

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
Bereich für Oralmedizin, zahnärztliche Röntgenologie und Chirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Dekalzifikation von Zahnhartgewebe

Eine vergleichende In-vitro-Untersuchung zum Einfluss von
Ultraschall, Temperatur und Entkalkungsmedium auf die Dauer der Dekalzifikation
unter Begutachtung der Qualität des histologischen Schnittpräparats

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Luisa Maria Bacigalupo

aus Berlin

Datum der Promotion: 26.02.2016

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Zusammenfassung	7
1.1 Zusammenfassung	7
1.2 Summary	8
2 Einleitung	10
3 Literaturübersicht	12
3.1 Zusammensetzung und Aufbau der Zahnhartgewebe	12
3.1.1 Zahnschmelz	12
3.1.2 Dentin	13
3.1.3 Wurzelzement	13
3.2 Dekalzifikation von Zahnhartgewebe	14
3.2.1 Dekalzifikation von Zahnhartgewebe durch Säure	14
3.2.2 Dekalzifikation von Zahnhartgewebe durch Chelatbildung	17
3.3 Vorbehandlung von Zahnhartgewebe im Rahmen der Dekalzifikation	18
3.4 Ermittlung des Endpunktes der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe	19
3.4.1 Physikalische Prüfung	19
3.4.2 Chemische Prüfung	19
3.4.3 Röntgenologische Prüfung	20
3.5 Nachbehandlung und histotechnische Aufbereitung von Zahnhartgewebe im Rahmen der Dekalzifikation	20
3.5.1 Wässerung von dekalzifiziertem Zahnhartgewebe	20
3.5.2 Einbettung von dekalzifiziertem Zahnhartgewebe	21
3.5.3 Schneiden von dekalzifiziertem Zahnhartgewebe	21
3.5.4 Färbung von dekalzifiziertem Zahnhartgewebe	22
3.6 Lichtmikroskopische Untersuchung von Zahnhartgewebe	23
3.7 Beeinflussung der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe	23
3.7.1 Veränderung der Konzentration der Entkalkungsflüssigkeit	24
3.7.2 Kombination verschiedener Lösungen	24
3.7.3 Erhöhung der Temperatur	25
3.7.4 Weitere Maßnahmen	27

3.8	Ultraschall	27
3.8.1	Physikalische Grundlagen	27
3.8.2	Einfluss von Ultraschall auf die Dekalzifikation von Zahnhartgewebe	28
4	Aufgabenstellung	29
5	Material und Methode	31
5.1	Probenauswahl	31
5.2	Selektierung	32
5.2.1	Selektierung intakter, kariesfreier Zähne	32
5.2.2	Selektierung demineralisierter, kariöser Zähne	32
5.3	Gruppeneinteilung	33
5.4	Lagerung der Zähne	34
5.5	Dekalzifikation	35
5.5.1	Entkalkungsmedien	35
5.5.2	Konventionelles Vorgehen	35
5.5.3	Vorgehen unter Verwendung von Ultraschall und Variabilität der Temperatur	36
5.5.3.1	Ultraschallgerät	36
5.5.3.2	Gerätespezifisches Vorgehen	37
5.6	Untersuchungsmethoden	39
5.6.1	Quantitative Untersuchung	39
5.6.2	Qualitative Untersuchung	39
5.7	Statistische Auswertung	40
6	Ergebnisse	42
6.1	Quantitative Auswertung	42
6.1.1	Einfluss von Ultraschall auf die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe	49
6.1.2	Einfluss der Entkalkungstemperatur auf die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe	51
6.1.3	Einfluss des Entkalkungsmediums auf die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe	53

6.1.4 Einfluss von Karies auf die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe	55
6.1.5 Einfluss des Zahntyps auf die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe	57
6.2 Qualitative Auswertung	59
6.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	62
7 Diskussion	63
7.1 Diskussion von Material und Methode	63
7.1.1 Zahnproben	63
7.1.2 Gruppeneinteilung	65
7.1.3 Probenlagerung	66
7.1.4 Entkalkungsmedien	66
7.1.5 Konventionelle Dekalzifikation	67
7.1.6 Dekalzifikation unter Verwendung von Ultraschall und Variabilität der Temperatur	68
7.1.7 Bestimmung des Endpunktes der Dekalzifikation	69
7.1.8 Histotechnische Aufbereitung	71
7.1.9 Lichtmikroskopische Untersuchung	72
7.2 Diskussion der Ergebnisse	72
7.2.1 Quantitative Auswertung	72
7.2.1.1 Einfluss von Ultraschall auf die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe	72
7.2.1.2 Einfluss der Entkalkungstemperatur auf die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe	74
7.2.1.3 Einfluss des Entkalkungsmediums auf die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe	75
7.2.1.4 Einfluss von Karies auf die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe	76
7.2.1.5 Einfluss des Zahntyps auf die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe	77
7.2.2 Qualitative Auswertung	78
8 Schlussfolgerung	80

9 Literaturverzeichnis	82
10 Anhang	90
10.1 Abkürzungsverzeichnis	90
10.2 Materialliste	91
11 Eidesstattliche Versicherung	93
12 Curriculum Vitae	94
13 Danksagung	95

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Die Dekalzifikation (Entkalkung) von Zahnhartgewebe ist erforderlich, um die Schneidbarkeit im Rahmen der Herstellung histologischer Schnittpräparate für die lichtmikroskopische Untersuchung zu gewährleisten. Konventionell werden Zähne durch Einlegen in Säure bei Raumtemperatur entkalkt. Im Routinebetrieb stellt dieser Prozess jedoch ein nicht standardisiertes Verfahren ohne verlässliche Vorhersagbarkeit der Entkalkungsdauer dar.

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Dauer der Dekalzifikation von Zähnen unterschiedlicher Beschaffenheit unter Verwendung verschiedener Entkalkungsmedien zu evaluieren und im Speziellen den Einfluss von Ultraschall unterschiedlicher Intensität und Temperatur variabler Höhe zu fokussieren. Ermittelt werden sollte die geringste Entkalkungsdauer unter qualitativer Beurteilung der Schnittpräparate.

Im Rahmen der Versuche wurden 126 menschliche, kariesfreie und kariöse Zähne unterschiedlicher Zahntypen (*Dentes incisivi*, *Dentes canini*, *Dentes sapientiae*) untersucht. Die Zähne wurden in 21 Gruppen zu je 6 Proben aufgeteilt. Die Zahnproben der ersten Studiengruppe entkalkten konventionell bei Raumtemperatur durch Einlegen in 7%ige Salpetersäure, 50%ige Ameisensäure und Decal[®]-Lösung. Durch ein Ultraschallgerät wurden die Faktoren Ultraschall und Temperatur anschließend in die Versuche miteinbezogen: Die Dekalzifikation erfolgte unter Verwendung der genannten Medien bei Ultraschalleistungen von 90 W und 180 W und Entkalkungstemperaturen von 17° C, 24° C und 35° C. Die Dekalzifikation galt als beendet, wenn die Proben mit einem Skalpell teilbar waren (physikalische Prüfung), die ermittelte Entkalkungsdauer in Stunden wurde erfasst. Der geteilte Zahn wurde in Paraffin eingebettet, mit einem Mikrotom geschnitten und Hämatoxylin-Eosin gefärbt, eine lichtmikroskopische Beurteilung erfolgte im Anschluss.

Mit zunehmender Ultraschalleistung des Ultraschallgerätes verringerte sich die Dauer der Dekalzifikation der Zähne; es bestanden signifikante Unterschiede zwischen einer Ultraschalleistung von 90 W und 180 W.

Durch einen Anstieg der Temperatur konnte die Entkalkungsdauer verkürzt werden; dies belegten die signifikanten Unterschiede zwischen den Entkalkungstemperaturen 17 °C und 35 °C.

Die Verwendung 7%iger Salpetersäure erzielte die geringste Entkalkungsdauer, gefolgt von Decal[®]-Lösung. Mit 50%iger Ameisensäure ergab sich eine signifikant verlängerte Dekalzifikationsdauer, bei konventionell mit Ameisensäure entkalkten Zähnen trat eine Mazeration ein.

Der Vergleich kariesfreier und kariöser Probestkörper und der verschiedenen Zahntypen zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Entkalkungsdauer.

Nach Abschluss der Dekalzifikation konnten 120 Schnittpräparate angefertigt werden. Sie wiesen eine einheitliche Hämatoxylin-Eosin-Färbung auf, lichtmikroskopisch ließen sich Dentin- und Zementstrukturen nachweisen. 6 konventionell mit Ameisensäure entkalkte Zähne konnten nicht aufbereitet werden.

Entscheidend für die Verringerung der Dekalzifikationsdauer ohne qualitative Beeinträchtigung des Präparats ist die Kombination der genannten Faktoren: Es empfiehlt sich eine Entkalkung unter Verwendung von Ultraschall hoher Leistung (180 W) bei einer Temperatur von 35 °C. 7%ige Salpetersäure und Decal[®]-Lösung sind als geeignete Entkalkungsmedien anzusehen.

1.2 Summary

Decalcification of the calcified tissues of teeth is necessary in order to prepare them for microscopic examination. A common decalcifying method includes immersing the teeth in acids at room temperature. This procedure usually leads to a variation in time required for decalcification, disallowing a standardisation of the process.

The aim of the present study was to evaluate the time required for decalcification of teeth that show a variety of their type and structure and to compare the efficacy of different decalcifying agents. Furthermore the impact of ultrasound and temperature on accelerating the process was focussed in order to evaluate a fast teeth decalcification method.

126 human carious and non-carious teeth of different types (Dentes incisivi, Dentes canini, Dentes sapientiae) were divided into 21 groups of 6 teeth. The specimen of the

first group were decalcified in 7% nitric acid, 50% formic acid and Decal[®]-solution at room temperature. In the following groups the influence of ultrasound and temperature was focussed, using an ultrasonic device: Teeth were immersed in the three agents and decalcified under the influence of ultrasonic power (90 W, 180 W) and different temperatures (17 °C, 24 °C, 25 °C). The end point of decalcification was determined by physical method, cutting the specimen with a scalpel. They were embedded in paraffin, sectioned by microtome, stained with haematoxylin-eosin and observed under the light microscope.

It was observed that under the influence of ultrasound decalcification was accelerated; shown by the significant differences of the time required for decalcification between 90 W and 180 W.

With an increase of the temperature decalcification was faster; proved by a significant difference between 17 °C and 35 °C.

It was found that 7% nitric acid was the fastest decalcifying agent followed by Decal[®]-solution. The time required for decalcification was the longest using 50% formic acid, maceration was observed at room temperature.

There was no significant difference related to the required time of decalcification between carious and non-carious specimen nor between the different types of teeth.

120 specimen were subjected to tissue processing and showed uniformity of staining and preservation of tissue morphology. 6 specimen that were decalcified with formic acid at room temperature could not be processed histologically.

Accelerating the process of decalcification, the combination of ultrasound (180 W), high temperature (35 °C) and 7 % nitric acid or Decal[®]-solution can be considered as a fast decalcification method that does not affect the histologic specimen.

2 Einleitung

Für die lichtmikroskopische Untersuchung von Zähnen ist in der Routinehistologie eine Dekalzifikation (Entkalkung) der Zahnhartsubstanz erforderlich, um die Schneidbarkeit des Präparats mit Hilfe eines Mikrotoms zu gewährleisten und ein histologisches Schnittpräparat anfertigen zu können.

Die konventionelle Dekalzifikation eines Zahnes erfolgt durch Einlegen eines Präparats in eine Entkalkungslösung bei Raumtemperatur, es erfolgt die Entfernung von Kalziumsalzen aus dem Zahnhartgewebe. Die Dauer des Entkalkungsprozesses hängt von der Beschaffenheit des Präparats, der verwendeten Entkalkungsflüssigkeit und der Entkalkungstemperatur ab.

In der Praxis sollte bei möglichst hoher Entkalkungsgeschwindigkeit eine gute Schneidbarkeit des Zahnhartgewebes erreicht werden, ohne dabei die Färbbarkeit des Präparats und die originären Gewebestrukturen zu beeinträchtigen. Im Routinebetrieb stellt der Dekalzifikationsprozess jedoch ein Problem dar; er ist nicht standardisiert und nimmt ohne eine verlässliche Vorhersagbarkeit eine lange Bearbeitungszeit in Anspruch.

Um die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe zu verringern, bemüht man sich, Techniken zur Beeinflussung des Entkalkungsprozesses zu finden, die nicht mit Einbußen bezüglich der Färbbarkeit und der Integrität der Gewebe einhergehen. Diverse Studien beschäftigen sich mit dem Einfluss unterschiedlicher Entkalkungsflüssigkeiten und evaluieren den Einfluss ihrer Konzentration auf den Entkalkungsprozess, weitere Untersuchungen fokussieren den Einfluss der Temperatur auf die Beschleunigung der Dekalzifikation.

Moderne medizintechnische Geräte bieten die Möglichkeit, die Entkalkungsgeschwindigkeit durch die Anwendung von Ultraschall unterschiedlicher Intensität und die Variabilität der Entkalkungstemperatur zu beeinflussen. In der Literatur sind bezüglich der Evaluation der Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe keine Zusammenhänge zwischen den Faktoren Ultraschall und Temperatur unter Verwendung verschiedener Entkalkungsflüssigkeiten beschrieben.

Das Ziel der vorliegenden In-vitro-Studie ist es, die Dauer des Entkalkungsprozesses von Zähnen unterschiedlicher Beschaffenheit mit Hilfe von verschiedenen Entkalkungsmedien zu ermitteln. Das spezielle Interesse gilt dabei der Auswertung des

Einflusses von Ultraschall unterschiedlicher Leistung und der Höhe der Temperatur auf die Entkalkungsgeschwindigkeit. Ermittelt werden soll die geringste Entkalkungsdauer unter anschließender Begutachtung der Eignung der Proben für die histotechnische Bearbeitung, der Färbbarkeit des histologischen Schnittpräparats und des Erhalts der originären Gewebemorphologie.

3 Literaturübersicht

In der Routinehistologie sind die verwendeten Geräte auf ein bestimmtes Maß an Gewebehärte eingestellt, so dass Paraffinschnitte zur lichtmikroskopischen Untersuchung von den meisten Gewebetypen ohne vorherige Bearbeitung mit den üblichen Mikrotomen hergestellt werden können (Lang 2006). Hartsubstanzhaltige Gewebe sind nicht schneidbar und können das Messer beschädigen (Burck 1988). Für die lichtmikroskopische Untersuchung von Zähnen ist daher eine Dekalzifikation der Hartsubstanzen erforderlich, um Präparate zu erhalten, die mit Mikrotomen geschnitten werden können (Menzel 1975, Lynch und Raphael 1983).

3.1 Zusammensetzung und Aufbau der Zahnhartgewebe

3.1.1 Zahnschmelz

Ausgereifter Zahnschmelz ist das härteste und am stärksten mineralisierte Zellprodukt des menschlichen Körpers. Seine Zusammensetzung verteilt sich auf den Wassergehalt, die organische Matrix und den kristallinen Anteil. Im ausgereiften Schmelz beträgt der Wassergehalt 4 Prozent seines Gewichts und 12 Prozent seines Volumens. Das Wasser ist überwiegend an Apatitkristalle in Form einer Hydratationsschale gebunden. Etwa $\frac{1}{4}$ des Wassergehalts ist frei in der organischen Matrix verfügbar. Die organische Matrix ist zu 1 Gewichtsprozent und 2 Volumenprozent vorhanden und besteht aus löslichen und unlöslichen Proteinen, Kohlenhydrat- und Lipidanteilen. Im inneren Drittel des Schmelzmantels findet sich der größte Anteil der organischen Substanz, angeordnet in Form von Schmelzbüscheln und Schmelzlamellen. Die Hauptbestandteile des kristallinen Anteils, der 95 Gewichtsprozent und 86 Volumenprozent des ausgereiften Schmelzes ausmacht, sind Kalzium und Phosphor. Das Verhältnis zwischen Kalzium und Phosphor schwankt zwischen 1,8 und 2,4. Des Weiteren weist Zahnschmelz geringe Anteile von Natrium, Magnesium, Chlor und Kalium auf. Das Schmelzmineral liegt als Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) vor, Fluoridionen oder Chloridionen substituieren die Hydroxylgruppen des Apatits. Die Mineraldichte beschreibt den Volumenanteil, der von den Schmelzkristalliten eingenommen wird und schwankt in den verschiedenen Bereichen des Schmelzmantels. Hohe Mineraldichten finden sich in der Mitte des Schmelzmantels und der Seitenflächen. Entlang der Fissuren, im Bereich der Schmelz-Dentin-Grenze und im zervikalen Schmelz ist die Mineraldichte vermindert. Die

Schmelzdicke ist variabel und reicht bei bleibenden Zähnen von wenigen Mikrometern am Zahnhals bis zu 3 mm im Bereich der Inzisalkanten und Höckerspitzen. Zahnschmelz ist in begrenztem Umfang permeabel, so können Moleküle sowohl von außen, als auch von der Pulpa aus durch die Schmelz-Dentin-Grenze in den Zahnschmelz eindringen. Als zellfreies Materialgefüge weist Zahnschmelz keinen physiologischen Metabolismus auf, es können jedoch chemische Veränderungen stattfinden, die seine Zusammensetzung beeinflussen (Radlanski 2011).

3.1.2 Dentin

Die chemische Zusammensetzung des Dentins unterscheidet sich grundlegend von der des Zahnschmelzes. Dentin besteht zu 10 Prozent seines Nassgewichts und 25 Prozent seines Volumens aus Wasser, zu 20 Gewichtsprozent und 20 Volumenprozent aus organischer Matrix, der Mineralanteil beträgt 70 Gewichtsprozent und 46 Volumenprozent. Die organische Matrix besteht zum größten Teil aus Fasern, die in eine amorphe Grundsubstanz eingebettet sind. Diese Fasern bestehen zu 90 Prozent aus Kollagen und zu 10 Prozent aus einer nichtkollagenen Grundsubstanz. Es handelt sich dabei größtenteils um Kollagen vom Typ I, des Weiteren um Kollagen vom Typ V und Typ III. Die nichtkollagene Matrix beinhaltet Proteoglykane, Glykoproteine, Sialoproteine, Mukoproteine, Phosphoproteine, Chondroitinsulfat, Lipide, Zitrat und Laktat. Der Mineralanteil des Dentins ist aus Hydroxylapatitkristallen aufgebaut, bestehend aus Kalzium und Phosphor in einem Gewichtsverhältnis von 1:2,13. Weitere Bestandteile des Dentins sind Karbonate, Magnesium und Spurenelemente. Das zirkumpulpale Dentin zeigt insgesamt einen homogenen Mineralgehalt. Geringer mineralisiert sind das Manteldentin und das Interglobulardentin, das peritubuläre Dentin zeigt hingegen eine stärkere Mineralisation. Entlang seiner tubulären Strukturen ist Dentin permeabel. Die Permeabilität ist in dickeren Dentinanteilen geringer und nimmt mit zunehmenden Alter im Rahmen der Sklerosierung ab (Radlanski 2011).

3.1.3 Wurzelzement

Von allen drei Zahnhartsubstanzen ist das Wurzelzement am wenigsten dicht mineralisiert und gleicht in seiner chemischen Zusammensetzung dem Knochen. Wurzelzement besteht zu 12 Prozent seines Gewichts und 36 Prozent seines Volumens aus Wasser, zu 27 Gewichtsprozent und 31 Volumenprozent aus organischer Matrix und besitzt einen Mineralgehalt von 61 Gewichtsprozent und 33 Volumenprozent.

Kollagen vom Typ I stellt den Hauptbestandteil der organischen Matrix dar. Das Zementmineral besteht aus den Hauptkomponenten Kalzium und Phosphor. In Abhängigkeit von der Lokalisation des Zements variiert das Kalzium-Phosphor-Gewichtsverhältnis. Wurzelzement ist in variablem Ausmaß permeabel. Azelluläres Fremdfaserzement wird entlang der einstrahlenden Sharpey-Fasern von wässrigen Farbstoffen durchdrungen. Die Lakunen und Kanälchen der Zementozyten des zellulären Gemischtfaserzements stellen Wege für eindringende Flüssigkeit dar. Die Permeabilität nimmt mit zunehmendem Alter ab (Radlanski 2011).

3.2 Dekalzifikation von Zahnhartgewebe

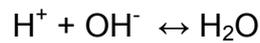
Die Entfernung von Kalziumsalzen aus einer Substanz wird als Dekalzifikation oder Entkalkung bezeichnet (Lynch und Raphael 1983, Lautenbach 1992). Physiologischerweise mineralisiertes oder pathologisch kalzifiziertes Gewebe kann im Rahmen der histotechnischen Verarbeitung mit Mikrotomen nicht zufriedenstellend geschnitten werden. Aus derartigem Gewebe müssen zur optischen Darstellung nichtgelöste, anorganische Kalziumsalze chemisch herausgelöst werden (Drury und Wallington 1980, Lang 2006). Die Dekalzifikation von Hartgeweben, so auch von Zahnhartgewebe, wird mittels entkalkifizierenden Säuren oder chelatbildenden Reagenzien durchgeführt (Bancroft 2002, Böcker et al. 2008). Die Dauer, die die Dekalzifikation beansprucht, variiert in Abhängigkeit von der verwendeten Entkalkungsflüssigkeit und ihrer Konzentration (An und Martin 2003).

3.2.1 Dekalzifikation von Zahnhartgewebe durch Säure

Das Einlegen in Säure gilt als gebräuchlichste Technik der Dekalzifikation von Hartgewebe (Cook und Ezra-Cohn 1962). Ziel der Entkalkung von menschlichen Zähnen durch Säuren ist die Entfernung der Mineralsalze der anorganischen Substanz, damit das Zahnhartgewebe schneidbar gemacht werden kann. Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ist Hauptbestandteil der anorganischen Substanz des Zahnhartgewebes und liegt im nassen Zustand im Gleichgewicht mit seiner gesättigten Lösung vor:



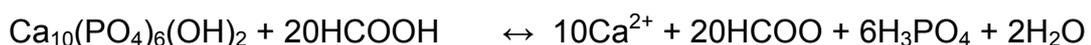
Werden Kalzium-, Phosphat- oder Hydroxylionen kontinuierlich von der rechten Seite entfernt, wird das Reaktionsgleichgewicht nicht erreicht. Die Reaktion wird solange von links nach rechts ablaufen, bis sich der Apatit auflöst. Eine hohe Konzentration an Wasserstoffionen (H^+) in einer umgebenden Flüssigkeit führt zu folgender Reaktion mit den Hydroxylionen des gelösten Apatits:



Die Hydroxylionen werden somit der oben genannten Reaktion entzogen, der Hydroxylapatit der anorganischen Zahnhartsubstanz wird aufgelöst. Säuren stellen eine Quelle für Wasserstoffionen dar und dienen somit als Entkalkungsflüssigkeit (Lang 2006).

In der Literatur finden eine Vielzahl an Säuren, die als Entkalkungsflüssigkeit dienen, Erwähnung. Nossek beschreibt als übliche Methode die Entkalkung von Zähnen mit 5%iger Salpetersäure (Nossek 1965). Burck nennt als Entkalkungsflüssigkeiten 5-7,5%ige Salpetersäure, 5%ige Trichloressigsäure, konzentrierte Ameisensäure und 5%ige schweflige Säure und empfiehlt die Zahnentkalkung mit konzentrierter Ameisensäure (Burck 1988). Lang unterscheidet zwischen der Entkalkung mit schwachen Säuren (Essigsäure und Pikrinsäure als Bestandteil von Fixierlösungen, Zitronensäure), starken organischen Säuren (Ameisensäure, Milchsäure, Trichloressigsäure) und starken anorganischen Säuren (Salpetersäure, Salzsäure) und gibt als gebräuchlichste Säuren Ameisensäure, Salpetersäure und Salzsäure an (Lang 2006). Folgende Reaktionen laufen im Rahmen der Dekalzifikation von Hartgewebe unter Verwendung der Entkalkungsflüssigkeiten Ameisensäure, Salpetersäure und Salzsäure ab (Lang 2006):

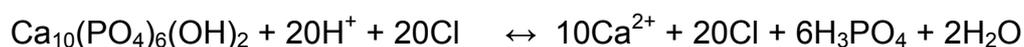
- Ameisensäure:



- Salpetersäure:



- Salzsäure:



Das gelöste Kalzium findet sich in Form von gelösten Kalzium-Ionen in der Entkalkungsflüssigkeit wieder (Lang 2006). Die entkalkende Säure wird durch Bildung ihrer Kalzium-Salze verbraucht (Burck 1988). In Folge dessen ist eine regelmäßige Erneuerung der Entkalkungsflüssigkeit nötig, damit die Dekalzifikation nicht stagniert. Burck gibt einen täglichen Wechsel der Säure an (Burck 1988), auch Lang beschreibt die Notwendigkeit, die Entkalkungsflüssigkeit alle 24 Stunden auszutauschen (Lang 2006).

Das Mengenverhältnis von Gewebe zu säurehaltiger Entkalkungsflüssigkeit soll 1:20 betragen (Lang 2006). Singh und Sircar und Afreen Nadaf et al. verwenden zur Entkalkung von Zähnen jeweils 100 ml einer dekalzifizierenden, säurehaltigen Lösung (Singh und Sircar 2010, Afreen Nadaf et al. 2011).

Burck gibt allgemein eine Eindringungsgeschwindigkeit der Entkalkungsflüssigkeiten von 1-2 cm in 2-4 Tagen an, die Angaben über die Entkalkungsdauer bei Raumtemperatur variieren von einem bis mehreren Tagen (Burck 1988). Lang verweist auf eine Entkalkungsdauer für starke Säuren von 24-48 Stunden und für schwache Säuren von 9-10 Tagen (Lang 2006). Die Dauer der Entkalkung durch Säuren ist Gegenstand verschiedener In-Vitro-Untersuchungen: Maurine William erzielte eine durchschnittliche Entkalkungsdauer von 7-9 Tagen für die Entkalkung eines Zahnes mit 5%iger Salpetersäure (Maurine William 1937). Nossek gibt eine Entkalkungsdauer von 48 Stunden für die Entkalkung von Zähnen mit 5%iger Salpetersäure bei Raumtemperatur an (Nossek 1965). Singh und Sircar beobachteten eine Entkalkungsdauer von 3-6 Tagen bei der Entkalkung von Prämolaren mit 10%iger Salpetersäure und eine Entkalkungsdauer von 7-9 Tagen bei der Dekalzifikation mit 10%iger Ameisensäure bei Raumtemperatur (Singh und Sircar 2010). Afreen Nadaf et al. untersuchten den Entkalkungsprozess kariesfreier Molaren in 5%iger Salpetersäure bei Raumtemperatur und geben eine Dauer von 20 Stunden an (Afreen Nadaf et al. 2011).

Da Zahnschmelz überwiegend aus anorganischem Material besteht, das bei der Dekalzifikation aufgelöst wird, ist dieser nach Abschluss der Entkalkung nicht mehr vorhanden. Die Entkalkung des Zahnes bewirkt, dass der Schmelz sich auflöst und folglich nicht mehr darstellbar ist (Steiniger et al. 2010). Dentin und Wurzelzement bleiben aufgrund ihres höheren Anteils an organischen Bestandteilen erhalten und lassen sich nach der histotechnischen Aufbereitung lichtmikroskopisch darstellen.

Neben der Entfernung der mineralischen Komponenten des anorganischen Anteils der Zahnhartsubstanz haben Säuren auch einen Effekt auf die organische Matrix des Zahnes (Mjör 1973). Säuren wirken nicht ausschließlich auf Hydroxylapatit, sondern beeinflussen das Gewebe im Allgemeinen. Folge ist eine Hydrolyse der Nukleinsäuren und eine daraus resultierende schlechtere Anfärbbarkeit für Hämatoxylin (Lang 2006). Je länger die Einwirkung einer Säure auf die Zahnhartsubstanz, desto reduzierter ist die Quantität der DNA des Gewebes (Sowmya et al. 2013).

3.2.2 Dekalzifikation von Zahnhartgewebe durch Chelatbildung

Chelatbildner sind Verbindungen, die die Fähigkeit besitzen, sich mit einem Metallion zu einem Chelat zu verbinden und ringförmige Komplexe zu bilden, wobei eine stabile kovalente Bindung des Metallatoms innerhalb eines Fünfer- oder Sechseringes entsteht (Lang 2006, Reiche 2009). Ein chelatbildendes Reagens, das im Überschuss vorhanden ist, bindet Metallionen. Ethylendiamintetraacid (EDTA) bildet in Kontakt mit Kalzium stabile Chelatverbindungen, es kommt zum Einbau des Kalziums in einen elektronegativen Komplex (Burck 1988).

Befindet sich Zahnhartgewebe in einer EDTA-Lösung, so werden freie Kalziumionen durch EDTA gebunden. Um das Reaktionsgleichgewicht zwischen ungelöstem und gelöstem Apatit wiederherzustellen, werden Kalziumionen aus dem Zahn kontinuierlich freigegeben, der Apatit löst sich folglich auf (Lang 2006). Da die Reaktion im schwach alkalischen Bereich ohne den Einfluss von Wasserstoffionen verläuft, werden Enzyme und Nukleinsäuren nicht beeinflusst. Die Entkalkung mit EDTA stellt daher im Vergleich zu der Entkalkung mit Säuren im Allgemeinen ein schonenderes Entkalkungsverfahren dar (Mjör 1973). Steht der Erhalt und Nachweis von Gewebestrukturen, zum Beispiel im Rahmen einer In-Situ-Hybridisierung zum Nachweis von Nukleinsäuren, im Mittelpunkt, geben Alers et al. der Dekalzifikation mit Hilfe von EDTA im Vergleich zu säurehaltigen Entkalkern den Vorzug (Alers et al. 1999). Weitere Autoren beschreiben ebenfalls einen guten Erhalt der Strukturen des mit EDTA entkalkten Gewebes (Matthews und Mason 1984, White et al. 1986, Athanasou et al. 1987).

Jedoch ist die Dauer der Dekalzifikation gegenüber der Entkalkung mit säurehaltigen Substanzen gesteigert: Singh und Sircar und Sanjai et al. verglichen in Untersuchungen die Entkalkung mit verschiedenen Entkalkungsflüssigkeiten, darunter verwendeten sie neben säurehaltigen Substanzen EDTA. Beide Studien kamen zu dem Ergebnis, dass die Entkalkung mit EDTA die langsamste darstellt, hinsichtlich der Qualität der

Gewebeproben ergaben sich die besten Ergebnisse (Singh und Sircar 2010, Sanjai et al. 2012). Sangeetha et al. erzielten ebenfalls die längste Entkalkungsdauer mit der Verwendung von EDTA im Vergleich zu Salpeter- und Ameisensäure; hinsichtlich des Erhalts der Gewebestrukturen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Sangeetha et al. 2013).

De-Deus et al. verwendeten zur Dekalzifikation von Molaren neben EDTA (Ethyldiamintetraacid) EDTAC (Ethyldiamintetraacid + Cetavlon) und CA (Citric acid, Zironensäure) als chelatbildende Reagenzien (De-Deus et al. 2008).

Die Dekalzifikation mit Chelatbildnern wird bei Raumtemperatur durchgeführt, ein Wechsel der Lösung im Abstand von 3-5 Tagen wird empfohlen (Lang 2006).

3.3 Vorbehandlung von Zahnhartgewebe im Rahmen der Dekalzifikation

Die histotechnische Verarbeitung von Hartgewebe beginnt mit einer Fixierung des zu entkalkenden Präparats, da sonst unfixiertes Gewebe von den Entkalkungsflüssigkeiten beschädigt werden kann (Pallaske und Schmidel 1959). Burck gibt an, dass das Gewebe vor der Dekalzifikation fixiert sein muss, da sonst eine Mazeration eintritt (Burck 1988).

Pallaske und Schmidel empfehlen die Fixierung mit Formalin als Fixierflüssigkeit, da dadurch das Quellen des Gewebes verringert werden kann (Pallaske und Schmidel 1959). Zappa et al. und Keklikogu et al. fixierten die zu entkalkenden Probekörper in ihrer In-Vitro Untersuchung zur Dekalzifikation von Zahnhartgewebe in einer 10%igen neutralgepufferten Formalinlösung (Zappa et al. 2005, Keklikoglu et al. 2013).

Das Mengenverhältnis zwischen Gewebe und Fixierflüssigkeit sollte dabei mindestens 1:20, die Fixierzeit mindestens 12 Stunden und maximal 48 Stunden betragen (Lang 2006). Singh und Sircar empfehlen eine Fixierdauer von mindestens 24 Stunden (Singh und Sircar 2010).

Phosphatpuffer von neutralgepuffertem Formalin als Fixiermedium kann jedoch der Säurewirkung der Entkalkungsflüssigkeit entgegenwirken; um dies zu vermeiden, empfiehlt Lang vor der Entkalkung eine ausgiebige Wässerung (Lang 2006). Nach Burck werden die besten Ergebnisse erreicht, indem nach Fixierung und Auswaschen die auf- und absteigende Alkoholreihe durchgegangen wird, um Niederschläge aus Säure und Formalin zu verhindern (Burck 1988).

3.4 Ermittlung des Endpunktes der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe

Die exakte Ermittlung des Endpunktes der Dekalzifikation ist im Rahmen der histotechnischen Aufbereitung von wesentlicher Bedeutung. Es muss zuverlässig sichergestellt werden, dass der Probekörper ausreichend entkalkt wurde, so dass zur anschließenden Verarbeitung übergegangen werden kann. Unvollständig entkalkte Areale des Hartgewebes verursachen Scharten im Mikrotommesser (Pallaske und Schmidel 1959). Gleichzeitig muss vermieden werden, dass die morphologischen Strukturen durch eine übermäßige Dekalzifikation geschädigt werden. Ist der exakte Zeitpunkt der Entkalkung ermittelt, sollten die Probekörper eine Radiergummikonsistenz aufweisen (Berg 1972).

3.4.1 Physikalische Prüfung

Den Endpunkt der Entkalkung ermittelt man durch Schneiden (Burck 1988). Der Probekörper muss dabei mit Hilfe eines Messers oder Skalpells ohne Widerstand zu durchdringen sein. Alternativ kann an einem gleichgroßen Vergleichsstück die Entkalkung durch Einschneiden geprüft werden; es wird davon ausgegangen, dass der Probekörper in gleichem Maß entkalkt ist wie das Vergleichsstück (Lang 2006).

Analog zur Schneidbarkeit mit Hilfe eines Messers kann das Durchdringen des Probekörpers mit einer Nadel getestet werden (Nadelstichprobe). Zur Prüfung wird dieser mit einer feinen Nadel ohne starken Widerstand durchdrungen (Pallaske und Schmidel 1959).

Zappa et al. prüften die Effektivität der Entkalkung in einem Intervall von 8 Stunden; diese galt als abgeschlossen, wenn eine Nadel durch den gesamten Probekörper geführt werden konnte (Zappa et al. 2005).

3.4.2 Chemische Prüfung

Durch einen kontinuierlichen Wechsel der verwendeten Entkalkungsflüssigkeit werden gelöste Kalziumionen entfernt. Die Dekalzifikation ist demnach abgeschlossen, wenn keine freien Kalziumionen in der umgebenden Flüssigkeit mehr vorhanden sind. Der Ammoniumoxalat-Test stellt eine Möglichkeit dar, das Vorhandensein von Kalziumionen und somit den Entkalkungsprozess chemisch zu überprüfen und eignet sich sowohl für säureentkalkte als auch für EDTA-entkalkte Proben. Ammoniumoxalat bildet in einer Lösung mit Kalzium ein unlösliches Salz. Tritt nach Zugabe einer Ammoniumoxalat-Lösung in die Entkalkungsflüssigkeit eine Trübung durch Bildung von Kalziumoxalat

auf, sind noch Kalziumionen vorhanden, die Entkalkung muss fortgesetzt werden. Der Entkalkungsprozess gilt als abgeschlossen, wenn bei Zugabe der Lösung keine Trübung mehr auftritt (Lang 2006).

Sanjai et al. fügten den untersuchten Entkalkungsflüssigkeiten eine Ammoniumoxalat-Lösung hinzu, beobachteten für einen Zeitraum von 30 Minuten, ob diese klar blieb und ermittelten somit den Endpunkt der Entkalkung (Sanjai et al. 2012).

3.4.3 Röntgenologische Prüfung

Der Endpunkt der Dekalzifikation kann mit Hilfe von Röntgenaufnahmen der zu entkalkenden Hartgewebe und der Beurteilung des Röntgenschattens überprüft werden (Burck 1988). Die Gewebedichte der Zahnhartgewebe wird mit einem Röntgengerät beurteilt (Lang 2006). Menzel fertigte in Untersuchungen zur Kontrolle des Entkalkungsvorganges in stündlichen Abständen Aufnahmen mit einem Dental-Röntgen-Gerät bei einem konstanten Fokus-Film-Abstand von 12 cm an und prüfte die Breite der noch verkalkten Hartschicht im gingivalen Kronendrittel (Menzel 1975). Singh und Sircar führten neben der physikalischen und chemischen Prüfung der Probekörper täglich eine radiologische Kontrolle mit einem Fokus-Film-Abstand von 15 cm durch bis der Endpunkt der Dekalzifikation ermittelt war (Singh und Sircar 2010).

3.5 Nachbehandlung und histotechnische Aufbereitung von Zahnhartgewebe im Rahmen der Dekalzifikation

3.5.1 Wässerung von dekalzifiziertem Zahnhartgewebe

Nach Abschluss der Dekalzifikation folgt die Entfernung der Entkalkungsflüssigkeit durch Auswaschen (Burck 1988). Lang empfiehlt eine ausgiebige Wässerung, um zu vermeiden, dass EDTA unlösliche Präzipitate in alkoholischen Lösungen bildet und säurehaltige Entkalkungsflüssigkeiten mit Formaldehyd giftige Dämpfe entwickeln (Lang 2006). Während des Wässerns ist ein Quellen der Kollagenfasern zu vermeiden; Burck gibt daher an, vorab eine Kollagenhärtung mit 5%iger Natrium- oder Lithiumsulfatlösung durchzuführen (Burck 1988).

Singh und Sircar reinigten zur Entfernung der Entkalkungsflüssigkeiten die Probekörper jeweils 2-3 Stunden unter fließendem Wasser (Singh und Sircar 2010). Sangeetha et al. empfehlen die Verwendung von destilliertem Wasser für 30 Minuten (Sangeetha et al. 2013). Sanjai et al. spülten die entkalkten Zähne für jeweils 10 Minuten unter fließendem Wasser (Sanjai et al. 2012).

3.5.2 Einbettung von dekalzifiziertem Zahnhartgewebe

Das dekalzifizierte Gewebe wird im Rahmen der Herstellung von Schnittpräparaten einer Einbettung unterzogen, bevor es geschnitten werden kann. In der Routinehistologie werden entkalkte Zähne in derselben Weise wie andere Gewebe mit Paraffin infiltriert. Stabilität und Gleichmäßigkeit der Konsistenz des Materials sind Voraussetzungen, um Schnitte der entkalkten Probekörper herstellen zu können. Um diese zu gewährleisten, trinkt man das entkalkte Gewebe in heißem Paraffinwachs und lässt es anschließend erstarren. Paraffin ist nicht wasserlöslich, so dass das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert werden muss, ein Intermediärmedium entfernt dabei den Alkohol. Die infiltrierten Gewebestücke werden im Anschluss zu einem Paraffinblock verarbeitet. Hartes Gewebe soll beim Ausgießen so orientiert sein, dass die Längsseite parallel zur Schneiderichtung liegt (Lang 2006).

3.5.3 Schneiden von dekalzifiziertem Zahnhartgewebe

Um die entkalkten und eingebetteten Probekörper einer lichtmikroskopischen Untersuchung unterziehen zu können, werden Schnittpräparate angefertigt. Die Herstellung von dünnen Schnitten (ca. 5-8 μm) erfolgt mit Hilfe von speziellen Maschinen, sogenannten Mikrotomen (Welsch 2006). Zum Schneiden von Zahnhartsubstanz werden Mikrotome mit Messern für hartes Gewebe verwendet. Bei der Anfertigung der Schnitte ist die genaue Orientierung nach den Hauptrichtungen des Zahnes (radial, quer, tangential) zu beachten (Schmidt und Keil 1958).

Aufgrund der dichten kollagenen Strukturen der Zahnhartsubstanz kann sich das Schneiden der Probekörper trotz der Entkalkung schwierig gestalten (Lang 2006). Unvollständig entkalkte Areale werden oftmals erst beim Schneiden bemerkt. Um die histotechnische Verarbeitung dennoch fortführen zu können, besteht die Möglichkeit, die Oberfläche des bereits eingeblockten Gewebes mit Hilfe der Einwirkung von Säuren zu entkalken. Dazu wird die oberflächliche Paraffinschicht entfernt und das Gewebe für kurze Zeit mit Säure bedeckt. Burck beschreibt das „Anentkalken“ in konzentrierter Ameisensäure, kommt bei einem Paraffinblock unerwartet während des Schneides eine verkalkte Stelle zum Vorschein (Burck 1988).

Singh und Sircar beobachteten, dass einige Probekörper trotz chemischer und röntgenologischer Ermittlung des Endpunktes der Dekalzifikation nicht weich genug waren, um geschnitten werden zu können und führten die Entkalkung für weitere 24 Stunden fort (Singh und Sircar 2010).

3.5.4 Färbung von dekalzifiziertem Zahnhartgewebe

Die mit Hilfe eines Mikrotoms geschnittenen und auf Objektträgern aufgebrauchten Präparate müssen zur besseren Kontrastierung der einzelnen Zell- und Gewebestandteile gefärbt werden (Welsch 2006).

In der Histologie und Histopathologie wird zur Beurteilung der morphologischen Strukturen und pathologischen Veränderungen des Gewebes eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung als Standardfärbung durchgeführt, mit der eine gute Darstellung des Gewebes gelingt. Als Übersichtsfärbung wird auch für dekalzifizierte Hartgewebe eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung empfohlen, die die Beurteilung morphologischer Strukturen und pathologischer Veränderungen zulässt (Lang 2006).

Hämatoxylin färbt Zellkerne und Zytoplasmaanteile, die reich an rauem endoplasmatischem Retikulum sind, blau-violett. Eosin färbt andere Zytoplasmaanteile sowie faserige extrazelluläre Komponenten rot, elastische Fasern erscheinen ungefärbt bis rosa (Welsch 2006). Dentin und Zement stellen sich aufgrund ihrer Kollagenfasern folglich rot dar.

Der Prozess der Dekalzifikation kann einen Einfluss auf die Anfärbbarkeit des Präparats und die Einheitlichkeit der Färbung nehmen. Säuren haben neben der Entfernung der mineralischen Komponenten der Zahnhartsubstanz auch einen Effekt auf die organische Matrix mit der möglichen Folge der Hydrolyse der Nukleinsäuren, woraus eine schlechtere Anfärbbarkeit resultieren kann (Stevens et al. 1990, Callis und Sterchi 1998). Weitere Autoren berichten von einer gelblichen Verfärbung der Präparate bei einer verlängerten Dekalzifikation mit Salpetersäure (Moore 1994, Culling et al. 1984).

Bei der Beurteilung verschiedener Entkalkungsmedien muss daher neben der Dauer der Dekalzifikation auch die Begutachtung der Färbung im Fokus der Aufmerksamkeit stehen. Sanjai et al. verglichen die Anfärbbarkeit der Präparate mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach der Dekalzifikation mit unterschiedlichen Entkalkungsflüssigkeiten und kamen zu dem Ergebnis, dass mit EDTA entkalkte Präparate die beste Qualität hinsichtlich der Anfärbbarkeit der Gewebe aufwiesen, während mit säurehaltigen Lösungen dekalzifizierte Zähne weniger gut anfärbbar waren (Sanjai et al. 2012). Die Einheitlichkeit der Färbung wurde in Untersuchungen von Singh und Sircar begutachtet; darin wiesen mit EDTA entkalkte Zähne gegenüber mit säurehaltigen Lösungen dekalzifizierten Zähnen eine einheitlichere Hämatoxylin-Eosin-Färbung auf (Singh und Sircar 2010).

Wijnbergen und Van Mullem untersuchten schwerpunktmäßig die Anfärbbarkeit grampositiver Bakterien nach Dekalzifikation von Zahnhartgewebe mit Salpetersäure, Ameisensäure und EDTA und evaluierten bei allen verwendeten Medien eine Reduzierung dieser (Wijnbergen und Van Mullem 1987).

3.6 Lichtmikroskopische Untersuchung von Zahnhartgewebe

Die histologische Untersuchung von Gewebestrukturen erfolgt routinemäßig mit einem Lichtmikroskop (Osborn und Ten Cate 1983). Zur Untersuchung von Hartgewebe kommen des Weiteren Elektronenmikroskope zum Einsatz (Arana-Chavez und Andia-Merlin 1998).

Beim üblichen Durchlichtmikroskop wird mittels eines Kondensors eine Lichtquelle in einem Objektiv abgebildet, wobei zwischen Kondensator und Objektiv das histologische Präparat in den Strahlengang der Lichtquelle eingeschoben wird. Das Objektiv entwirft ein vergrößertes Zwischenbild des Präparats im Tubus, das dann mit dem Okular als Lupe vergrößert betrachtet wird (Rohen und Lütjen-Drecoll 2000).

Die lichtmikroskopische Betrachtung der entkalkten Paraffinschnitte erlaubt die Begutachtung der Strukturen des Zahnes. Zahnschmelz ist nach der Dekalzifikation aufgrund seines hohen Anteils an anorganischer Substanz nicht mehr vorhanden und lässt sich im Gegensatz zu Dentin und Wurzelzement nicht darstellen. Im Bereich des Dentins bleibt das Kollagen erhalten; ähnlich wie das Dentin verhält sich das Zement (Welsch 2006).

Neben der Untersuchung der Zahnstrukturen in der Routinehistologie wird die lichtmikroskopische Untersuchung von entkalkten Zähnen in der Histopathologie eingesetzt, um pathologische Prozesse des Zahnes zu analysieren.

3.7 Beeinflussung der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe

Die Standardentkalkung von Zahnhartgewebe bei Raumtemperatur ohne den Einsatz von beschleunigenden Maßnahmen stellt einen langwierigen Prozess dar. Aus diesem Grund existieren in der Literatur vielfältige Angaben zu Techniken der Beschleunigung des Dekalzifikationsprozesses. Um die Entkalkungszeit zu verkürzen, aber auch um möglichst vollständig zu entkalken, wurden verschiedene Verfahren zur Beeinflussung der Dekalzifikation entwickelt (Menzel 1975). Eine Überbewertung der Entkalkungsgeschwindigkeit kann jedoch zu Einbußen bezüglich der Anfärbbarkeit und der Integrität der Gewebe führen.

3.7.1 Veränderung der Konzentration der Entkalkungsflüssigkeit

Die ersten Versuche der Beschleunigung des Entkalkungsprozesses beinhalten eine Erhöhung der Konzentration säurehaltiger Entkalkungsflüssigkeiten. Nossek vergleicht die Anwendung von 25%iger Salpetersäure als Schnellentkalkungsmittel mit der Standardverwendung 5%iger Salpetersäure und kommt zu dem Ergebnis, dass durch die Erhöhung der Konzentration zwar eine schnellere Entkalkung erzielt wird, diese aber mit einer beträchtlichen Gewebeschädigung verbunden ist. So konnte die Entkalkung von Zähnen je nach Zahngattung bei Zimmertemperatur nach ungefähr 3 Tagen abgeschlossen werden; das Ergebnis war eine noch mögliche Kernfärbung, aber stark aufgelöstes, zerrissenes Dentin, das eine Beurteilung des Gewebes nicht mehr zuließ (Nossek 1965).

Eine Erhöhung der Konzentration der Entkalkungsflüssigkeit führt zu einer schnelleren Dekalzifikation, aber auch zu einer vermehrten Gewebeschädigung (Lang 2006).

3.7.2 Kombination verschiedener Lösungen

Eine Möglichkeit, den Entkalkungsprozess zu beeinflussen, ist die Kombination verschiedener dekalzifizierender Lösungen. Als sogenannte Säuregemische kommen verschiedene Lösungen zum Einsatz: Als Schnellentkalkungsflüssigkeit empfiehlt Berg die Kombination aus einer 25- oder 32%igen Salzsäure, einer 85%igen Ameisensäure, Aluminiumchlorid und destilliertem Wasser (Berg 1972). Auch Nossek beschreibt die Verwendung eines Säuregemisches aus den Komponenten Salzsäure, Ameisensäure, Aluminiumchlorid und Aqua dest. und erzielt dabei eine geringe Verbesserung der Färbbarkeit der Präparate, die Entkalkungszeit verlängert sich jedoch gegenüber der Dekalzifikation mit 5%iger Salpetersäure (Nossek 1965). Unter der Bezeichnung *Morse's Solution* bekannt, ist eine aus Natriumcitrat und Ameisensäure bestehende Entkalkungsflüssigkeit (Morse 1945), die in den Untersuchungen von Shibata et al. Verwendung findet und als Standardentkalkungsflüssigkeit empfohlen wird (Shibata et al. 2000).

In der Histologie und Histopathologie hat sich zur Entkalkung von Hartgeweben die Kombination aus EDTA und dekalzifizierenden Säuren bewährt. Im Handel werden Schnellentkalkungslösungen unterschiedlicher Zusammensetzung angeboten (Lang 2006). Die unter dem Markennamen Decal[®] (Decal Chemical Corporation, Tallman, NY, USA) erhältliche Entkalkungslösung setzt sich aus den Komponenten Salzsäure, EDTA

und gereinigtem Wasser zusammen. Ihr Einfluss auf die Dekalzifikation von Zahnhartgewebe wurde bisher nicht eingängig untersucht.

Säuren werden zudem zur Beeinflussung ihrer Eigenschaften mit anderen Substanzen vermengt, die selbst keinen entkalkenden Einfluss auf das Zahnhartgewebe haben. Die Lösungen enthalten Alkohol oder Formaldehyd, um bei einer mangelhaften Fixierung der Gewebe während der Entkalkung einen Ausgleich zu schaffen (Lang 2006). Als Methode der Zahnentkalkung mit einer guten Kernfärbung empfehlen Pallaske und Schmidel die Kombination aus konzentrierter Ameisensäure und 10%igem Formalin (Pallaske und Schmidel 1959). Burck erwähnt, dass Zähne mit konzentrierter Ameisensäure in Kombination mit 70%igem Alkohol entkalkt werden (Burck 1988).

3.7.3 Erhöhung der Temperatur

Eine Temperaturerhöhung des den Probekörper umgebenden Mediums gegenüber der Raumtemperatur führt zu einer Erwärmung des Gewebes und beeinflusst den Entkalkungsprozess. Für die Reaktion chemischer Prozesse gilt die Regel, dass jede Reaktion durch eine Temperatursteigerung um 10 °C eine Verdoppelung der Reaktionsgeschwindigkeit erfährt (Nossek 1965, Verdenius und Alma 1958).

Durch Erhöhung der Temperatur besteht die Gefahr von Gewebeschädigung (Lang 2006). Myers et al. konnten beweisen, dass eine Temperatur von 600 °C einen destruktiven Einfluss auf Zahnhartgewebe hat und zu einer Veränderung in Form von Schrumpfung führt (Myers et al. 1999). Prakash et al. kamen in ihrer Studie über den Einfluss von Hitze auf extrahierte Zähne zu dem Ergebnis, dass sich bereits ab einer Temperatur von 300 °C signifikante Unterschiede in Bezug auf die Morphologie des Zahnes ergeben (Prakash et al. 2014). Um das Risiko einer Gewebeschädigung zu minimieren, entkalkten Bourque et al. Knochen und Zähne mit EDTA-Lösung bei einer Temperatur von -4 °C (Bourque et al. 1993).

Nossek erwärmte die Entkalkungsflüssigkeit mit dem Ergebnis, dass die Wärmewirkung einen wesentlichen Faktor für die schnellere Entkalkung von Hartgeweben darstellt und empfiehlt die Entkalkung bei 37 °C (Nossek 1965).

Eine Temperaturerhöhung wird durch mikrowellen-unterstützte Verfahren gewährleistet. Die Wärmeeinstrahlung der Mikrowellen, die eine bessere Penetration und Diffusion des Entkalkungsmediums ermöglicht, führt zu einer Reduktion der Entkalkungsdauer, dabei empfiehlt es sich, die Temperatur bei 37 °C zu halten (Boon und Kok 1987).

Balaton und Loget geben an, dass mit Hilfe mikrowellen-unterstützter Prozeduren die Dauer der Dekalzifikation von Knochenproben um den Faktor 11 verringert werden kann (Balaton und Loget 1989). Roncaroli et al. berichten von einer signifikanten Beschleunigung und einer Reduzierung der Dauer des Dekalzifikationsprozesses von Tagen auf Stunden (Roncaroli et al. 1991). Dabei haben die Mikrowellen keinen Einfluss auf die Qualität der histologischen Schnittpräparate (Mathai et al. 2008). Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Untersuchungen von Cunningham et al. und Pitol et al., die eine Reduzierung der Dekalzifikationsdauer und den Erhalt der Gewebemorphologie durch Mikrowellen nachweisen (Cunningham et al. 2001, Pitol et al. 2007).

Vongsavan et al. untersuchten die Effekte von Mikrowellenstrahlung auf die Dauer der Dekalzifikation von Ratten- und Katzenschneidezähnen in einer EDTA-Lösung in einem Mikrowellengerät bei einer Temperatur von 39 ± 2 °C und verglichen diese mit Kontrollproben in einem konventionellen Ofen bei 39 °C und Probekörpern, die bei Raumtemperatur entkalkten. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Verwendung des Mikrowellengeräts und des konventionellen Ofens, die Dekalzifikation wurde jedoch mit Hilfe beider Verfahren gegenüber der Dekalzifikation bei Raumtemperatur beschleunigt (Vongsavan et al. 1990).

Singh und Sircar verglichen in einer In-Vitro-Untersuchung die Dauer der Entkalkung von Prämolaren bei Raumtemperatur in Salpetersäure mit der Dekalzifikation in einem Mikrowellenofen bei einer Temperatur von 38-40 °C in Salpetersäure und erlangten mit Hilfe des mikrowellen-unterstützten Verfahrens mit einer durchschnittlichen Zeit von 2 Tagen die kürzeste Entkalkungsdauer ohne eine Gewebeschädigung zu verzeichnen (Singh und Sircar 2010).

Sangeetha et al. fokussierten in ihrer Studie die Dekalzifikation unter Verwendung von Mikrowellen mit Hilfe eines Mikrowellengerätes (700 W), erhöhten die Entkalkungstemperatur mit Hilfe dessen auf 41-43 °C und erlangten ebenfalls eine Verringerung der Entkalkungsdauer (Sangeetha et al. 2013).

Keithley et al. evaluierten, dass sich zur besonders schonenden Entkalkung in der Immunhistochemie die Kombination von Mikrowellen und EDTA-Lösung als Entkalkungsmedium eigne (Keithley et al. 2000).

3.7.4 Weitere Maßnahmen

Elektrolytische Entkalkungsmethoden basieren auf dem Grundprinzip, dass durch ein Säuregemisch, in dem sich das zu entkalkende Präparat befindet, ein Gleichstrom hindurchgeführt wird. Das Anlegen einer Spannung erzeugt ein elektrisches Feld, das einen kontinuierlichen Ionentransport und das Abwandern der gelösten Ionen gewährleistet, gleichzeitig aber auch den Zustrom neuer für die Entkalkung aktiver Ionen fördert. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der schnellen Entfernung von Kalzium aus dem Gewebe, da es zur Kathode wandert (Burck 1988).

Nossek gibt der elektrolytischen Schnellentkalkungsmethode gegenüber anderen Entkalkungsmethoden den Vorrang, da sie bei größter Gewebeschonung kurze Entkalkungszeiten zulässt (Nossek 1965). Burck bestätigt den Zeitgewinn, bezweifelt aber den Vorteil der elektrolytischen Entkalkung (Burck 1988). Lang beschreibt die Elektrolyse unter Anlegen einer Spannung als eine aus der Mode gekommene Methode (Lang 2006).

Die Vakuumentkalkung in einem Drucktopf gilt als ein weiterer Versuch der Schnellentkalkung von Zähnen (Verdenius und Alma 1958). Während Waerhaug die Verwendung eines Vakuums als rapide Methode der Dekalzifikation bezeichnet, ergeben sich laut den Untersuchungen von Nossek weder schnellere Entkalkungszeiten noch bessere Ergebnisse (Waerhaug 1949, Nossek 1965). Lang bezeichnet die Vakuumbehandlung als Mittel zur Beschleunigung der Entkalkung als fraglich (Lang 2006).

3.8 Ultraschall

3.8.1 Physikalische Grundlagen

Elastische Wellen mit Frequenzen von der menschlichen Hörschwelle (15 bis 20 kHz) bis etwa 10 GHz werden als Ultraschall bezeichnet (Meschede 2010).

Zur Erzeugung von Ultraschall verwendet man mechanische und elektroakustische Schallquellen; die überwiegend eingesetzten elektroakustischen Wandler sind piezoelektrische oder magnetostriktive Sender. Piezoelektrische Kristalle zeigen in elektrischen Wechselfeldern periodische Längenänderungen, die sich als Dichteschwankungen auf das umgebende Medium übertragen können (Haas 2012).

In der modernen Ultraschall-Medizintechnik transformieren elektromechanische Wandler, bestehend aus einer mit piezoelektrischem Material aufgebauten Einheit, die von einem Generator gelieferte Frequenzleistung in eine mechanische Wechselleistung

mit entsprechender Bewegungsamplitude. Diese mechanische Bewegung kann direkt oder verstärkt in eine Flüssigkeit übertragen werden. Durch starke Ultraschallfelder sinkt in Flüssigkeiten der Druck lokal unter den zur dort herrschenden Temperatur gehörenden Dampfdruck der Flüssigkeit, wodurch es zu einer Bildung von Dampfblasen kommt (Kavitation). Die Flüssigkeit verdampft lokal, um beim Übergang in die Überdruckphase wieder schlagartig zu kondensieren, wobei hohe Druckspitzen auftreten (Haas 2010). Beim Implodieren der energiereichen Kavitationsblasen entstehen Flüssigkeitsjets, die mit mehrfacher Schallgeschwindigkeit auf Oberflächen treffen können. Innere Reibung und Erwärmung der Flüssigkeit nehmen durch den Effekt der Kavitation zu (Bandelin et al. 2006).

Viele physikalische Wirkungen des Ultraschalls beruhen auf der Implosion der Kavitationsblasen: Durch intensive Ultraschallstrahlung lassen sich feste Stoffe in Flüssigkeiten dispergieren, chemische Reaktionen werden in Ultraschallfelder eingeleitet, Lösungs- und Diffusionsprozesse beschleunigt (Haas 2012).

3.8.2 Einfluss von Ultraschall auf die Dekalzifikation von Zahnhartgewebe

Durch medizintechnische Ultraschallgeräte lassen sich Kavitationseffekte erzeugen, infolge derer Flüssigkeitsjets an Festkörperoberflächen erzeugt werden. Durch Kavitation ausgelöste turbulente Strömungen fördern die Durchmischung von Reagenzien; die Relativbewegung von Teilchen in Flüssigkeiten wird beschleunigt, so dass Diffusionsprozesse verbessert werden können (Bandelin et al. 2006).

Nimmt man die Dekalzifikation von Hartgewebe unter Zuhilfenahme eines Ultraschallgerätes vor, das Kavitationseffekte erzeugt, so wird eine Veränderung des Dekalzifikationsprozesses hinsichtlich der Dauer der Entkalkung und des Erhalts der originären Gewebestrukturen beschrieben. Der Dekalzifikationsprozess kann durch Beschallung bei besseren Ergebnissen der Strukturhaltung beschleunigt werden (Burck 1988). Durch die Technik des Ultraschalls werden die kristallinen Strukturen des anorganischen Anteils der Hartgewebe während der Dekalzifikation zielgerichtet zertrümmert, wodurch eine rasche und gleichzeitig zellschonende Entkalkung mit geeigneten Lösungen durchführbar ist. Verkürzungen der Entkalkungszeit um bis zu 75 % werden in der Literatur beschrieben (Lang 2006).

4 Aufgabenstellung

Das Ziel der durchgeführten In-vitro-Untersuchung ist die Ermittlung der Dauer der Dekalzifikation von extrahierten, menschlichen Zähnen der zweiten Dentition. In die Versuche miteinbezogen werden Zähne, die bezüglich ihrer anatomischen Form und in Hinblick auf ihren pathologischen Zustand (Karies) eine unterschiedliche Beschaffenheit aufweisen. Es handelt sich um mittlere Schneidezähne des Unterkiefers (Dentes incisivi medialis der Mandibula), Eckzähne des Oberkiefers (Dentes canini der Maxilla) und dritte Molaren des Ober- und Unterkiefers (Dentes sapientiae der Mandibula und der Maxilla) im intakten und kariösen Zustand.

Das spezielle Interesse gilt der Auswertung des Einflusses der Faktoren Ultraschall, Temperatur und Entkalkungsmedium auf den Entkalkungsprozess und der vergleichenden Darstellung der einzelnen Ergebnisse. Ermittelt werden soll die geringste Entkalkungsdauer unter anschließender Begutachtung der Eignung der Proben für die histotechnische Bearbeitung und lichtmikroskopischer Analyse der originären Strukturen der Zahnhartgewebe.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

1. Ist die Dauer der Dekalzifikation eines Zahnes beeinflussbar durch die Anwendung von Ultraschall und abhängig von der Ultraschalleistung?
 - 90 W (50%ige Ultraschalleistung) vs. 180 W (100%ige Ultraschalleistung)
2. Ist die Dauer der Dekalzifikation eines Zahnes abhängig von der verwendeten Entkalkungstemperatur?
 - 17 °C vs. 24 °C vs. 35 °C
3. Ist die Dauer der Dekalzifikation eines Zahnes abhängig vom verwendeten Entkalkungsmedium?
 - 7%ige Salpetersäure (Medium I) vs. 50%ige Ameisensäure (Medium II) vs. Decal[®]-Lösung (Medium III)
4. Ist die Dauer der Dekalzifikation eines Zahnes abhängig von seinem pathologischen Zustand (Karies)?
 - kariöser Zustand vs. kariösfreier Zustand des Zahnes

-
5. Ist die Dauer der Dekalzifikation eines Zahnes abhängig vom Zahntyp?
 - Dentis incisivi medialis der Mandibula vs. Dentis canini der Maxilla vs. Dentis sapientiae der Mandibula und der Maxilla
 6. Welchen Einfluss haben die in die Untersuchung miteinbezogenen Faktoren auf die anschließende histotechnische Bearbeitung (Herstellung von Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnittpräparaten) und den lichtmikroskopischen Nachweis der originären Strukturen des Zahnhartgewebes?

Aus den aufgeführten Fragestellungen ergeben sich folgende Arbeitshypothesen für die Entkalkung von Zahnhartgewebe, die es zu bestätigen oder widerlegen gilt.

1. Die Dauer der Dekalzifikation eines Zahnes ist durch die Anwendung von Ultraschall beeinflussbar und abhängig von der gewählten Ultraschalleistung.
2. Die Dauer der Dekalzifikation eines Zahnes ist abhängig von der gewählten Entkalkungstemperatur.
3. Die Dauer der Dekalzifikation eines Zahnes ist abhängig vom verwendeten Entkalkungsmedium.
4. Die Dauer der Dekalzifikation eines Zahnes ist abhängig von seinem pathologischen Zustand (Karies).
5. Die Dauer der Dekalzifikation eines Zahnes ist abhängig vom jeweiligen Zahntyp.
6. Die in die Untersuchung miteinbezogenen Faktoren haben einen Einfluss auf die anschließende histotechnische Bearbeitung (Herstellung von Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnittpräparaten) und den lichtmikroskopischen Nachweis der originären Strukturen des Zahnhartgewebes.

5 Material und Methode

5.1 Probenauswahl

Zur Untersuchung wurden 126 menschliche extrahierte Zähne der zweiten Dentition verwendet, die anatomisch verschiedenen Zahntypen zugeteilt werden konnten. Dabei handelte es sich um mittlere untere Schneidezähne (Dentes incisivi medialis der Mandibula, I1), obere Eckzähne (Dentes canini der Maxilla, C) und untere und obere Weisheitszähne (Dentes sapientiae der Mandibula und der Maxilla, M3).

Aus einer Aufteilung zu gleichen Teilen der 126 Probenkörper auf die 3 Zahntypen ergab sich eine Anzahl von 42 Zähnen je Zahntyp. Des Weiteren wurden sowohl intakte, kariesfreie als auch demineralisierte, kariöse Zähne für die Untersuchung zugelassen.

Die Anzahl von 42 Zähnen einer Zahntyps setzte sich zusammen aus jeweils 21 intakten und 21 kariösen Zähnen (Abb. 5.1).

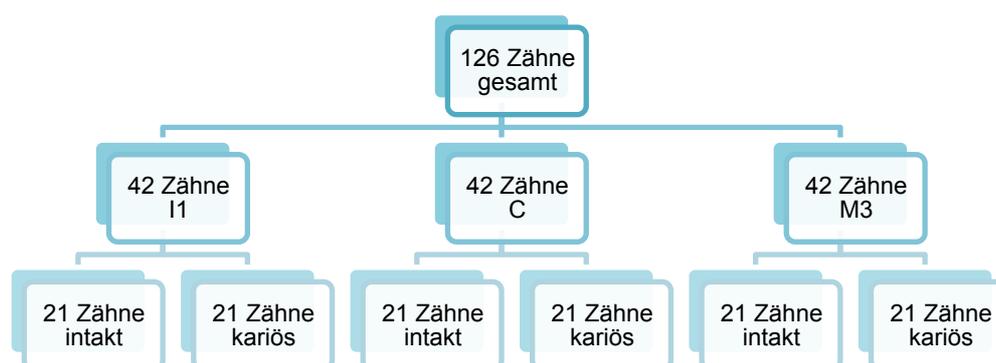


Abb. 5.1: Zusammensetzung der Probenkörper

Die verwendeten Zähne stammen aus der Abteilung für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin des Instituts für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (Charité - Universitätsmedizin Berlin) und wurden für Forschungszwecke zusammengetragen.

Der Zeitpunkt der Extraktion und das Alter dieser Zähne waren nicht bekannt. Die Zähne wurden mit einem Scaler (McFarlane, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) von Zahnstein, Konkrement und weiteren Geweberesten befreit.

5.2 Selektierung

5.2.1 Selektierung intakter, kariesfreier Zähne

Bei der Selektierung der intakten Probekörper wurden Zähne, die Demineralisationen, Erosionen, Frakturen, Resorptionen, Restaurationen oder keilförmige Zahnhalsdefekte aufwiesen, nicht zugelassen. Des Weiteren wurde berücksichtigt, dass die Zähne eines Zahntyps nicht bzw. nur geringfügig in ihrer anatomischen Beschaffenheit voneinander abweichen, Ziel war die Selektierung gleichwertiger, intakter Zähne.

Die Zahnlänge wurde von der Inzisalkante (*Dentes incisivi medialis*, *Dentes canini*) bzw. der Okklusalfäche (*Dentes sapientiae*) bis zum Apex mit einer Schiebelehre (HS-Boley-Schiebelehre, Henry Schein Dental Deutschland GmbH, Langen, Deutschland) vermessen. Die Probekörper einer Zahngruppe wichen in ihrer Zahnlänge maximal $+ / - 2$ mm voneinander ab.

Der vestibulo-orale und mesio-distale Durchmesser der Zähne wurde in Höhe der Schmelz-Zement-Grenze unter Zuhilfenahme eines Tasterzirkels (HS-Tasterzirkel nach Iwanson, Henry Schein Dental Deutschland GmbH, Langen, Deutschland) bestimmt. Zähne, die mehr als $+ / - 2$ mm von den anderen Probekörpern ihrer Zahngruppe abweichen, führten zum Ausschluss.

5.2.2 Selektierung demineralisierter, kariöser Zähne

Um sicherzustellen, dass es sich bei der Auswahl um gleichwertige kariöse Zähne handelt, war es zusätzlich notwendig, den kariösen Defekt eines Zahnes genauer zu untersuchen. Dabei erfolgte der Einsatz eines röntgenologischen Verfahrens; Röntgenaufnahmen der Zähne wurden analog in Paralleltechnik angefertigt, dabei wurde die Filmebene parallel zur Zahnachse mit einem Film-Fokus-Abstand von 30 cm ausgerichtet (Heliodent DS, Sirona Dental GmbH, Wals, Österreich). Das Filmformat betrug 3,1 x 4,1 cm (Kodak Insight Film, Carestream Dental, Rochester, NY, USA).

Anhand der Röntgenbilder der einzelnen Zähne war es möglich, gleichwertige Zähne anhand des Grades ihres kariösen Defekts zu selektieren. Dabei erfolgte die Einordnung des kariösen Defekts anhand der Begutachtung der Ausdehnung in Schmelz und Dentin und der anschließenden Zuordnung zu den Klassen C1-C4 der röntgenologischen Klassifikation kariöser Läsionen, nach der Zahnhartsubstanzverluste der äußeren Schmelzhälfte der Klasse C1, der inneren Schmelzhälfte der Klasse C2, der äußeren Dentinhälfte der Klasse C3 und der inneren Dentinhälfte der Klasse C4 zugeordnet werden (Pitts 1984, Pitts und Rimmer 1992).

Die für die Untersuchung verwendeten kariösen Zähne wiesen als gemeinsames Merkmal einen kariösen Defekt des Grades C4 und somit einen Zahnhartsubstanzverlust von Schmelz- und Dentinarealen bis in die innere Dentinhälfte auf.

5.3 Gruppeneinteilung

Die selektierten Probekörper wurden auf 21 Studiengruppen verteilt. Jede Gruppe setzte sich aus einer Probenzahl von 6 Zähnen ($n = 6$) zusammen, bestehend aus jeweils 2 Zähnen einer Zahngruppe, je einem intakten, gesunden und einem kariösen Zahn (Tab. 5.1).

Tab. 5.1: Zusammensetzung der Probekörper einer Studiengruppe

Bezeichnung	Zusammensetzung
Studiengruppe ($n = 6$)	2 Dentes incisivi medialis (I1) <ul style="list-style-type: none"> • 1 intakter Zahn • 1 kariöser Zahn
	2 Dentes canini (C) <ul style="list-style-type: none"> • 1 intakter Zahn • 1 kariöser Zahn
	2 Dentes sapientiae (M3) <ul style="list-style-type: none"> • 1 intakter Zahn • 1 kariöser Zahn

Im Rahmen der Hauptfragestellungen wurden 7 Versuchsreihen mit jeweils 3 Studiengruppen durchgeführt; dies ergab des Weiteren die Einteilung in Haupt- und Untergruppen (Tab. 5.2). Jede Versuchsreihe wurden jeweils mit 3 unterschiedlichen Entkalkungsflüssigkeiten durchgeführt: Hauptgruppe 1 untersuchte die Behandlung mit 7%iger Salpetersäure (Medium I), Hauptgruppe 2 mit 50%iger Ameisensäure (Medium II) und Hauptgruppe 3 mit Decal[®]-Lösung (Decal Chemical Corporation, Tallman, NY, USA; Medium III).

In der Untergruppe 1 wurde die Untersuchung konventionell ohne die Verwendung von Ultraschall bei Raumtemperatur durchgeführt. In der Untergruppe 2 erfolgte die

Versuchsdurchführung bei 50%iger Ultraschalleistung und einer Temperatur von 17 °C, in der Untergruppe 3 bei 50%iger Ultraschalleistung und einer Temperatur von 24 °C, in der Untergruppe 4 bei 50%iger Ultraschalleistung und einer Temperatur von 35 °C. Die Untergruppen 5-7 untersuchten den Einfluss 100%iger Ultraschalleistung, in der Untergruppe 5 bei einer Temperatur von 17 °C, in der Untergruppe 6 bei einer Temperatur von 24 °C und in der Untergruppe 7 bei einer Temperatur von 35 °C. Insgesamt wurden somit 21 Studiengruppen mit einer Anzahl von je 6 Probenkörpern (n = 6) gebildet; daraus resultierte die Gesamtprobenzahl von 126.

Tab. 5.2: Bezeichnung der Studiengruppen

Hauptgruppe Untergruppe (n = 6)	Hauptgruppe 1 (Medium I)	Hauptgruppe 2 (Medium II)	Hauptgruppe 3 (Medium III)
Untergruppe 1 kein Ultraschall, Raumtemperatur	1.1	2.1	3.1
Untergruppe 2 Ultraschall 50 %, 17 °C	1.2	2.2	3.2
Untergruppe 3 Ultraschall 50 %, 24 °C	1.3	2.3	3.3
Untergruppe 4 Ultraschall 50 %, 35 °C	1.4	2.4	3.4
Untergruppe 5 Ultraschall 100 %, 17 °C	1.5	2.5	3.5
Untergruppe 6 Ultraschall 100 %, 24 °C	1.6	2.6	3.6
Untergruppe 7 Ultraschall 100 %, 35 °C	1.7	2.7	3.7

5.4 Lagerung der Zähne

Die Zähne lagerten vor Beginn der Untersuchungen in einer 20%igen Isopropanol-Lösung (2-Propanol, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Die maximale Lagerungszeit der Zähne nach Extraktion betrug ein Jahr.

5.5 Dekalzifikation

5.5.1 Entkalkungsmedien

Während der Untersuchung fanden drei unterschiedliche Entkalkungsflüssigkeiten analog zur Hauptgruppeneinteilung Verwendung (Tab. 5.3).

Tab. 5.3: Angaben zu den verwendeten Entkalkungsmedien

Bezeichnung	Entkalkungsflüssigkeit
Medium I	Salpetersäure (HNO ₃) <ul style="list-style-type: none"> • Hersteller: <ul style="list-style-type: none"> - Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Medium II	Ameisensäure (CH ₂ O ₂) <ul style="list-style-type: none"> • Hersteller: <ul style="list-style-type: none"> - Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Medium III	Decal [®] -Lösung <ul style="list-style-type: none"> • Hersteller: <ul style="list-style-type: none"> - Decal Chemical Corporation, Tallman, NY, USA • Zusammensetzung: <ul style="list-style-type: none"> - Ethylendiamintetraacid (EDTA) - Salzsäure (HCl) - entionisiertes Wasser

5.5.2 Konventionelles Vorgehen

Die jeweils 6 Probekörper unterschiedlicher Beschaffenheit der Untergruppe 1 (Dekalzifikation ohne Ultraschall bei Raumtemperatur) wurden in Behälter eingelegt, die mit den Entkalkungsflüssigkeiten 7%ige Salpetersäure (Medium I), 50%ige Ameisensäure (Medium II) und Decal[®]-Lösung (Medium III) im Mengenverhältnis Zahn zu Flüssigkeit 1:20 gefüllt wurden (Studiengruppen 1.1, 2.1, 3.1).

Die Probekörper der Untergruppe 1 wurden konventionell in der jeweiligen Entkalkungsflüssigkeit ohne Anwendung von Ultraschall und Variabilität der Temperatur untersucht; sie diente somit als Kontrollgruppe. Die konventionelle Dekalzifikation bei Raumtemperatur wurde mit insgesamt 18 Probekörpern unterschiedlicher Zahngruppen (I1, C, M3) und Beschaffenheit (intakt, kariös) durchgeführt.

5.5.3 Vorgehen unter Verwendung von Ultraschall und Variabilität der Temperatur

5.5.3.1 Ultraschallgerät

Die weitere Durchführung der Versuche erfolgte unter Verwendung des Ultraschallgeräts *SONOCOOL* (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland), das mit einer Ultraschalleistung von 180 W und einer Ultraschallfrequenz von 35 kHz betrieben wurde (Abb. 5.2). Die Ultraschalleistung des Gerätes war in vier Stufen einstellbar, der zu variierende Temperaturbereich des Ultraschallbades betrug 15-35 °C. Das Gerät bestand aus einer Schwingwanne, die mit einer Arbeitsfüllmenge von 5 Litern Kontaktflüssigkeit, bestehend aus 4,5 Litern Wasser und 0,5 Litern der tensidhaltigen Lösung *TICKOPUR TR 3* (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) zur Reduzierung der Oberflächenspannung, gefüllt wurde. Die Kontaktflüssigkeit gewährleistete die verlustfreie Übertragung des Ultraschalls in die im Einsatzgefäß befindlichen Entkalkungsflüssigkeiten. Der Probenhalter konnte insgesamt 11 Einsatzgefäße aus Glas mit einer Füllmenge von 100 ml fassen; er gewährleistete, dass diese mindestens 2 cm tief in die Kontaktflüssigkeit eintauchten ohne den Wannenboden zu berühren. Ein unter dem Schwingwannenboden befestigter Ultraschall-Schwinger wandelte elektrische Energie in mechanische Schwingungen um, wodurch die Flüssigkeiten mit 35 kHz zum Schwingen gebracht wurden und implodierende Vakuubläschen entstanden (Kavitation).



Abb. 5.2: Ultraschallgerät *SONOCOOL*, Probenhalter mit Einsatzgefäßen aus Glas, Kontaktflüssigkeit *TICKOPUR TR 3* (aus: Datenblatt *SONOCOOL*, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, 2014)

5.5.3.2 Gerätespezifisches Vorgehen

Im weiteren Vorgehen wurden mit Hilfe des Ultraschallgerätes *SONOCOOL* die Parameter Ultraschallintensität und Temperatur in die Versuche miteinbezogen. Es bestand die Möglichkeit, die Leistung des Ultraschalls und die Höhe der Temperatur der die Probekörper umgebenden Flüssigkeit zu variieren.

Zunächst erfolgte die Versuchsdurchführung mit 50%iger Ultraschalleistung (90 W), dazu wurden die jeweils 6 Probekörper einer Studiengruppe in Einsatzgefäße gelegt, die im Anschluss mit den Entkalkungsflüssigkeiten 7%ige Salpetersäure (Medium I), 50%ige Ameisensäure (Medium II) und Decal[®]-Lösung (Medium III) gefüllt wurden. Die Inbetriebnahme des Gerätes erfolgte zunächst bei einer Temperatur von 17 °C (Studiengruppen 1.2, 2.2, 3.2), gefolgt von den Temperaturen 24 °C (Studiengruppen 1.3, 2.3, 3.3) und 35 °C (Studiengruppen 1.4, 2.4, 3.4).

Im Anschluss erfolgte die Versuchsdurchführung bei 100%iger Ultraschalleistung (180 W). Analog zu den Versuchen mit 50%iger Ultraschalleistung wurde die Höhe der Temperatur der umgebenden Flüssigkeit variiert, so dass die Durchführung in den drei verschiedenen Entkalkungsflüssigkeiten bei 17 °C (Studiengruppen 1.5, 2.5, 3.5), 24 °C (Studiengruppen 1.6, 2.6, 3.6) und 35 °C (Studiengruppen 1.7, 2.7, 3.7) erfolgte.

Die Dekalzifikation unter Verwendung von Ultraschall und Variabilität der Temperatur wurde mit insgesamt 108 Probekörpern durchgeführt, die sich in der Zuordnung zu ihrer Zahngruppe (I1, C, M3) und ihrer Beschaffenheit (intakt, kariös) unterschieden.

Das entsprechende Studiendesign des ultraschallunterstützten Vorgehens ist der Tabelle 5.4 zu entnehmen.

Tab. 5.4: Studiendesign: Dekalzifikation von Zahnhartgewebe unter Verwendung von Ultraschall und Variabilität der Temperatur

						Ultraschallintensität			
						50%		100%	
						path. Zustand		path Zustand	
						intakt	kariös	intakt	kariös
						Anzahl	Anzahl	Anzahl	Anzahl
Temperatur	17 °C	Medium	Salpetersäure	Zahntyp	I1	1	1	1	1
					C	1	1	1	1
					M3	1	1	1	1
			Ameisensäure	Zahntyp	I1	1	1	1	1
					C	1	1	1	1
					M3	1	1	1	1
			Decal®	Zahntyp	I1	1	1	1	1
					C	1	1	1	1
					M3	1	1	1	1
	24 °C	Medium	Salpetersäure	Zahntyp	I1	1	1	1	1
					C	1	1	1	1
					M3	1	1	1	1
			Ameisensäure	Zahntyp	I1	1	1	1	1
					C	1	1	1	1
					M3	1	1	1	1
			Decal®	Zahntyp	I1	1	1	1	1
					C	1	1	1	1
					M3	1	1	1	1
	35 °C	Medium	Salpetersäure	Zahntyp	I1	1	1	1	1
					C	1	1	1	1
					M3	1	1	1	1
			Ameisensäure	Zahntyp	I1	1	1	1	1
					C	1	1	1	1
					M3	1	1	1	1
Decal®			Zahntyp	I1	1	1	1	1	
				C	1	1	1	1	
				M3	1	1	1	1	

5.6 Untersuchungsmethoden

5.6.1 Quantitative Untersuchung

Zum Vergleich der einzelnen Behandlungen wurde bei jedem Probekörper der Endpunkt der Dekalzifikation mittels physikalischer Prüfung bestimmt. Die Gewebeproben wurden zunächst in einem Intervall von 2 Stunden mit einem Skalpell (Carbon Steel Surgical Blades, Swann-Morton, Sheffield, England) auf ihre Schneidbarkeit überprüft. Nachfolgende Kontrollintervalle richteten sich nach der festgestellten Konsistenz der Präparate, so dass anschließend in einem kürzeren Zeitabstand oder verlängerten Intervallen von bis zu 12 Stunden die Schneidbarkeit erneut kontrolliert wurde. Die Entkalkungsflüssigkeiten wurden täglich erneuert. War das Durchdringen des Zahnes mit Hilfe des Skalpells ohne Widerstand möglich, wiesen die Proben eine radiergummiartige Konsistenz auf. Die Dekalzifikation galt als abgeschlossen, wenn eine vollständige Teilung des Zahnes erfolgen konnte. Die ermittelte Dauer der Entkalkung in Stunden wurde erfasst.

5.6.2 Qualitative Untersuchung

Die entkalkten Probekörper wurden einer mikroskopischen Untersuchung unterzogen. Hierzu bedurfte es einer histotechnischen Aufbereitung, beginnend mit der Nachbehandlung der Probekörper: Die Probekörper der Hauptgruppe 1 und 2, die in 7%iger Salpetersäure (Medium I) und in 50%iger Ameisensäure (Medium II) entkalkten, wurden einer 2-stündigen Wässerung unterzogen.

Für Probekörper der Hauptgruppe 3, die mit Decal[®]-Lösung (Medium III) behandelt wurden, war diese Nachbehandlung nicht notwendig. Nach Anweisung des Herstellers ist nach Abschluss der Entkalkung lediglich eine fließende Wässerung von 3 Minuten erforderlich, dies wurde in dieser Studie berücksichtigt.

Im Anschluss erfolgte im histologischen Standardverfahren die Einbettung der Proben in Paraffin (Sasol Wax 0587, Sasol Wax GmbH, Hamburg, Deutschland) mit Hilfe eines Gewebeeinfiltrationsautomaten (ASP300 S, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) und die Anfertigung von Schnittpräparaten mit Hilfe eines Mikrotoms (Schlittenmikrotom 2000 R, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland). Die Präparate wurden einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Hämatoxylin-Monohydrat, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) unterzogen. Im Anschluss erfolgte eine optische Analyse der auf Objektträgern (Superfrost Plus Menzel-Gläser, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig,

Deutschland) angeordneten Präparate unter Verwendung eines Lichtmikroskops (Olympus BX41, Olympus Corporation, Shinjuko Tokio, Japan).

Qualitativ beurteilt wurden folgende Kriterien:

- Schneidbarkeit der Probekörper
- Anfärbbarkeit mit Hämatoxylin-Eosin
- Mikroskopische Darstellbarkeit der Zahnhartgewebe

5.7 Statistische Auswertung

Bei den eingesetzten deskriptiven und inferenzstatistischen Verfahren zur Auswertung der Untersuchung handelt es sich insgesamt um ein multifaktorielles Design. Ultraschall, Temperatur, Entkalkungsmedium, pathologischer Zustand (Karies) und Zahntyp stellen die unabhängigen Variablen (Faktoren) dar, ihre Wirkung auf die abhängige Variable, die Zeit bis zum Endpunkt der Dekalzifikation, wurde untersucht.

Für die Kennzeichnung der Verteilungen wurden Pivot-Tabellen erstellt, welche Median, Mittelwert und Standardabweichung (SD) als wichtigste Lage- und Streuungsmaße sowie Minima und Maxima in den einzelnen Faktorstufenkombinationen über die abhängige Variable zeigen. Zur Visualisierung der Verteilungen wurden zusätzlich Balkendiagramme generiert, die der Vergleichbarkeit zwischen den Faktoren und seinen Stufen dienen. Es sei erwähnt, dass die Stufen eines Faktors dessen Ausprägungen meinen, so hat zum Beispiel der Faktor Temperatur 3 Stufen (17 °C, 24 °C und 35 °C).

Zur Prüfung auf Unterschiede wurde zunächst untersucht, ob die Voraussetzungen für parametrische Verfahren erfüllt waren. Zu diesen Voraussetzungen zählt die Normalverteilung der Residuen in den einzelnen Faktorstufen, mindestens Intervallskalenniveau der abhängigen Variablen sowie Homogenität der Varianzen zwischen den Faktorstufen. Da diese Voraussetzungen deutlich verletzt waren (teilweise wiesen sie eine Varianz mit dem Wert 0 auf, da alle gemessenen Zeiten gleich waren), musste auf nonparametrische Verfahren zurückgegriffen werden. Da es sich um unabhängige Gruppen handelt, wurde zur Überprüfung der Unterschiede zwischen 2 Gruppen der Mann-Whitney-U Test eingesetzt. Wurden die Unterschiede zwischen 3 Gruppen untersucht, so kam der Kruskal-Wallis-H Test zum Einsatz. Sollte das Ergebnis eines Kruskal-Wallis Tests statistisch signifikant sein, wurden anschließend Post-hoc Tests in Form von multiplen paarweisen Vergleichen

durchgeführt. Um dem methodischen Problem der Alpha-Fehler Kumulierung adäquat zu begegnen, wurde das Signifikanzniveau mit der Dunn-Bonferroni Methode adjustiert. Es sei angemerkt, dass die eingesetzten Verfahren ausschließlich die Ranginformationen der Daten nutzen und analysieren.

Der allgemeinen methodischen Konvention folgend wurde ein α -Niveau von 5 % festgelegt, dies entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit bzw. dem Fehler 1. Art, die Nullhypothese zu verwerfen und die Alternativhypothese anzunehmen, obwohl in Wahrheit die Nullhypothese gilt. Die Alternativhypothesen in der vorliegenden Untersuchung beziehen sich also immer auf Unterschiede zwischen den einzelnen Faktorstufen. Eine simultane Prüfung mehrerer Faktoren und Wechselwirkungen ist mit nonparametrischen Verfahren allerdings nicht möglich, daher wurde für jeden Faktor ein einzelner Test durchgeführt. Lag der p-Wert als Ergebnis der statistischen Prüfung gleich oder unter dem kritischen Wert von 0,05, so war das Ergebnis signifikant und die Alternativhypothese wurde angenommen und galt als bestätigt. Der kritische p-Wert wurde im Output immer als „Sig.“ angegeben, alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt, da die Hypothesen ungerichtet formuliert wurden. Zur Veranschaulichung der Unterschiede wurden die Daten zusätzlich mit Box-Whisker-Plots visualisiert, die die Verteilung, Ausreißer sowie Median und die Quartile zeigen.

Für alle statistischen Analysen kamen Microsoft Excel 2010 und IBM SPSS Statistics 22 zum Einsatz.

6 Ergebnisse

6.1 Quantitative Auswertung

Die quantitative Analyse besteht aus der vergleichenden Untersuchung der einzelnen Studiengruppen hinsichtlich der gemessenen Zeit, bis die Probekörper schneidbar waren und somit der Endpunkt der Dekalzifikation erreicht wurde (physikalische Prüfung). Zur Auswertung kamen alle zur Untersuchung zugelassenen Proben.

Die Tabelle 6.1 gibt Auskunft über die Dauer der Dekalzifikation mittels des konventionellen Vorgehens bei Raumtemperatur ohne Verwendung von Ultraschall. Die Angaben beziehen sich auf die Zeit vom Einlegen der Proben in die jeweils verwendete Entkalkungsflüssigkeit bis zum ermittelten Endpunkt der Dekalzifikation; die Angabe erfolgte in Stunden. Die konventionell entkalkten Probekörper dienten als Kontrollgruppe.

Die Tabelle 6.2 bezieht sich auf die Dekalzifikation unter Zuhilfenahme eines Ultraschallgeräts (SONOCOOL), mit dem die Parameter Ultraschallintensität und Temperatur in die Versuche miteinbezogen werden konnten. Die Tabelle berücksichtigt folglich die Faktoren Ultraschall, Temperatur, Medium, pathologischer Zustand (Karies) und Zahntyp und gibt die Dauer der Dekalzifikation in Stunden an.

Tab. 6.1: Dauer der konventionellen Dekalzifikation von Zahnhartgewebe (Zeit in Stunden) bei Raumtemperatur ohne Verwendung von Ultraschall

				Karies	
				intakt	kariös
				Zeit in Stunden	Zeit in Stunden
Medium	Salpetersäure 7%	Zahntyp	I1	72,00	48,00
			C	72,00	96,00
			M3	96,00	96,00
	Ameisensäure 50%	Zahntyp	I1	1728,00	1728,00
			C	1848,00	1896,00
			M3	1896,00	1848,00
	Decal®	Zahntyp	I1	144,00	144,00
			C	144,00	168,00
			M3	144,00	168,00

Tab. 6.2: Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe (Zeit in Stunden) unter Verwendung von Ultraschall und Variabilität der Entkalkungstemperatur

						Ultraschallintensität			
						50%		100%	
						Karies		Karies	
						intakt	kariös	intakt	kariös
						Zeit in Stunden	Zeit in Stunden	Zeit in Stunden	Zeit in Stunden
Temp.	17 °C	Medium	Salpetersäure	Zahntyp	I1	24,00	24,00	10,00	10,00
					C	24,00	24,00	10,00	10,00
					M3	24,00	24,00	10,00	10,00
			Ameisensäure	Zahntyp	I1	57,00	57,00	48,00	48,00
					C	72,00	72,00	96,00	96,00
					M3	57,00	72,00	96,00	96,00
			Decal®	Zahntyp	I1	26,00	26,00	10,00	10,00
					C	52,00	52,00	24,00	24,00
					M3	52,00	52,00	24,00	24,00
	24 °C	Medium	Salpetersäure	Zahntyp	I1	23,00	23,00	8,00	8,00
					C	23,00	23,00	10,00	10,00
					M3	24,00	23,00	10,00	10,00
			Ameisensäure	Zahntyp	I1	54,00	54,00	46,00	46,00
					C	61,66	54,00	82,00	70,00
					M3	54,00	54,00	82,00	70,00
			Decal®	Zahntyp	I1	24,00	24,00	8,00	8,00
					C	30,00	30,00	10,00	12,00
					M3	30,00	30,00	10,00	12,00
	35 °C	Medium	Salpetersäure	Zahntyp	I1	4,50	4,50	4,00	4,00
					C	6,00	4,50	7,00	7,00
					M3	8,66	8,66	7,00	7,00
			Ameisensäure	Zahntyp	I1	12,16	12,16	36,00	36,00
					C	34,66	34,66	36,00	48,00
					M3	36,16	34,66	48,00	50,00
Decal®			Zahntyp	I1	12,00	12,00	7,00	7,00	
				C	20,00	20,00	12,00	12,00	
				M3	24,00	20,00	12,00	12,00	

Tabelle 6.3 zeigt die Klassierung der Variablen Zeit in Stunden in 5 Intervalle (< 20 Stunden, 20-40 Stunden, 40-60 Stunden, 60-80 Stunden, > 80 Stunden), diesen wurde jeweils die ermittelte Anzahl an Proben zugeteilt.

Die Abbildungen 6.1 - 6.5 visualisieren die klassierten Zeitintervalle in Form von Balkendiagrammen, die der Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Faktoren (Ultraschall, Medium, Temperatur, pathologischer Zustand (Karies), Zahntyp) dienen.

Tab. 6.3: Anzahl der dekalzifizierten Proben je klassiertem Zeitintervall

		Zeit in Stunden (klassiert)				
		< 20 h	20 - 40 h	40 - 60 h	60 - 80 h	> 80 h
		Anzahl	Anzahl	Anzahl	Anzahl	Anzahl
Ultraschall	50%	10	28	12	4	0
	100%	32	7	7	2	6
Temperatur	17 °C	8	12	9	3	4
	24 °C	12	12	7	3	2
	35 °C	22	11	3	0	0
Medium	Salpetersäure	24	12	0	0	0
	Ameisensäure	2	7	15	6	6
	Decal®	16	16	4	0	0
Karies	intakt	21	18	9	2	4
	kariös	21	17	10	4	2
Zahntyp	I1	18	10	8	0	0
	C	12	13	4	4	3
	M3	12	12	7	2	3
	Gesamtsumme	42	35	19	6	6

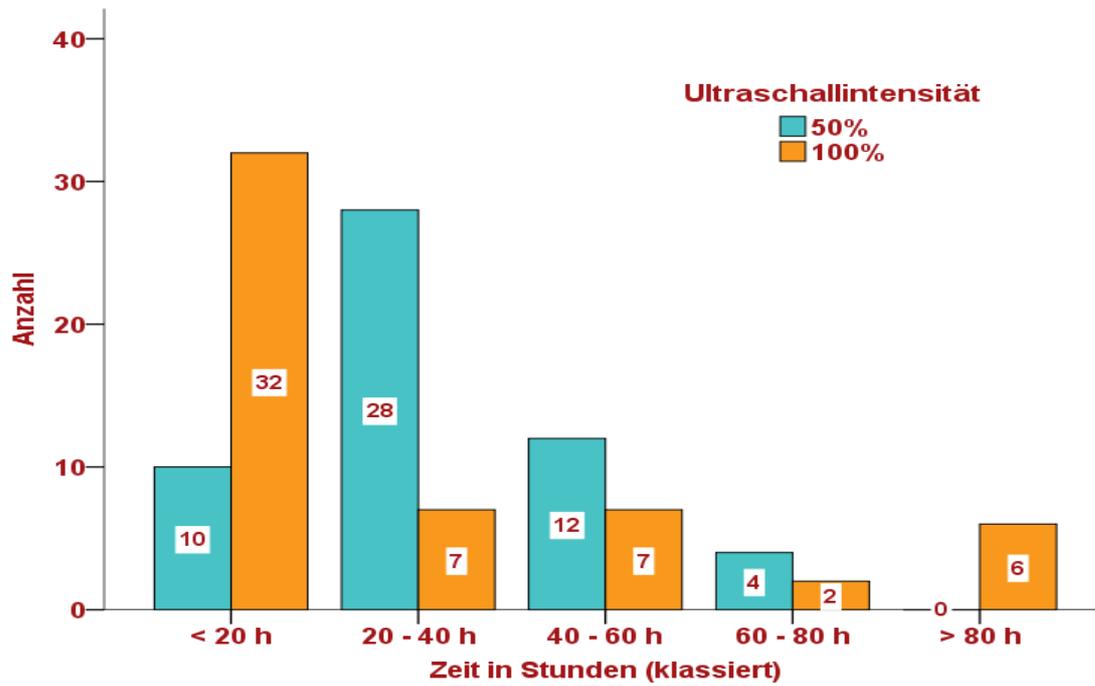


Abb. 6.1: Balkendiagramm für die Zeit der Dekalzifikation in Stunden (klassiert) unter Verwendung von Ultraschall bei 50%iger (90 W) und 100%iger (180 W) Leistung

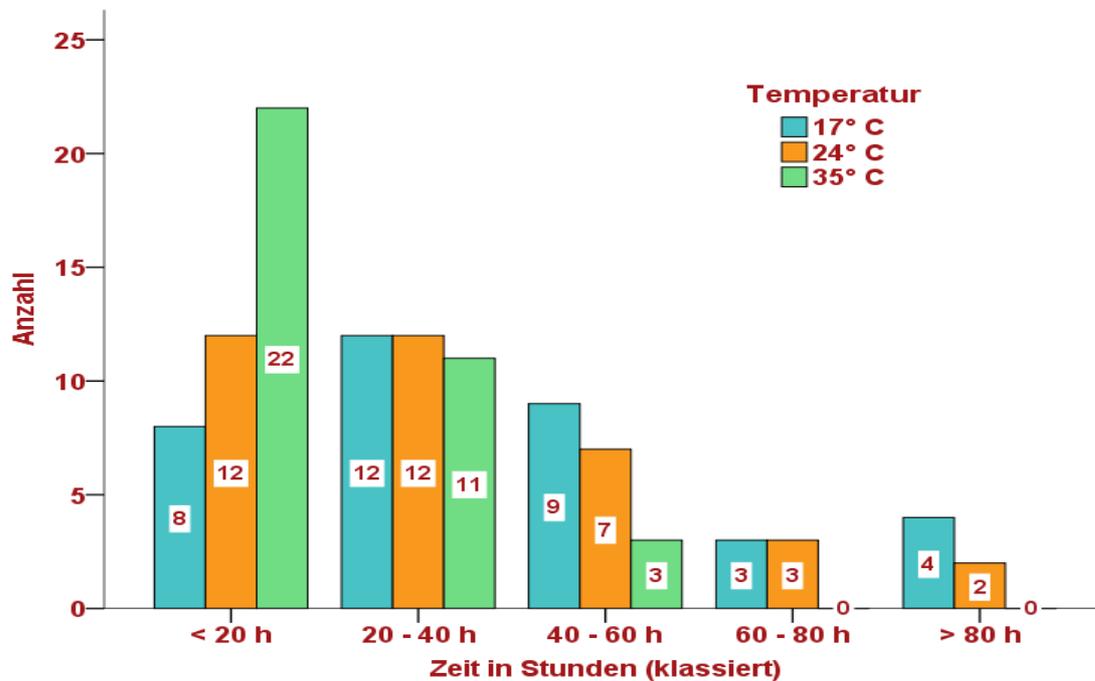


Abb. 6.2: Balkendiagramm für die Zeit der Dekalzifikation in Stunden (klassiert) bei den Temperaturen 17 °C, 24 °C und 35 °C

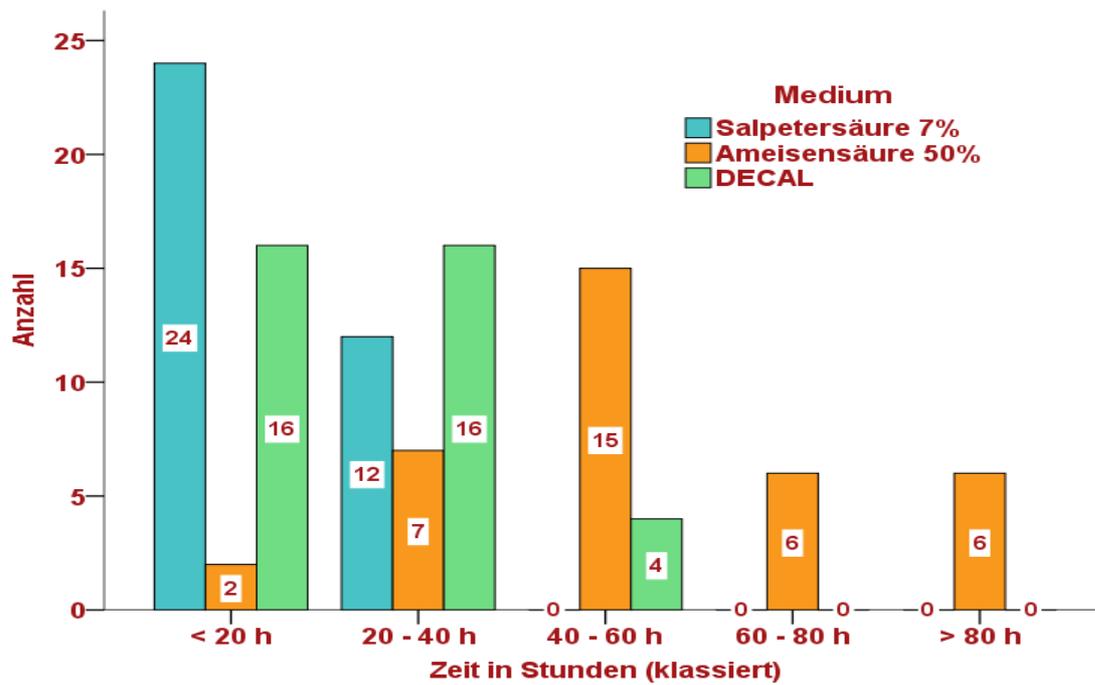


Abb. 6.3: Balkendiagramm für die Zeit der Dekalzifikation in Stunden (klassiert) unter Verwendung 7%iger Salpetersäure, 50%iger Ameisensäure und Decal®-Lösung

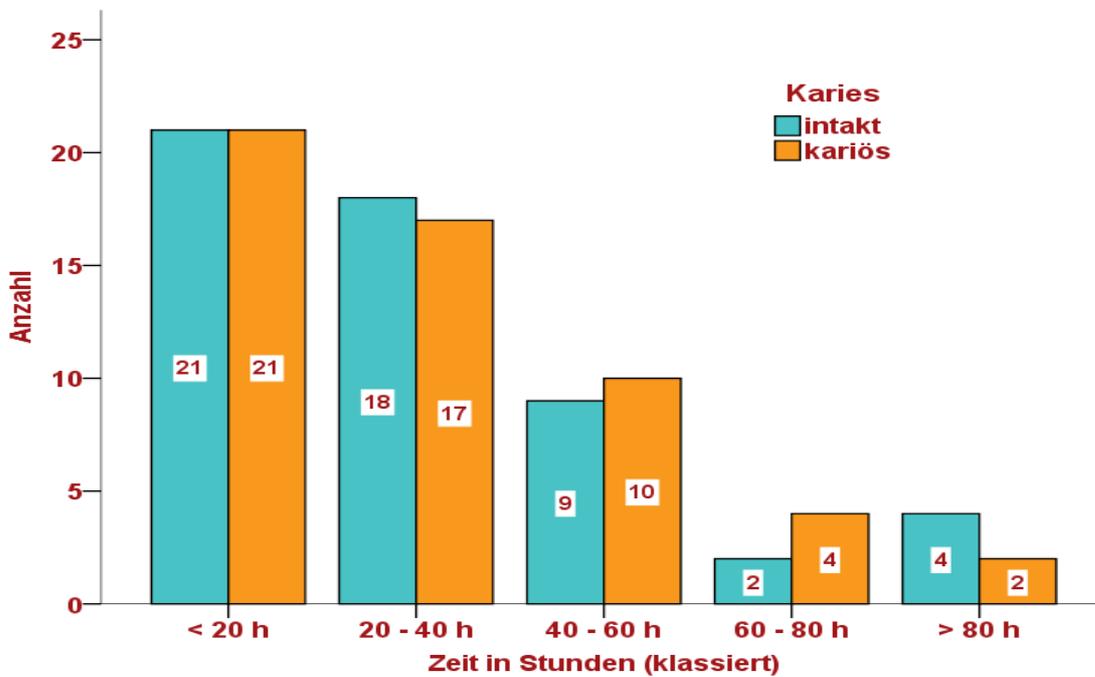


Abb. 6.4: Balkendiagramm für die Zeit der Dekalzifikation in Stunden (klassiert) von intakten und kariösen Probekörpern

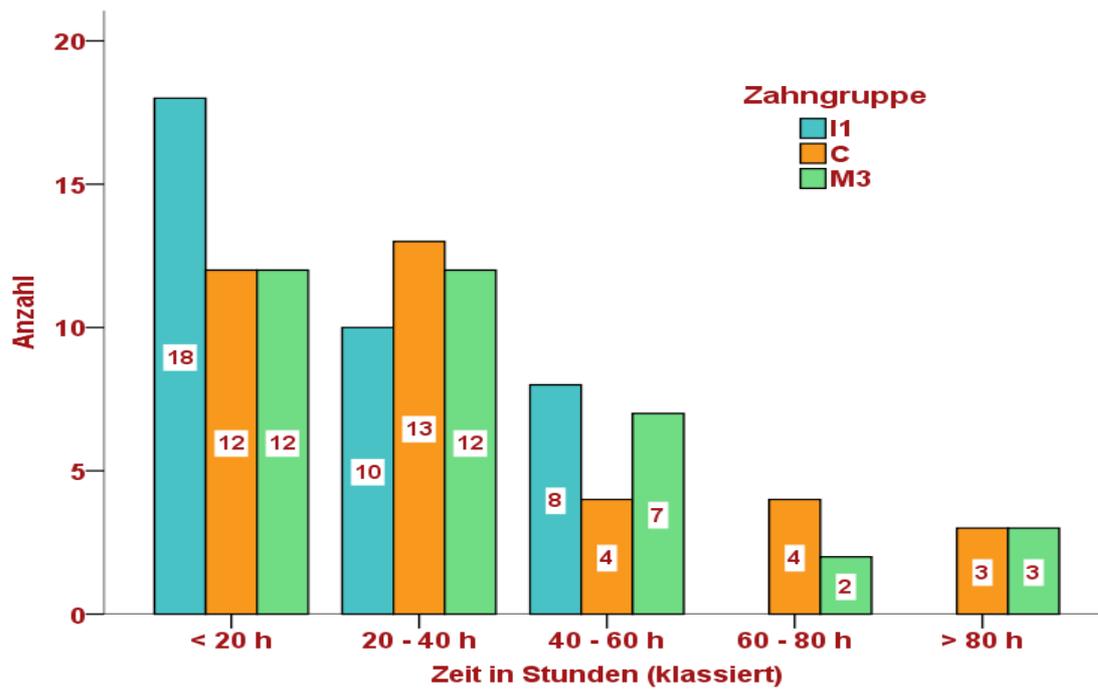


Abb. 6.5: Balkendiagramm für die Zeit der Dekalzifikation in Stunden (klassiert) von Dentis incisivi (I1), Dentis canini (C) und Dentis sapientiae (M3)

Die Tabelle 6.4 gibt Auskunft über die ermittelten Mittel- und Medianwerte, die Standardabweichung sowie die Minimum- und Maximumwerte der abhängigen Variablen, der Zeit in Stunden vom Einlegen der Probekörper in die jeweils verwendete Entkalkungsflüssigkeit bis zum ermittelten Endpunkt der Entkalkung. Die Tabelle berücksichtigt die Faktoren Ultraschall, Temperatur, Medium, den pathologischen Zustand (Karies) und den Zahntyp.

Tabelle 6.4: Statistische Angaben

		Zeit in Stunden						Perzentil 25	Perzentil 75
		Mittelwert	Median	SD	Minimum	Maximum			
Ultraschall	50%	32,20	24,00	18,83	4,50	72,00	23,00	52,00	
	100%	28,15	12,00	28,26	4,00	96,00	10,00	46,00	
Temperatur	17 °C	40,19	25,00	27,95	10,00	96,00	24,00	57,00	
	24 °C	31,96	24,00	22,80	8,00	82,00	10,00	54,00	
	35 °C	18,37	12,00	14,41	4,00	50,00	7,00	34,66	
Medium	Salpetersäure	13,11	10,00	7,74	4,00	24,00	7,00	23,00	
	Ameisensäure	55,92	54,00	21,56	12,16	96,00	41,08	71,00	
	Decal®	21,50	20,00	13,24	7,00	52,00	12,00	26,00	
Karies	intakt	30,24	24,00	24,34	4,00	96,00	10,00	48,00	
	kariös	30,11	24,00	23,85	4,00	96,00	10,00	48,00	
Zahntyp	I1	22,98	17,58	17,63	4,00	57,00	8,00	36,00	
	C	33,71	24,00	26,56	4,50	96,00	11,00	52,00	
	M3	33,84	24,00	25,74	7,00	96,00	11,00	52,00	
	Gesamtsumme	30,18	24,00	23,98	4,00	96,00	10,00	48,00	

Die grafische Darstellung der Datenverteilung erfolgt auf der Grundlage der in Tabelle 6.4 dargestellten Werte mit Hilfe von Box-Plot-Diagrammen. Die Begrenzung einer Box erfolgt durch das untere (25 %-Perzentil) und obere (75 %-Perzentil) Quartil, wobei der Interquartilsabstand dem Wertebereich entspricht, in dem sich die mittleren 50 % der Daten befinden. Der Medianwert wird durch die horizontale Linie innerhalb der Box gekennzeichnet und trennt die Verteilung in zwei gleich große Hälften. Die Darstellung des Minimum- und Maximumwertes erfolgt durch die Whisker der Box (unterer und oberer Fühler), die Werte beschreiben den jeweils kleinsten bzw. größten Wert des Datensatzes. Bei den sich unterhalb oder oberhalb dieser Grenze befindenden Punkte handelt es sich um Ausreißer.

6.1.1 Einfluss von Ultraschall auf die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe

Zur Auswertung des Einflusses der Ultraschalleistung auf die Dauer der Dekalzifikation in Stunden wurden die Probekörper der Studiengruppen, die mit 50%iger Ultraschalleistung (90 W) entkalkt wurden mit den Studiengruppen verglichen, bei derer Entkalkung eine 100%ige Ultraschallintensität (180 W) zum Einsatz kam. Voraussetzung für die Variabilität der Ultraschalleistung war die Verwendung eines Ultraschallgerätes (SONOCOOL).

Die Dekalzifikation mit 50%iger Ultraschalleistung (90 W) zeigte einen Medianwert von 24 Stunden. Der Minimalwert betrug 4,5 Stunden, der Maximalwert lag bei 72 Stunden. Die Zähne, die mit 100%iger Ultraschalleistung (180 W) entkalkt wurden, erreichten einen Medianwert von 12 Stunden, der damit geringer ausfiel. Das Minimum lag bei 4 Stunden, das Maximum erreichte einen Wert von 96 Stunden. Eine größere Streuung der Werte konnte verzeichnet werden (Abb. 6.6).

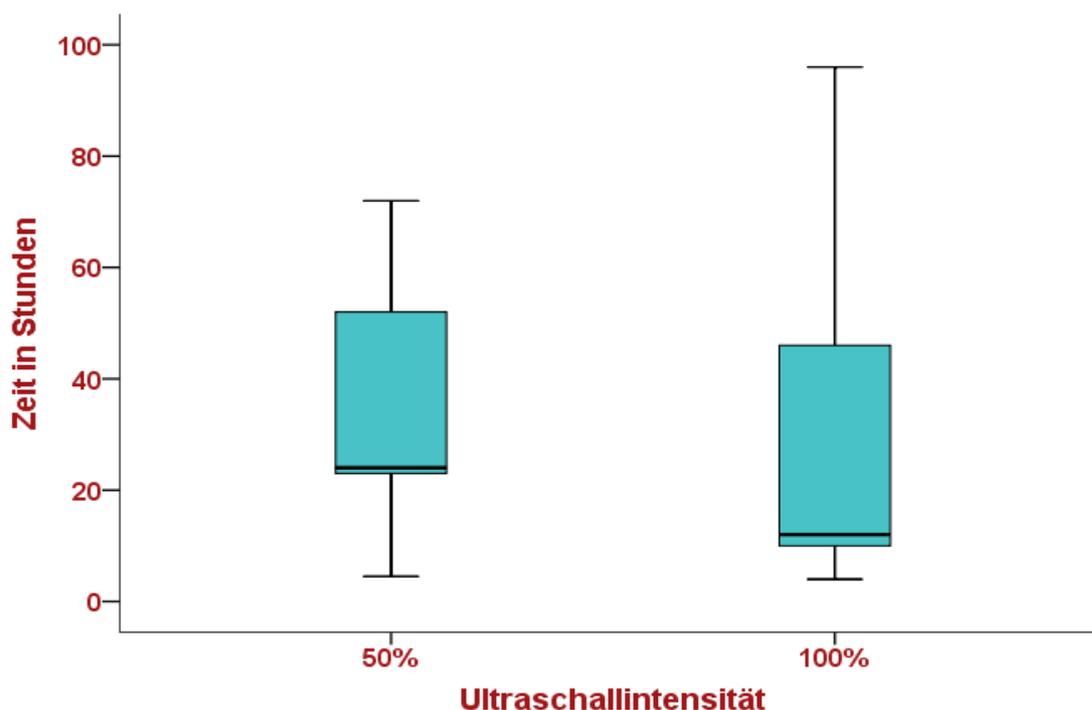


Abb. 6.6: Boxplots für die Zeit der Dekalzifikation in Stunden mit 50%iger (90 W) und 100%iger (180 W) Ultraschalleistung

Zur Überprüfung der Unterschiede zwischen den zwei Gruppen (50%ige Ultraschalleistung, 100%ige Ultraschalleistung) wurde der Mann-Whitney-U Test eingesetzt. Die paarweise Auswertung mittels des Tests hinsichtlich der Variablen Zeit in Stunden ergab signifikante Unterschiede ($p = 0,014$). Tabellarisch sind die ermittelten statistischen Werte in Tabelle 6.5 dargestellt.

Tab. 6.5: Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests (Ultraschall)

Ränge

Ultraschallintensität		N	Mittlerer Rang	Summe der Ränge
Zeit in Stunden	50%	54	61,85	3340,00
	100%	54	47,15	2546,00
	Gesamtsumme	108		

Teststatistiken

	Zeit in Stunden
Mann-Whitney-U-Test	1061,000
Wilcoxon-W	2546,000
U	-2,446
Asymp. Sig. (2-seitig)	,014

6.1.2 Einfluss der Entkalkungstemperatur auf die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe

Der Vergleich der Dauer der Dekalzifikation (Zeit in Stunden) bei verschiedenen Temperaturen (17 °C, 24 °C und 35 °C) ist der Abbildung 6.7 zu entnehmen. Die Temperatur konnte am Ultraschallgerät (SONOCOOL) variabel eingestellt werden.

Den höchsten Medianwert erreichte mit 25 Stunden die Gruppe der Proben, die bei 17 °C entkalkt wurden, gefolgt von den Zähnen der Dekalzifikation bei einer Temperatur von 24 °C mit einem Medianwert von 24 Stunden. Den geringsten Medianwert wiesen die Probekörper der Entkalkung bei 35 °C auf, dieser lag bei 12 Stunden.

Mit einem Minimum von 4 Stunden wiesen die Zähne der Entkalkung bei einer Temperatur von 35 °C den geringsten Minimalwert auf. Den höchsten Maximalwert konnten mit 96 Stunden die Proben der Dekalzifikation bei 17 °C verzeichnen.

Mit steigender Temperatur sank die Streuung der Werte. Die Standardabweichung der Proben der Dekalzifikation bei 17 °C betrug 27,95 Stunden, die der bei 35 °C entkalkten Zähne lag hingegen bei 14,41 Stunden.

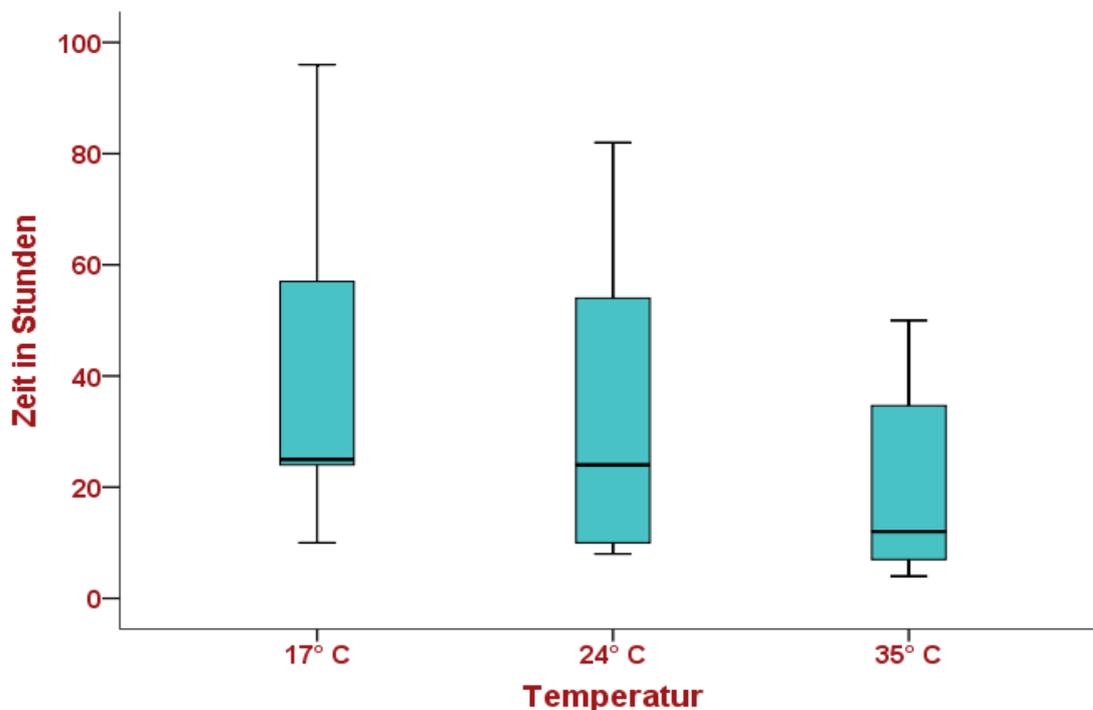


Abb. 6.7: Boxplots für die Zeit in Stunden der Dekalzifikation bei 17 °C, 24 °C und 35 °C

Die Unterschiede zwischen den drei Gruppen (17 °C, 24 °C, 35 °C) wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-H-Tests untersucht und sind in Tabelle 6.6 dargestellt. Das Ergebnis war statistisch signifikant, so dass anschließend Post-hoc Tests in Form von multiplen paarweisen Vergleichen durchgeführt wurden. Die Unterschiede zwischen den entkalkten Probekörpern entsprechen der ermittelten korrigierten Signifikanz (Korr. Sig.) und waren bei einer Temperatur von 35 °C und 17 °C ($p = 0,000$) statistisch hoch signifikant. Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen 35 °C und 24 °C ($p = 0,021$). Die paarweise Auswertung zwischen den Zähnen der Entkalkung bei 24 °C und 17 °C zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,562$).

Tab. 6.6: Ergebnisse des Kruskal-Wallis-H-Tests (Temperatur)

Ränge

Temperatur		N	Mittlerer Rang
Zeit in Stunden	17 °C	36	67,58
	24 °C	36	57,88
	35 °C	36	38,04
	Gesamtsumme	108	

Teststatistiken

	Zeit in Stunden
Chi-Quadrat	16,732
df	2
Asymp. Sig.	,000

Paarweise Vergleiche von Temperatur

Sample 1-Sample 2	Teststatistik	Standardfehler	Standardteststatistik	Sig.	Korr. Sig.
35 °C-24 °C	19,833	7,362	2,694	,007	,021
35 °C-17 °C	29,542	7,362	4,013	,000	,000
24 °C-17 °C	9,708	7,362	1,319	,187	,562

6.1.3 Einfluss des Entkalkungsmediums auf die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe

Um den Einfluss des Entkalkungsmediums auf die Dauer der Entkalkung in Stunden zu untersuchen, erfolgte der in Abbildung 6.8 dargestellte Vergleich der Probekörper, die in 7%iger Salpetersäure (Medium I), 50%iger Ameisensäure (Medium II) und Decal[®]-Lösung (Medium III) entkalkt wurden.

Die Dekalzifikation mit 7%iger Salpetersäure wies den geringsten Medianwert von 10 Stunden auf, gefolgt von der Entkalkung mit Decal[®]-Lösung mit einem Median von 20 Stunden. Die mit 50%iger Ameisensäure entkalkten Proben erreichten einen Medianwert von 54 Stunden.

Der geringste Minimalwert betrug 4 Stunden (7%ige Salpetersäure), der höchste Maximalwert lag bei 96 Stunden (50%ige Ameisensäure).

Die Abbildung 6.8 zeigt deutlich, dass die Dekalzifikation mit 50%iger Ameisensäure eine hohe Streuung aufweist (Standardabweichung 21,56), während die Streuung der Probekörper, die mit 7%iger Salpetersäure entkalkt wurden, mit einer Standardabweichung von 7,74 gering ausfällt.

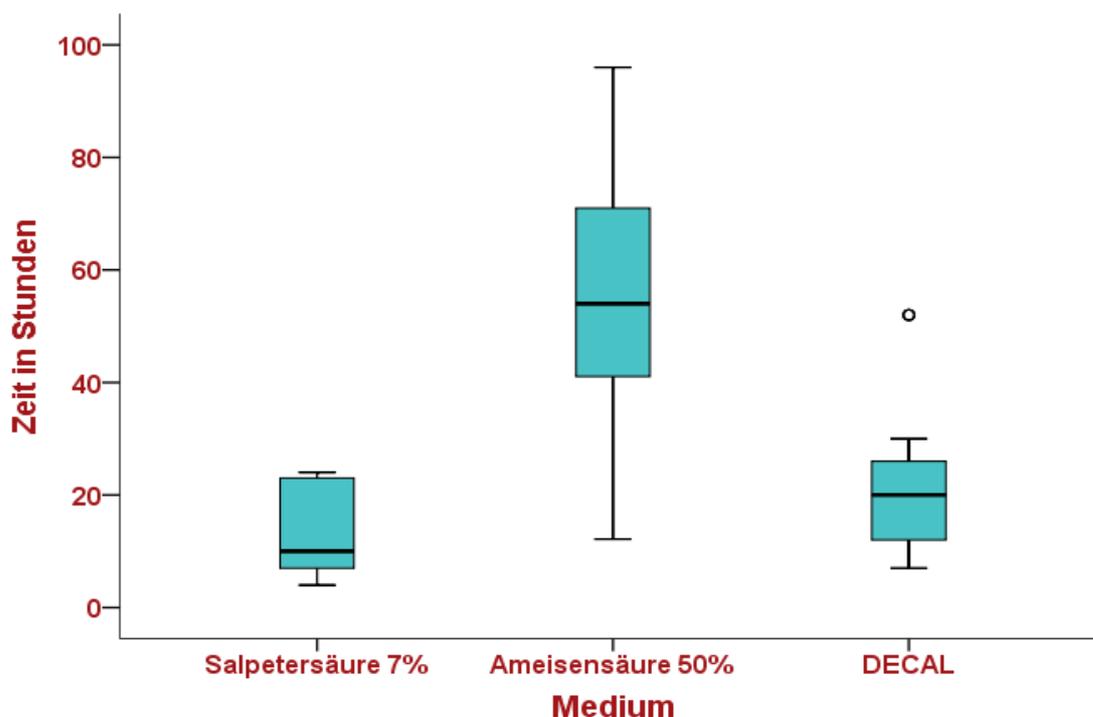


Abb. 6.8: Boxplots für die Zeit der Dekalzifikation in Stunden mit 7%iger Salpetersäure (Medium I), 50%iger Ameisensäure (Medium II) und Decal[®]-Lösung (Medium III)

Da die Unterschiede zwischen den drei untersuchten Medien nach Anwendung des Kruskal-Wallis-H-Tests signifikant waren, wurden des Weiteren multiple paarweise Vergleiche durchgeführt, die der Tabelle 6.7 zu entnehmen sind. Die Unterschiede zwischen den Entkalkungsmedien 7%ige Salpetersäure und Decal[®]-Lösung waren entsprechend der korrigierten Signifikanz (Korr. Sig.) signifikant ($p = 0,023$). Im Vergleich zur 50%igen Ameisensäure zeigten beide Medien hoch signifikante Unterschiede ($p = 0,000$).

Tab. 6.7: Ergebnisse des Kruskal-Wallis-H-Tests (Medium)

Ränge

Medium		N	Mittlerer Rang
Zeit in Stunden	Salpetersäure 7%	36	28,35
	Ameisensäure 50%	36	87,17
	Decal [®]	36	47,99
	Gesamtsumme	108	

Teststatistiken

	Zeit in Stunden
Chi-Quadrat	66,179
df	2
Asymp. Sig.	,000

Paarweise Vergleiche von Medium

Sample 1-Sample 2	Teststatistik	Standardfehler	Standardteststatistik	Sig.	Korr. Sig.
Salpetersäure 7%- Decal [®]	-19,639	7,362	-2,668	,008	,023
Salpetersäure 7%-Ameisensäure 50%	-58,819	7,362	-7,989	,000	,000
Decal [®] -Ameisensäure 50%	39,181	7,362	5,322	,000	,000

6.1.4 Einfluss von Karies auf die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe

Um den Einfluss des pathologischen Zustandes (Karies) eines Zahnes auf die Dauer der Dekalzifikation zu untersuchen, wurden die intakten, kariesfreien Probekörper mit den kariösen verglichen. Als gemeinsames Merkmal wiesen alle kariösen Proben einen Defekt des Grades C4 und somit einen Zahnhartsubstanzverlust von Schmelz- und Dentinarealen bis in die innere Dentinhälfte auf. Die Ergebnisse sind grafisch in Abbildung 6.9 dargestellt.

Beide Gruppen wiesen einen Medianwert von 24 Stunden auf. Die Ergebnisse wichen auch in Bezug auf den Minimalwert von 4 Stunden und den Maximalwert von 96 Stunden nicht voneinander ab.

Mit Angaben von 24,34 Stunden (intakt) und 23,85 (kariös) kann auch die Standardabweichung als vergleichbar bezeichnet werden.

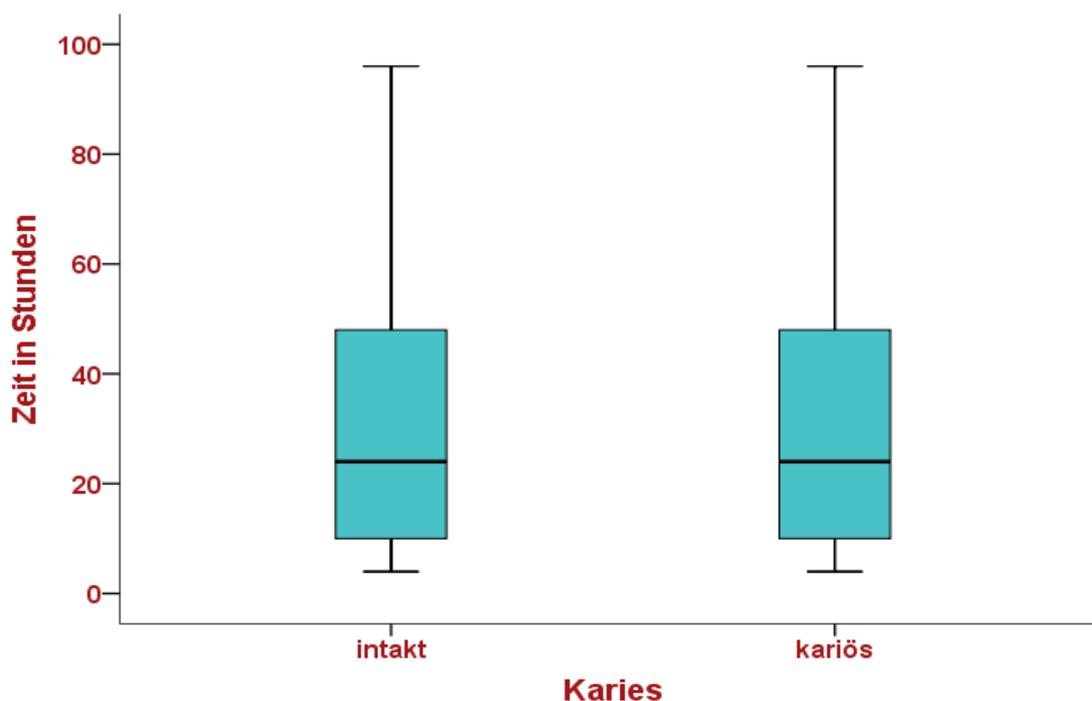


Abb. 6.9: Boxplots für die Zeit der Dekalzifikation in Stunden intakter und kariöser Zähne

Der Mann-Whitney-U-Test wurde zur paarweise Auswertung hinsichtlich der Variablen Zeit in Stunden eingesetzt und ergab keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,978$) zwischen intakten und kariösen Zähnen. Die ermittelten Ergebnisse sind in der Tabelle 6.8 dargestellt.

Tab. 6.8: Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests (Karies)

Ränge

pathologischer Zustand (Karies)		N	Mittlerer Rang	Summe der Ränge
Zeit in Stunden	intakt	54	54,58	2947,50
	kariös	54	54,42	2938,50
	Gesamtsumme	108		

Teststatistiken

	Zeit in Stunden
Mann-Whitney-U-Test	1453,500
Wilcoxon-W	2938,500
U	-,028
Asymp. Sig. (2-seitig)	,978

6.1.5 Einfluss des Zahntyps auf die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe

Abschließend wurde der Einfluss verschiedener Zahntypen auf die Dauer der Entkalkung untersucht. Es erfolgte der Vergleich zwischen drei unterschiedlichen Zahntypen (Dentes incisivi medialis, Dentes canini, Dentes sapientiae), der grafisch in Abbildung 6.10 dargestellt ist.

Während die Schneidezähne (Dentes incisivi medialis) mit 17,58 Stunden den niedrigsten Medianwert aufwiesen, lag dieser bei den Eckzähnen (Dentes canini) und dritten Molaren (Dentes sapientiae) bei jeweils 24 Stunden.

Den niedrigsten Minimalwert von 4 Stunden und den niedrigsten Maximalwert von 57 Stunden wiesen die Schneidezähne auf. Die Eckzähne verzeichneten einen Minimalwert von 4,5 Stunden und einen Maximalwert von 96 Stunden. Bezüglich der dritten Molaren lag das Minimum bei 7 Stunden, das Maximum ebenfalls bei 96 Stunden. Folglich verzeichnete die Gruppe der Eckzähne die höchste Streuung.

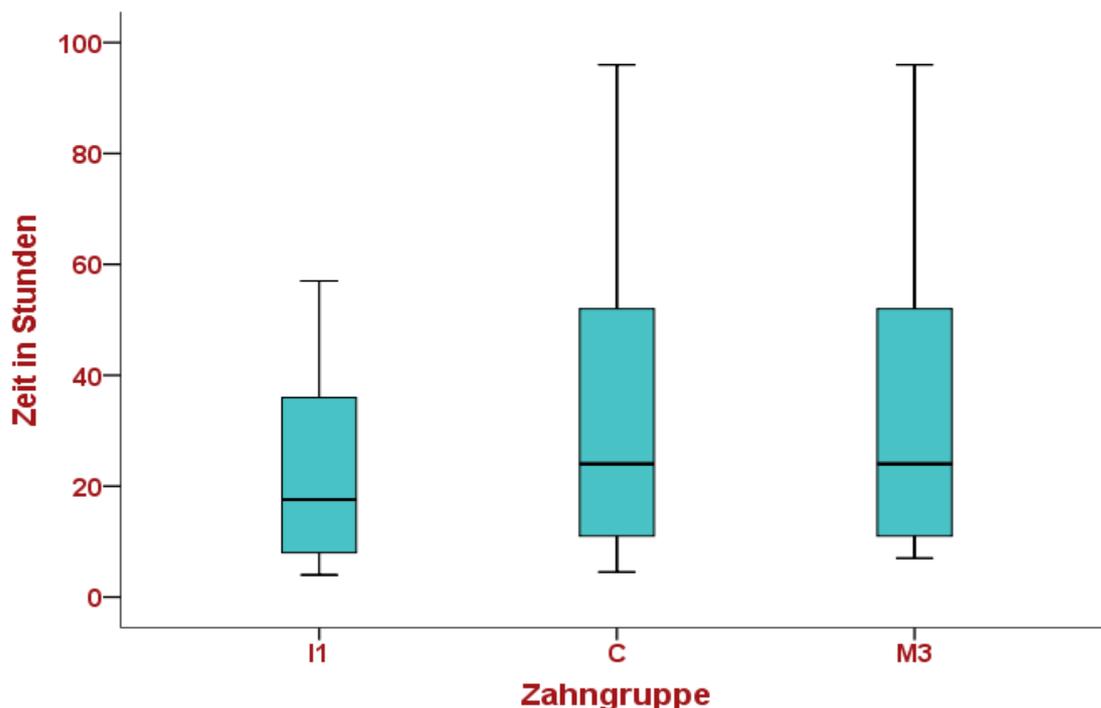


Abb. 6.10: Boxplots für die Zeit der Dekalzifikation in Stunden von Dentes incisivi medialis (I1), Dentes canini (C), Dentes sapientiae (M3)

Die Unterschiede zwischen den drei Gruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-H-Test untersucht (Tab. 6.9). Das Ergebnis war nicht statistisch signifikant ($p = 0,115$), so dass anschließend keine paarweisen Vergleiche durchgeführt wurden.

Tab 6.9: Ergebnisse des Kruskal-Wallis-H-Tests (Zahntyp)

Ränge

Zahntyp		N	Mittlerer Rang
Zeit in Stunden	I1	36	45,69
	C	36	58,21
	M3	36	59,60
	Gesamtsumme	108	

Teststatistiken

	Zeit in Stunden
Chi-Quadrat	4,327
df	2
Asymp. Sig.	,115

6.2 Qualitative Auswertung

Nach der Dekalzifikation und Teilung des Zahnes erfolgte im histologischen Standardverfahren die Einbettung der Proben in Paraffin und die Anfertigung von Schnittpräparaten mit Hilfe eines Mikrotoms. Die Präparate wurden nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung einer lichtmikroskopischen, optischen Analyse unterzogen.

Schneidbarkeit der Probekörper

- Alle 108 Probekörper der ultraschallunterstützten Dekalzifikation mit Hilfe des Ultraschallgerätes *SONOCOOL* waren schneidbar; die Schneidbarkeit war sehr gut.
- 12 der insgesamt 18 konventionell entkalkten Probekörper waren schneidbar; die Schneidbarkeit war gut.
- 6 Probekörper, die konventionell mit 50%iger Ameisensäure entkalkt wurden, konnten aufgrund eines gelartigen Zustandes nicht geschnitten und histologisch aufbereitet werden.
- Insgesamt waren 120 Probekörper schneidbar.

Anfärbbarkeit mit Hämatoxylin-Eosin

- Die Anfärbbarkeit mit Hämatoxylin-Eosin war bei allen 120 angefertigten Schnittpräparaten gegeben.
- Die Färbung der 120 Schnitte war einheitlich; es konnten keine Unterschiede zwischen den gefärbten Präparaten verzeichnet werden.

Mikroskopische Darstellbarkeit der Zahnhartgewebe

- Dentin- und Zementstrukturen des Zahnhartgewebes konnten bei allen 120 gefärbten Schnittpräparaten lichtmikroskopisch nachgewiesen werden.
- Zahnschmelz ließ sich nicht darstellen.
- Pulpagewebe war nicht nachweisbar.

Die Abbildungen 6.11 - 6.14 zeigen exemplarisch die nach der Dekalzifikation mit je 50%iger und 100%iger Ultraschallintensität angefertigten Schnittpräparate bei 10-facher und 20-facher Vergrößerung nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

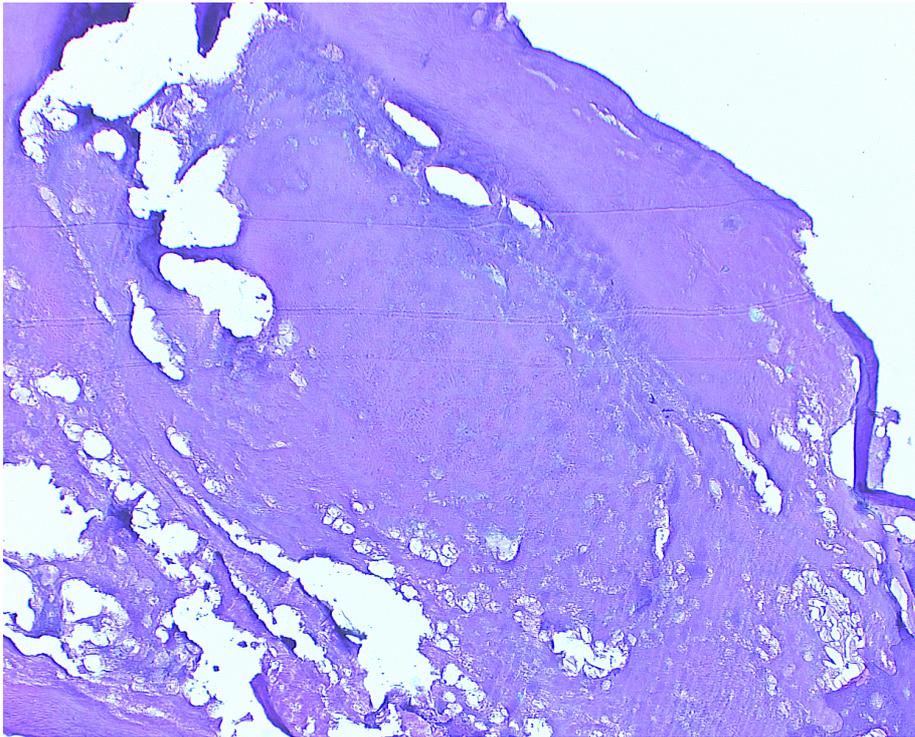


Abb. 6.11: Histopathologisches Schnittpräparat eines kariösen Dens caninus (C) nach Entkalkung mit 50%iger Ultraschalleistung bei 35 °C unter Verwendung von Medium II (50%ige Ameisensäure), HE-Färbung, 10-fache Vergrößerung

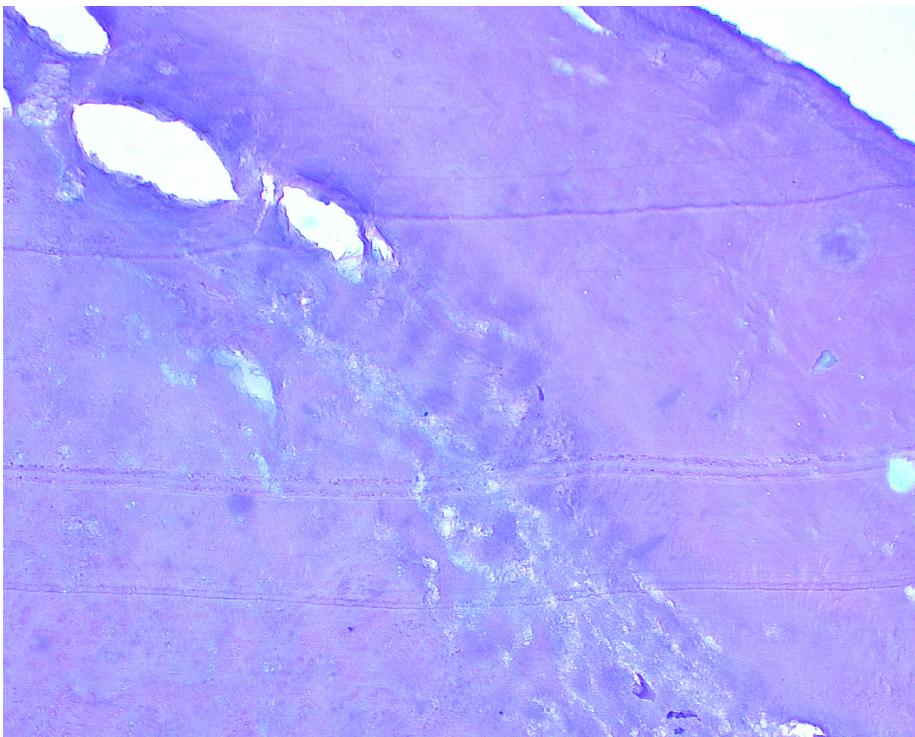


Abb. 6.12: Histopathologisches Schnittpräparat eines kariösen Dens caninus (C) nach Entkalkung mit 50%iger Ultraschalleistung bei 35 °C unter Verwendung von Medium II (50%ige Ameisensäure), HE-Färbung, 20-fache Vergrößerung

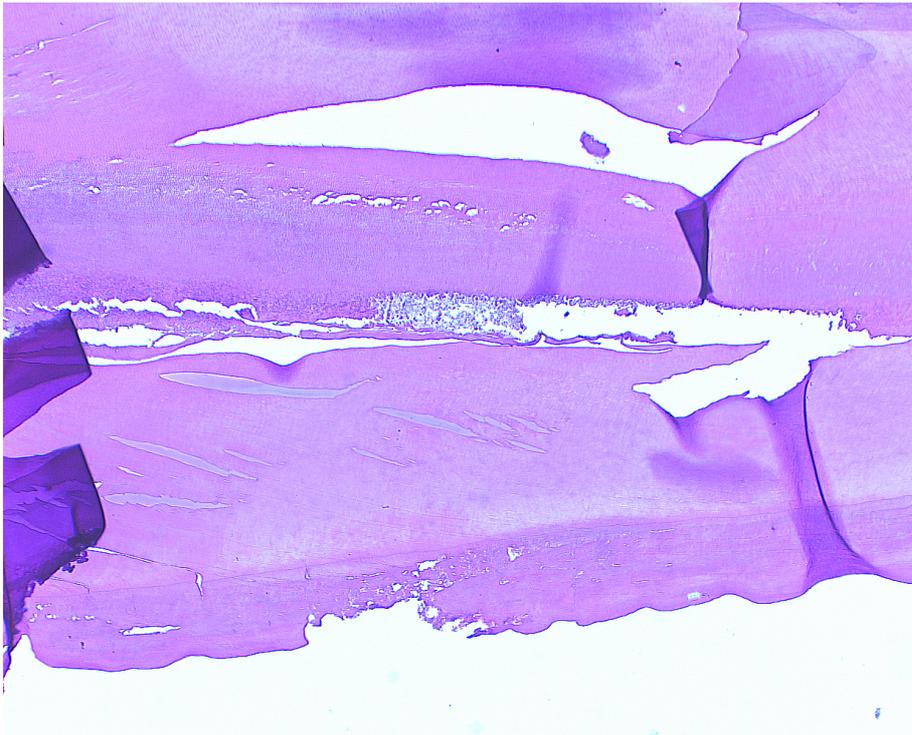


Abb. 6.13: Histopathologisches Schnittpräparat eines kariösen Dens incisivus (I) nach Entkalkung mit 100%iger Ultraschalleistung bei 17 °C unter Verwendung von Medium II (50%ige Ameisensäure), HE-Färbung, 10-fache Vergrößerung

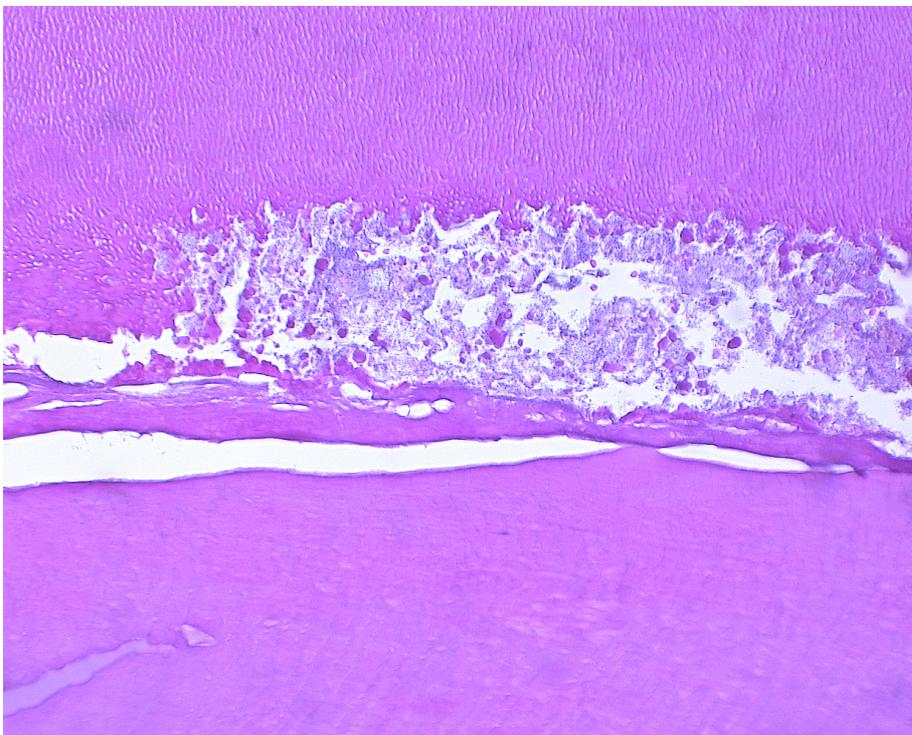


Abb. 6.14: Histopathologisches Schnittpräparat eines kariösen Dens incisivus (I) nach Entkalkung mit 100%iger Ultraschalleistung bei 17 °C unter Verwendung von Medium II (50%ige Ameisensäure), HE-Färbung, 20-fache Vergrößerung

6.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Quantitativ zeigten sich bezogen auf die Dauer der Dekalzifikation in Stunden hinsichtlich des Vergleichs zwischen 50%iger (90 W) und 100%iger (180 W) Ultraschalleistung statistisch signifikante Unterschiede.

Der Vergleich der verschiedenen Entkalkungstemperaturen (17 °C, 24 °C, 35 °C) in Bezug auf die Entkalkungsdauer resultierte ebenso wie der Vergleich zwischen den verwendeten Entkalkungsmedien (7%ige Salpetersäure, 50%ige Ameisensäure, Decal[®]-Lösung) in signifikanten Unterschieden.

Hinsichtlich des Vergleichs des pathologischen Zustandes der Probekörper (intakt, kariös) und der untersuchten Zahntypen (Dentes incisivi medialis, Dentes canini, Dentes sapientiae) ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede bezogen auf die Dauer der Dekalzifikation.

Die qualitative Begutachtung beinhaltete die Schneidbarkeit der Probekörper nach dem ermittelten Endpunkt der Dekalzifikation, die Anfärbbarkeit mit Hämatoxylin-Eosin und die Darstellbarkeit der Gewebestrukturen des Zahnes.

Alle 108 Probekörper der ultraschallunterstützten Dekalzifikation und 12 der insgesamt 18 konventionell entkalkten Probekörper waren schneidbar, so dass insgesamt 120 Schnittpräparate hergestellt werden konnten. 6 Probekörper, die konventionell mit 50%iger Ameisensäure entkalkt wurden, konnten aufgrund eines gelartigen Zustandes nicht geschnitten und histologisch aufbereitet werden.

Eine einheitliche Anfärbbarkeit mit Hämatoxylin-Eosin war bei allen 120 angefertigten Schnittpräparaten gegeben.

Lichtmikroskopisch ließen sich Dentin- und Zementstrukturen des Zahnhartgewebes bei allen 120 gefärbten Schnittpräparaten nachweisen, während der Zahnschmelz und das Pulpagewebe keine Darstellung fanden.

7 Diskussion

7.1 Diskussion von Material und Methode

7.1.1 Zahnproben

Für die Versuche wurden 126 menschliche extrahierte Zähne der zweiten Dentition verwendet. Die Verwendung menschlicher Zähne verfolgte das Ziel, die Situation im histologischen und histopathologischen Routinebetrieb, der die lichtmikroskopische Untersuchung von menschlichem Zahnhartgewebe fokussiert, nachzuahmen.

Alternativ bietet sich die Verwendung von tierischen Zähnen an. Birkedal-Hansen führte Untersuchungen zur Entkalkung von Zahnhartsubstanz anhand von Probekörpern durch, die zuvor aus Elfenbein eines Elefanten gewonnen wurden (Birkedal-Hansen 1974). Vongsavan et al. untersuchten die Entkalkung von Ratten- und Katzenzähnen (Vongsavan et al. 1990). Rattenzähne waren ebenfalls Untersuchungsgegenstand in den Versuchen zur Dekalzifikation von Smith und Warshawsky und Moore (Smith 1990, Warshawsky und Moore 1967). Des Weiteren weisen bovine Zähne im Vergleich zu menschlichen Zähnen morphologische Ähnlichkeiten auf (Camargo et al. 2008). Jedoch stellen tierische Zähne im Allgemeinen keinen Vorteil gegenüber menschlichen Zähnen in Bezug auf die strukturellen Eigenschaften des Zahnhartgewebes dar und sind zudem kein Untersuchungsgegenstand in der humanen Histopathologie, so dass aus einer Untersuchung keine verlässlich übertragbaren Angaben zur Dauer der routinemäßigen Entkalkung menschlicher Zähne resultieren könnten. Vergleichbare Studien mit ähnlichem Versuchsaufbau wurden mit menschlichen Zähnen der zweiten Dentition durchgeführt (Zappa et al. 2005, Mattuella et al. 2007, Singh und Sircar 2010, Afreen Nadaf et al. 2011, Sanjai et al. 2012).

Die 126 Probekörper setzten sich aus Zähnen anatomisch unterschiedlicher Beschaffenheit zusammen, dabei handelte es sich um untere, mittlere Schneidezähne (*Dentes incisivi* der Mandibula), obere Eckzähne (*Dentes canini* der Maxilla) und untere und obere Weisheitszähne (*Dentes sapientiae* der Mandibula und Maxilla). Ausschlaggebend für die Untersuchung unterschiedlicher Zahntypen war ihre differente anatomische Form, Länge und Breite, so dass sich aus der durchgeführten Studie übertragbare Zeitangaben auf Zähne unterschiedlicher Anatomie ergeben konnten, die auch im histologischen Routinebetrieb entkalkt werden.

Der mittlere untere Schneidezahn (*Dens incisivus medialis inferior*) besitzt eine Wurzel und stellt mit einer durchschnittlichen Zahnlänge von 21,5 mm und seiner in mesio-

distaler Richtung stark abgeplatteten Form den kleinsten Zahntyp dar; sein mesio-distaler Kronendurchmesser beträgt 5,4 mm, die vestibulo-orale Breite misst im Durchschnitt 6 mm. Der obere Eckzahn (*Dens caninus superior*) weist eine Wurzel und eine durchschnittliche Zahnlänge von 28 mm auf, er ist folglich der längste Zahn aller menschlichen Zähne zweiter Dentition und besitzt einen mesio-distalen Kronendurchmesser von 7,6 mm, vestibulo-oral beträgt dieser 8,1 mm. Zur Repräsentation mehrwurziger Zähne erfolgte zudem die Untersuchung von dritten Molaren (*Dens sapientiae superiores et inferiores*). Die Weisheitszähne des Ober- und Unterkiefers weisen die Grundformen der entsprechenden Molaren auf, die Angaben zu ihrer Länge und Breite sind jedoch variabel (Lehmann et al. 2012).

Die ausgewählten Zahntypen stellen mit ihrer differenten Beschaffenheit die Variabilität der humanen Zähne zweiter Dentition dar; es galt die Auswirkung dessen auf die Dauer ihrer Entkalkung zu untersuchen. Die Dekalzifikation mehrerer Zahntypen wurde ebenfalls von Zappa et al. berücksichtigt, die eine Gesamtzahl von 288 Zähnen untersuchten, die sich aus Inzisiven, Caninen, Prämolaren und Molaren zusammensetzte (Zappa et al. 2005). Prakash et al. nahmen in ihrer Studie eine Unterteilung in 3 Zahngruppen vor und untersuchten Frontzähne, Prämolaren und Molaren (Prakash et al. 2014). Singh und Sircar führten in ihrer Studie eine Dekalzifikation mit einer Zahngruppe, bestehend aus zwei Zahntypen, durch; sie untersuchten 40 erste und zweite Prämolaren (Singh und Sircar 2010). Afreen Nadaf et al. beurteilten den Entkalkungsprozess anhand von 30 Molaren und fokussierten somit ebenfalls eine Zahngruppe (Afreen Nadaf et al. 2011). Keklikoglu et al. entfernten die Kronen einwurzeliger Zähne, so dass lediglich die Wurzeln der Probekörper dekalzifiziert und untersucht wurden (Keklikoglu et al. 2013).

Des Weiteren waren sowohl intakte, kariesfreie als auch kariöse Zähne Gegenstand der Untersuchung. Die Histopathologie analysiert routinemäßig den mikroskopischen Aspekt krankhafter Veränderungen. Orale pathologische Veränderungen sind oftmals dentogenen Ursprungs, die Karies wiederum ist die häufigste Erkrankung der Zahnhartsubstanzen (Hellwig et al. 2013). Ziel der vorliegenden Studie war es daher, auch die Dekalzifikation erkrankter, kariöser Zahnhartsubstanz und die Unterschiede im Vergleich zu gesunder Substanz zu untersuchen; folglich wurden intakte und kariöse Probekörper zu den Versuchen zugelassen. Während Afreen Nadaf et al. und Singh und Sircar die Dekalzifikation gesunder, kariesfreier Zähne untersuchten, evaluierten Zappa et al. den Vergleich zwischen gesunder und kariöser Zahnhartsubstanz (Afreen

Nadaf et al. 2011, Singh und Sircar 2010, Zappa et al. 2005). Mattuella et al. untersuchten ausschließlich Zähne mit kariösen Läsionen, Kriterium ihrer Selektierung war eine Ausdehnung der Karies bis in das Dentin ohne Erreichen der Pulpa; wie in der vorliegenden Studie kam zur Diagnostik des Kariesfortschritts ein röntgenologischer Nachweis zur Anwendung (Mattuella et al. 2007).

Das Alter der extrahierten Zähne war nicht bekannt. Das Gewebe des menschlichen Zahnes unterliegt lebenslang fortschreitenden Veränderungen, wie der Bildung von Sekundär- und Tertiärdentin. Typisches Merkmal für den gealterten Zahn ist die Sklerose des Dentins (Klimm et al. 2003). Durch das unbekanntes Alter wiesen die extrahierten Zähne folglich einen unterschiedlich großen Anteil an Hartgewebe auf, so dass es trotz sorgfältiger Selektierung in der vorliegenden Studie zu Unterschieden zwischen den Probekörpern kam. Um diesen Einfluss auf die Auswertung der Ergebnisse zu eliminieren, verwendeten Prakash et al. Zähne von Patienten unterschiedlichen Alters und legten drei Altersgruppen fest (Prakash et al. 2014).

Die Entfernung von Zahnstein, Konkrement und Ablagerungen reduzierte den Einfluss ergebnisverfälschender Gewebe auf die Dauer der Dekalzifikation der Zahnhartgewebe.

7.1.2 Gruppeneinteilung

in der vorliegenden Studie wurde die Anzahl der untersuchten Probekörper für eine Studiengruppe auf 6 festgelegt. Insgesamt wurden 21 Studiengruppen gebildet, woraus eine Gesamtprobenzahl von 126 resultierte. Jede Studiengruppe setzte sich aus 2 Zähnen unterschiedlicher Zahntypen (Dentes incisivi medialis der Mandibula, Dentes canini der Maxilla, Dentes sapientiae der Mandibula und Maxilla) zusammen, je einer intakten und einer kariösen Probe. Durch die vorgenommene Gruppeneinteilung konnte der Einfluss von Ultraschall, Entkalkungsflüssigkeit, Temperatur, Karies und Zahntyp untersucht werden.

Afreen Nadaf et al. legten in ihrer Studie eine Anzahl von 10 Zähnen gleicher Beschaffenheit pro Gruppe und eine Gesamtgruppenanzahl von 3 fest (Afreen Nadaf et al. 2011). Singh und Sircar untersuchten insgesamt 40 Proben, die sie auf 4 Gruppen mit einer Anzahl von je 10 Zähnen verteilten (Singh und Sircar 2010). Beide Studien zeigen keine Variabilität in Bezug auf die Zusammensetzung einer Gruppe. Zappa et al. nahmen hingegen eine vergleichbare Gruppenzusammensetzung vor, bestehend aus jeweils 8 Zähnen unterschiedlicher Zahntypen in intaktem und kariösem Zustand (Zappa et al. 2005).

7.1.3 Probenlagerung

Vor Beginn der Untersuchungen lagerten die Zähne für einen Zeitraum von maximal einem Jahr in einer 20%igen Isopropanollösung.

Die Wasser-Alkohollösung besitzt eine antiseptische Eigenschaft und wirkt desinfizierend, das Wachstum von Keimen wird eingeschränkt (Frey und Althaus 2010). Von einer Lagerung in physiologischer Kochsalzlösung oder destilliertem Wasser wurde abgesehen, da diese nicht über ein keimreduzierendes Wirkspektrum verfügen.

Eine wichtige Anforderung an das Lagerungsmedium bestand darin, keinen dekalzifizierenden Einfluss auf die Proben zu haben, der zu einer Beeinflussung der ermittelten Dauer der Entkalkung führte. Die Zähne sollten durch das Lagerungsmedium nicht in ihrer Struktur verändert werden. Baumeister konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen in Alkohol gelagerten Zähnen und einer Kontrollgruppe in Bezug auf einen Mineralverlust feststellen (Baumeister 2011).

7.1.4 Entkalkungsmedien

Zur Dekalzifikation von Zahnhartgewebe stehen verschiedene Flüssigkeiten zur Verfügung, die auch bei der Entkalkung von Knochenmaterial Anwendung finden, wodurch ein Vergleich zwischen Untersuchungen von Zahn und Knochen möglich wird (Gabe 1976). In der vorliegenden Studie wurde die Entkalkung der selektierten Probekörper unter Verwendung von drei Entkalkungsmedien durchgeführt: 7%ige Salpetersäure (Medium I), 50%ige Ameisensäure (Medium II) und Decal[®]-Lösung (Decal Chemical Corporation, Tallman, NY, USA; Medium III).

Die Dekalzifikation von Zahnhartgewebe durch Säure gilt als Standardverfahren (Sheehan und Hrapchak 1980) und wurde durch die Verwendung von Salpetersäure und Ameisensäure untersucht. Salpetersäure gilt als starke anorganische, Ameisensäure als starke organische Säure; beide gelten in der Literatur als gebräuchliche Säuren zur Entkalkung von Zahnhartgewebe (Lang 2006). Die Entkalkung durch Säuren ist Gegenstand verschiedener vergleichbarer Studien: Singh und Sircar untersuchten den Vergleich zwischen der Dekalzifikation mit 10%iger Salpetersäure und 10%iger Ameisensäure (Singh und Sircar 2010). Sangeetha et al. verwendeten 5%ige Salpetersäure und 5%ige Ameisensäure in ihren Untersuchungen (Sangeetha et al. 2013). Joshi et al. legten den Fokus in ihrer Studie auf die Entkalkung mit Salpetersäure in unterschiedlichen Konzentrationen (Joshi et al. 2014), während Keklikoglu et al. und Hatta et al. die Dekalzifikation mit Ameisensäure evaluierten

(Keklikoglu et al. 2013, Hatta et al. 2014). Bereits frühe Untersuchungen zur Entkalkung von Zähnen beinhalten die Verwendung von starken Säuren (Menzel 1975, Nossek 1965). Sie stellen einen festen Bestandteil im histologischen Routinebetrieb dar und fanden folglich Beachtung in der vorliegenden Studie.

Die Entkalkung mit Chelatbildnern (EDTA) stellt im Vergleich zur Entkalkung mit Säuren ein schonenderes Entkalkungsverfahren dar (Mjör 1973). Die Entkalkungsdauer ist jedoch gegenüber der Dekalzifikation mit Säuren erhöht: Verschiedene Studien kommen zu dem Ergebnis, dass die Dekalzifikation mit EDTA im Vergleich zu Säuren die langsamste darstellt, sich hinsichtlich der Qualität der Gewebeproben jedoch die besten Ergebnisse ergeben (Singh und Sircar 2010, Sanjai et al. 2012, Sangeetha et al. 2013).

Die unter dem Handelsnamen Decal[®] erhältliche Entkalkungslösung besteht aus EDTA, Salzsäure (HCl) und entionisiertem Wasser. Die Lösung kombiniert die dekalzifizierenden Eigenschaften von Säuren und Chelatbildnern. In der vorliegenden Studie fand sie Verwendung, um den Einfluss der Kombination der Substanzen auf die Dauer der Entkalkung unter Begutachtung des Zustandes der Gewebe zu untersuchen, während vergleichbare Untersuchungen entweder den Einfluss von Säuren oder Chelatbildner evaluierten.

7.1.5 Konventionelle Dekalzifikation

Das konventionelle Vorgehen ist fester Bestandteil histologischer und histopathologischer Untersuchungen von Zahnhartgewebe und beinhaltet das Einlegen der Proben in Behälter, die mit den verwendeten Entkalkungsflüssigkeiten gefüllt werden. So finden sich in der Literatur bereits frühe Angaben zu diesem Verfahren (Pallaske und Schmidel 1959, Berg 1972).

In der vorliegenden Untersuchung wurden Glasbehälter in einem Mengenverhältnis von 1:20 (Zahn zu Flüssigkeit) entsprechend einer Angabe von Lang mit den drei Entkalkungsflüssigkeiten gefüllt (Lang 2006). Die konventionelle Entkalkung erfolgte bei Raumtemperatur. Zahlreiche Studien, die die Dekalzifikation von Zahnhartgewebe untersuchen, führen die Versuche konventionell bei Raumtemperatur durch (Zappa et al. 2005, Afreen Nadaf et al. 2011, Sanjai et al. 2012, Keklikoglu et al. 2013, Joshi et al. 2014). Da die vorliegende Studie den Einfluss von Ultraschall und Temperatur auf den Dekalzifikationsprozess fokussiert, können die konventionell entkalkten Probekörper als Kontrollgruppe zusammengefasst werden.

7.1.6 Dekalzifikation unter Verwendung von Ultraschall und Variabilität der Temperatur
Um die Faktoren Ultraschallintensität und Temperatur in die Untersuchungen einbeziehen zu können, wurde für die vorliegende Studie das Ultraschallgerät SONOCOOL (Bandelin electronic GmbH&Co. KG, Berlin, Deutschland) verwendet; es handelt sich dabei um ein medizintechnisches Produkt, das in der Pathologie und Analyselaboren seinen Einsatz findet. Laut Herstellerangaben ist eine deutlich schnellere Entkalkung von Hartgewebeproben gegenüber herkömmlichen Verfahren möglich (Bandelin et al. 2006).

Das Gerät wurde mit einer Ultraschalleistung von 180 W und einer Ultraschallfrequenz von 35 kHz betrieben und hatte die Aufgabe, Kavitationseffekte zu erzeugen, die zur Auslösung von turbulenten Strömungen führen, folglich die Durchmischung von Reagens fördern und die Relativbewegung von Teilchen in Flüssigkeiten beschleunigen (Bandelin et al. 2006). Des Weiteren erläutert Lang, dass durch die Technik des Ultraschalls kristalline Strukturen des anorganischen Anteils zielgerichtet zertrümmert werden, wodurch eine rasche und zellschonende Entkalkung mit geeigneten Lösungen durchgeführt werden soll (Lang 2006). Burck gibt an, dass der Entkalkungsprozess durch Beschallung bei besseren Ergebnissen der Strukturhaltung beschleunigt werden kann (Burck 1988).

Es galt folglich, den Einfluss von Ultraschall unterschiedlicher Leistung (90 W, 180 W) auf den Dekalzifikationsprozess zu untersuchen. Hatta et al. untersuchten in ihrer Studie den Einfluss von Ultraschall auf die Dekalzifikation von Rinderknochen (Rippen) und verwendeten ein Ultraschall-Reinigungsgerät, das mit 40 kHz betrieben wurde (Hatta et al. 2014). In der Literatur existieren keine vergleichenden Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Ultraschalleistungen auf die Entkalkung von Zähnen.

Neben der Verwendung von Ultraschall gilt die Erhöhung der Temperatur des das Zahnhartgewebe umgebenden Mediums als in der Literatur beschriebene Maßnahmen, die Entkalkung zu beschleunigen (Lang 2006). Nossek zeigte in einer Studie, dass die Wärmewirkung einen wesentlichen Faktor für die schnellere Entkalkung von Hartgeweben darstellt und empfiehlt die Entkalkung bei 37 °C (Nossek 1965). Singh und Sircar verglichen in ihrer In-Vitro-Untersuchung die Entkalkung bei Raumtemperatur mit der Dekalzifikation in einem Mikrowellenofen bei 38-40 °C und erlangten mit einer durchschnittlichen Zeit von 2 Tagen die kürzeste Entkalkungsdauer ohne eine Gewebeschädigung zu verzeichnen (Singh und Sircar 2010). Auch

Sangeetha et al. führten die Entkalkung von Hartgewebe mit Hilfe eines Mikrowellengerätes bei einer Temperatur von 41-43 °C durch (Sangeetha et al. 2013). Der zu variierende Temperaturbereich des Ultraschallbades des Ultraschallgerätes SONOCOOL betrug 15-35 °C. In der vorliegenden Studie wurde die Dekalzifikation bei drei verschiedenen Temperaturen (17 °C, 24 °C und 35 °C) durchgeführt. Damit wurden die empfohlenen Temperaturangaben in der Literatur berücksichtigt, zudem sollte untersucht werden, ob bereits niedrigere Temperaturen die Dauer der Entkalkung beeinflussen.

Die Einsatzgefäße des Ultraschallgeräts bestanden aus Glas und wurden mit 100 ml der entsprechenden Entkalkungsflüssigkeit gefüllt. Dies gewährleistete die Vergleichbarkeit mit der konventionell entkalkten Kontrollgruppe, deren Entkalkung im vergleichbaren Verhältnis von Zahn zu Flüssigkeit durchgeführt wurde, und fand in Anlehnung an Untersuchungen statt, in denen die Probekörper ebenfalls in 100 ml Flüssigkeit eingelegt wurden (Zappa et al. 2005, Singh und Sircar 2010, Afreen Nadaf et al. 2011, Sangeetha et al. 2013, Joshi et al. 2014).

7.1.7 Bestimmung des Endpunktes der Dekalzifikation

Die Ermittlung des Endpunktes der Dekalzifikation war in der vorliegenden Studie von wesentlicher Bedeutung, um exakte und vergleichbare Werte in Bezug auf die Dauer der Entkalkung zu erhalten. Zudem kann nur nach ausreichender Entkalkung zur anschließenden Verarbeitung der Zahnhartgewebe mit dem Mikrotom übergegangen werden; gleichzeitig galt es zu vermeiden, dass die Gewebestrukturen durch eine übermäßige Dekalzifikation geschädigt werden. Die übermäßige Einwirkung der Entkalkungsmedien führt zu unzureichenden Ergebnissen (Mawhinney et al. 1984).

Zur Bestimmung des exakten Endpunktes der Dekalzifikation werden in der Literatur das chemische, das röntgenologische und das physikalische Prüfungsverfahren beschrieben.

Der Ammoniumoxalat-Test stellt eine Möglichkeit dar, den Entkalkungsprozess chemisch zu überprüfen und eignet sich sowohl für säureentkalkte als auch für EDTA-entkalkte Probekörper (Lang 2006). Der Entkalkungsprozess gilt als abgeschlossen, wenn nach Zugabe einer Ammoniumoxalat-Lösung keine Trübung auftritt. Sanjai et al. fügten der Entkalkungsflüssigkeit eine Ammoniumoxalat-Lösung hinzu, beobachteten für einen Zeitraum von 30 Minuten, ob diese klar blieb und ermittelten somit chemisch den Endpunkt der Entkalkung (Sanjai et al. 2012). Sangeetha et al. überprüften ihre

Proben nach mikrowellenunterstützter Dekalzifikation ebenfalls chemisch und verwendeten Kalziumoxalat (Sangeetha et al. 2013). Das chemische Prüfungsverfahren unterliegt der akkuraten Durchführung einer erfahrenen Person (Mawhinney et al. 1984).

Bei der röntgenologischen Prüfung kann der Endpunkt der Entkalkung mit Hilfe von Röntgenaufnahmen der zu entkalkenden Hartgewebe und der Beurteilung des Röntgenschnitts überprüft werden (Burck 1988). Menzel fertigte zur Kontrolle des Entkalkungsvorganges in stündlichen Abständen Aufnahmen mit einem Dental-Röntgen-Gerät bei einem konstanten Fokus-Film-Abstand von 12 cm an und beurteilte die Breite der noch verkalkten Hartschicht im gingivalen Kronendrittel (Menzel 1975). Singh und Sircar führten neben der physikalischen und chemischen Prüfung der Probekörper täglich eine radiologische Kontrolle mit einem Fokus-Film-Abstand von 15 cm durch bis der Endpunkt der Dekalzifikation erreicht war (Singh und Sircar 2010). Das röntgenologische Verfahren gilt als simpel und akkurat, jedoch ist es mit einem erhöhten Kostenaufwand verbunden und eignet sich nur für Kontrollintervalle von 24 Stunden (Mawhinney et al. 1984).

Das physikalische Verfahren überprüft den Erfolg der Entkalkung durch Schneiden (Burck 1988). Der Probekörper muss dabei mit Hilfe eines Messers oder Skalpells ohne Widerstand zu durchdringen sein (Berg 1972). Analog zur Schneidbarkeit mit Hilfe eines Messers kann das Durchdringen des Probekörpers physikalisch mit einer Nadel getestet werden (Nadelstichprobe). Zappa et al. prüften die Effektivität der Entkalkung in einem Intervall von 8 Stunden; diese galt als abgeschlossen, wenn eine Nadel durch den gesamten Probekörper geführt werden konnte (Zappa et al. 2005). In der vorliegenden Studie wurden die Gewebeproben physikalisch mit Hilfe eines Skalpells auf ihre Schneidbarkeit überprüft. Die physikalische Prüfung stellt ein im Analyzelabor reproduzierbares, kostengünstiges Verfahren dar, den Endpunkt der Dekalzifikation festzustellen und benötigt keine zusätzlichen Hilfsmittel, wie Röntgenapparaturen oder chemische Lösungen.

In der vorliegenden Studie wurden die Proben zunächst nach 2 Stunden auf ihre Schneidbarkeit überprüft, nachfolgende Kontrollintervalle richteten sich nach der festgestellten Konsistenz der Proben, so dass anschließend erneut in einem kürzeren Zeitabstand oder verlängerten Intervallen von bis zu 12 Stunden kontrolliert wurde. Die Kontrolle in Intervallen erfolgte in Anlehnung an Zappa et al., die das Prüfungsintervall auf 8 Stunden festlegten (Zappa et al. 2005). In Bezug auf die Länge der

einzuhaltenden Kontrollintervalle bei der physikalischen Prüfung existieren in der Literatur keine weiteren Angaben.

Es sei zu erwähnen, dass die Beurteilung der Konsistenz und die damit einhergehende Festlegung der nachfolgenden Kontrollintervalle der Fähigkeit und Einschätzung der die Untersuchung durchführende Person unterliegt.

7.1.8 Histotechnische Aufbereitung

Die entkalkten Proben wurden einer histotechnischen Aufbereitung unterzogen, beginnend mit der Nachbehandlung des Hartgewebes. Die Qualität des histologischen Präparats ist abhängig von der kompletten Entfernung der Entkalkungsflüssigkeit (Silva et al. 2011).

Burck empfiehlt die Entfernung der Säure durch Auswaschen (Burck 1988). Singh und Sircar reinigten die Probekörper jeweils 2-3 Stunden (Singh und Sircar 2010). Sanjai et al. spülten die entkalkten Zähne für jeweils 10 Minuten unter fließendem Wasser (Sanjai et al. 2012). Lang beschreibt eine ausgiebige Wässerung (Lang 2006); um diese zu gewährleisten, wurden in der vorliegenden Studie die Probekörper, die in Salpetersäure und Ameisensäure entkalkten, einer 2-stündigen Wässerung unterzogen. Für die Proben, die mit Decal[®]-Lösung dekalzifiziert wurden, war nach Anweisung des Herstellers nach Abschluss der Entkalkung lediglich eine fließende Wässerung von 3 Minuten erforderlich. Anschließend erfolgten die Infiltrierung der entkalkten Gewebeproben mit Paraffin und die Herstellung von Paraffinblöcken. Im Anschluss wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Schlittenmikrotom 2000 R, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) Schnittpräparate angefertigt.

Als Übersichtsfärbung wird für dekalzifizierte Hartgewebe eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt, die die Beurteilung morphologischer Veränderungen zulässt (Lang 2006). In zahlreichen vergleichbaren Studien findet die Hämatoxylin-Eosin-Färbung zur Darstellung der Strukturen der dekalzifizierten Zahnhartsubstanz Anwendung (Zappa et al. 2005, Singh und Sircar 2010, Afreen Nadaf et al. 2011, Silva et al. 2011, Sanjai et al. 2012, Sangeetha et al. 2013, Hatta et al 2014). In Anlehnung an die Literaturangaben und an das Vorgehen im histologischen Routinebetrieb wurde in der vorliegenden Studie die Hämatoxylin-Eosin-Färbung zur Beurteilung der morphologischen Strukturen und pathologischen Veränderungen des Gewebes eingesetzt.

7.1.9 Lichtmikroskopische Untersuchung

Zur Visualisierung der gefärbten Präparate erfolgte der Einsatz eines Lichtmikroskops (Olympus BX41, Olympus Corporation, Shinjuko Tokio, Japan), das in der Routinehistologie zur Untersuchung von Zahnstrukturen und in der Histopathologie zur Analyse pathologischer Prozesse eingesetzt wird (Osborn und Ten Cate 1983).

Die Integrität und Darstellung der Gewebe kann durch den Vorgang der Dekalzifikation beeinflusst werden; dies sollte mit Hilfe der lichtmikroskopischen Analyse untersucht werden. In der vorliegenden Studie wurden die Präparate bei 10facher und 20facher Vergrößerung analysiert.

7.2 Diskussion der Ergebnisse

7.2.1 Quantitative Auswertung

7.2.1.1 Einfluss von Ultraschall auf die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe

Ein Ziel der vorliegenden Studie war es, festzustellen, ob die Verwendung von Ultraschall während des Dekalzifikationsprozesses gegenüber einer konventionellen Entkalkung in einer Verkürzung der Entkalkungsdauer resultiert. Der Einfluss von Ultraschall auf die Dauer der Dekalzifikation wurde in zwei Intensitäten untersucht, bei 50%iger (90 W) und 100%iger (180 W) Ultraschalleistung, welche variabel am Gerät SONOCOOL einstellbar waren.

Die Medianwerte variierten von 12 Stunden bei 100%iger Ultraschalleistung bis hin zu 24 Stunden bei 50%iger Ultraschalleistung. Folglich trat bei Verdoppelung der Ultraschalleistung eine Halbierung der Stundenanzahl in Bezug auf den Median ein. Die Probekörper, die mit 100%iger Ultraschalleistung entkalkt wurden, wiesen eine größere Streuung der Werte auf. Die ermittelten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren signifikant.

Durch starke Ultraschallfelder sinkt in Flüssigkeiten der Druck lokal unter den, zur dort herrschenden Temperatur gehörenden Dampfdruck der Flüssigkeit, wodurch es zur Bildung von Dampfblasen, der sogenannten Kavitation, kommt (Haas 2010). Die Kavitation kann als Ursache für die signifikante Beschleunigung des Dekalzifikationsprozesses angesehen werden: Durch die Implosionen der energiereichen Blasen entstehen Flüssigkeitsjets, die mit mehrfacher Schallgeschwindigkeit auf die Oberfläche des Zahnhartgewebes treffen. Dadurch kann

die Entkalkungslösung in kürzerer Zeit in das Gewebe eindringen, innere Reibung und Erwärmung der Flüssigkeit nehmen zu (Bandelin et al. 2006).

Des Weiteren beschrieben Verdenius und Alma in ihrer Studie, dass Bewegung im Allgemeinen die Möglichkeit der Interaktion zwischen Objekt und dem umgebenden Entkalkungsmedium erhöht, woraus eine beschleunigte Dekalzifikation resultiert (Verdenius und Alma 1958). Diese Erkenntnis findet als weitere Ursache für die gewonnenen Ergebnisse Erwähnung, da sich die Probekörper in der vorliegenden Studie im Ultraschallbad in Bewegung befanden.

Bezüglich der Verwendung von Ultraschall zur Beeinflussung der Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe existieren keine direkt vergleichbaren Studien. Hatta et al. untersuchten, ob mit Hilfe eines Ultraschall-Reinigungsgeräts eine Beschleunigung der Dekalzifikation von Hartgewebe gegenüber des konventionellen Verfahrens erzielt werden kann; Gegenstand der Untersuchung war jedoch boviner Knochen, zudem wurden nicht verschiedene Ultraschalleistungen miteinander verglichen (Hatta et al. 2014).

Menzel führte eine vergleichende In-Vitro-Untersuchung durch, bei der 10 menschliche Zähne in einem Ultraschallgerät mit einer Leistung von 45 W entkalkt wurden, sich jedoch kein Vorteil hinsichtlich der Entkalkungsgeschwindigkeit gegenüber der konventionellen Entkalkung ergab; es konnte folglich keine Beschleunigung des Entkalkungsprozesses durch Ultraschall festgestellt werden (Menzel 1975). Da diese Aussage den in der vorliegenden Untersuchung gewonnenen Ergebnissen widerspricht und festgestellt werden konnte, dass sich mit zunehmender Ultraschalleistung die Dauer der Dekalzifikation verringert, ist anzunehmen, dass erst ab einer bestimmten Ultraschalleistung eine signifikante Beschleunigung der Entkalkung eintritt, die folglich zwischen 45 W und 90 W liegen muss.

Die aufgestellte Arbeitshypothese, die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe ist durch die Anwendung von Ultraschall beeinflussbar und abhängig von der gewählten Ultraschalleistung, wird durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt. Sie erlauben folglich eine standardmäßige Verwendung von Ultraschall mit einer Ultraschalleistung von 180 W, soll die Entkalkung von Zähnen und somit der gesamte Untersuchungsprozess in histologischen und histopathologischen Routinebetrieben beschleunigt werden.

7.2.1.2 Einfluss der Entkalkungstemperatur auf die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Einfluss der Temperatur auf die Dauer der Dekalzifikation untersucht, indem die Untersuchungen bei drei verschiedenen Temperaturen (17 °C, 24 °C, 35 °C) durchgeführt wurden.

Die Medianwerte der untersuchten Gruppen zeigen, dass die Dauer der Dekalzifikation mit steigender Temperatur sinkt. Sie variieren von 12 Stunden (35 °C) über 24 Stunden (24 °C) bis hin zu 25 Stunden (17 °C). Während sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Entkalkungsdauer bei 35 °C und 17 °C und 35 °C und 24 °C ergaben ($p \leq 0,05$), weist der Unterschied zwischen 24 °C und 17 °C keine statistische Signifikanz auf. Gleichzeitig zeigt sich, dass die Streuung der Werte mit steigender Temperatur sinkt, so ist sie bei einer Temperatur von 35 °C am geringsten.

Vergleichbare Studienkonzepte untersuchten den Einfluss einer Temperaturerhöhung auf die Dekalzifikation von Zahnhartgewebe (Vongsavan et al. 1990, Zappa et al. 2005, Singh und Sircar 2010, Sangeetha et al. 2013). Gegenstand dieser Untersuchungen war jedoch der Vergleich zwischen der Entkalkung bei Raumtemperatur und einer weiteren Temperatur, die Autoren verglichen nicht mehrere Temperaturintervalle miteinander.

Singh und Sircar verglichen in ihrer In-Vitro-Untersuchung die Dauer der Entkalkung bei Raumtemperatur mit der Dekalzifikation in einem Mikrowellenofen bei 38-40 °C und erlangten mit Hilfe des mikrowellen-unterstützten Verfahrens eine signifikant kürzere Entkalkungsdauer (Singh und Sircar 2010). Sangeetha et al. evaluierten den Einfluss von Mikrowellen bei einer Temperatur von 41-43 °C und erzielten ebenfalls eine kürzere Entkalkungsdauer gegenüber des konventionellen Vorgehens bei Raumtemperatur (Sangeetha et al. 2013). Der Einfluss von Mikrowellen ist in der vorliegenden Studie jedoch kein Untersuchungsgegenstand und somit ist die Vergleichbarkeit der Studien in Bezug auf den Einfluss der Temperatur kritisch zu beurteilen, obwohl Vongsavan et al. in ihren Untersuchungen zu dem Ergebnis kamen, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen der Verwendung eines Mikrowellengeräts (39 +/- 2 °C) und eines konventionellen Ofens (39 °C) bestehen, die Dekalzifikation jedoch mit Hilfe beider Verfahren gegenüber einer Dekalzifikation bei Raumtemperatur beschleunigt werden kann (Vongsavan et al. 1990).

Zappa et al. verglichen die Entkalkung bei Raumtemperatur und einer Temperatur von 37 °C, die durch einen Brutschrank erzeugt wurde und beschrieben ebenfalls eine Beschleunigung der Entkalkungsdauer (Zappa et al. 2005).

Die vorliegende Untersuchung kann das in den vergleichbaren Untersuchungen evaluierte Ergebnis bestätigen: Mit steigender Temperatur tritt eine Verkürzung der Dekalzifikationsdauer ein. Zu erklären ist dieses Ergebnis mit dem allgemein in der Chemie geltenden Grundsatz, dass bei endothermen Lösungsvorgängen die Löslichkeit eines Feststoffes mit steigender Temperatur zunimmt (Mortimer 2007).

Folglich kann die vor den Versuchen aufgestellte Hypothese, die Dauer der Dekalzifikation sei abhängig von der gewählten Entkalkungstemperatur, verifiziert und die Erhöhung der Temperatur als sinnvolle Maßnahme angesehen werden, den Dekalzifikationsprozess zu beschleunigen.

7.2.1.3 Einfluss des Entkalkungsmediums auf die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe

Ein Ziel der vorliegenden Studie war es, die Einwirkung verschiedener Entkalkungsflüssigkeiten auf die Zahnhartsubstanz zu evaluieren; zum Einsatz kamen 7%ige Salpetersäure, 50%ige Ameisensäure und Decal[®]-Lösung.

Hinsichtlich der Dauer der Entkalkung variieren die Medianwerte der untersuchten Entkalkungsmedien von 10 Stunden (7%ige Salpetersäure) über 20 Stunden (Decal[®]) bis hin zu 54 Stunden (50%ige Ameisensäure). Die Unterschiede zwischen den verwendeten Medien in Bezug auf die Entkalkungsdauer waren statistisch signifikant. Während die Streuung der Werte der Dekalzifikation mit Salpetersäure und Decal[®]-Lösung vergleichbar war, lag diese bei Verwendung von Ameisensäure deutlich höher. Über die Anwendung von Decal[®]-Lösung als Entkalkungsflüssigkeit existieren bislang keine Studien in der Literatur, Salpetersäure und Ameisensäure hingegen sind Gegenstand verschiedener vergleichbarer Untersuchungen: Nossek erzielte eine Dauer von 48 Stunden für die Entkalkung von Zähnen mit 5%iger Salpetersäure bei Raumtemperatur (Nossek 1965). Singh und Sircar beobachteten eine Entkalkungsdauer von 3-6 Tagen bei der Entkalkung von kariesfreien Prämolaren mit 10%iger Salpetersäure und eine Entkalkungsdauer von 7-9 Tagen bei der Dekalzifikation von kariesfreien Prämolaren mit 10%iger Ameisensäure bei Raumtemperatur (Singh und Sircar 2010). Afreen Nadaf et al. untersuchten den

Entkalkungsprozess kariesfreier Molaren in 5%iger Salpetersäure bei Raumtemperatur und geben eine Dauer von 20 Stunden an (Afreen Nadaf et al. 2011).

Die ermittelten Werte der genannten Studien sind nicht direkt mit den vorliegenden vergleichbar, da die verwendeten Säuren unterschiedliche Konzentrationen aufwiesen, die Proben teilweise anderer anatomischer und pathologischer Beschaffenheit waren und diese konventionell bei Raumtemperatur entkalkt wurden. Es kann lediglich übereinstimmend festgestellt werden, dass mit Salpetersäure und Ameisensäure eine Entkalkung von Zahnhartsubstanz erfolgen kann. Soll jedoch eine Säureentkalkung mit geringem Zeitaufwand stattfinden, sprechen die ermittelten Unterschiede lediglich für die Verwendung von 7%iger Salpetersäure. Die Verwendung von 50%iger Ameisensäure erzielt im Gegensatz dazu eine verlängerte Entkalkungsdauer, zudem sind die ermittelten Werte aufgrund der hohen Streuung wenig reproduzierbar.

Zahlreiche Studien evaluieren den Einfluss von EDTA auf den Entkalkungsprozess und stellen übereinstimmend fest, dass die Dauer der Dekalzifikation gegenüber der Verwendung von Salpeter- und Ameisensäure verlängert ist (Singh und Sircar 2010, Sanjai et al. 2012, Sangeetha et al. 2013). Decal[®]-Lösung erzielte in der vorliegenden Untersuchung eine längere Entkalkungsdauer als Salpeter- und eine kürzere Entkalkungsdauer als Ameisensäure. Die Entkalkungslösung enthält zwar EDTA, kombiniert den Chelatbildner jedoch mit der dekalzifizierenden Eigenschaft von Salzsäure (HCl), so dass eine direkte Vergleichbarkeit zu den Ergebnissen der genannten Studien nicht gewährleistet werden kann.

Die Dauer der Dekalzifikation eines Zahnes ist abhängig von der Wahl des Entkalkungsmediums, wie die signifikanten Ergebnisse in der vorliegenden Studie belegen, somit gilt die Arbeitshypothese als bestätigt.

7.2.1.4 Einfluss von Karies auf die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe

Um den Einfluss des pathologischen Zustandes (Karies) von Zahnhartgewebe auf die Dauer der Dekalzifikation zu evaluieren, erfolgte die Versuchsdurchführung sowohl mit intakten, kariesfreien als auch mit kariösen Zahnproben.

Beide Gruppen wiesen einen Medianwert von 24 Stunden in Bezug auf die Dauer der Entkalkung auf. Des Weiteren besaßen sowohl die kariesfreien als auch die kariösen Probekörper einen Minimalwert von 4 Stunden und wichen auch in Bezug auf den Maximalwert von 96 Stunden nicht voneinander ab. Es konnte folglich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Entkalkungsdauer festgestellt werden.

In der Literatur finden sich mit Ausnahme der Studien von Zappa et al. und Mattuella et al. keine Untersuchungen, die den Einfluss einer Karies auf die Dekalzifikation des Zahnhartgewebe evaluieren (Zappa et al. 2005, Mattuella et al. 2007). Ein Vergleich dieser Studien mit den gewonnenen Ergebnissen ist an dieser Stelle der Diskussion jedoch nicht möglich, da die Autoren nicht den Vergleich mit kariesfreien Zähnen in Bezug auf die Dauer der Dekalzifikation untersuchten.

Die Ergebnisse widerlegen die Arbeitshypothese, der pathologische Zustand (Karies) eines Zahnes habe einen signifikanten Einfluss auf die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe.

7.2.1.5 Einfluss des Zahntyps auf die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe

Abschließend wurde in der vorliegenden Studie der Einfluss der verschiedenen Zahntypen auf die Dekalzifikationsdauer evaluiert.

Die mittleren Schneidezähne (*Dentes incisivi medialis*) wiesen dabei mit einer Entkalkungsdauer von 4 Stunden den niedrigsten Minimalwert auf. Mit einem Medianwert von 17,58 Stunden entkalkten sie am schnellsten. Eckzähne (*Dentes canini*) und dritte Molaren (*Dentes sapientiae*) verzeichneten mit 96 Stunden den höchsten Maximalwert und wichen auch in Bezug auf ihren Medianwert von 24 Stunden nicht voneinander ab.

Die statistische Auswertung zum Einfluss der unterschiedlichen Zahntypen auf die Dekalzifikationsdauer ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Zahntypen, so dass die aufgestellte Arbeitshypothese, die Dauer der Dekalzifikation ist abhängig vom Zahntyp, widerlegt werden kann.

Die schnellste Entkalkung der mittleren Schneidezähne (*Dentes incisivi medialis*) lässt sich durch seine anatomische Beschaffenheit erklären; es handelt sich um den kleinsten Zahntyp entsprechend seiner Länge und Breite, folglich liegt weniger zu entkalkende Substanz vor, die Entkalkungsdauer ist verringert. Eckzähne (*Dentes canini*) und dritte Molaren (*Dentes sapientiae*) weichen zwar in Bezug auf ihre Anatomie (Wurzelanzahl, Wurzellänge) voneinander ab, ihre Masse lässt sich jedoch als vergleichbar bezeichnen; die Angaben zur Dauer ihrer Entkalkung weichen in Folge dessen nur geringfügig voneinander ab.

Die gewonnenen Werte je Zahngruppe stellen Referenzwerte für die Dekalzifikation in der histologischen und histopathologischen Praxis dar.

7.2.2 Qualitative Auswertung

Der mit Hilfe eines Skalpells geteilte Zahn wurde im histologischen Standardverfahren in Paraffin eingebettet, mit einem Mikrotom geschnitten und das Schnittpräparat anschließend Hämatoxylin-Eosin gefärbt, die mikroskopische Beurteilung der Qualität der Schnitte erfolgte im Anschluss.

Nach der ultraschallunterstützten Dekalzifikation erweis sich die Schneidbarkeit der angefertigten Paraffinblöcke als problemlos; zu erwähnen sei jedoch, dass die histologische Bearbeitung von Zahnhartsubstanz generell von der Erfahrung und Kenntnis der durchführenden Person abhängt.

Die mit Salpetersäure und Decal[®]-Lösung konventionell entkalkten Proben erwiesen sich ebenfalls als schneidbar, während die konventionelle Dekalzifikation mit Ameisensäure keine histologische Aufbereitung zuließ, da die Proben einen gelartigen Zustand aufwiesen und nicht schneidbar waren. Der stattgefunden Prozess kann als Mazeration bezeichnet werden; es fand eine Erweichung des Gewebes durch einen längeren Kontakt mit einer Flüssigkeit statt (Lautenbach 1992).

Die Anfärbbarkeit mit Hämatoxylin-Eosin war bei allen 120 angefertigten Schnittpräparaten gegeben, die Färbung der Schnitte war einheitlich; es konnten keine Unterschiede zwischen den gefärbten Präparaten verzeichnet werden.

Sanjai et al. verglichen die Anfärbbarkeit der Präparate mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach der Dekalzifikation mit unterschiedlichen Entkalkungsflüssigkeiten und kamen zu dem Ergebnis, dass mit EDTA-Lösung entkalkte Präparate die beste Qualität hinsichtlich der Anfärbbarkeit der Gewebe aufwiesen, während mit säurehaltigen Lösungen dekalzifizierte Zähne weniger gut anfärbbar waren (Sanjai et al. 2012). Die Einheitlichkeit der Färbung wurde in einer vergleichenden In-Vitro-Untersuchung von Singh und Sircar begutachtet; dabei wiesen mit EDTA-Lösung entkalkte Zähne gegenüber mit säurehaltigen Lösungen dekalzifizierten Zähnen eine einheitlichere Hämatoxylin-Eosin-Färbung auf (Singh und Sircar 2010).

In der vorliegenden Studie wurde neben Salpeter- und Ameisensäure Decal[®]-Lösung als Entkalkungsflüssigkeit verwendet, die sich aus EDTA und Salzsäure zusammensetzt. Da es sich bei Letzterer um ein EDTA-Säure-Gemisch handelt, ist die Vergleichbarkeit mit den genannten Studien eingeschränkt und erklärt das nicht übereinstimmende Ergebnis.

Mit Hilfe der lichtmikroskopischen Untersuchung konnte festgestellt werden, dass alle Schnittpräparate den gewünschten Erhalt der Dentin- und Zementstrukturen aufwiesen,

während sich der Zahnschmelz aufgrund seiner chemischen Zusammensetzung nach einer Entkalkung im Allgemeinen nicht darstellen lässt. Auch das Pulpagewebe war in allen Versuchsreihen nach der Entkalkung histologisch nicht mehr nachweisbar. Afreen Nadaf et al. begutachteten in einer In-Vitro-Untersuchung den Erhalt der Struktur der Pulpa, der organischen Dentinmatrix und des Wurzelzements nach der Entkalkung mit unterschiedlichen Entkalkungsflüssigkeiten und erlangten die besten Ergebnisse bei der Entkalkung mit EDTA (Afreen Nadaf et al. 2011). Sanjai et al. berichten von den besten Ergebnissen bezüglich der Integrität der Zahngewebe bei vorheriger Dekalzifikation mit EDTA-Lösung im Vergleich zur Entkalkung mit säurehaltigen Lösungen (Sanjai et al. 2012).

Der Untersuchungsschwerpunkt der vorliegenden Studie war die Dekalzifikation und anschließende mikroskopische Untersuchung von Zahnhartgewebe, der Fokus lag nicht auf der Darstellbarkeit von Weichgewebe (Pulpa), so dass EDTA nicht in reiner Form in den Versuchsaufbau integriert wurde und abermals keine direkte Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der genannten Studien möglich ist. Zudem erfolgte die der mikroskopischen Untersuchung vorangegangene Entkalkung in den Studien von Afreen Nadaf et al. und Sanjai et al. nicht unter dem Einfluss von Ultraschall.

Vergleicht man die Präparate, die zuvor mit dem konventionellen Verfahren entkalkt wurden (Kontrollgruppe) mit den Proben, die unter Anwendung von Ultraschall dekalzifizierten, ergab sich eine Qualitätsverbesserung bezüglich der Schnittqualität.

Folglich kann die Dekalzifikation unter Verwendung von Ultraschall als ein schonendes Verfahren angesehen werden, Zahnhartsubstanz zu entkalken, ohne die Schneidbarkeit der Probekörper, die Anfärbbarkeit und Darstellbarkeit des Zahnhartgewebes zu beeinflussen.

8 Schlussfolgerung

Unter Betrachtung der vor den Versuchen aufgestellten Arbeitshypothesen kann die Dauer der Dekalzifikation eines menschlichen Zahnes der zweiten Dentition durch verschiedene Faktoren signifikant beeinflusst werden, ohne die histotechnische Aufbereitung und lichtmikroskopische Darstellbarkeit der Zahnhartgewebe zu beeinträchtigen:

- **Ultraschall**

Die Entkalkungsdauer verringert sich mit zunehmender Ultraschalleistung; es bestehen signifikante Unterschiede zwischen der Verwendung einer Ultraschalleistung von 90 W und 180 W. Die aufgestellte Arbeitshypothese, die Dauer der Dekalzifikation von Zahnhartgewebe ist durch Ultraschall beeinflussbar und abhängig von der gewählten Ultraschalleistung, gilt als bestätigt.

- **Temperatur**

Zwischen der Dekalzifikation von Zähnen bei einer Temperatur von 17 °C und 35 °C ergeben sich statistisch signifikante Unterschiede in Bezug auf ihre Entkalkungsdauer; mit steigender Temperatur wird der Entkalkungsprozess beschleunigt. Somit wurde die Arbeitshypothese, die Dauer der Dekalzifikation ist abhängig von der gewählten Temperatur, verifiziert.

- **Entkalkungsflüssigkeit**

Wie in der aufgestellten Arbeitshypothese angenommen, ist die Wahl des Entkalkungsmediums ausschlaggebend für die Dauer der Dekalzifikation: Soll diese mit möglichst geringem Zeitaufwand stattfinden, sprechen die signifikanten Ergebnisse für die Verwendung von 7%iger Salpetersäure. Wird im histologischen Routinebetrieb nicht die Geschwindigkeit des Dekalzifikationsprozesses fokussiert, so können unter Verwendung von Decal[®]-Lösung ebenfalls gute Resultate erzielt werden. Die Verwendung von 50%iger Ameisensäure kann nicht empfohlen werden: Sie erzielt eine signifikant verlängerte Entkalkungsdauer, die ermittelten Werte sind aufgrund einer hohen Streuung wenig reproduzierbar, zudem trat im konventionellen Verfahren eine Mazeration der Zähne ein.

Die Dauer der Dekalzifikation eines Zahnes ist hingegen nicht statistisch signifikant abhängig von:

- seiner pathologischen Beschaffenheit (Karies)
- seiner Zugehörigkeit zu einem Zahntyp

Der Vergleich zwischen intakten und kariösen Proben zeigte ebenso wie der zwischen Zähnen verschiedener Zahntypen (Dentes incisivi, Dentes canini, Dentes sapientiae) keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Entkalkungsdauer. Die Arbeitshypothesen, die Dauer der Dekalzifikation eines Zahnes ist abhängig von seinem pathologischen Zustand (Karies) und vom Zahntyp, wurden in der vorliegenden Studie widerlegt.

Die Kombination aus den genannten Faktoren stellt den entscheidenden Effekt zur Verringerung der Dauer der Dekalzifikation ohne qualitative Beeinträchtigung des histologischen Schnittpräparats dar; es empfiehlt sich eine Durchführung mit 7%iger Salpetersäure oder Decal[®]-Lösung unter Verwendung von Ultraschall bei einer Leistung von 180 W und einer Temperatur von 35 °C.

9 Literaturverzeichnis

1. Afreen Nadaf MS, Radhika MB, Lalita JT, Paremala K, Sudhakara M. Decalcification: a simpler and better alternative. *Journal of Dentistry and Oral Biosciences*, 2:10-13 (2011).
2. Alers JC, Kritjenberg PJ, Vissers KL, van Dekken H. Effect of bone decalcification procedures on DNA in situ hybridization. EDTA is highly preferable to an routinely used acid decalcifier. *J Histochem Cytochem*, 47:703-710 (1999).
3. An YH, Martin KL. *Handbook of histology methods for bone and cartilage*. Humana Press, New York (2003).
4. Arana-Chavez VE, Andia-Merlin RY. Scanning electron microscopy examination of resorbing enamel surfaces in unexfoliated primary molar teeth. *J Dent Child*, 3:182-185 (1998).
5. Athanasou NA, Quinn J, Heryet A, Woods CG, McGee JO. Effects of decalcification agents on immunoreactivity of cellular antigens. *J Clin Pathol*, 40:874-878 (1987).
6. Balaton AJ, Loget P. Accelerated decalcification using microwaves. *Ann Pathol*, 9:140-141 (1989).
7. Bancroft JD. *Theory and practice of histological techniques*. Churchill Livingstone, Edinburgh (2002).
8. Bandelin S, Herrmann M, Jung R, Radandt R. *Niederfrequenter Ultraschall: Grundlagen, Technik, Anwendungen*. Süddeutscher Verlag onpact, München (2006).
9. Baumeister JP. *Mikroradiografische Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Lagerungsmedien und der Politur auf die In-vitro-De- und*

-
- Remineralisation von bovinem und humanem Schmelz (Dissertation). Charité - Universitätsmedizin, Berlin (2011).
10. Birkedal-Hansen H. Kinetics of acid demineralization in histologic technique. *J Histochem Cytochem*, 22:434-441 (1974).
 11. Berg G. *Histologische Labortechnik*. Lehmann, München (1972).
 12. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch, H (Hrsg.). *Pathologie*. Elsevier, Urban & Fischer, München - Jena (2008).
 13. Boon ME, Kok LP. *Microwave cookbook of pathology*. Coulomb Press Leyden, Leiden (1987).
 14. Bourque WT, Gross M, Hall BK. A histological processing technique that preserves the integrity of calcified tissues (bone, enamel), yolk amphibian embryos, and growth factor antigens in skeletal tissue. *J Histochem Cytochem*, 41:1429-1434 (1993).
 15. Burck HC. *Histologische Technik. Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate in Unterricht und Praxis*. Thieme, Stuttgart (1988).
 16. Callis G, Sterchi D. Decalcification of bone: literature review and practical study of various decalcifying agents, methods, and their effects on bone histology. *J Histotechnol*, 21:49-58 (1998).
 17. Camargo MA, Marques MM, de Cara AA. Morphological analysis of human and bovine dentine by scanning electron microscope investigation. *Arch Oral Biol*, 53:105-108 (2008).
 18. Cook SF, Ezra-Cohn HE. A comparison of methods for decalcifying bone. *J Histochem Cytochem*, 10:560-563 (1962).

19. Culling CF, Allison RT, Barr WT. Cellular pathology technique. Butterworths, London (1984).
20. Cunningham CD, Schulte BA, Bianchi LM, Weber PC, Schmiedt BN. Microwave decalcification of human temporal bones. *Laryngoscope*, 111:278-282 (2001).
21. De-Deus G, Reis C, Fidel S, Fidel RA, Paciornik S. Longitudinal and quantitative evaluation of dentin demineralization when subjected to EDTA, EDTAC, and citric acid: a co-site digital optical microscopy study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 105:391-397 (2008).
22. Drury RA, Wallington EA. Carleton's histological technique. Oxford University press, Oxford (1980).
23. Frey HH, Althaus FR. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie der Veterinärmedizin. Enke, Stuttgart (2010).
24. Gabe M. Histological techniques. Masson, Paris (1976).
25. Haas U, Physik. Für Pharmazeuten, Mediziner und Studierende mit Physik als Nebenfach. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (2011).
26. Hatta H, Tsuneyama K, Nomoto K, Hayashi S, Miwa S, Nakajima T, Nishida T, Nakanishi Y, Imura J. A simple and rapid decalcification procedure of skeletal tissues for pathology using an ultrasonic cleaner with D-mannitol and formic acid. *Acta Histochem*, 116:753-757 (2014).
27. Hellwig E, Klimek J, Attin T. Einführung in die Zahnerhaltung. Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie. Deutscher Zahnärzte-Verlag, Köln (2013).
28. Joshi H, Parikh N, Soni N, Jain S, Barad J, Patel N. Comparison of efficacy of various decalcifying agents on human teeth. *J Res Adv Dent*, 3:47-52 (2014).

-
29. Keithley EM, Truong T, Chandranait B, Billings PB. Immunohistochemistry and microwave decalcification of human temporal bones. *Hear Res*, 148:192-196 (2000).
 30. Keklikoglu N, Akinci S. Comparison of three different techniques for histological tooth preparation. *Folia Histochem Cytobiol*, 51:286-291.
 31. Klimm W, Gäbler S, Viergutz G. *Endodontologie. Grundlagen und Praxis*. Deutscher Zahnärzte-Verlag, Köln (2003).
 32. Lang G. *Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Springer, Wien - New York (2006).
 33. Lautenbach E. *Wörterbuch Zahnmedizin. Zahn, Mund, Kiefer, Gesicht*. Verlag für Zahnmedizin, Hanau (1992).
 34. Lehmann KM, Hellwig E, Wenz HJ. *Zahnärztliche Propädeutik. Einführung in die Zahnheilkunde*. Deutscher Zahnärzte-Verlag, Köln (2012).
 35. Lynch MJ, Raphael SS. *Lynch's medical laboratory technology*. W.B. Saunders, London (1983).
 36. Mathai AM, Naik R, Pai MR, Rai S, Baliga P. Microwave histoprocessing versus conventional histoprocessing. *Ind J Pathol Microbiol*, 51:12-16 (2008).
 37. Matthews JB, Mason GI. Influence of decalcifying agents on immunoreactivity of formalin fixed paraffin embedded tissue. *Histochem J*, 16:771-787 (1984).
 38. Maurine William AB. A technique for the preparation of histologic sections through teeth and jaws for teaching and research. *J Dent Res*, 16:183-189 (1937).
 39. Mattuella LG, Bento LW, Vier-Pelisser FV, Araiyo FB, Fossati AC. Comparative analysis of two fixating and two decalcifying solutions for processing of human

-
- primary teeth with inactive dentin carious lesion. *Rev Odonto Cienc*, 22:99-105 (2007).
40. Mawhinney WH, Richardson E, Malcolm AJ. Control of rapid nitric acid decalcification. *J Clin Pathol*, 37:1409-1413 (1984).
 41. Menzel HJ. Die Entkalkung von Zähnen für feingewebliche Untersuchungen unter der Einwirkung von Ultraschall. *Dtsch zahnärztl Z*, 30:462-464 (1975).
 42. Meschede D (Hrsg.). *Gerthsen Physik*. Springer, Berlin - Heidelberg (2010).
 43. Mjör IA, Pindborg JJ. *Histology of the human tooth*. Scandinavian University Books. Munksgaard, Copenhagen (1973).
 44. Moore, RJ. Bone. In: Woods AE, Ellis R (Hrsg.). *Laboratory histopathology*. Churchill Livingstone, New York (1994).
 45. Morse M. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. *J Dent Res*, 24:143-153 (1945).
 46. Mortimer CE, Müller U. *Chemie*. Thieme, Marburg (2010).
 47. Myers SL, Williams JM, Hodges JS. Effects of extreme heat on teeth with implications for histologic processing. *Forensic Sci*, 44:805-809 (1999).
 48. Nossek H. Vergleichende Untersuchungen zur Schnellentkalkung von Zähnen. *Dtsch zahnärztl Z*, 8:931-937 (1965).
 49. Osborn JW, Ten Cate AR. *Advanced dental histology*. Wright, Bristol (1983).
 50. Pallaske G, Schmidel E. *Pathologisch-histologische Technik*. Parey, Berlin (1959).

-
51. Pitol DL, Caetano FH, Lunardi LO. Microwave-induced fast decalcification of rat bone for electron microscopic analysis: an ultrastructural and cytochemical study. *Braz Dent J*, 18:153-157 (2007).
 52. Pitol DL, Issa JP, Caetano FH, Lunardi LO. Decalcification dynamic of dog mineralized tissue by microwaves. *Int J Morphol*, 25:309-313 (2007).
 53. Pitts NB. Systems for rating approximal carious lesions diagnosed from bitewing radiographs: Proposals for future standardization. *Community Dent Oral Epidemiol*, 12:114-122 (1984).
 54. Pitts NB, Rimmer PA. An in vivo comparison of radiographic and directly assessed clinical caries status of posterior approximal surfaces in primary and permanent teeth. *Caries Res*, 26:146-152 (1992).
 55. Prakash AP, Reddy SD, Rao MT, Ramanand OV. Scorching effects of heat on extracted teeth - A forensic view. *J Forensic Dent Sci*, 6:186-190 (2014).
 56. Radlanski RJ. *Curriculum Orale Struktur- und Entwicklungsbiologie*. Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin (2011).
 57. Reiche D. *Roche Lexikon Medizin*. Elsevier, Urban & Fischer, München - Jena (2009).
 58. Rohen JW, Lütjen-Drecoll E. *Funktionelle Histologie*. Schattauer, Stuttgart (2000).
 59. Roncaroli F, Mussa B, Bussulati G. Microwave oven for improved tissue fixation and decalcification. *Pathologica*, 83:307-310 (1991).
 60. Sangeetha R, Uma K, Chandavarkar V. Comparison of routine decalcification methods with microwave decalcification of bone and teeth. *J Oral Maxillofac Pathol*, 17:386-391 (2013).

61. Sanjai K, Kumarswamy J, Patil A, Papaiah L, Jayaram S, Krishnan L. Evaluation and comparison of decalcification agents on the human teeth. *J Oral Maxillofac Pathol*, 16:222-227 (2012).
62. Schmidt WJ, Keil A. Die gesunden und die erkrankten Zahngewebe des Menschen und der Wirbeltiere im Polarisationsmikroskop. Theorie, Methodik, Ergebnisse der optischen Strukturanalyse der Zahnhartsubstanzen samt ihrer Umgebung. Hanser Verlag, München (1958).
63. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology. Mosby, Maryland Heights (1980).
64. Shibata Y, Fujita S, Takahashi H, Yamaguchi A, Koji T. Assessment of decalcifying protocols for detection of specific RNA by non-radioactive in situ hybridization in calcified tissues. *Histochem Cell Biol*, 113:153-159 (2000).
65. Silva GA, Moreira A, Alves JB. Histological processing of teeth and periodontal tissues for light microscopy analysis. *Methods Mol Biol*, 689:19-36 (2011).
66. Singh S, Sircar K. Evaluation of efficacy of various chemicals for decalcification of dental hard tissues - An in-vitro study. *Journal of Orofacial & Health Sciences*, 1:5-10 (2010).
67. Smith CE. Effect of glutaraldehyde and decalcifying agents on acid phosphomonoester hydrolase activity in the enamel organ of the rat incisor: a biochemical study comparing enamel organ with liver. *J Histochem Cytochem*, 28:689-699 (1980).
68. Sowmya K, Sudheendra US, Khan S, Nagpal N, Prathamesh S. Assessment of morphological changes and DNA quantifications: An in vitro study on acid-immersed teeth. *J Forensic Dent Sci*, 5:42-46 (2013).
69. Steiniger B, Schwarzbach H, Stachniss V. Mikroskopische Anatomie der Zähne und des Parodonts. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2010).

-
70. Stevens A, Lowe J, Bancroft JD. Bone. In: Stevens A, Bancroft JD. Theory and practice of histological techniques. Churchill Livingstone, Edinburgh, 309–341 (1990).
 71. Verdenius HHW, Alma L. A quantitative study of decalcification methods in histology. *J Clin Path*, 11:229-236 (1958).
 72. Vongsavan N, Matthews B, Harrison GK. Decalcification of teeth in a microwave oven. *Histochem J*, 22:377-380 (1990).
 73. Waerhaug J. Decalcification of bone and teeth under vacuum - a rapid method for producing hard tissue preparations. *J Dent Res*, 28:525 (1949).
 74. Warshawsky H, Moore G. A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. *J Histochem Cytochem*, 15:542-549 (1967).
 75. Welsch U. Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. Elsevier, Urban & Fischer, München - Jena (2006).
 76. White HJ, Senia ES, Zislis T, Fox LT, Zeagler JW. A study of the odontoblast process with transmission electron microscopy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 62:569-79 (1986).
 77. Wijnbergen M, Van Mullern PJ. Effect of histological decalcifying agents on number and stainability of gram-positive bacteria. *J Dent Res*, 66:1029-1031 (1987).
 78. Zappa J, Cieslik-Bielecka A, Adwent M, Cieslik T, Sabat D. Comparison of different decalcification methods to hard teeth tissues morphological analysis. *Dent Med Probl*, 42:21-26 (2005).

10 Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
Asymp. Sig.	Asymptomatische Signifikanz
C	Dens caninus (Eckzahn)
C1	Zahnhartsubstanzverlust der äußeren Schmelzhälfte (röntgenologisch)
C2	Zahnhartsubstanzverlust der inneren Schmelzhälfte (röntgenologisch)
C3	Zahnhartsubstanzverlust der äußeren Dentinhälfte (röntgenologisch)
C4	Zahnhartsubstanzverlust der inneren Dentinhälfte (röntgenologisch)
CA	citric acid (Zitronensäure)
CH ₂ O ₂	Ameisensäure, Methansäure
df	Zahl der Freiheitsgrade
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraacid
EDTAC	Ethylendiamintetraacid + Cetavlon
H ⁺	Wasserstoffion
HCl	Salzsäure, Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNO ₃	Salpetersäure, Hydrogennitrat
I1	Dens incisivus medialis (mittlerer Schneidezahn)
Korr. Sig.	Korrigierte Signifikanz
M3	Dens molaris tertius, Dens sapientiae (dritter Molar, Weisheitszahn)
N	Größe der Population
n	Anzahl
p-Wert	Probability-Wert (Wahrscheinlichkeitswert)
Sig.	Signifikanz, statistische Signifikanz
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)

10.2 Materialliste

Im Folgenden aufgelistet sind die in der Arbeit verwendeten Materialien und Geräte.

Die Durchführung der Versuche erfolgte im Zentrum für Oralpathologie (Friedrich-Ebert-Straße 33, 14469 Potsdam).

- Ameisensäure, 50%ig:
Ameisensäure, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Decal[®]-Lösung:
Decal Chemical Corporation, Tallman, NY, USA
- Gewebeinfiltrationsautomat:
ASP300 S, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
- Hämatoxylin-Lösung:
Hämatoxylin-Monohydrat, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Isopropanol-Lösung, 20%ig:
2-Propanol, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Lichtmikroskop:
Olympus BX41, Olympus Corporation, Shinjuko Tokio, Japan
- Mikrotom:
Schlittenmikrotom 2000 R, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
- Objektträger:
Superfrost Plus Menzel-Gläser, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
- Paraffin:
Sasol Wax 0587, Sasol Wax GmbH, Hamburg, Deutschland

- Röntgen-Gerät:
Heliodent DS, Sirona Dental GmbH, Wals, Österreich
- Röntgen-Film (3,1 x 4,1 cm):
Kodak Insight Film, Carestream Dental, Rochester, NY, USA
- Salpetersäure, 7%ig:
Salpetersäure, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Scaler:
McFarlane, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA
- Schiebelehre:
HS-Boley-Schiebelehre, Henry Schein Dental Deutschland GmbH, Langen, Deutschland
- Skalpell:
Carbon Steel Surgical Blades, Swann-Morton, Sheffield, England
- SONOCOOL Ultraschallgerät:
Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
- Tasterzirkel:
HS-Tasterzirkel nach Iwanson, Henry Schein Dental Deutschland GmbH, Langen, Deutschland
- *TICKOPUR TR 3* Kontaktflüssigkeit:
Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland

11 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Luisa Maria Bacigalupo, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Dekalzifikation von Zahnhartgewebe - Eine vergleichende In-vitro-Untersuchung zum Einfluss von Ultraschall, Temperatur und Entkalkungsmedium auf die Dauer der Dekalzifikation unter Begutachtung der Qualität des histologischen Schnittpräparats “ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Luisa Maria Bacigalupo

12 Curriculum Vitae

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

13 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. A. M. Schmidt-Westhausen für die Überlassung des Themas und ihre hilfreiche und freundliche Unterstützung bei der Ausarbeitung der Arbeit.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. H. Ehardt für die ausführliche Beratung und Diskussion des Themas, die Hilfestellung während der Durchführung der Versuche, die Einbindung in seinen Praxisalltag und die Möglichkeit der Nutzung der Räumlichkeiten und Geräte des Zentrums für Oralpathologie Potsdam. Mein Dank gilt zudem seinen Mitarbeiterinnen, die mir stets Auskunft gewährten.

Ich danke Herrn E. Kirst für die freundliche methodische und statistische Beratung.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn R. Jung (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin) für die Möglichkeit der Nutzung des Ultraschallgerätes *SONOCOOL* und den technischen Rat.