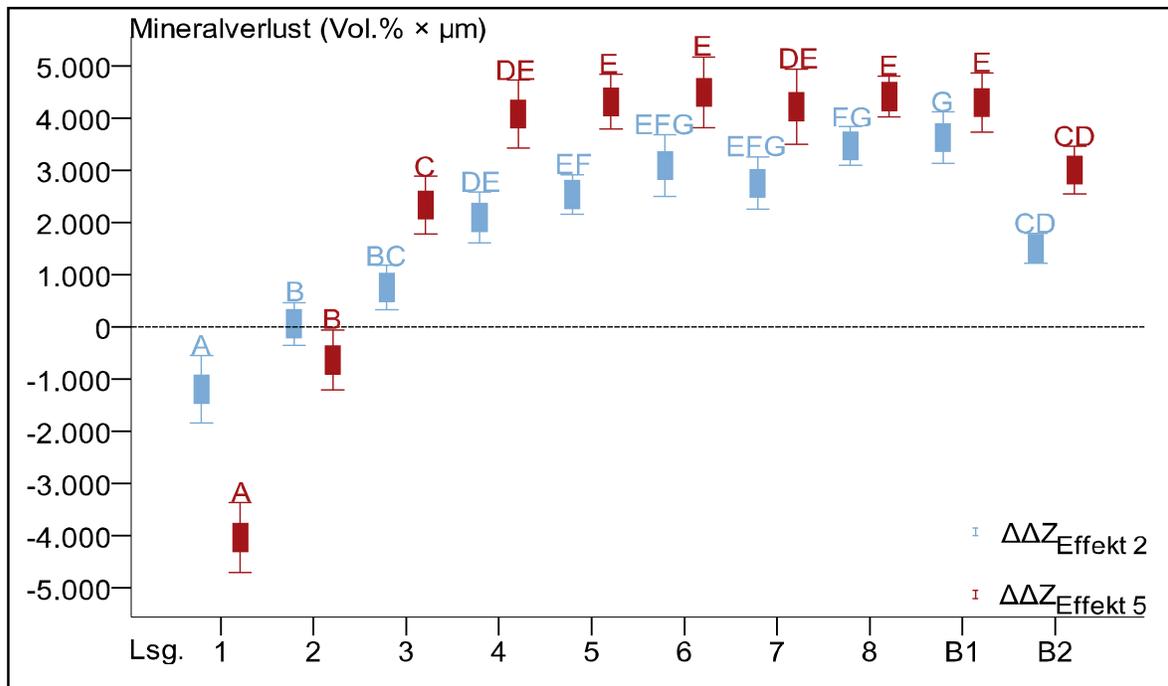
Werden nur die Veränderungen des Mineralgehaltes der äußeren 41 μm der Läsion betrachtet, fällt auf, dass die Lösung 1 zu einer signifikanten Zunahme des  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2 + 5}}$  Wertes gegenüber dem  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2 + 5}}$  Wert der Proben in der Lösung 2 führt ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Tukey Post-hoc-Test; Abb. 14). Die Abnahme von  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$  der Proben in den Lösungen 3 bis 8, B1 und B2 unterschied sich nicht signifikant ( $p > 0,05$ ; Abb. 14). Die Lösungen 6, 7 und B1 bewirkten im Vergleich zu den Lösungen 3, 4, 5, 8 und B2 eine signifikant höhere Abnahme von  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$  ( $p < 0,05$ ; Abb. 14), wobei sich die  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$  Werte der Proben in den Lösung 5, 6, 7 und 8 nicht signifikant voneinander unterschieden ( $p > 0,05$ ; Abb. 14).



**Abb. 14** Absoluter Mineralverlust des äußeren Läsionsanteiles ( $\Delta\Delta Z$ , Vol.%  $\times$   $\mu\text{m}$ ) nach der zwei- ( $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$ ) und fünfwöchigen ( $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$ ) Lagerung der demineralisierten Schmelzproben in den einzelnen Lösungen. Negative Werte stehen für eine Zunahme des Mineralverlustes, positive Werte für eine Abnahme. Gruppen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Tukey Post-hoc-Test).

#### Veränderung des Mineralgehaltes des inneren Läsionsanteiles

Die Lösung 1 verursachte im inneren Läsionsteil der Proben eine signifikante Zunahme von  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2+5}}$  gegenüber der Lösung 2 ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Tukey Post-hoc-Test; Abb. 15). Im Vergleich zur Lösung 2 führten die Lösungen 3 und B2 zu einer signifikanten Abnahme der  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2+5}}$  Werte ( $p < 0,05$ ; Abb. 15). Auch die restlichen Lösungen konnten eine signifikante Reduktion von  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt}}$  verzeichnen ( $p < 0,05$ ; Abb. 15). Die Abnahme der  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$  Werte der Proben in den Lösungen 4 und 5 war signifikant geringer als die der Proben in den Lösungen 6 bis 8 und B1 ( $p < 0,05$ ; Abb. 13). Die Lösungen 4 bis 8 und B1 bewirkten keine signifikant unterschiedliche Verminderung von  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$  ( $p > 0,05$ ; Abb. 15).



**Abb. 15** Absoluter Mineralverlust des inneren Läsionsanteiles ( $\Delta\Delta Z$ , Vol.%  $\times$   $\mu\text{m}$ ) nach der zwei- ( $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt } 2}$ ) und fünfwöchigen ( $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt } 5}$ ) Lagerung der demineralisierten Schmelzproben in den einzelnen Lösungen. Negative Werte stehen für eine Zunahme des Mineralverlustes, positive Werte für eine Abnahme. Gruppen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Tukey Post-hoc-Test).

### 5.2.3 Läsionstiefe der Schmelzproben

Die Läsionstiefen nach der Demineralisation ( $LT_{\text{Demin}}$ ) aller 180 Schmelzproben unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $p = 0,947$ ; ANOVA). Der Mittelwert des  $LT_{\text{Demin}}$  Wertes betrug  $168 \mu\text{m}$  bei einem 95 %-Konfidenzintervall von  $165 - 178$ . Alle Messwerte der Läsionstiefen und ihre zugehörigen Konfidenzintervalle der Demineralisation (Ausgangswerte), nach zwei- ( $LT_{\text{Effekt } 2}$ ) und fünfwöchiger ( $LT_{\text{Effekt } 5}$ ) Lagerung der Schmelzproben in den Lösungen sind in Tabelle XVII zusammengestellt.

Im Vergleich zum  $LT_{\text{Demin}}$  Wert zeigten die Proben, die in Lösung 1 gelagert waren, keine signifikante Veränderung ihres  $LT_{\text{Effekt } 2}$  Wertes ( $p = 0,275$ ;  $t$ -Test bei gepaarten Stichproben; Tab. XVII), wohingegen der  $LT_{\text{Effekt } 5}$  Wert gegenüber dem  $LT_{\text{Demin}}$  Wert signifikant zunahm ( $p = 0,002$ ; Tab. XVII). Ausgehend von dem  $LT_{\text{Demin}}$  Wert der Proben führte die Lösung 2 zu keiner signifikanten Änderung des  $LT_{\text{Effekt } 2 + 5}$  Wertes ( $p > 0,05$ ; Tab. XVII). Die restlichen Lösungen (3 bis 8, B1, B2) bewirkten eine

signifikante Reduktion von  $LT_{\text{Effekt } 2 + 5}$  der jeweiligen Schmelzproben verglichen mit dem zugehörigen  $LT_{\text{Demin}}$  Wert ( $p < 0,05$ ; Tab. XVII).

**Tabelle XVII:** Mittelwerte und Konfidenzintervalle der Läsionstiefen ( $\mu\text{m}$ ) nach Demineralisation ( $LT_{\text{Demin}}$ ) und Lagerung in den einzelnen Lösungen nach zwei ( $LT_{\text{Effekt } 2}$ ) und fünf ( $LT_{\text{Effekt } 5}$ ) Wochen

Lsg.	Läsionstiefe Schmelz ( $\mu\text{m}$ )							
	$LT_{\text{Demin}}$		$LT_{\text{Effekt } 2}$		$LT_{\text{Demin}}/$ $LT_{\text{Effekt } 2}$	$LT_{\text{Effekt } 5}$		$LT_{\text{Demin}}/$ $LT_{\text{Effekt } 5}$
	MW	KI 95 %	MW	KI 95 %	p	MW	KI 95 %	p
1	175	163;188	169	156;182	0,275	190	176;204	0,002
2	164	149;178	160	141;178	0,286	157	143;170	0,081
3	171	157;184	158	146;171	0,017	130	116;144	<0,001
4	169	155;182	137	123;152	<0,001	95	76;114	<0,001
5	170	157;184	127	112;143	<0,001	64	50;79	<0,001
6	167	154;180	114	97;132	<0,001	68	49;88	<0,001
7	162	149;176	126	110;142	<0,001	71	51;90	<0,001
8	169	157;180	112	92;131	<0,001	69	49;89	<0,001
B1	168	156;180	117	94;140	<0,001	80	57;104	<0,001
B2	135	126;145	95	83;107	<0,001	95	83;107	<0,001

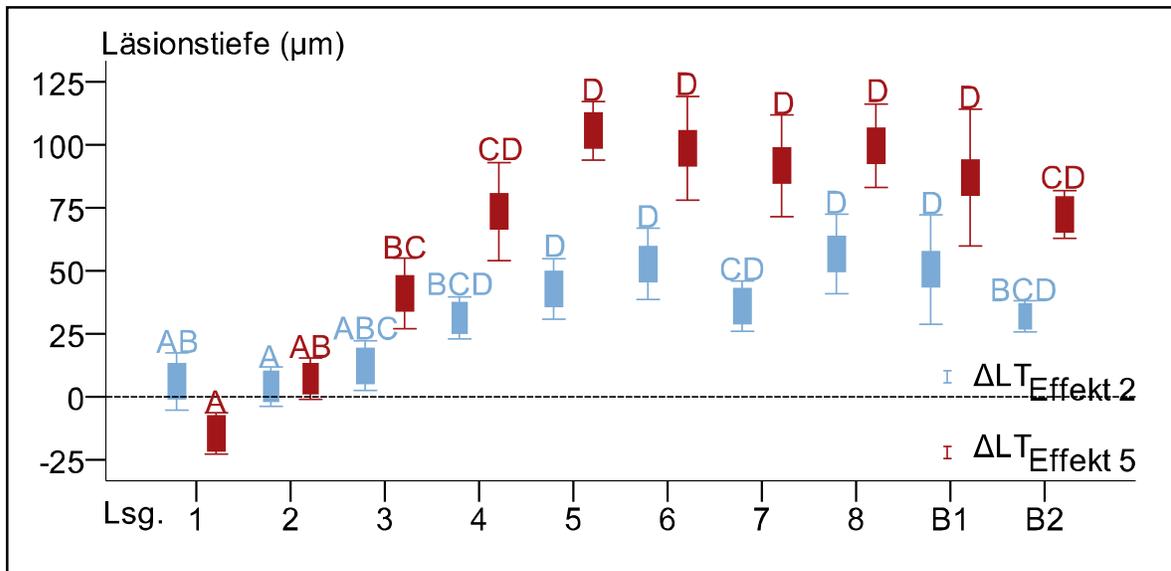
Signifikante Unterschiede zwischen  $LT_{\text{Demin}}$  und  $LT_{\text{Effekt } 2 + 5}$  sind mit p-Werten ( $p < 0,05$ ; t-Test bei gepaarten Stichproben) gekennzeichnet; MW = Mittelwert; KI = Konfidenzintervall;

Lsg. = Lösung

#### 5.2.4 Veränderung der Läsionstiefe der Schmelzproben

Die Läsionstiefe ( $\Delta LT_{\text{Effekt}}$ ) der Schmelzproben nach ihrer zwei- ( $\Delta LT_{\text{Effekt } 2}$ ) und fünfwoöchigen ( $\Delta LT_{\text{Effekt } 5}$ ) Lagerung in den unterschiedlichen Lösungen wurde miteinander verglichen.

Die Lösungen 1 und 2 verursachten eine signifikante Zunahme von  $\Delta LT_{\text{Effekt } 2 + 5}$  gegenüber den restlichen Lösungen ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Tukey Post-hoc-Test; Abb. 16). Die Reduktion der  $\Delta LT_{\text{Effekt } 2 + 5}$  Werte der Proben in den Lösungen 3, 4 und B2 war signifikant geringer als die der Proben in den Lösungen 5 bis 8 und B1 ( $p < 0,05$ ; Abb. 16).

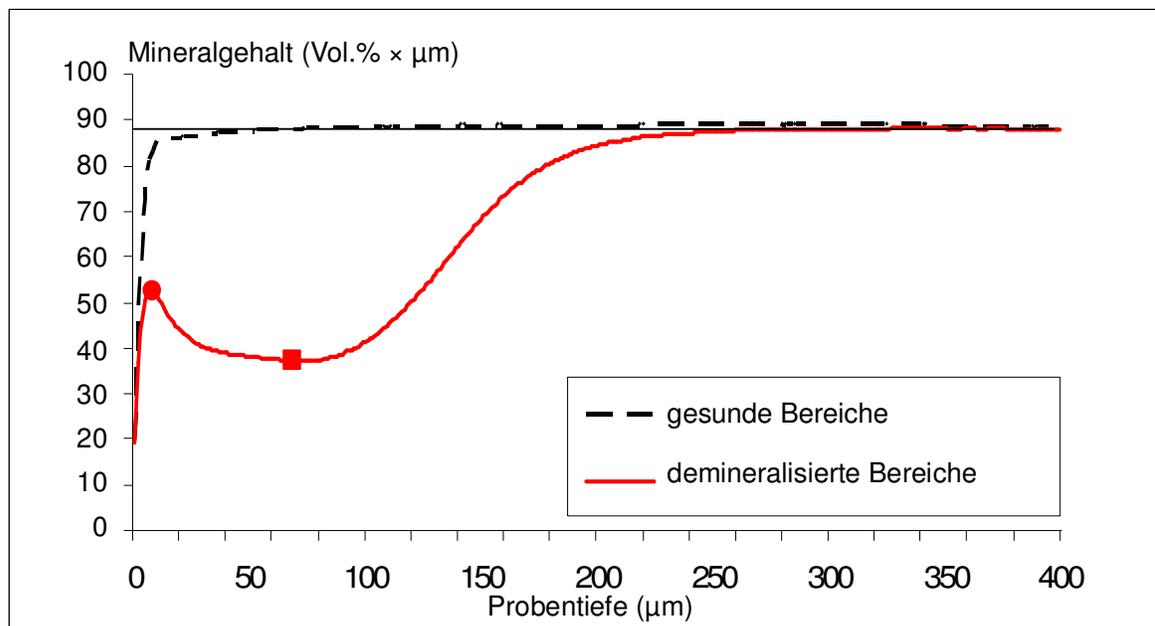


**Abb. 16** Absolute Läsionstiefe ( $\Delta LT$ ,  $\mu m$ ) nach der zwei- ( $\Delta LT_{\text{Effekt 2}}$ ) und fünfwoöchigen ( $\Delta LT_{\text{Effekt 5}}$ ) Lagerung der demineralisierten Schmelzproben in den einzelnen Lösungen. Negative Werte stehen für eine Zunahme der Läsionstiefe, positive Werte für eine Abnahme. Gruppen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Tukey Post-hoc-Test).

### 5.3 Qualitative Auswertung

#### 5.3.1 Struktureller Aufbau der Schmelzläsionen

Der Mittelwertgraph der Bereiche „Kontrolle Gesund“ aller 180 Schmelzproben zeigt einen geringen oberflächlichen Mineralverlust, der auf projektionsbedingte Fehler zurückgeführt wurde (Abb. 17). Der Mittelwertgraph nach einer 19tägigen Demineralisation der Proben (gemessene Bereiche „Kontrolle Demineralisation“) stellt das typische Bild einer initialen Läsion mit ihrer pseudointakten Oberflächenschicht (OS) und dem Läsionskörper (LK) dar (Abb. 17). Wie im Graphen ersichtlich, steigt der Mineralgehalt der Läsion von der Schmelzoberfläche bis zu seinem Höhepunkt innerhalb der OS (Abb. 17, roter Punkt) an. Anschließend sinkt dieser mit zunehmender Läsionstiefe auf seinen im LK befindlichen geringsten Wert ab (Abb. 17, rotes Quadrat). Danach nimmt der Mineralgehalt bis zum gesunden Schmelzbereich stetig zu. Die genauen Messwerte der  $\Delta Z_{\text{Demin}}$ ,  $\Delta Z_{\text{Effekt 2+5}}$ ,  $LT_{\text{Demin}}$  sowie  $LT_{\text{Effekt 2+5}}$  und ihre zugehörigen Konfidenzintervalle wurden bereits in den Abschnitten 5.2.1 „Mineralverlust der Schmelzproben“ und 5.2.3 „Läsionstiefe der Schmelzproben“ dargestellt.

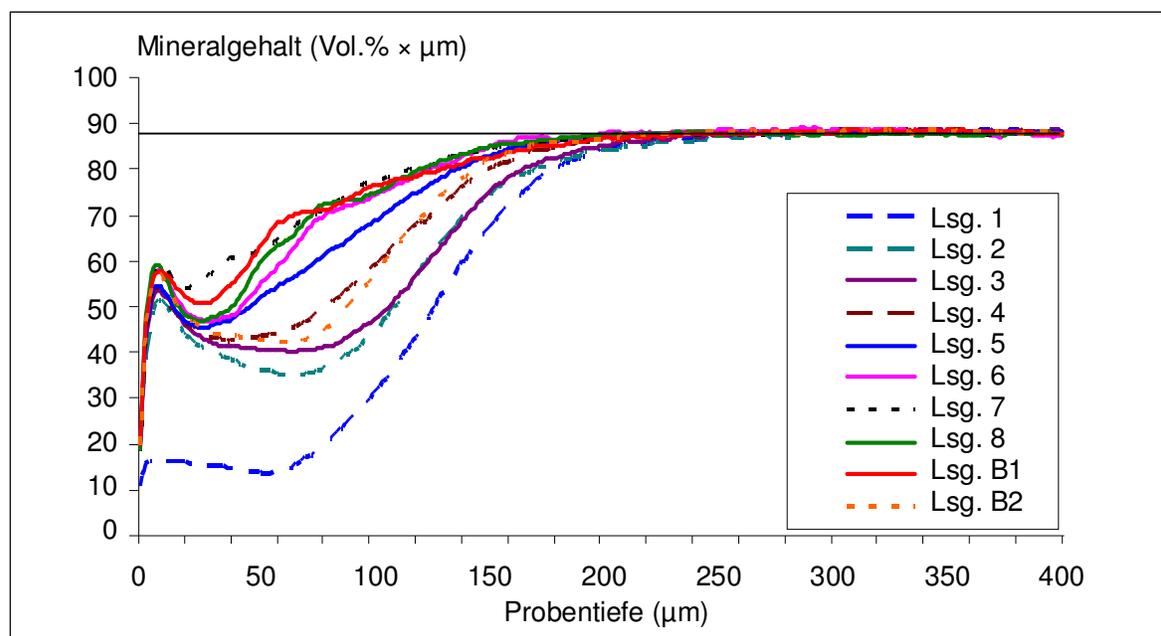


**Abb. 17** Mittelwertgraphen aller Probenbereiche „Kontrolle Gesund“ und „Kontrolle Demineralisation“. Der rote Punkt stellt den Bereich des höchsten Mineralgehaltes in der Läsion dar, das rote Quadrat den geringsten Mineralgehalt der Läsion.

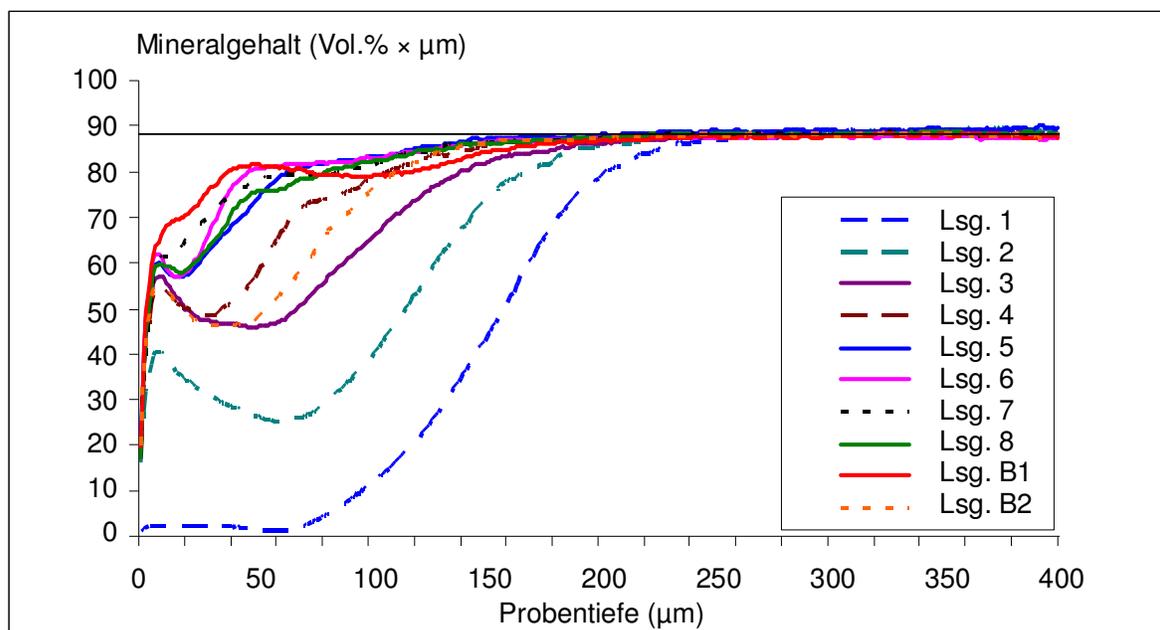
Die Mittelwertgraphen, die von den Messwerten aller Probenbereiche „Effektbereich 2“ erstellt wurden, zeigten, dass nach einer zweiwöchigen Lagerung der Schmelzproben in den jeweiligen Lösungen strukturelle Veränderungen in den demineralisierten Läsionen stattgefunden haben. Die Lösung 1 führte zu einem weiteren Mineralverlust. Hierbei vergrößerte sich der LK, die OS ging verloren und die Läsionstiefe blieb unverändert bestehen. Die Lösungen 2 und 3 bewirkten keine deutlich erkennbaren strukturellen Veränderungen der Ausgangssituation (Abb. 18). Durch die Mineralanlagerung im tiefen Läsionsbereich des LK kam es bei den Proben in den Lösungen B2, 4 und 5 zu einer Abnahme der Läsionstiefe. Dabei blieb die OS unverändert und der strukturelle Grundaufbau der initialen Läsion erhalten (Abb. 18). Diese in der Tiefe festgestellte Mineralanlagerung war in Lösung 5 am ausgeprägtesten. Die Lösungen B1, 6, 7, und 8 führten zu einem höheren Mineralgewinn. Hier erfolgte vor allem eine Anlagerung des Minerals in der Tiefe des LK. Ein geringer Zuwachs fand auch im Bereich der OS statt (Abb. 18). Besonders deutlich waren die Veränderungen an den Proben, die in den Lösung 7 und B1 lagerten, erkennbar. In diesen Fällen ist der LK zum Großteil mit Mineral gefüllt und der Mineralgehalt in der OS hatte leicht zugenommen (Abb. 18).

Die Mittelwertgraphen der Bereiche „Effektbereich 5“ der Proben nach der fünföchigen Lagerung in den Lösungen zeigten weitere Strukturveränderungen. Die Lösung 1

verursachte nach wie vor einen Mineralverlust, wobei sich die Grundform der Läsion nicht veränderte und die Läsionstiefe zunahm. Die Lösung 2 führte zu einem Mineralverlust im Bereich des LK und der OS (Abb. 19). Im Gegensatz zur zweiwöchigen Lagerung zeigten die Proben in Lösung 3 nach fünf Wochen bei einer verringerten Läsionstiefe einen deutlichen Mineralgewinn vor allem im tiefen Bereich des LK und teilweise in der OS (Abb. 19). Die Lösungen 4 und B2 bewirkten ebenfalls einen erneuten Mineralgewinn, wodurch sich die Läsionstiefe weiterhin verringerte (Abb. 19). Das Mineralisationsmuster der Proben glich dem von Lösung 3. Dieser Effekt war bei Lösung B2 nicht ganz so stark ausgeprägt (Abb. 19). Ebenfalls zu einem Mineralzuwachs führten die Lösungen 5, 6 und 8 (Abb. 19). Auch hier fand eine Auffüllung des Defektes in der Tiefe der Läsion statt. Die pseudointakte Oberflächenschicht konnte dabei in allen drei Lösungen einen Zuwachs verzeichnen. Die höchste Mineralanlagerung wurde mit den Lösungen 7 und B1 erreicht. Hier ist die ursprüngliche Struktur der Ausgangsläsion nicht mehr erkennbar (Abb. 19). Der LK ist fast vollständig gefüllt und eine OS ist nicht mehr erkennbar. Bezüglich des Verteilungsmusters des Mineralen in den Läsionen der Proben in Lösung B1 fällt auf, dass, im Gegensatz zu den Proben in den wässrigen Lösungen, ein geringerer Mineralgewinn in der Tiefe stattgefunden hatte.



**Abb. 18** Mittelwertgraphen aller Probenbereiche „Effektbereich 2“ nach zweiwöchiger Lagerung in den jeweiligen Lösungen.



**Abb. 19** Mittelwertgraphen aller Probenbereiche „Effektbereich 5“ nach fünfwöchiger Lagerung in den jeweiligen Lösungen.

## 5.5 Quantitative Auswertung der Dentinproben

Alle errechneten Messgrößen (siehe Abschnitt 5.5 „Quantitative Auswertung der Dentinproben“) der einzelnen Proben in den jeweiligen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $p > 0,05$ ; Kolmogorow-Smirnov-Test).

### 5.5.1 Mineralverlust der Dentinproben

Die 180 Dentinproben unterschieden sich in ihrem Mineralverlust nach der Demineralisation ( $\Delta Z_{\text{Demin}}$ ) nicht signifikant ( $p = 0,998$ ; ANOVA) voneinander. Der Mittelwert des  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  Wertes betrug 4101 Vol.% bei einem 95 %-Konfidenzintervall von 4021 - 4180. Die gemessenen Werte aller Mineralverluste und ihre zugehörigen Konfidenzintervalle nach der Demineralisation (Ausgangswerte) sowie einer zwei- ( $\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$ ) und fünfwöchigen ( $\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$ ) Lagerung in den jeweiligen Lösungen sind in den Tabellen XVIII, XIX und XX zusammengefasst.

### Mineralverlust der gesamten Läsion

Die  $\Delta Z_{\text{Effekt 2+5}}$  Werte aller Probengruppen unterschieden sich signifikant von dem jeweiligen  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  Wert ( $p < 0,05$ ;  $t$ -Test bei gepaarten Stichproben; Tab. XVIII). Im

Vergleich zu dem zugehörigen  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  Wert führten die Lösungen 1 und 2 zu einer signifikanten Zunahme von  $\Delta Z_{\text{Effekt 2+5}}$  ( $p < 0,05$ ), wohingegen die Lösungen 3 bis 8, B1 und B2 zu einer signifikanten Reduktion von  $\Delta Z_{\text{Effekt 2+5}}$  der Proben führten ( $p < 0,05$ ; Tab. XVIII).

**Tabelle XVIII:** Mittelwerte und Konfidenzintervalle der Mineralverluste ( $\text{Vol}\% \times \mu\text{m}$ ) nach Demineralisation ( $\Delta Z_{\text{Demin}}$ ) und Lagerung in den einzelnen Lösungen nach zwei ( $\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$ ) und fünf ( $\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$ ) Wochen

Mineralverlust Dentin ( $\text{Vol}\% \times \mu\text{m}$ )								
Lsg.	$\Delta Z_{\text{Demin}}$		$\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$		$\Delta Z_{\text{Demin}} / \Delta Z_{\text{Effekt 2}}$	$\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$		$\Delta Z_{\text{Demin}} / \Delta Z_{\text{Effekt 5}}$
	MW	KI 95 %	MW	KI 95 %	p	MW	KI 95 %	p
1	4173	3931;4416	5133	4868;5398	<0,001	6923	6585;7261	<0,001
2	4141	3828;4453	4419	4090;4747	0,009	4812	4497;5127	<0,001
3	4082	3809;4353	3733	3417;4048	0,002	3285	2900;3670	<0,001
4	4035	3885;4184	2561	2335;2787	<0,001	1865	1683;2047	<0,001
5	4158	3880;4437	2471	2266;2676	<0,001	1592	1438;1745	<0,001
6	4122	3826;4419	2158	1962;2354	<0,001	1438	1259;1617	<0,001
7	4016	3721;4312	2159	1961;2356	<0,001	1254	1099;1409	<0,001
8	4114	3759;4470	2295	2117;2473	<0,001	1378	1183;1573	<0,001
B1	4062	3806;4318	2346	2152;2540	<0,001	1717	1484;1950	<0,001
B2	4102	3853;4350	2818	2532;3104	<0,001	2064	1843;2285	<0,001

Signifikante Unterschiede zwischen  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  und  $\Delta Z_{\text{Effekt 2+5}}$  sind mit p-Werten ( $p < 0,05$ ; t-Test bei gepaarten Stichproben) gekennzeichnet; MW = Mittelwert; KI = Konfidenzintervall; Lsg. = Lösung

#### Mineralverlust des äußeren Läsionsanteiles

Wird nur der Mineralverlust der äußeren 25  $\mu\text{m}$  (KI 24; 26;  $p = 0,224$ ; ANOVA) der Läsionen betrachtet, fällt auf, dass sich bis auf die Gruppe 3 alle übrigen Probengruppen bezüglich der  $\Delta Z_{\text{Effekt 2+5}}$  Werte signifikant von dem korrespondierenden  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  Wert unterscheiden ( $p < 0,05$ ; t-Test bei gepaarten Stichproben; Tab. XIX). Die Proben, die in der Lösung 3 gelagert waren, wiesen im Vergleich zum Ausgangswert, eine signifikante Reduktion des  $\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$  Wertes auf ( $p = 0,009$ ; Tab. XIX). Nach einer weiteren Lagerung von 21 Tagen in der gleichen Lösung war jedoch kein signifikanter

Unterschied zum Ausgangswert erkennbar ( $p = 0,299$ ; Tab. XIX). Die Lösungen 1 und 2 verursachten gegenüber den jeweiligen  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  Werten eine signifikante Zunahme von  $\Delta Z_{\text{Effekt } 2+5}$  ( $p < 0,05$ ; Tab. XIX). Die Lösungen 4 bis 8, B1 und B2 führten, verglichen mit ihren  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  Werten, zu einer signifikanten Abnahme von  $\Delta Z_{\text{Effekt } 2+5}$  ( $p < 0,05$ ; Tab. XIX).

**Tabelle XIX:** Mittelwerte und Konfidenzintervalle der Mineralverluste (Vol%  $\times$   $\mu\text{m}$ ) der äußeren Läsionsanteile nach Demineralisation ( $\Delta Z_{\text{Demin}}$ ) und Lagerung in den einzelnen Lösungen nach zwei ( $\Delta Z_{\text{Effekt } 2}$ ) und fünf ( $\Delta Z_{\text{Effekt } 5}$ ) Wochen

Mineralverlust äußerer Läsionsanteil Dentin (Vol% $\times$ $\mu\text{m}$ )									
Lsg.	$\Delta Z_{\text{Demin}}$			$\Delta Z_{\text{Effekt } 2}$			$\Delta Z_{\text{Effekt } 5}$		
	MW	KI 95 %		MW	KI 95 %	p	MW	KI 95 %	P
1	579	475;682		995	853;1136	<0,001	1102	951;1253	<0,001
2	602	491;713		677	556;799	<0,001	796	657;934	<0,001
3	594	473;715		552	433;671	0,009	577	452;702	0,299
4	497	415;579		296	225;367	<0,001	260	192;327	<0,001
5	569	461;676		249	185;313	<0,001	228	176;280	<0,001
6	549	484;614		156	110;202	<0,001	187	146;227	<0,001
7	587	476;699		197	126;267	<0,001	130	87;173	<0,001
8	590	492;687		183	130;235	<0,001	139	89;188	<0,001
B1	547	455;639		142	94;189	<0,001	178	126;230	<0,001
B2	504	391;616		436	327;544	<0,001	394	302;486	<0,001

Signifikante Unterschiede zwischen  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  und  $\Delta Z_{\text{Effekt } 2+5}$  sind mit p-Werten ( $p < 0,05$ ; t-Test bei gepaarten Stichproben) gekennzeichnet; MW = Mittelwert; KI = Konfidenzintervall; Lsg. = Lösung

#### Mineralverlust des inneren Läsionsanteiles

Der  $\Delta Z_{\text{Effekt } 2+5}$  Wert des inneren Läsionsbereiches jeder Probengruppe (von 25  $\mu\text{m}$  bis 174  $\mu\text{m}$ ; KI 171; 177;  $p = 0,923$ ; ANOVA) unterschied sich signifikant von dem zugehörigen  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  Wert ( $p \leq 0,05$ ; t-Test bei gepaarten Stichproben; Tab. XX). Die Lösungen 1 und 2 verursachten im Vergleich zum  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  Wert eine signifikante Zunahme von  $\Delta Z_{\text{Effekt } 2+5}$  ( $p \leq 0,05$ ; Tab. XX), wohingegen die Lösungen 3 bis 8, B1 und B2 zu einer signifikanten Reduktion von  $\Delta Z_{\text{Effekt } 2+5}$  gegenüber dem  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  Wert führten ( $p < 0,05$ ; Tab. XX).

**Tabelle XX:** Mittelwerte und Konfidenzintervalle der Mineralverluste (Vol% × µm) der inneren Läsionsanteile nach Demineralisation ( $\Delta Z_{\text{Demin}}$ ) und Lagerung in den einzelnen Lösungen nach zwei ( $\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$ ) und fünf ( $\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$ ) Wochen

Mineralverlust innerer Läsionsanteil Dentin (Vol% × µm)								
Lsg.	$\Delta Z_{\text{Demin}}$		$\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$		$\Delta Z_{\text{Demin}}/$ $\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$	$\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$		$\Delta Z_{\text{Demin}}/$ $\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$
	MW	KI 95 %	MW	KI 95 %	p	MW	KI 95 %	P
1	3595	3409;3780	4138	3848;4428	0,001	5821	5509;6132	<0,001
2	3539	3291;3786	3741	3444;4038	0,050	4017	3701;4333	0,007
3	3488	3285;3691	3181	2907;3454	0,004	2708	2353;3063	<0,001
4	3537	3393;3681	2265	2062;2469	<0,001	1606	1449;1762	<0,001
5	3587	3379;3799	2222	2041;2403	<0,001	1363	1212;1515	<0,001
6	3573	3304;3843	2002	1836;2168	<0,001	1252	1088;1415	<0,001
7	3429	3182;3676	1962	1793;2131	<0,001	1124	983;1266	<0,001
8	3525	3247;3803	2112	1971;2253	<0,001	1239	1080;1399	<0,001
B1	3515	3302;3728	2204	2020;2388	<0,001	1539	1340;1738	<0,001
B2	3598	3417;3780	2382	2142;2623	<0,001	1670	1470;1870	<0,001

Signifikante Unterschiede zwischen  $\Delta Z_{\text{Demin}}$  und  $\Delta Z_{\text{Effekt 2 + 5}}$  sind mit p-Werten ( $p \leq 0,05$ ; t-Test bei gepaarten Stichproben) gekennzeichnet; MW = Mittelwert; KI = Konfidenzintervall; Lsg. = Lösung

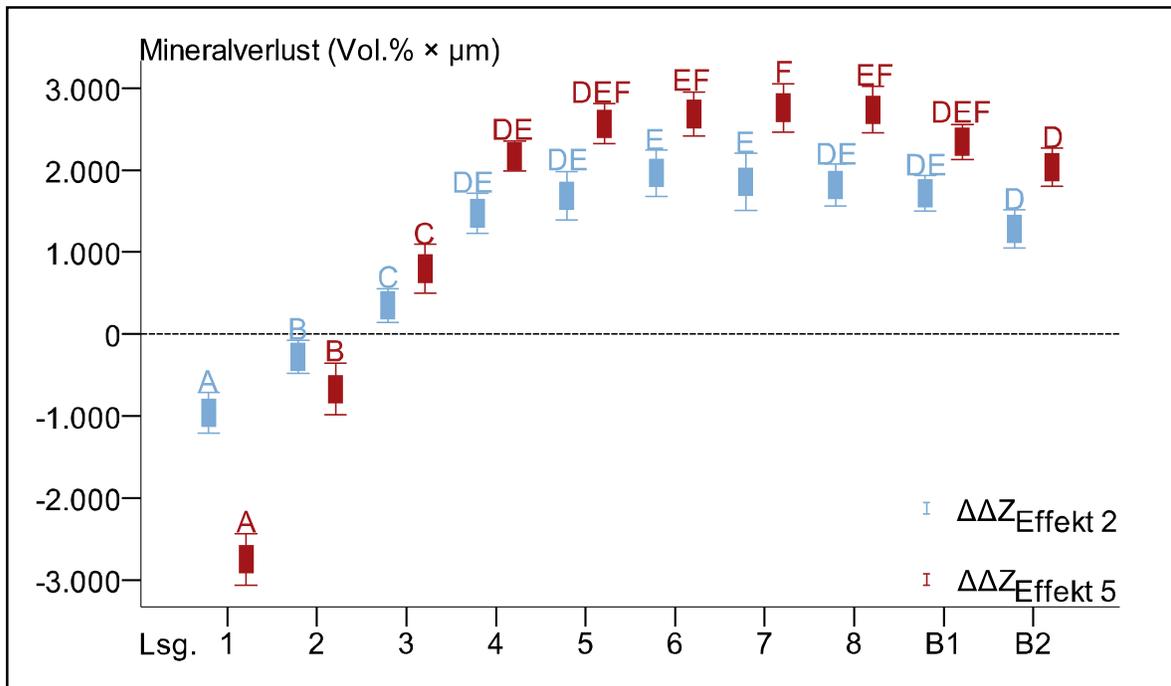
### 5.5.2 Veränderung des Mineralgehaltes der Dentinproben

Der absolute Mineralverlust ( $\Delta Z_{\text{Effekt}}$ ) der Dentinproben wurde nach ihrer zwei- ( $\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$ ) und fünfwoöchigen ( $\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$ ) Lagerung in den unterschiedlichen Lösungen miteinander verglichen.

#### Veränderung des Mineralgehaltes der gesamten Läsion

Die in der Lösung 1 gelagerten Dentinproben wiesen eine signifikante Zunahme von  $\Delta Z_{\text{Effekt 2 + 5}}$  gegenüber dem  $\Delta Z_{\text{Effekt 2 + 5}}$  Wert der Proben aus der Lösung 2 auf ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Tukey Post-hoc-Test; Abb. 20). Die Lösung 3 bewirkte im Vergleich zu den Lösungen 1 und 2 eine signifikante Abnahme von  $\Delta Z_{\text{Effekt 2 + 5}}$  ( $p < 0,05$ ; Abb. 20). Im Unterschied dazu führten die restlichen Lösungen zu einer signifikant höheren Reduktion von  $\Delta Z_{\text{Effekt 2 + 5}}$  ( $p < 0,05$ ; Abb. 20). Eine signifikant geringere Abnahme von  $\Delta Z_{\text{Effekt 2 + 5}}$  bei den in den Lösungen 4, 5 und B2 gelagerten Proben wurde jedoch gegenüber den Proben in Lösung 6, 7, 8 und B1 festgestellt ( $p < 0,05$ ;

Abb. 20). Die deutlichste Verringerung des  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$  Wertes wurde bei den Proben in den Lösungen 6 und 7, nach fünf Wochen bei denen in Lösung 7 beobachtet (Abb. 20).

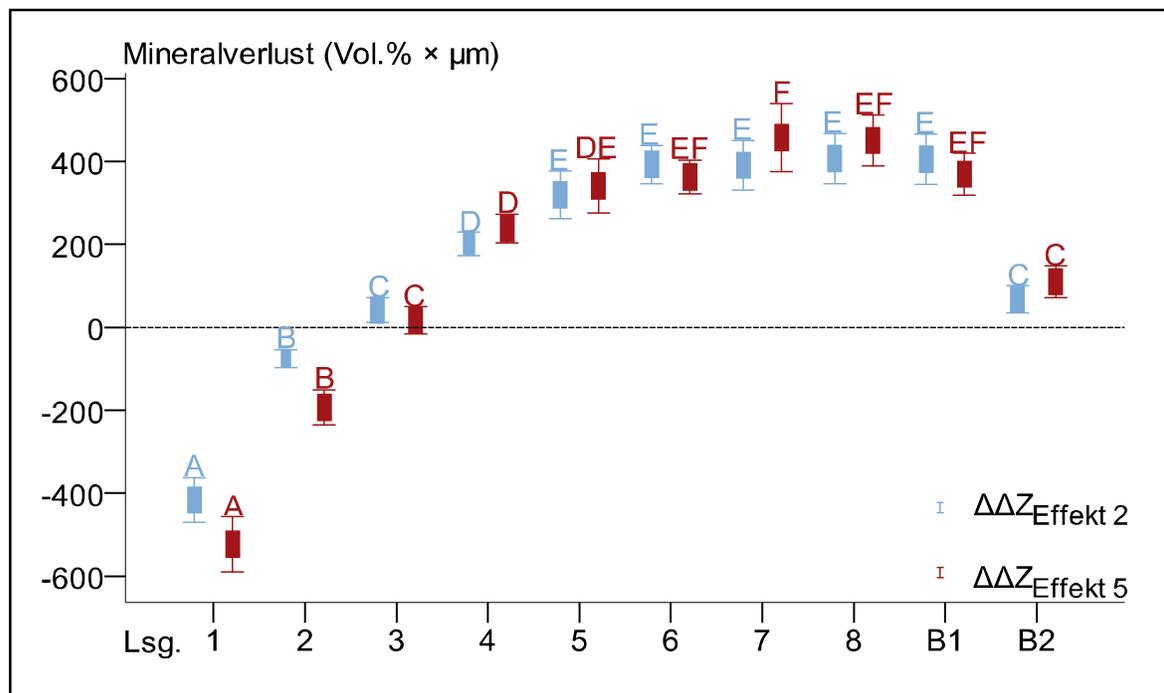


**Abb. 20** Absoluter Mineralverlust ( $\Delta\Delta Z$ , Vol.% ×  $\mu\text{m}$ ) nach der zwei- ( $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$ ) und fünföchigen ( $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$ ) Lagerung der demineralisierten Dentinproben in den einzelnen Lösungen. Negative Werte stehen für eine Zunahme des Mineralverlustes, positive Werte für eine Abnahme. Gruppen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Tukey Post-hoc-Test).

#### Veränderung des Mineralgehaltes des äußeren Läsionsanteiles

Werden die Veränderungen des Mineralgehaltes der äußeren 25  $\mu\text{m}$  der Läsion analysiert, fällt auf, dass die Lösungen 1 und 2 zu einer signifikant unterschiedlichen Zunahme von  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2+5}}$  führten. Dabei ist der Anstieg des  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2+5}}$  Wertes der Lösung 1 signifikant höher als jener der Lösung 2 ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Tukey Post-hoc-Test; Abb. 21). Im Vergleich dazu bewirken die restlichen Lösungen eine signifikante Abnahme von  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2+5}}$  ( $p < 0,05$ ; Abb. 21). Die Reduktion von  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2+5}}$  der Proben in Lösung 3 und B2 war signifikant geringer als die der in Lösung 4 gelagerten Proben ( $p < 0,05$ ; Abb. 21). Gegenüber dem  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$  Wert der Lösung 4 konnten die Lösungen 5 bis 8 und B1 eine signifikant höhere Abnahme der  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$  Werte bewirken. Nach einer fünföchigen Lagerung der Proben führten die Lösungen 6, 7, 8

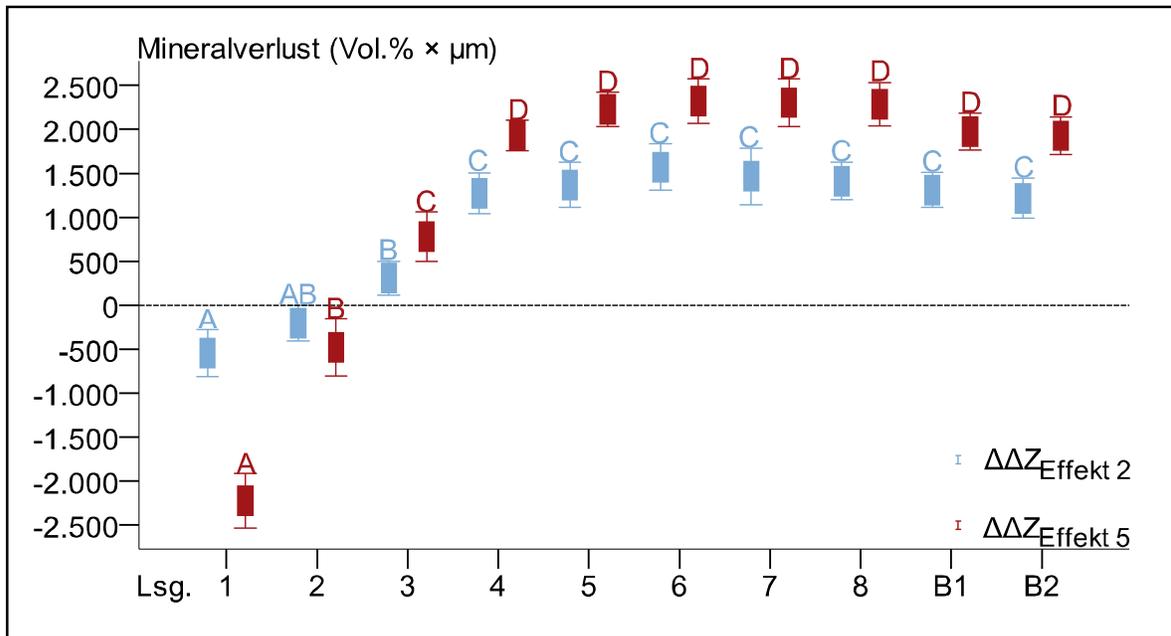
und B1 zu einer signifikant höheren Abnahme von  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt}}$  als die Lösungen 4 und 5 ( $p < 0,05$ ; Abb. 21).



**Abb. 21** Absoluter Mineralverlust des äußeren Läsionsanteiles ( $\Delta\Delta Z$ , Vol.% × µm) nach der zwei- ( $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$ ) und fünfwöchigen ( $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$ ) Lagerung der demineralisierten Dentinproben in den einzelnen Lösungen. Negative Werte stehen für eine Zunahme des Mineralverlustes, positive Werte für eine Abnahme. Gruppen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Tukey Post-hoc-Test).

#### Veränderung des Mineralgehaltes des inneren Läsionsanteiles

Die Lösung 1 verursachte im inneren Läsionsteil der Proben eine signifikante Zunahme des  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2 + 5}}$  Wertes gegenüber der Lösung 2 ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Tukey Post-hoc-Test; Abb. 22). Der  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$  Wert der in Lösung 3 gelagerten Proben unterschied sich nicht signifikant von dem  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$  Wert der Proben in Lösung 2 ( $p > 0,05$ ; Abb. 22), wohingegen der  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$  Wert dieser Proben im Vergleich zum  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$  Wert der Proben in Lösung 2 signifikant abnahm ( $p < 0,05$ ; Abb. 22). Die Lösungen 4 bis 8, B1 und B2 führten zu einer signifikanten Reduktion von  $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2 + 5}}$  ( $p < 0,05$ ; Abb. 22).



**Abb. 22** Absoluter Mineralverlust des inneren Läsionsanteiles ( $\Delta\Delta Z$ , Vol.%  $\times$   $\mu\text{m}$ ) nach der zwei- ( $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 2}}$ ) und fünfwöchigen ( $\Delta\Delta Z_{\text{Effekt 5}}$ ) Lagerung der demineralisierten Dentinproben in den einzelnen Lösungen. Negative Werte stehen für eine Zunahme des Mineralverlustes, positive Werte für eine Abnahme. Gruppen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Tukey Post-hoc-Test).

### 5.5.3 Läsionstiefe der Dentinproben

Die Läsionstiefen nach der Demineralisation ( $LT_{\text{Demin}}$ ) aller 180 Dentinproben unterschieden sich nicht signifikant ( $p = 0,923$ ; ANOVA) voneinander. Der Mittelwert des  $LT_{\text{Demin}}$  Wertes betrug  $174 \mu\text{m}$  bei einem 95 %-Konfidenzintervall von  $171 - 177$ . Alle Messwerte der Läsionstiefen und ihre zugehörigen Konfidenzintervalle der Demineralisation (Ausgangswerte), nach zwei- ( $LT_{\text{Effekt 2}}$ ) und fünfwöchiger ( $LT_{\text{Effekt 5}}$ ) Lagerung der Proben in den Lösungen, sind in der Tabelle XXI dargestellt.

Die in der Lösung 1 gelagerten Dentinproben zeigten keine signifikante Veränderung ihres  $LT_{\text{Effekt 2}}$  Wertes zum  $LT_{\text{Demin}}$  Wert ( $p = 0,865$ ;  $t$ -Test bei gepaarten Stichproben; Tab. XXI). Der  $LT_{\text{Effekt 5}}$  Wert hatte jedoch im Vergleich zum Ausgangswert signifikant zugenommen ( $p < 0,001$ ; Tab. XXI). Die Lösung 2 führte zu keinem signifikanten Unterschied zwischen dem  $LT_{\text{Demin}}$  Wert und dem  $LT_{\text{Effekt 2 + 5}}$  Wert ( $p > 0,05$ ; Tab. XXI). Zwischen dem  $LT_{\text{Demin}}$  Wert und dem  $LT_{\text{Effekt 2}}$  Wert der Proben in Lösung 3 bestand kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,459$ ; Tab. XXI), jedoch fand eine signifikante Reduktion von  $LT_{\text{Effekt 5}}$  gegenüber dem Ausgangswert statt ( $p = 0,006$ ; Tab. XXI). Die übrigen Dentingruppen (4 bis 8, B1, B2) zeigten nach der Lagerung in den jeweiligen Lösungen

eine signifikante Abnahme von  $LT_{\text{Effekt } 2 + 5}$  im Vergleich zum jeweiligen  $LT_{\text{Demin}}$  Wert ( $p < 0,05$ ; Tab. XXI).

**Tabelle XXI:** Mittelwerte und Konfidenzintervalle der Läsionstiefen ( $\mu\text{m}$ ) nach Demineralisation ( $LT_{\text{Demin}}$ ) und Lagerung in den einzelnen Lösungen nach zwei ( $LT_{\text{Effekt } 2}$ ) und fünf ( $LT_{\text{Effekt } 5}$ ) Wochen

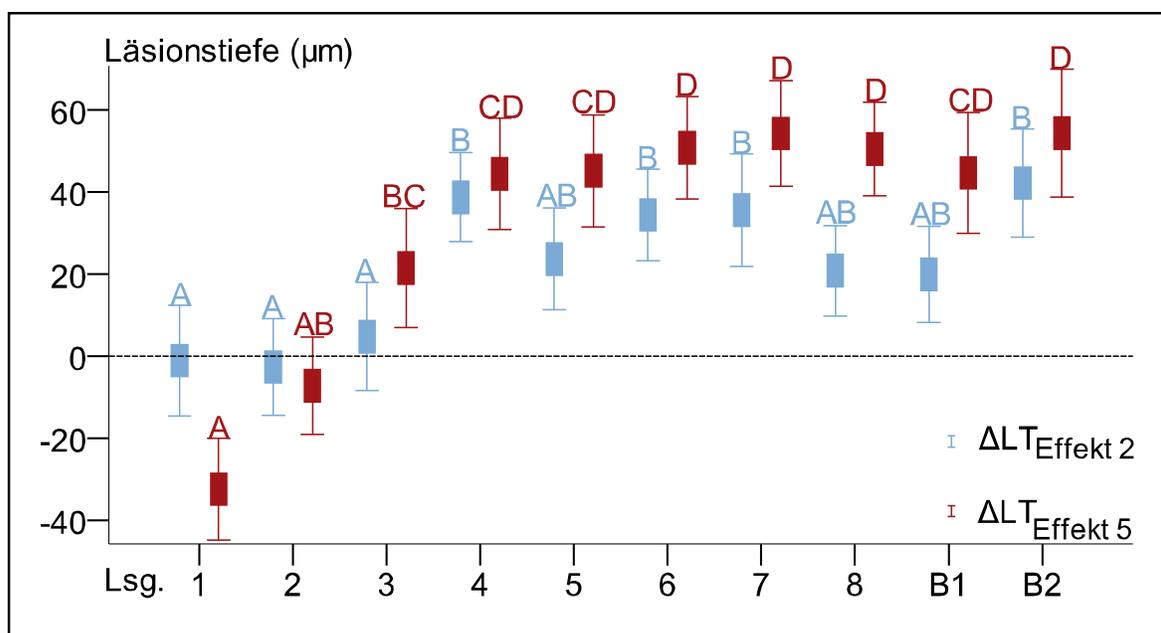
Lsg.	Läsionstiefe Dentin ( $\mu\text{m}$ )							
	$LT_{\text{Demin}}$		$LT_{\text{Effekt } 2}$		$LT_{\text{Demin}}/$ $LT_{\text{Effekt } 2}$	$LT_{\text{Effekt } 5}$		$LT_{\text{Demin}}/$ $LT_{\text{Effekt } 5}$
	MW	KI 95 %	MW	KI 95 %	p	MW	KI 95 %	P
1	174	166;183	176	163;188	0,865	207	197;217	<0,001
2	171	159;182	173	164;183	0,640	178	167;189	0,219
3	169	159;179	164	152;176	0,459	148	133;163	0,006
4	176	167;184	137	131;143	<0,001	131	123;139	<0,001
5	174	162;185	150	141;159	0,001	129	120;137	<0,001
6	173	162;183	138	133;143	<0,001	122	114;129	<0,001
7	177	166;189	142	133;151	<0,001	123	112;134	<0,001
8	177	166;188	156	148;164	0,001	127	119;134	<0,001
B1	171	159;183	151	141;160	0,002	126	119;133	<0,001
B2	179	170;189	137	127;147	<0,001	125	114;135	<0,001

Signifikante Unterschiede zwischen  $LT_{\text{Demin}}$  und  $LT_{\text{Effekt } 2 + 5}$  sind mit p-Werten ( $p < 0,05$ ; t-Test bei gepaarten Stichproben) gekennzeichnet; MW = Mittelwert; KI = Konfidenzintervall; Lsg. = Lösung

#### 5.5.4 Veränderung der Läsionstiefe der Dentinproben

Die Läsionstiefe ( $\Delta LT_{\text{Effekt}}$ ) der Dentinproben wurde nach ihrer zwei- ( $\Delta LT_{\text{Effekt } 2}$ ) und fünfwoöchigen ( $\Delta LT_{\text{Effekt } 5}$ ) Lagerung in den unterschiedlichen Lösungen miteinander verglichen.

Die Reduktion von  $\Delta LT_{\text{Effekt } 2}$  der Proben in den Lösungen 4 bis 8, B1 und B2 war signifikant höher als die der Proben in den Lösungen 1 bis 3 ( $p < 0,05$ ; Abb. 23). Die Lösungen 1 und 2 führten zu einer signifikanten Zunahme von  $\Delta LT_{\text{Effekt } 5}$ , wobei die restlichen Lösungen eine signifikante Abnahme von  $\Delta LT_{\text{Effekt } 5}$  bewirkten ( $p < 0,05$ ; Abb. 23). Die Reduktion von  $\Delta LT_{\text{Effekt } 5}$  der Proben in Lösungen 6, 7, 8 und B2 war signifikant höher als bei den Proben in den Lösungen 3, 4, 5 und B1 ( $p < 0,05$ ; Abb. 23).

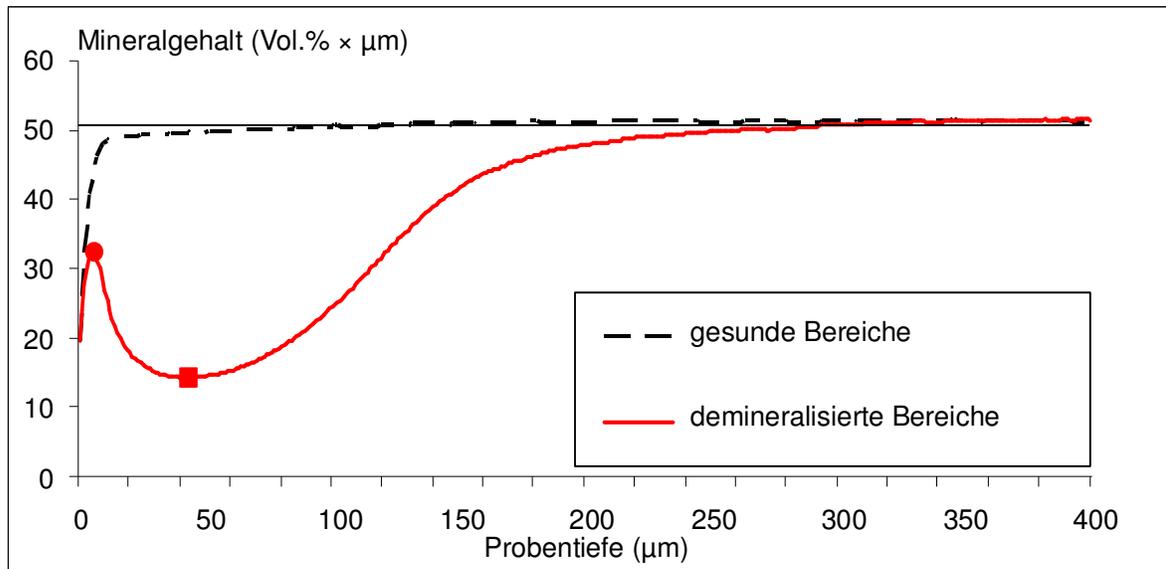


**Abb. 23** Absolute Läsionstiefe ( $\Delta LT$ ,  $\mu m$ ) nach der zwei- ( $\Delta LT_{\text{Effekt 2}}$ ) und fünfwoöchigen ( $\Delta LT_{\text{Effekt 5}}$ ) Lagerung der demineralisierten Dentinproben in den einzelnen Lösungen. Negative Werte stehen für eine Zunahme der Läsionstiefe, positive Werte für eine Abnahme. Gruppen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Tukey Post-hoc-Test).

## 5.6 Qualitative Auswertung der Dentinproben

### 5.6.1 Struktureller Aufbau der Dentinläsionen

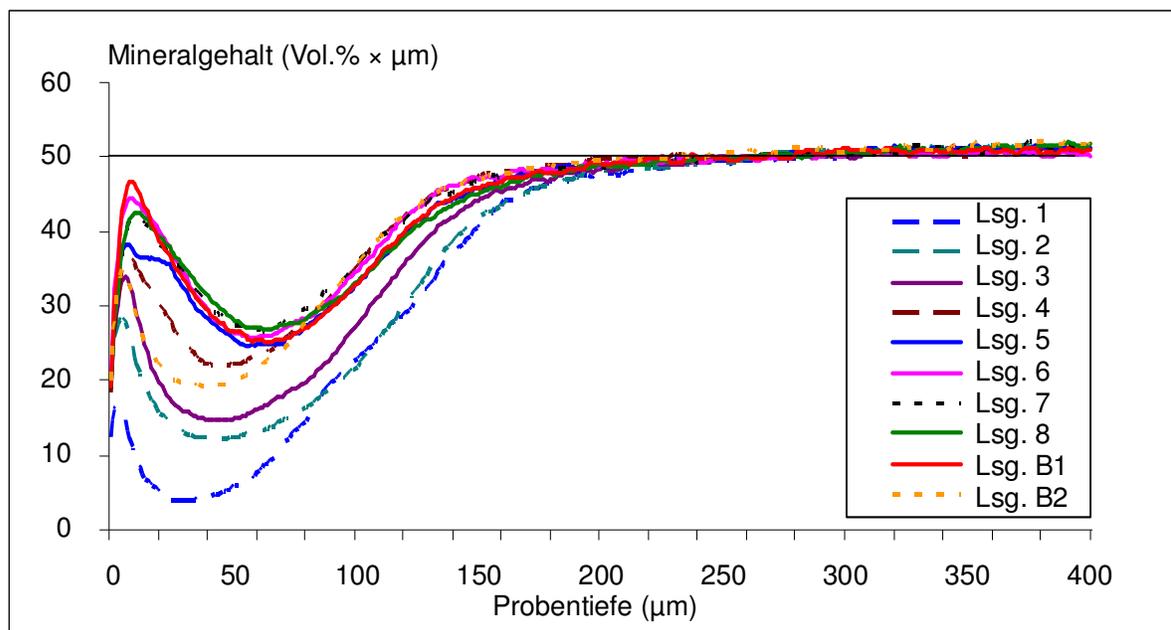
Der Mittelwertgraph, der die gesunden Bereiche der Dentinproben darstellt, zeigt einen geringen Mineralverlust der Dentinoberfläche. Dieser wurde auf projektionsbedingte Fehler zurückgeführt (Abb. 24). Der Mittelwertgraph hat nach einer sechstägigen Demineralisation der Proben das typische Aussehen einer initialen Läsion mit einer OS und einem LK (Abb. 24). Der Mineralgehalt der Läsion im Graphen der Demineralisation steigt beginnend von der Dentinoberfläche bis zu seinem Höchstwert innerhalb der OS an (Abb. 24, roter Kreis). Anschließend sinkt der Mineralgehalt mit zunehmender Läsionstiefe zu seinem im LK befindlichen Minimum ab (Abb. 24, rotes Quadrat). Von diesem Punkt aus nimmt der Mineralgehalt bis zum gesunden Dentin stetig zu. Bezüglich der genauen Messwerte der  $\Delta Z_{\text{Demin}}$ ,  $\Delta Z_{\text{Effekt 2 + 5}}$ ,  $LT_{\text{Demin}}$  sowie  $LT_{\text{Effekt 2 + 5}}$  und ihre zugehörigen Konfidenzintervalle wird auf die Abschnitte 5.5.1 „Mineralverlust der Dentinproben“ und 5.5.3 „Läsionstiefe der Dentinproben“ verwiesen.



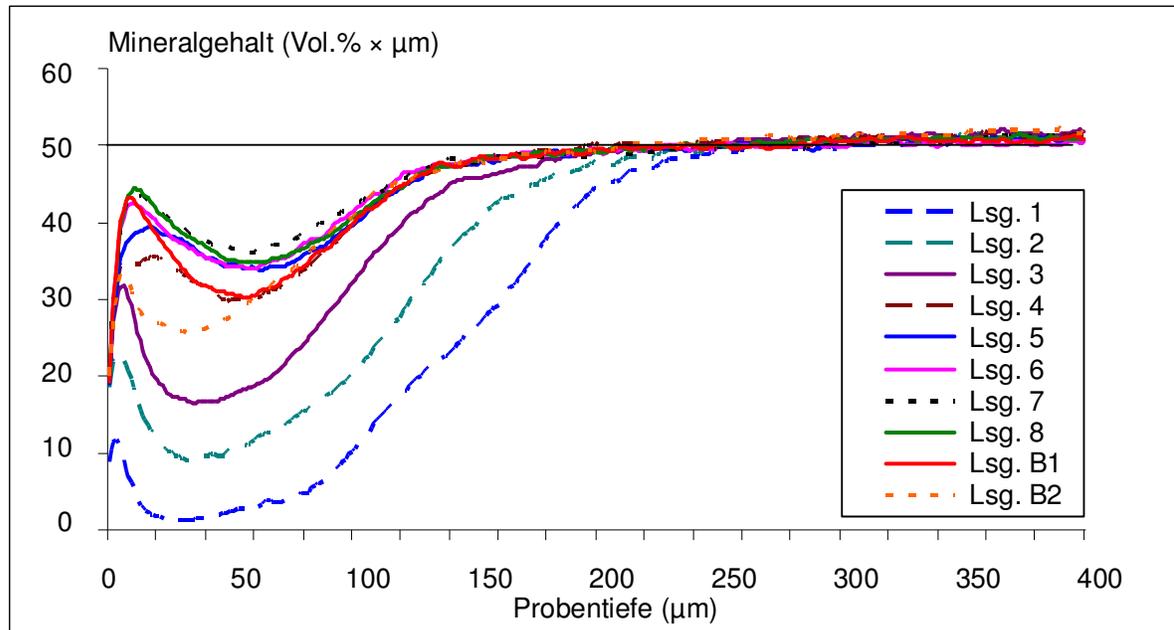
**Abb. 24** Mittelwertgraphen aller gesunden und demineralisierten Probenbereiche. Der rote Punkt stellt den Bereich des höchsten Mineralgehaltes in der Läsion dar, das rote Quadrat den geringsten Mineralgehalt der Läsion.

Die Mittelwertgraphen, die von den Messwerten aller Probenbereiche „Effektbereich 2“ erstellt wurden, zeigten, dass nach der zweiwöchigen Lagerung der Proben in den jeweiligen Lösungen strukturelle Veränderungen der initialen Läsionen stattgefunden haben. Die Lösungen 1 und 2 verursachten einen weiteren Mineralverlust. Hierbei vergrößerte sich der LK und die OS verlor an Höhe. Die Läsionstiefe blieb allerdings unverändert (Abb. 25). Dieser Mineralverlust war bei der Lösung 1 ausgeprägter als bei der Lösung 2. Die Lösung 3 führte zu einer geringen Mineralisation in der Tiefe der Läsion. Das Aussehen der initialen Läsion änderte sich in diesem Fall wenig und die Läsionstiefe blieb erhalten (Abb. 25). Durch die Mineralanlagerung im Bereich des geringsten Mineralgehaltes im LK kam es bei den Proben in den Lösungen B2 und 4 zu einer Verkleinerung der Läsion (Abb. 25). Zusätzlich nahm die Läsionstiefe ab und die OS gewann an Höhe. Diese Strukturveränderungen waren bei den Proben der Lösung 4 größer als bei denen in Lösung B2. Die Lösungen 5, 6, 7, 8 und B1 bewirkten eine noch höhere Mineralisation. Das Muster der Mineralanlagerung ähnelte dem der Proben der Lösungen 4 und B2 (Abb. 25). Die OS verzeichnete vor allem bei den Proben in den Lösungen 6, 7, 8 und B1 einen erheblichen Mineralzugewinn. Besonders deutlich erkennbar ist diese Zunahme an den Proben, die in Lösungen B1 gelagert waren. Die OS reicht hier fast bis zum gesunden Bereich (Abb. 24; Abb. 25). Der strukturelle Grundaufbau der initialen Läsion blieb bei allen Proben erhalten.

Die Mittelwertgraphen der Bereiche „Effektbereich 5“ der Proben zeigten weitere Strukturveränderungen. Die Lösungen 1 und 2 verursachten nach wie vor einen Mineralverlust, wobei sich das Aussehen der Läsion nicht veränderte (Abb. 26). Die Läsionstiefe der Proben in Lösung 1 nahm zu. Nach fünf Wochen hatte eine geringe Mineralanlagerung im LK der Läsionen der Proben in Lösung 3 stattgefunden und sich die Läsionstiefe verringert (Abb. 26). Die Lösungen 4 und B2 führten zu einer deutlichen Auffüllung des LK und die Läsionstiefe verkleinerte sich im Vergleich zur zweiwöchigen Lagerung (Abb. 26). Dieser Effekt war bei der Lösung B2 nicht ganz so stark ausgeprägt. Auch die OS konnte in beiden Lösungen einen geringen Zuwachs verzeichnen. Die Proben der Lösung 5 glichen vom Mineralisationsmuster denen von Lösung 4 und B2. Allerdings wurde in diesem Fall mehr Mineral angelagert (Abb. 26). Den größten Mineralgewinn bewirkten die Lösungen 6, 7, 8 und B1 (Abb. 26). Auch hier ging die Auffüllung des Defektes vom Bereich mit dem geringsten Mineralgehalt des LK aus. Die OS der Läsionen verzeichneten, im Vergleich zu der Lagerung nach zwei Wochen in den Lösungen B1 und 6, einen deutlichen Mineralverlust. Ihr Niveau war dem von den Lösungen 7 und 8 ähnlich, wobei sich dieses in den weiteren 21 Tagen der Lagerung nicht verändert hatte (Abb. 26). Auch nach fünf Wochen blieb der strukturelle Grundaufbau der initialen Läsion bei allen Proben erhalten.



**Abb. 25** Mittelwertgraphen aller Probenbereiche „Effektbereich 2“ nach zweiwöchiger Lagerung in den jeweiligen Lösungen.



**Abb. 26** Mittelwertgraphen aller Probenbereiche „Effektbereich 5“ nach fünfwöchiger Lagerung in den jeweiligen Lösungen.

## 6 Diskussion

### 6.1 Diskussion von Material und Methode

#### 6.1.1 Bovine Zahnhartsubstanzen

In der vorliegenden Studie wurden Schmelz- und Dentinproben von bleibenden Rinderfrontzähnen verwendet. Aufgrund deren ausreichender Verfügbarkeit und Größe eignen sie sich sehr gut für die Herstellung von vergleichbaren Proben in den jeweilig erforderlichen Dimensionen. Zudem sind die chemische Zusammensetzung (Kalzium, Phosphat und Magnesium) sowie Dichte und Härte von bovinen Zähnen ähnlich der von menschlichen Zähnen [Esser *et al.* 1998]. Angesichts dieser Eigenschaften werden bei In-vitro-Untersuchungen häufig Rinderzähne als Ersatz von humanen Zähnen eingesetzt [Ten Cate *et al.* 1978; Hara *et al.* 2008; Kielbassa *et al.* 2001]. Bei der Verwendung von bovinen Zähnen muss allerdings beachtet werden, dass diese auch Unterschiede zu denen des Menschen aufweisen. So ist beispielsweise die Zahnhartsubstanz von Rinderzähnen poröser als die von menschlichen Zähnen. Die damit einhergehende höhere Diffusionsrate begünstigt eine schnellere Ausbildung von kariösen Läsionen [Featherstone *et al.* 1981]. Des Weiteren bestehen strukturelle Abweichungen in der Größe der Apatitkristalle und interprismatischen Substanz [Oesterle *et al.* 1998].

#### 6.1.2 Vorbereitung der Proben

Um eine größtmögliche Vergleichbarkeit der Zahnhartsubstanzen zu gewährleisten, wurden alle 180 Schmelzproben aus den Labialflächen sowie die 180 Dentinproben aus dem zervikalen Wurzelbereich der Rinderfrontzähne gewonnen. Die weitere Bearbeitung der Proben erfolgte in Anlehnung an frühere Studien. Sie wurden dementsprechend in Kunstharz eingebettet und die Oberflächen durch Parallelisierung und Politur mittels Schleifpapier aufsteigender Körnung homogenisiert [Tschoppe *et al.* 2007]. Durch die Entfernung der äußeren Zahnhartsubstanzschicht wurde eine Standardisierung der Oberfläche erreicht. Diese Vorbehandlung der Zahnoberfläche führte im Vergleich zu einer unbehandelten Probenoberfläche zu keinem wesentlichen Einfluss auf die Tiefe der anschließend künstlich erzeugten Läsionen [Featherstone *et al.* 1981]. Um kariesähnliche initiale Läsionen in den Proben zu erzeugen, wurden die Schmelzproben für 19 und die Dentinproben für sechs Tage einer jeweils spezifizierten Demineralisationslösung ausgesetzt [Buskes *et al.* 1985; Tschoppe *et al.* 2009]. Die mikroradiografische Auswertung der demineralisierten Bereiche aller Proben zeigte ein für initiale Läsionen charakteristisches Bild mit einer OS und einem LK. Da diese Charakteristika sowohl an natürlichen als auch an künstlich erzeugten initialen Läsionen

in zahlreichen Untersuchungen beobachtet wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die gewählten Methoden zur Demineralisation von Schmelz- und Dentinproben für die Belange der Untersuchung zielführend waren [Buskes *et al.* 1985; Arends *et al.* 1997; Fejerskov 2008].

### 6.1.3 Transversale Mikroradiografie

Zur quantitativen Analyse der De- und Remineralisationsvorgänge der Zahnhartsubstanzen wurde in dieser Studie die transversale Mikroradiografie gewählt, da sich diese bereits in zahlreichen Remineralisationsstudien bewährt hat [Buskes *et al.* 1985; Arends *et al.* 1997; Kawasaki *et al.* 2000; Fejerskov *et al.* 2008]. Die Messung des Mineralverlustes und der Läsionstiefe erfolgte anhand der von jeder Probe hergestellten Dünnschliffe. Die Bereinigung des projektionsbedingten Messfehlers, der bei der Bestimmung des Mineralverlustes und der Läsionstiefe an den Oberflächen der Schmelz- und Dentinproben auftrat, wurde bei der Auswertung der Daten berücksichtigt. Hierfür musste von den gemessenen Werten nach der Demineralisation und einer zwei- und fünfwöchigen Remineralisation jeweils der Mineralverlust des gesunden Bereiches abgezogen werden [Kielbassa *et al.* 2005; Tschoppe *et al.* 2007]. Die Messwerte der gesamten Läsion lieferten jedoch keine detaillierten Angaben über die genaue Verteilung des Minerals innerhalb der Läsion. Um auch spezifische strukturelle Veränderungen innerhalb der Läsion während der Remineralisation zu erfassen, wurden in dieser Studie mittels der mikroradiografischen Auswertung die Mineralverluste sowie die Veränderungen des Mineralverlustes für den äußeren und inneren Bereich der Läsion getrennt analysiert [Kawasaki *et al.* 2000; Kielbassa *et al.* 2005]. Bei dieser Analyse-methode ist kritisch festzuhalten, dass anhand der transversalen Mikroradiografie zwar ein resultierender Mineralgewinn in den initialen Läsionen dargestellt werden kann, dabei aber der Beweis fehlt, dass es sich tatsächlich um HAP handelt und nicht um eine Ablagerung von anderen Kalzium-Phosphat-Verbindungen (OKP, DKPD, amorphes Kalziumphosphat). Dieser Nachteil der TMR könnte in künftigen In-vitro-Untersuchungen von Remineralisationslösungen durch die Anwendung von zusätzlichen Analysemethoden, wie der Infrarotspektroskopie oder Röntgendiffraktion, ausgeglichen werden.

## 6.2 Diskussion der Ergebnisse

Die zehn unterschiedlichen Versuchslösungen, deren Mineralisationswirkungen auf die Zahnhartsubstanzläsionen untersucht wurden, setzten sich aus acht wässrigen Lösungen (pH 6,3, Phosphatpuffer), einer originalen BUSKES-Lösung (pH 7; Referenzlösung; B1) sowie einer modifizierten BUSKES-Lösung (pH 6,3; Positiv-

kontrolle; B2) zusammen. Ausgehend von der in der Literatur beschriebenen Erkenntnis, dass Phosphat in Kombination mit Kalzium in einer übersättigten Lösung ( $IP > LP$ ) Kalzium-Phosphat-Verbindungen bildet, wurden den wässrigen Lösungen 3 bis 8 Kalziumkonzentrationen in aufsteigender Menge beigemischt. Auch die BUSKES-Lösungen enthielten Kalzium und Phosphat [Buskes *et al.* 1985; Backer Dirks 1966; Driessens *et al.* 1990; Featherstone 2000; Fejerskov *et al.* 2008].

Der bedeutende Einfluss des Sättigungsgrades (HAP, OKP, DKPD) einer Lösung auf deren Remineralisationseigenschaft bezüglich Zahnhartsubstanzläsionen wurde auch in dieser Studie beobachtet. Wie erwartet führten innerhalb beider Lagerungszeiträume alle Versuchslösungen, die Kalzium und Phosphat enthielten und in Bezug auf HAP übersättigt waren (Lösung 3 bis 8, B1, B2), zu einem Mineralgewinn bei den Schmelz- und Dentinproben [Klimm 1997; Fejerskov *et al.* 2008]. Dieser Mineralgewinn fand jeweils in der gesamten Läsion sowie in den einzeln betrachteten äußeren und inneren Bereichen der Läsion statt. Ebenfalls verringerte sich die Läsionstiefe. Obwohl alle remineralisierenden Lösungen bezüglich HAP übersättigt waren, ergaben sich deutliche Unterschiede beim Vergleich der Mineralgewinne der Läsionen der einzelnen Gruppen untereinander. Diese waren sowohl bei der gesonderten Betrachtung der gesamten Läsion als auch bei der isolierten Analyse des äußeren und inneren Läsionsanteiles erkennbar. Die wässrigen Versuchslösungen 6, 7 und 8 und die originale BUSKES-Lösung führten zu einem vergleichbaren und innerhalb der Versuchsreihe größten Mineralgewinn. Zusätzlich verzeichneten die Läsionstiefen der in diesen Lösungen gelagerten Schmelz- und Dentinproben die stärksten Abnahmen.

Im Gegensatz zu den vorgenannten Versuchslösungen war die bei den wässrigen Lösungen 4, 5 und der modifizierten BUSKES-Lösung im ähnlichen Umfang ausgeprägte Remineralisationseigenschaft deutlich geringer. Die Lösungen, die den höchsten Mineralgewinn bewirkten, wiesen im Vergleich zu den Lösungen 4, 5 und B2 deutlich höhere Übersättigungswerte in Bezug auf HAP auf, waren jedoch auch im Vergleich untereinander nicht homogen hinsichtlich der Sättigung an HAP. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass die HAP-Sättigung nicht den allein bestimmenden Faktor für das Ausmaß des untersuchten Mineralgewinnes darstellt.

Da neben dem HAP noch andere Kalzium-Phosphat-Verbindungen wie OKP und DKPD eine wichtige Rolle bei der Remineralisation spielen, wurden die Sättigungen der einzelnen Versuchslösungen auch für OKP und DKPD berechnet. Diese Kalzium-Phosphat-Verbindungen sind Vorstufen des HAP, wobei OKP eine direkte Vorstufe des HAP ist und DKPD über Transformationsvorgänge durch die Zwischenstufe OKP in HAP umgewandelt wird [Johnsson *et al.* 1992; Driessens *et al.* 1990; Dorozhkin *et al.* 2002]. Sowohl die Lösungen mit dem höchsten Mineralgewinn (6, 7, 8, B1) als auch die Versuchslösungen, die einen geringeren Mineralzuwachs verzeichneten, waren in

Bezug auf OKP übersättigt. Wie bei der Betrachtung der Sättigung des HAP wiesen die Lösungen 6, 7, 8 und B1 zwar höhere Sättigungswerte als die Versuchslösungen 4, 5 und B2 auf, unterschieden sich aber untereinander deutlich hinsichtlich der gemessenen Werte für OKP. Somit trug vermutlich neben dem HAP auch die Präzipitation von OKP zum allgemein beobachteten Mineralzuwachs bei, begründet aber nicht ausschließlich die Unterschiede in der Ausprägung der Remineralisation beider Lösungsgruppen.

Bei der Betrachtung der Sättigungen in Bezug auf DKPD war ein Unterschied zwischen den Versuchslösungen mit der stärksten Remineralisationseigenschaft und jenen, die einen geringeren Mineralgewinn aufwiesen, erkennbar. Im Gegensatz zu den Lösungen 4, 5 und B2 waren die Lösungen 6, 7, 8, B1 in Bezug auf DKPD übersättigt bis gesättigt. Der Grad der Sättigung bezogen auf DKPD scheint daher eine bedeutende Rolle im Zusammenhang mit der remineralisierenden Wirkung einer Lösung zu spielen. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen anderer In-vitro-Remineralisationsstudien [Lynch *et al.* 2007; Hara *et al.* 2008]. Abweichend von diesen Untersuchungen führten in der vorliegenden Studie nicht nur die hinsichtlich DKPD übersättigten Lösungen 7 und 8 zu einem Mineralgewinn, sondern auch die an DKPD gesättigten Lösungen 6 und B1. Dies lässt vermuten, dass bereits eine Sättigung in Bezug auf DKPD (IP = LP) einen entscheidenden Einfluss auf die Remineralisationseigenschaft einer Lösung ausüben könnte. Die Sättigungswerte der Versuchslösungen 7 und 8 liegen nur geringfügig über denen der Lösungen 6 und B1. Da die Versuchslösungen der oben genannten Studien deutlicher in Bezug auf DKPD übersättigt waren, wäre es sinnvoll in weiteren In-vitro-Studien zu untersuchen, ob höhere Übersättigungen in Bezug auf DKPD zu noch größeren Mineralgewinnen führen.

In dieser Studie wurde neben der quantitativen Veränderung des Mineralgehaltes der Zahnhartsubstanzläsionen auch die Verteilung des Minerals innerhalb der Läsionen untersucht. Obwohl die Schmelz- und Dentinproben, die in den gleichen übersättigten Versuchslösungen lagerten, vergleichbare Mineralgewinne aufwiesen, ergab die Betrachtung des Mineralisationsmusters deutliche Unterschiede bezüglich der beiden Probenarten. Der strukturelle Grundaufbau der initialen Läsion blieb bei den Dentinproben über die beiden Lagerungszeiträume in den remineralisierenden Lösungen erhalten. Es fand ein deutlicher Mineralzuwachs in der OS und eine geringe Auffüllung des LK statt. Im Gegensatz dazu zeigten die Läsionen der Schmelzproben ein abweichendes Mineralisationsmuster. Die übersättigten Lösungen führten zu einer Mineralanlagerung, die ausgehend von der Tiefe der Läsion nach und nach den LK auffüllte. Nach der fünfwöchigen Lagerung war der Grundaufbau der initialen Läsion vor allem bei den Proben, die in den mineralisationsstärksten Lösungen lagerten (6, 7, 8, B1) nicht mehr nachvollziehbar. Bei beiden Probenarten bewirkten die

Lösungen mit der stärksten Remineralisationseigenschaft (6, 7, 8, B1) die ausgeprägtesten Strukturveränderungen. In der Literatur wird beschrieben, dass die ursprüngliche Mineralverteilung der Schmelz- und Dentinläsion eine wichtige Rolle für das Remineralisationsmuster eines Defektes spielt [Kawasaki *et al.* 2000, Fejerskov *et al.* 2008]. Besitzt die Läsion eine dicke, mineralreiche OS, findet die Remineralisation vermehrt an der Oberfläche statt. Obwohl in dieser Studie anhand der Mittelwertgraphen der initialen Schmelz- und Dentinläsionen auf die Existenz einer OS geschlossen werden konnte, wiesen nur die Dentinläsionen das oben beschriebene Remineralisationsmuster auf. Die vermehrte Mineralanlagerung in der OS der Dentinläsionen führte zu einem erschwerten Eindringen der Versuchslösungen und der darin gelösten Kalzium- und Phosphationen in die Tiefe der Läsionen. Aus diesem Grund fand im inneren Läsionsanteil, unabhängig vom Sättigungsgrad der Versuchslösung, ein ähnlich ausgeprägter Mineralgewinn statt.

Bei Schmelz hingegen wurde trotz einer vorhandenen OS ein Remineralisationsmuster beobachtet, wie es in der Literatur bei einer fortgeschrittenen Läsion ohne oder mit einer dünnen, gering mineralisierten OS beschrieben wird. Demnach begann bei den Schmelzproben die Auffüllung des Defektes aus der Tiefe der Läsion heraus [Kawasaki *et al.* 2000, Fejerskov *et al.* 2008]. Ausgehend von dieser Beobachtung könnte angenommen werden, dass die OS der initialen Schmelzläsionen zu Versuchsbeginn geringer mineralisiert war als die der Dentinläsionen und somit ein direkter Vergleich des Mineralisationsmusters der Schmelz- und Dentinproben nicht möglich wäre. Ein Hinweis auf diese Vermutung wäre, dass aufgrund der dünneren OS der Schmelzläsionen die Versuchslösungen und deren Kalzium- und Phosphationen, ungehindert in die Tiefe der Läsion diffundieren konnten und dementsprechend die jeweils stärker gesättigten Lösungen zu einem deutlicheren Mineralgewinn führten.

Ein weiteres Indiz für eine unterschiedliche Dicke der ursprünglichen OS ist, dass im Gegensatz zu den Dentinläsionen ein kompletter Verlust der OS bei den Schmelzläsionen während der Lagerung in der ungesättigten Lösung 1 beobachtet wurde. Eine mögliche Ursache für die differierende Dicke der OS der Probenarten zu Versuchsbeginn könnte in der abweichenden Herstellung der künstlichen Schmelz- und Dentinläsionen mittels unterschiedlicher Lagerungszeiten und Demineralisationslösungen begründet sein [Buskes *et al.* 1985; Ten Cate JM *et al.* 1998]. Die für Dentin- und Schmelzläsionen jeweils spezifischen Herstellungsverfahren waren notwendig, da sich Schmelz und Dentin strukturell voneinander unterscheiden [Schröder *et al.* 1987; Le Geros *et al.* 1991; Ten Cate *et al.* 1985].

In einer künftigen Studie könnte eine genaue Bestimmung des Mineralgehaltes der alleinigen OS der Schmelz- und Dentinläsion nach der Demineralisation durchgeführt werden. Hierfür müsste zunächst die Ausdehnung der OS der Schmelz- und

Dentinläsionen auf den jeweiligen Mittelwertgraphen definiert werden. Die innerhalb der OS bestimmten Mineralgehalte könnten als Vergleich der jeweiligen Probenarten untereinander dienen. Dabei stellt sich die Frage, ob eine Bereinigung der originär unterschiedlichen Mineralanteile im Schmelz und Dentin vorgenommen werden sollte. Würden ausgehend von dieser Vorgehensweise nach der Lagerung in den unterschiedlichen Demineralisationslösungen vergleichbare Mineralgehalte in der OS der beiden Zahnhartsubstanzläsionen festgestellt werden, wäre dies ein Beleg für die in dieser Studie beobachteten, unterschiedlichen Mineralisationsmuster von Schmelz- und Dentinläsionen.

Zur Stabilisierung des pH-Wertes wurde den BUSKES-Lösungen ein für den Menschen toxischer Puffer (HEPES = Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure) beigemischt [Zigler *et al.* 1985; Spierenburg *et al.* 1984]. Bei den wässrigen Lösungen kam anstelle des HEPES-Puffers ein Phosphatpuffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 1:2) zum Einsatz, der bereits erfolgreich im Rahmen einer Remineralisationsstudie in einem Speicheleratzmittel (Saliva natura<sup>®</sup>-Lösungen) *in vitro* verwendet wurde [Tschoppe *et al.* 2009]. Im Zuge der Vorversuche der vorliegenden Studie erwies sich dieser Phosphatpuffer über den gesamten Untersuchungszeitraum von acht Wochen als zuverlässiger Stabilisator des pH Wertes (pH 6,3) von wässrigen Lösungen. Die über den gesamten Versuchsablauf stabilen pH-Werte aller Lösungen waren mit denen von humanem Speichel vergleichbar, die je nach Stimulation im Bereich von 6,0 und 7,5 liegen [Klimm 1997; Driessens *et al.* 1990]. Die unter klinischen Bedingungen auftretenden pH-Wert-Schwankungen des Speichels, die aufgrund des Wechselspiels zwischen der Produktion organischer Säuren mittels Plaquebakterien in Abhängigkeit des Nahrungsangebotes und der Puffersysteme des Speichels entstehen, wurden in dieser Studie nicht berücksichtigt, da nur gezielt die mineralisierende Wirkung der verschiedenen Versuchslösungen bei konstantem pH-Wert untersucht werden sollte [Carlsson *et al.* 1974; Kielbassa *et al.* 2009]. Nachdem pH-Wert-Schwankungen zu wechselnden Sättigungssituationen im Speichel und in den eingesetzten Versuchslösungen führen könnten, sollten diese bei weiterführenden Untersuchungen berücksichtigt werden. Ein möglicherweise entscheidender Einfluss dieser Schwankungen auf das Ausmaß des Mineralgewinnes könnte damit nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Studie wurden jeweils 18 demineralisierte Schmelz- und Dentinproben pro Gruppe über einen Zeitraum von zwei und fünf Wochen in je 200 ml einer der zehn Versuchslösungen gelagert. Alle Versuchslösungen wurden nach 24 Stunden gewechselt. Während diesem 24stündigen Lagerungszeitraum fand keine Bodensatzbildung statt. Diese Beobachtung wurde durch eine Analyse der Ionenkonzentrationen der zubereiteten Versuchslösungen verifiziert. Daher kann angenommen werden, dass alle den Versuchslösungen beigefügten Ionen für eine mögliche Remineralisation ver-

füßbar waren. Wird die in diesem Versuch verwendete Lösungsmenge von 200 ml isoliert betrachtet, muss kritisch angemerkt werden, dass diese nicht auf eine klinische Situation übertragbar ist. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es einerseits einem Menschen nicht möglich ist diese große Flüssigkeitsmenge als einmalige Spülung zu verwenden und andererseits die Anzahl der Zahnoberflächen, die mit den Versuchslösungen umspült wurde, in der menschlichen Mundhöhle deutlich größer wäre. Auch ist der intensive Kontakt zwischen der Zahnhartsubstanz und den Lösungen, der aus den langen Lagerungszeiten der Proben in den Versuchslösungen resultiert, am Menschen nicht realisierbar. In einer weiteren In-vitro-Untersuchung könnten diese Umstände berücksichtigt und eine der Klinik entsprechenden Situation simuliert werden. Anstelle der 18 Proben könnten, ausgehend von der Anzahl der Zahnoberflächen im Mund des Menschen, 128 Proben gewählt werden. Die Lagerung dieser Proben sollte in 200 ml Versuchslösung, aber auch in einer deutlich geringeren Menge, ähnlich der einer Mundspülung (10 ml), erfolgen. Ebenfalls müsste im Falle einer derartigen Untersuchung die Lagerungsdauer der Proben auf eine klinisch anwendbare Zeit reduziert werden.

Eine Abweichung der Mineralisationsergebnisse dieser neuen Studie von den hier vorliegenden Ergebnissen wäre zu erwarten, da die Lösungsmenge, Probenanzahl und Reaktionszeit variieren. Sollten die in dieser Studie untersuchten wässrigen Versuchslösungen 6, 7, 8 und B1, die den höchsten Mineralzuwachs erzielten, auch in der neuen, den klinischen Umstände angepassten In-vitro-Untersuchung zu einem Mineralzuwachs führen, wäre anschließend eine In-vivo-Studie möglich. Zudem würde eine klinische Untersuchung Einflussfaktoren, wie Nahrung, Mundhygiene, Speichel und Plaque berücksichtigen, die einen starken Einfluss auf die Diffusion, Konzentration und Sättigung haben [König 1987]. Insbesondere könnte der Speichel eine In-vivo-Remineralisation wesentlich beeinflussen, da er eine Reihe von Proteinen beinhaltet.

Frühere In-vitro-Studien haben gezeigt, dass das Hinzufügen von Muzinen (Glykoproteinen) zu einer wässrigen Versuchslösung die Zahnhartsubstanz vor Demineralisation schützen und in Kombination mit fluoridhaltigen Mundhygieneprodukten sogar remineralisationsfördernd wirken kann [Kielbassa *et al.* 2005; Meyer-Lueckel *et al.* 2004]. Die im Speichel befindlichen Prolin-reichen Proteine können sich an Kalziumionen binden und dadurch eine spontane Präzipitation von Kalzium-Phosphat-Verbindungen verhindern. Die Übersättigung des Speichels wird somit aufrechterhalten. Aufgrund dieser Fähigkeit besteht die Möglichkeit, dass sie sich an die freien Kalziumionen, der in dieser Studie verwendeten Versuchslösung, binden und somit eine Veränderung des Kalziumgehaltes mit einer einhergehenden Verlangsamung der Remineralisation bewirken [Hara *et al.* 2008; Fejerskov *et al.* 2008].

Die vorliegende Untersuchung hat sich bei der Analyse der Remineralisationseigenschaft der Lösungen ausschließlich und in Anlehnung an die Zusammensetzung der BUSKES-Lösung auf die Grundbausteine des HAP, dem Kalzium und dem Phosphat, beschränkt. Unberücksichtigt blieb, dass das HAP der Zahnhartsubstanz als nicht stöchiometrische Verbindung betrachtet wird und im Zuge einer Remineralisation auch Fluorid-, Karbonat- und andere Ionen, die im Speichel vorkommen, eingebaut werden können [Nikiforuk *et al.* 1985; König 1987]. Hierdurch ändern sich wichtige Eigenschaften der Zahnhartsubstanz, wie die Löslichkeit, Größe und Stabilität der Kristalle. So stellt vor allem Fluorapatit, das bei der Integration von Fluoridionen in das Apatitkristallgitter entsteht, die stabilste Form des Apatits gegen Säureangriffe dar [Le Geros *et al.* 1991; Heslop *et al.* 2005]. Die Bildung von Fluorapatit ist erstrebenswert, da in der Mundhöhle permanente pH-Wert-Schwankungen vorherrschen. Somit wäre es bei weiteren Remineralisationsuntersuchungen sinnvoll, den Versuchslösungen 6, 7 und 8 Fluorid beizumengen. Da sich jedoch durch Zugabe von Fluoriden das Mineralisationsmuster ändern kann, muss dieser Umstand bei weiterführenden In-vitro-Studien berücksichtigt werden [Kawasaki *et al.* 2000].

Abschließend ist bei den Ergebnissen dieser Studie zu berücksichtigen, dass die untersuchte De- und Remineralisation von Schmelz und Dentin als rein physikalisch-chemischer Vorgang betrachtet wurde. Diese isolierte Betrachtungsweise ist bei Schmelz ausreichend, da dieser fast ausschließlich mineralischer Natur ist (98 Gew% Kalzium-Phosphat-Verbindungen) und Wechselwirkungen zwischen der Schmelzoberfläche und dem umgebenden Milieu zu De- und Remineralisationsvorgängen führen, die vor allem durch Veränderungen des  $LP_{\text{HAP, OKP, DKPD}}$  des Schmelzes gegenüber dem IP der umgebenden Lösung bestimmt werden [Le Geros *et al.* 1991; Fejerskov *et al.* 2008].

Anders verhält es sich beim Dentin, dessen Reaktionsmöglichkeiten wesentlich komplexer sind und immer eine Kombination von physikalischen-chemischen und biologischen Reaktionen des Dentins darstellen. Dentin besteht zwar aus den gleichen anorganischen Kalzium-Phosphat-Verbindungen wie Schmelz, weist aber im Gegensatz zu diesem (Dentin 70 Gew%) einen geringeren Anteil an anorganischem Mineral auf [Schröder *et al.* 1987; Le Geros *et al.* 1991]. Darüber hinaus sind im Gegensatz zu Schmelz die Apatitkristalle im Dentin kleiner und nicht in Prismenform angeordnet. Zusätzlich besteht Dentin zu 20 Gew% aus einer organischen Matrix, die sich aus Kollagen Typ 1 (80 – 90 %), nichtkollagener Grundsubstanz und Matrixproteinen zusammensetzt (8 - 9 %; Phosphoproteine, Proteoglycane, Phospholipiden) [Arnold 2006; Ten Cate *et al.* 1985]. Die Apatitkristalle sind um das dreidimensional strukturierte Kollagengerüst angeordnet. Die an die Kollagenfasern gebundenen Matrixproteine haben einen entscheidenden Einfluss auf die Nukleation und Regulation des

Kristallwachstums während der Dentinogenese [Arnold 2006; Ten Cate 2008, Fejerskov et al. 2008]. Im Zuge einer Demineralisation von Dentin, die durch von Mikroorganismen produzierte organische Säuren oder mithilfe einer Demineralisationslösung hervorgerufen wird, löst sich zwar ein Großteil der anorganischen Bestandteile, trotzdem bleibt ein kleiner und direkt das Kollagengerüst umgebender Mineralanteil samt Kollagengerüst bestehen. Die darin verbliebenen Matrixproteine könnten im Zuge der Remineralisation ebenfalls von Bedeutung sein [Bertassoni et al. 2009]. Somit spielt bei der Remineralisation von Dentin wahrscheinlich nicht nur die Sättigungssituation einer Versuchslösung in Bezug auf DKPD eine große Rolle, sondern auch die erwähnten Matrixproteine. Diese besitzen meistens eine hohe Affinität zu Kalziumionen, die sie an sich binden, und könnten dadurch das Kalzium-Phosphat-Verhältnis, der in dieser Studie eingesetzten Versuchslösung, beeinflussen. Dieser wesentliche Unterschied zwischen Schmelz- und Dentinremineralisation könnte sich in einer In-vivo-Studie an Zähnen mit lebender Pulpa noch deutlicher darstellen, da die Odontoblasten laufend neue Grundsubstanz und Matrixproteine produzieren.

## 7 Schlussfolgerungen

In dieser In-vitro-Studie konnte gezeigt werden, dass die untersuchten wässrigen Versuchslösungen mit den drei höchsten Kalziumkonzentrationen (Lösungen 6, 7, 8) sowohl bei den Schmelz- als auch Dentinläsionen zu einem zur originalen BUSKES-Lösung vergleichbaren Mineralgewinn führten. Diese drei wässrigen Versuchslösungen (6, 7, 8) hatten mit der BUSKES-Lösung gemeinsam, dass sie in Bezug auf HAP und OKP deutlich übersättigt waren. Bezogen auf DKPD lagen sie gesättigt bis leicht übersättigt vor. Die Lösungen mit einer deutlich geringeren Remineralisationseigenschaft (Lösungen 4, 5, B2) waren ebenfalls in Bezug auf HAP und OKP übersättigt. Bezogen auf DKPD lagen sie ungesättigt vor. Die Nullhypothese kann somit auf Basis dieser Erkenntnisse verworfen werden. Da die wässrigen Lösungen mit einer erhöhten Kalziumkonzentration entgegen der eingangs definierten Vermutung, zu einer lediglich gleichen Remineralisation führten, kann die Arbeitshypothese nur eingeschränkt bestätigt werden. Die Kalziumkonzentration, die in den wässrigen Lösungen (6, 7, 8) jeweils deutlich über dem Niveau der originalen BUSKES-Lösung lag, scheint kein ausschlaggebender Faktor für die Remineralisationseigenschaft einer Lösung zu sein. Von größerer Bedeutung für die remineralisierende Wirkung einer Lösung könnte der Grad der Sättigung hinsichtlich DKPD sein, da die Versuchslösungen, die in Bezug auf DKPD gesättigt bis übersättigt waren, den größten Mineralzuwachs in den Zahnhartsubstanzläsionen verzeichneten.

Der Phosphatpuffer, der in dieser Studie allen wässrigen Versuchslösungen beigemischt wurde, kann als HEPES-Ersatz angesehen werden, da er den pH-Wert (pH 6,3) über den gesamten Zeitraum des Versuches stabil hielt. Aufgrund dieses Ergebnisses ist es bei künftigen In-vivo-Studien möglich, diesen für den Menschen nicht toxischen Phosphatpuffer bei der Herstellung von Remineralisationslösungen zu verwenden.

Die Untersuchung zeigte zudem, dass sich das Remineralisationsmuster von Schmelz- und Dentinläsionen deutlich voneinander unterschied. Die Ursache hierfür scheint eine differierende OS der Schmelz- und Dentinläsionen zu sein. In weiteren Studien müsste dieser Umstand entsprechend verifiziert werden, da ansonsten dem in der Literatur beschriebenen Mineralisationsmuster von Schmelz- und Dentinläsionen widersprochen werden würde.

## 8 Zusammenfassung

**Problemstellung:** Die Remineralisationslösung nach Buskes *et al.*, die einen für den Menschen toxischen Puffer (HEPES = Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure) enthält, wird bei In-vitro-Remineralisationsstudien häufig verwendet. Als möglicher HEPES-Ersatz könnte ein Phosphatpuffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 1:2) dienen, der im Rahmen einer In-vitro-Untersuchung bereits erfolgreich in einem Speichelerersatzmittel (Saliva natura®-Lösungen) eingesetzt wurde. **Zielsetzung:** Das Ziel dieser Studie war, die Remineralisationseigenschaften von acht wässrigen Versuchslösungen (Lösung 1 bis 8) mit unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen (Phosphatpuffer, pH 6,3) und einer modifizierten BUSKES-Lösung (pH 6,3, B2) auf Schmelz und Dentin zu untersuchen. Als Referenzlösung diente die originale BUSKES-Lösung (pH 7,0, B1). **Material und Methoden:** Aus 45 Rinderfrontzähnen wurden je 180 standardisierte Schmelz- und Dentinproben präpariert und in Kunstharz eingebettet. Ein Viertel der jeweiligen Probenoberfläche wurde mit Nagellack (Kontrolle Gesund) abgedeckt. Anschließend erfolgte eine Demineralisation der Proben (Schmelz: pH 4,95, 19 Tage; Dentin: pH 5,00, 6 Tage; 37 °C). Danach wurde ein Drittel des demineralisierten Bereiches jeder Probe mit Nagellack (Kontrolle Demineralisation) abgedeckt. Je 18 Proben wurden in den jeweiligen Versuchslösungen (1 bis 8, B1, B2) für zwei und fünf Wochen (37 °C) gelagert. Anschließend angefertigte Dünnschliffe wurden hinsichtlich der Mineralverluste (gesamte Läsion, äußerer und innerer Läsionsanteil) und Läsionstiefen (gesamte Läsion) ausgewertet (TMR). **Ergebnisse:** Nach beiden Lagerungszeiträumen der Proben in den Lösungen 3 bis 8 (enthielten Kalzium), B1 und B2 zeigten sich im Vergleich zu den Ausgangswerten signifikante Abnahmen des Mineralverlustes ( $p < 0,05$ ; *t*-Test). Die Lösungen 6, 7, 8 und B1 führten bei beiden Probenarten zu den signifikant größten Abnahmen des Mineralverlustes (gesamte Läsion, äußerer und innerer Läsionsanteil) und der Läsionstiefen (gesamte Läsion;  $p < 0,05$ ; ANOVA, Tukey Post-hoc-Test). Die Lösungen 6, 7, 8 und B1 waren in Bezug auf HAP, OKP und DKPD gesättigt bis übersättigt. **Schlussfolgerungen:** Die Versuchslösungen, die bezogen auf HAP und OKP übersättigt sowie hinsichtlich DKPD gesättigt bis übersättigt waren, erzielten bei beiden Zahnhartsubstanzen den größten Mineralgewinn. Der Phosphatpuffer hielt den pH-Wert bei 6,3 stabil.

**Schlagwörter:** [Mineralisation] [Karies] [Schmelz] [Dentin] [DKPD-Sättigung]

**Klinische Bedeutung:** Die wässrigen Lösungen 6, 7 und 8 (Phosphatpuffer), die vergleichbare Remineralisationseigenschaften wie die Lösung B1 aufwiesen, könnten in zukünftigen In-vivo-Studien als Remineralisationslösungen eingesetzt werden.

## 9 Abstract

**Statement of problem:** A remineralizing solution according to Buskes *et al.* (HEPES-buffered) has often serves as a positive control in remineralization studies. Due to the toxicity of HEPES, its utilization is limited to *in vitro* conditions. A phosphate-buffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 1:2) might act as an alternative non-toxic buffer. **Objectives:** In this *in vitro* study the effects of eight aqueous solutions (solution 1 to 8) with various calcium concentrations (phosphate-buffer, pH 6.3) and a modified version of the BUSKES solution (pH 6.3, B2) on remineralization of demineralized enamel and dentin were investigated. The BUSKES solution with pH 7.0 served as reference (B1). **Materials and methods:** 180 bovine enamel and dentin specimens were prepared before/after demineralization (37 °C; enamel: pH 4.95, 19 days; dentin: pH 5.00, 6 days). One quarter of each specimen's surface was covered with nail varnish (control sound/demineralised). The specimens (n = 18) were exposed to ten different solutions (1 to 8, B1, B2). Mineral losses (whole lesion and surface area/inner part of the lesion) before and after storage (2 and 5 weeks; 37 °C) were evaluated from microradiographs. **Results:** After both periods of storage dentin and enamel specimens immersed in aqueous solutions 3 to 8 (containing calcium), B1 and B2 showed a significantly decreased mineral loss compared to baseline ( $p < 0.05$ ; *t*-test). The significantly highest mineral gain was observed with specimens stored in solutions 6, 7, 8 and B1 (complete lesion, surface area/inner part of the lesion;  $p < 0.05$ ; ANOVA, Tukey post hoc test). Solutions 6, 7, 8 and B1 were saturated or supersaturated with respect to DCPD. **Conclusions:** DCPD seems to be a more appropriate predictor for remineralization compared to OCP and HA. The addition of phosphates as a buffer seems to be suitable to maintain a constant pH.

**Keywords:** [mineralization] [caries] [enamel] [dentin] [DCPD saturation]

**Clinical significance:** The phosphate-buffer could substitute the toxic nature of HEPES leading to solutions. Following remineralizing effects of aqueous solutions 6, 7 and 8 should be tested clinically.

## 10 Literaturverzeichnis

Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FJ. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005;43:5721-5732

J Arends J, Christoffersen J. The nature of early caries lesions in enamel. *Dent Res* 1986;65:2-11

Arends J, Ruben JL, Inaba D. Major topics in quantitative microradiography on enamel and dentin: R parameter, mineral distribution visualization, and hyper-remineralization. *Adv Dent Res* 1997;11:403-414

Arnold WH. Mikromorphologie und Molekularbiologie der Dentinogenese und Amelogenese. *Dtsch Zahnärztl Z* 2006;61:524-534

Baume LJ. Allgemeine Grundsätze für eine internationale Normung der Kariesstatistiken. *Int Dent J* 1962;12:279-290

Bertassoni LE, Habelitz S, Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. Biomechanical perspective on the remineralization of dentin. *Caries Res* 2009;43:70-77

Buskes JAKM, Christofferson J, Arends J. Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions. A new technique with application. *Caries Res* 1985;19:490-496

Carlsson J, Griffith CJ. Fermentation products and bacterial yields in glucose-limited and nitrogen-limited cultures of streptococci. *Arch Oral Biol* 1974;19:1105-1109

Dawes C. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *J Physiol* 1972;220:529-545

Dibdin GH. The stability of water in human dental enamel studied by proton nuclear magnetic resonance. *Arch Oral Biol* 1972;17:433-437

Dorozhkin SV, Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed* 2002; 41:3130-3146

Driessens FCM, Verbeeck RMH. *Biominerals*. CRC Press, Florida 1990;130-143

Edgar WM, Mullane DM. *Saliva and oral health*. British Dental Association, London 1990;27-41

Esser M, Tinschert J, Marx R. Materialkennwerte der Zahnhartsubstanz des Rindes im Vergleich zur humanen Zahnhartsubstanz. *Dtsch Zahnärztl Z* 1998;53:713-717

Exterkate RAM, Damen JJM, Ten Cate JM. A single-section model for enamel de- and remineralization studies. 1. The effects of different Ca/P ratios in remineralization solutions. *J Dent Res* 1993;72:1599-1603

Featherstone JDB, Mellberg JR. Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. *Caries Res* 1981;15:109-114

Featherstone JDB. Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J* 2008;53:286-291

Featherstone JDB. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc* 2000;131:887-899

- Featherstone JDB. Remineralization, the natural caries repair process - the need for new approaches. *Adv Dent Res* 2009;21:4-7
- Fejerskov O, Kidd E. Dental caries. Blackwell Munksgaard, Oxford 2008;23-48, 164-247
- Gustafsson BE, Quensel CE, Lanke LS, Lundquist C, Grahnen H, Bonow BE, Krasse B: The Vipeholm dental caries study. The effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta Odontol Scand* 1954;11:232-264
- Hallsworth AS, Robinson C, Weatherell JA. Mineral and magnesium distribution within the approximal carious lesion of dental enamel. *Caries Res* 1972;6:156-168
- Hara AT, Karlinsey RL, Zero DT. Dentine remineralization by simulated saliva formulations with different Ca and P contents. *Caries Res* 2008;42:51-56
- Heslop DD, Bi Y, Baig AA, Otsuka M, Higuchi WI. A comparative study of the metastable equilibrium solubility behaviour of high-crystallinity and low-crystallinity carbonated apatites using pH and solution strontium as independent variables. *J Colloid Interface Sci* 2005;289:14-25
- Institut der deutschen Zahnärzte (IDZ). Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). [http://www.kzbv.de/service/DMS\\_%20IV\\_Kurz.pdf](http://www.kzbv.de/service/DMS_%20IV_Kurz.pdf)
- Johnsson MSA, Nancollas GA. The role of brushite and octacalcium phosphate in apatite formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1992;3:61-82
- Kawasaki K, Ruben J, Tsuda H, Huysmans MCDNJM, Takagi O. Relationship between mineral distribution in dentin lesion and subsequent remineralization *in vitro*. *Caries Res* 2000;34:395-403
- Keyes PH. Recent advances in dental caries research. Bacteriology. Bacteriological findings and biological implications. *Int Dent J* 1962;12:443-463
- Kielbassa AM, Shohadai SP, Schulte-Monting J. Effect of saliva substitutes on mineral content of demineralized and sound dental enamel. *Support Care Cancer* 2001;9:40-47
- Kielbassa AM, Oeschger U, Schulte-Monting J, Meyer-Lueckel H. Microradiographic study on the effects of salivary proteins on *in vitro* demineralization of bovine enamel. *J Oral Rehabil* 2005;32:90-96
- Kielbassa AM, Gillmann L, Zantner C, Meyer-Lueckel H, Hellwig E, Schulte-Monting J. Profilometric and microradiographic studies on the effects of toothpaste and acidic gel abrasivity on sound and demineralized bovine dental enamel. *Caries Res* 2005;39:380-386
- Kielbassa AM, Tschoppe P, Hellwig E, Wrbas KT. Effects of regular and whitening dentifrices on remineralization of bovine enamel *in vitro*. *Quintessence Int* 2009;40:103-112
- Klimm W. Kariologie. Carl Hanser, München 1997:79-141
- König KG. Karies und Kariesprophylaxe. Goldmann, München 1971:33-35
- König KG. Karies und Parodontopathien. Georg Thieme, Stuttgart 1987:30-74
- Larson MJ, Pearce EIF. Saturation of human saliva with respect to calcium salts. *Arch Oral Biol* 2003;48:317-322
- Le Geros RZ. Calcium phosphate in oral biology and medicine. Karger, Basel 1992;23,108-129

Lilienthal B, Goldsworthy NE, Sullivan HR, Cameron DA. The biology of the children of Hopewood House. Bowral, N.S.W. I. Observation on dental caries extending over five years (1947-1952). *Dent J Aust* 1953;25:163-168

Lynch RJM, Momy U, Ten Cate JM. Effect of lesion characteristics and mineralising solution type on enamel remineralization *in vitro*. *Caries Res* 2007;41:257-262

Maiwald HJ. Grundlagen, erfolgreiche Konzepte und neue Methoden der Kinderbehandlung in der Zahnarztpraxis. Spitta, Balingen 2000; Kapitel 3.2.3

Margolis HC, Moreno EC. Composition of pooled plaque fluid from caries-free and caries-positive individuals following sucrose exposure. *J Dent Res* 1992;71:1776-1784

Marsh PD, Martin M. Orale Mikrobiologie. Georg Thieme, Stuttgart 2003;67-94

Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994;8:263-271

Mellberg JR, Loertscher KL. Comparison of *in vitro* fluoride uptake by human and bovine enamel from acidulated phosphate-fluoride solutions. *J Dent Res* 1974;53:64-67

Meyer-Lueckel H, Umland N, Hopfenmuller W, Kielbassa AM. Effect of mucin alone and in combination with various dentifrices on *in vitro* remineralization. *Caries Res* 2004;38:478-483

Miller WD. Die Mikroorganismen der Mundhöhle. Georg Thieme, Leipzig 1889

Neff D. Acid production from different carbohydrate sources in human plaque *in situ*. *Caries Res* 1967;1:78-87

Nikiforuk G. Understanding dental caries. Karger, Basel 1985;45-46

Oesterle LJ, Shellhart WC, Belanger G. The use of bovine enamel in bonding studies. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1998;113:514-519

Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Ervin RF, Gordon HA, Wagner M. Experimental caries in germfree rats inoculated with enterococci. *J Am Dent Assoc* 1955;50:259

Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Wagner M, Gordon HA, Luckey TD. Use of the germfree animal technic in the study of experimental dental caries I. Basic observation on rats reared free of all microorganism. *J Dent Res* 1954;33:147-151

Ruben J, Arends J. Shrinkage prevention of *in vitro* demineralised human dentine in transversal microradiography. *Caries Res* 1993;27:262-265

Sauerwein E. Kariologie. Georg Thieme, Stuttgart 1974;66-104

Schröder HE. Orale Strukturbiologie. Georg Thieme, Stuttgart 1987:73-85

Schumacher GH, Schmidt H, Böring H, Richter W. Anatomie und Biochemie der Zähne. Gustav Fischer, Stuttgart 1989;327

Silverstone LM, Hicks M, Mary J, Featherstone JDB. Dynamic factors affecting lesion initiation and progression in human dental enamel. Part I. The dynamic nature of enamel caries. *Quintessence Int* 1988;19:683-711

Spiereburg GT, Oerlemans FTJJ, van Laarhoven JPRM, de Bruyn CHMM. Phototoxicity of N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid-buffered culture media for human leukemic cell lines. *Cancer Res* 1984;44:2253-2254

Takuma S. Electron microscopy of the structure around the dentinal tubule. *J Dent Res* 1960;39:973-981

Ten Cate AR. *Oral Histology: Development, structure and function*. The C. V. Mosby Company, Toronto 1985;198-201,146-182

Ten Cate JM, Arends J. Remineralization of artificial enamel lesions *in vitro*. *Caries Res* 1978;12:213-222

Ten Cate JM, Featherstone JDB. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991;2:283-296

Ten Cate JM. Remineralization of deep enamel dentine caries lesions. *Aust Dent J* 2008; 53:281-285

Tschoppe P, Kielbassa AM, Meyer-Lueckel H. Evaluation of the remineralizing capacities of modified saliva substitutes *in vitro*. *Arch Oral Biol* 2009; 54:810-816

Tschoppe P, Meyer-Lueckel H, Toll R, Kielbassa AM. In-vitro-Studie zur Untersuchung eines neuen Speichelersatzmittels (Saliva natura<sup>®</sup>) auf Schmelz und Dentin. *Laryngorhinootologie* 2007;86:723-727

Whelton H. Introduction: The anatomy and physiology of salivary glands. In: Edgar WM, Mullane DM. *Saliva and oral health*. British Dental Association, London 1990;1-8

Zigler JS, Lepe-Zuniga JL, Vistica B, Grey I. Analysis of the cytotoxic effects of light-exposed HEPES-Containing cultures medium. *In Vitro Cell Dev Biol* 1985;5:282-287

## 11 Anhang

### 11.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AKP	amorphes Kalziumphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata
B1	BUSKES-Lösug (pH 7,0)
B2	BUSKES-Lösug (pH 6,3)
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumion
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	Kalziumdichlorid-2-hydrat
DKPD	Dikalziumphosphatdihydrat
F <sup>-</sup>	Fluoridion
g	Gramm
g/l	Gramm pro Liter
Gew%	Gewichtsprozent
H <sup>+</sup>	Wasserstoffionen
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Dihydrogenphosphat
HAP	Hydroxylapatit
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Hydrogenphosphat
IP	Ionenprodukt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KHN	Knoop-hardness numbers
KOH	Kalilauge
kV	Kilovolt
LK	Läsionskörper
LPHA	Löslichkeitsprodukt für Hydroxylapatit
Lsg.	Lösungen
LT <sub>Demin</sub>	Läsionstiefe nach Demineralisation minus Läsionstiefe gesund
mA	Milliampere
mg	Milligramm
mg/l	Milligramm pro Liter
MHDP	Methylendiphosphonsäure
min	Mineralverlust
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
mmol/l	Millimol pro Liter
nm	Nanometer
OKP	Oktakalziumphosphat
OH <sup>-</sup>	Hydroxylion
OS	pseudointakte Oberflächenschicht
pH	potentia Hydrogenii

---

$\text{PO}_4^-$	Phosphation
ppm	parts per million
Tab.	Tabelle
TMR	Transversale Mikroradiografie
U/min	Umdrehung pro Minute
Vol%	Volumenprozent
Vol.% $\times$ $\mu\text{m}$	Mineralverlust
z. B.	zum Beispiel
$\Delta\text{L}_{\text{Effekt}}$	Läsionstiefe nach Demineralisation minus Läsionstiefe nach Lagerung in den Lösungen
$\Delta\text{Z}_{\text{Demin}}$	Mineralverlust nach Demineralisation minus Mineralverlust gesund
$\Delta\text{Z}_{\text{Effekt}}$	Mineralverlust minus Mineralverlust gesund
$\Delta\Delta\text{Z}_{\text{Effekt}}$	Mineralverlust nach Demineralisation minus Mineralverlust nach Lagerung in den Lösungen
$\mu\text{m}$	Mikrometer

## 11.2 Liste der verwendeten Materialien

- Mat. 1 Bandsäge Exakt 300cl; Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland
- Mat. 2 CCD-Videokamera Modul XC 77CE; Sony, Tokio, Japan
- Mat. 3 CME-Spritzenfilter; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Mat. 4 Dikaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4$ ); Merck, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 5 Durchlichtmikroskop Axioskop 2; Zeiss, Oberkochen, Deutschland
- Mat. 6 Eisessig ( $CH_3COOH$ ); Merck, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 7 Ethylenglykol 99 %; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
- Mat. 8 Exakt Mikroschleifsystem 400 CS; Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland
- Mat. 9 Film Fuji fine grain positive film 71337; FUJIFILM, Düsseldorf, Deutschland
- Mat. 10 Hepes (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure) Puffer 1 M; Biochrom, Berlin, Deutschland
- Mat. 11 ICP OES Optima 2100 DV; Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
- Mat. 12 Ionenchromatographen 761 Compact IC; Metrohm, Filderstadt, Deutschland
- Mat. 13 Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ ); Merck, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 14 Kaliumhydroxid (KOH) 1 M; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 15 Kalziumdichlorid-2-hydrat ( $CaCl_2 \times 2H_2O$ ); Merck, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 16 Leukofix; BSN medical, Hamburg, Deutschland
- Mat. 17 Magnet-Rührer IKA-Kombimag RCT; Jahnke & Kunkel, Staufen i. Breisgau, Deutschland
- Mat. 18 Methyl-4-hydroxybenzoat; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
- Mat. 19 Methylendiphosphonsäure >98% (MHDP); Merck, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 20 Mikrometer Digimatic Bügelmessschraube; Mitutoyo, Kawasaki, Japan
- Mat. 21 Nagellack Express Finish Lacquer; Maybelline Jade, New York, USA
- Mat. 22 Natriumkarbonat 3,3 M; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 23 Natriumchlorid 0,9 % Fresenius Spüllösung; Fresenius, Bad Homburg v. d. H., Deutschland
- Mat. 24 Natriumhydrogenkarbonat 1 M ; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 25 PASW Statistics 18; Version 18.0.0; SPSS, München, Deutschland
- Mat. 26 pH-Meters GMH 3510; Greisinger Electronic, Regenstauf, Deutschland
- Mat. 27 Pipette Research; Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Mat. 28 Plexiglasobjektträger Diaplust; Oststeinbeck, Deutschland
- Mat. 29 Poliermaschine Phoenix Alpha; Wirtz-Buehler, Düsseldorf, Deutschland
- Mat. 30 Propyl-4-hydroxybenzoat; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
- Mat. 31 Röntgengenerator PW 1730/10; Philips, Eindhoven, Niederlande
- Mat. 32 Salpetersäure 65 %; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 33 Salzsäure (HCL) 0,1 M; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Mat. 34 Schleifgerät Labo Pol 25; Struers, Willich, Deutschland
- Mat. 35 Schleifpapier: Körnung 1200, 2500, 4000; Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland
- Mat. 36 Sekundenkleber Instant Fix; Henry Schein, Melville, USA

- 
- Mat. 37 Skalpell; Feather, Osaka, Japan
- Mat. 38 Tabellenkalkulationssoftware Office Excel 2003; Microsoft Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland
- Mat. 39 Technovit 4071; Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland
- Mat. 40 TMR-Probenhalter; Charité CFM Facility Management, Berlin, Deutschland
- Mat. 41 Transversal Micro Radiography Software (TMR) für Windows; Version 2.0.27.2; Inspektor Research System BV, Amsterdam, Niederlande
- Mat. 42 Ultrazentrifuge L 70; Beckmann, München, Deutschland
- Mat. 43 Waage Sartorius Excellence E 2000 D; Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Mat. 44 Wärmeschrank Venticell 404; MMM Medcenter, Planegg, Deutschland

### **11.3 Danksagung**

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Andrej M. Kielbassa (Abteilung für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie) danke ich sehr herzlich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas, seine wertvolle Unterstützung und die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können.

Herrn Dr. Peter Tschoppe (Abteilung für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie) gilt mein besonderer Dank für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung meiner Doktorarbeit. Seine Anregungen und Ratschläge habe ich immer geschätzt.

Für die hilfsbereite und freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche danke ich Herrn Rainer Toll (Abteilung für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie) und Herrn Dr. Hendrik Wetzel (Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung, Abteilung Stärke/Molekulare Eigenschaften).

#### **11.4 Lebenslauf**

**"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."**

### 11.5 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Barbara Exeli-Knoflach, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Effekte unterschiedlicher Kalziumkonzentrationen in wässrigen Lösungen auf demineralisierte bovine Zahnhartsubstanzen in vitro selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum: 3. Dezember 2010

---

Unterschrift