

Aus dem Institut für  
Tierschutz, Tiervershalten und Labortierkunde  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dissertation

**Einfluss von angesäuertem Tränkwasser auf die Zähne  
von Mäusen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Marko Kostov**

aus Berlin

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. N.-C. Jühr
2. Priv.-Doz. Dr. med. dent. K. Bitter
3. Priv. Doz. Dr. S. Paris

Datum der Promotion: 22.03.2013

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>5</b>
2.1	Ansäuerung von Tränkwasser bei Versuchstieren	5
2.1.1	Auswirkungen von angesäuertem Tränkwasser auf die Zähne von Versuchstieren	7
2.1.2	In vitro Untersuchungen zur Säurewirkung auf Zähne	9
2.2	Die Kauwerkzeuge der Maus	11
2.2.1	Zahnformel und Zahnbild der Maus	11
2.2.2	Zahnentwicklung und altersbedingte Veränderungen	15
2.2.3	Die Zähne keimfreier Mäuse	16
<b>3</b>	<b>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>17</b>
3.1	Material und Methoden	17
3.1.1	Versuchstiere	17
3.1.2	Haltung der Tiere	17
3.1.3	Ansäuerung des Tränkwassers	18
3.2	Versuchsgruppen	18
3.3	Probenbearbeitung	18
3.3.1	Bestimmung von Zahnbelag	19
3.3.2	Zahnhartsubstanzdefekte Severity-Index nach Radike und Muhler (1953)	19
3.3.3	Bestimmung von Erosionen und Abrieb nach Sorvari et al. 1988	20
3.3.4	Fissurentiefe nach Karle et al. 1980	21
3.3.5	Raster-Elektronenmikroskopie	22
3.3.6	Statistische Auswertung	22
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>23</b>
4.1	Bestimmung von Zahnbelag	23
4.2	Zahnhartsubstanzdefekte – Severity-Index	27
4.3	Bestimmung von Erosionen und Abrieb	31
4.4	Fissurentiefe	35
4.5	Raster-Elektronenmikroskopie	39
4.5.1	Befunde an den Molaren	40
4.5.2	Befunde an den Incisivi	48
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>59</b>
	Danksagung	66
	Lebenslauf	67
	Selbstständigkeitserklärung	68

## 1. EINLEITUNG

Während die Maus in vielen Fachrichtungen das am meisten verwendete Versuchstier ist, spielte sie nach Ratte und Hamster in der experimentellen Zahnmedizin eine untergeordnete Rolle. Navia (1977) findet nur sehr wenige Kariesstudien an Mäusen, die die Meinung festigen, dass Mäuse keine kariogene Flora tragen (Sharawy et al. 1967, Ooshima et al. 1981). Für die Untersuchung alveolarer Knochenresorption erwiesen sich Mäuse als geeignet (Baer und Newton 1960, Gustafson et al. 1987).

Einige Publikationen berichten über Versuche mit kariogenen Diäten und mit kariogenen Keimen an keimfreien Mäusen (Rosen und Williams 1969, Gallusi und Grippaudo 1971, Kato 1976, Kato et al. 1977, Yanagawa 1979, Maeda et al. 1995, Ribeiro-Sobrinho et al. 1996, 1998).

Mit der Möglichkeit Versuchstiere genetisch zu verändern rückte die Maus in das wissenschaftliche Interesse zahnmedizinischer Forschung. (Gluhak-Heinrich 2000, Culp et al. 2005).

Genetisch veränderte Mäuse stellen wegen oft verminderter Vitalität, Resistenz bzw. Immunabwehr hohe hygienische Anforderungen an Zucht und Haltung. Als notwendige Hygienevorkehrung zur Verhinderung einer Keimbelastung über das Tränkwasser gehört dessen Ansäuerung. Da nur ein Befund über die Wirkung organischer Säuren auf die Zähne von Mäusen vorliegt (Sharawy et al. 1967) aber kein Befund über den Einfluss von mit HCl angesäuertem Wasser, sollte mit dieser Arbeit der Versuch einer Klärung des Einflusses von HCL im Tränkwasser besonders im Hinblick auf zahnmedizinische experimentelle Untersuchungen durchgeführt werden.

In diesem Sinne soll ermittelt werden, ob erosive Schäden durch eine Tränkwasseransäuerung mit HCl auf einen pH-Wert von 2 an den Zähnen von konventionellen oder keimfreien Mäusen auftreten.

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Ansäuerung von Tränkwasser bei Versuchstieren

In den 50er Jahren war die Haltung von und Versuche mit Versuchstieren auf einem derart schlechten Stand, dass die Food and Drug Administration (amerikanische Arzneimittelzulassungsbehörde) die Zulassung von neuen Arzneimitteln einstellte, „weil kein Vertrauen mehr in die präklinische Prüfung besteht“.ENZOOTISCHE Infektionen mit Viren oder Bakterien, sowie Parasitenbefall waren als Ursache offenkundig. Weil die Zulassung neuer Arzneimittel in den USA die Voraussetzung für Exporte auch in andere Länder der Welt ist, war mit erheblichen wirtschaftlichen Einbußen der forschenden Pharmaindustrie zu rechnen. Mit Kenntnisnahme dieser Entscheidung war eine Auseinandersetzung mit dieser Problematik unumgänglich. In vielen Ländern der Welt wurden unabhängig voneinander Konzepte für einen Neuanfang entwickelt. Als Hypothesen wurden formuliert:

1. Ein infektionsfreies Tier ist nur das keimfreie Tier.
2. Besiedlung des keimfreien Tieres mit einer pathogenfreien Darmflora.
3. Haltung der Tiere in geschützten Räumen (Barriersystem) und Versorgung mit sterilem Futter und Tränkwasser, sowie sterilen Haltungseinrichtungen (Käfige, Einstreu usw.).
4. Regelmäßige Überprüfung der Pathogenfreiheit: SPF-Status (spezifiziert-pathogenfreie Tiere).

Unter erheblichem finanziellem Aufwand, durch Aufbau von Einrichtungen zur Gewinnung und Haltung keimfreier Tiere und Tierhaltungsbereichen nach dem Barriersystem, gelang es neue pathogenfreie Versuchstierbestände aufzubauen.

Bereits in den 60er Jahren erschienen Hinweise über Infektionen bei SPF-Tieren, die subletal bestrahlt bzw. immunsuppressiv behandelt waren. *Pseudomonas aeruginosa* und Staphylokokken wurden diagnostiziert. Als Infektionsquelle wurde Tränkwasser ermittelt. Als pragmatischer Lösungsansatz wurde von Schaedler und Dubos (1962) und Mc Pherson (1963) eine Tränkwasserkonservierung - Tränkwasseransäuerung - durch Zusatz von Salzsäure und dadurch folgender Senkung des pH-Wertes auf pH2 bis 2,5 vorgeschlagen und in vielen Einrichtungen angewandt (Hoag et al. 1965, Trentien et al. 1966, McDougall et al. 1967).

Schädliche Auswirkungen wurden bei Mäusen nicht beobachtet. Ebenso wurden Futteraufnahme, Fortpflanzung, Wasseraufnahme, Gewichtsentwicklung und Zuchtergebnisse nicht beeinflusst (Mc Pherson 1963, Les 1968).

Mullink und Rümke (1971) untersuchten den Einfluss von 2-6 monatiger HCl Tränke (pH2,6 bis 2,8) auf die Schlafzeit von Mäusen nach Hexobarbitalverabreichung (60 mg/kg KG i.v.) und konnten keine Unterschiede zur leitungswassergetränkten Gruppe feststellen. Die pathologisch histologische Untersuchung der Tiere nach 6 monatiger HCl Tränke (im Sinne einer chronischen Toxizitätsprüfung) ergab keine Hinweise auf eine Schädwirkung. Die Zähne wurden offensichtlich nicht untersucht und im Bericht nicht erwähnt.

Tober-Meyer und Bieniek (1977) berichten, dass 7 monatige Tränke mit angesäuertem Wasser bei Ratten folgende Parameter nicht beeinflusst: Gewichtsentwicklung, Blutbild, Blutglukose, alkalische Phosphatase, GOT, GPT, Kreatinkinase, Gesamtprotein, Kreatinin, Phosphor, Natrium, Kalium und Calcium im Serum, sowie den Säure-Basenstatus im Blut. Die referierten Befunde führten dazu, dass die Ansäuerung von Tränkwasser mit Salzsäure von der Gesellschaft für Versuchstierkunde (1978) als notwendige Hygienevorkehrung bei der Haltung von SPF-Versuchstieren empfohlen wurde.

Die Tränkwasseransäuerung bewährte sich und ermöglichte Zucht und Haltung natürlicher Defekt-Mutanten wie z.B. thymusloser nu/nu Mäuse, sowie anderer Mutanten. Mit der Verfügbarkeit transgener Mäuse erhielten hygienische Sicherheitsmaßnahmen erneut hohe Aktualität. Obwohl genetisch hoch definiert waren viele Linien kaum oder nur kurze Zeit lebensfähig und waren durch eine erhebliche Vitalitätsminderung zu charakterisieren. Banale Infektionen waren tödlich, neue Krankheitsbilder wurden registriert (*Pneumocystis carinii*).

Für zahnmedizinische experimentelle Untersuchungen an der Maus ist zu klären, ob für derartige Versuche eine Tränkwasseransäuerung tolerierbar ist.

### **2.1.1 Auswirkung von angesäuertem Tränkwasser auf die Zähne von Versuchstieren**

Bereits 1943 hat McClure nach vorausgehenden in vitro Versuchen zur Säurelöslichkeit von Dentin und Zahnschmelz (Rosebury 1938), die destruktive Wirkung von verdünnten Säuren auf die Molaren von Ratten in vivo beschrieben, bei Anwendung von Salzsäure (0,16%, pH1,5), Milchsäure (0,5%, pH2,4) und Zitronensäure (0,5%, pH2,5). Er beobachtete die größten Schädigungen bei Verabreichung von Salzsäure. Die entstandenen Schäden wurden an der lingualen Seite der Unterkiefermolaren beobachtet, deren Kronen fast vollständig zerstört waren. Das an der okklusalen Fläche natürlicherweise freiliegende Dentin war durch die Säure trichterförmig ausgehöhlt, vermutlich durch die höhere Löslichkeit von Dentin gegenüber Schmelz. Generell waren aber Dentin und Schmelz gleich betroffen. Zur Objektivierung des Zahnhartsubstanzverlustes wurden die Gewichte der Zähne ermittelt. Die Gewichtsunterschiede zur Kontrollgruppe betrugen für die Molaren im Durchschnitt 34%, bei den Unterkiefermolaren bis zu 51,7%. Die Molaren zeigten eine mehr oder weniger glatte Oberfläche und völligen Höckerverlust.

Mit der Hypothese, dass der Zahnschmelz besonders verwundbar durch Säure ist, untersuchten Tolo und Erichson (1969) den Einfluss von angesäuertem Tränkwasser bei Ratten. Über 6 bis 11 Monate wurde mit Salzsäure auf pH2,5 angesäuertes Tränkwasser verabreicht. Die Auswirkungen wurden auf der Basis der Längenmessung der Molarensegmente und Prüfung der Schmelzdefekte an den bukkalen und lingualen Seiten der Molaren beurteilt. Die Untersuchung konnte keine Abweichungen, die auf Erosionen hinweisen, feststellen.

Wegen der Bedeutung der Schneidezähne (Nagezähne) für die Nahrungsaufnahme untersuchten Ladeburg und Juhr (1983/84) eine mögliche Schädigung von auf pH2,2 angesäuertem Tränkwasser auf Rattenzähne nach 12 monatiger Verabreichung. Eine Abnahme der Schmelzschicht konnte nicht beobachtet werden. Eine Vergrößerung der Oberflächenstruktur wurde als altersbedingte Abnutzungserscheinung beurteilt.

1980 berichteten Karle et al. über Zahnschäden bei Ratten, die für 6-24 Wochen mit durch Salzsäure auf pH2,2 angesäuertem Tränkwasser getränkt wurden. Erhebliche Schäden wurden registriert. Prädispositionsstelle war die linguale Kronenseite der Molaren, besonders an den Unterkiefern. Abätzungen der Schmelzschicht (die nur 0,03 bis 0,015mm beträgt) traten bereits deutlich nach 6 Wochen Säuretränke auf. Erosionen und Abrasionsschäden führten zur Bildung einer einseitigen Platte von lingual zu bukkal und damit zum Verlust der Fissuren.

Neben der Wirkung von Salzsäure auf die Zähne von Versuchstieren wurde auch der Einfluss anderer mineralischer und organischer Säuren untersucht. Gortner et al. (1945) belegten die Zahnschmelz - schädigende Wirkung von Milchsäure-Tränke auf Rattenzähne.

Bieri et al. (1946) zeigten die erosive Wirkung von 0,2%iger Phosphorsäure und Essigsäure auf Rattenzähne. Muller und Gortner (1949) ermittelten, dass Orthophosphorsäure (pH2,5) im Tränkwasser stark erosiv wirkt, ebenso aber auch Milchsäure (pH4). Holloway et al. (1958) stellten für Weinsäure eine erosive Wirkung

auf Rattenzähne fest. König et al. (1961) verwendeten Orthophosphorsäure (pH2) im Tränkwasser und beobachteten Zahnschmelzschädigungen.

Schweizer-Hirt et al. (1978) berichteten über Erosionen und Entkalkungen hauptsächlich an den Lingualflächen der Unterkiefermolaren bei Ratten die mit Most getränkt wurden. Der Most enthielt 0,7% Apfelsäure, 0,23% Zitronensäure und 0,01% Milchsäure. Sie stellten fest, dass sich Erosionen bei Nagern schneller bilden, da „ausgewachsene Tiere“ pro Tag 200 ml Flüssigkeit pro kg Körpergewicht aufnehmen, was 14 l/Tag beim Menschen entsprechen würde.

Darüber hinaus liegen weitere Berichte über Zahnschädigungen durch Fruchtsaft-Tränke bei Ratten vor, u.a. von Gortner et al. (1946), Wynn und Haldi (1948), Gortner und Kenisberg (1952), Hartless und Wagg (1962).

Allenspach-Petrzilka et al. (1987) tränkten Ratten mit 0,1M Milchsäure und stellten schwere kariöse Läsionen an der dentinfreien lingualen Seite der unteren ersten und zweiten Molaren fest, mit Ausbildung von „Dentinal Windows“. Geringe Schäden wurden am freiliegenden Dentin beobachtet.

In einem Versuch mit 100 Ratten, die 42 Tage mit einem „sport-drink“ der 3% Zitronensäure enthielt getränkt wurden, sahen Sorvari et al. (1988) ausgeprägte Erosionen, besonders an der lingualen Seite der Unterkiefermolaren und dort besonders ausgeprägt an den plaquefreien Kronenbereichen, an denen das Dentin frei liegt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde ein erhöhter Zahnabrieb beobachtet.

Nach meiner Kenntnis berichteten Sharawy et al. (1967), als einzige über eine Säureschadwirkung auf die Zähne von Mäusen. Sie bepinselten die Molaren 50 Mal mit einmolaren Lösungen von Milch-, Essig-, Zitronen- und Ameisensäure auf die Unterkiefermolaren. Danach entwickelten sich bei 4 von 8 Mäusen, die mit Milchsäure behandelt wurden, deutliche Anzeichen von Zahnkaries. Sie bemerkten, dass der alveolare Knochenschwund bei allen Säurebehandlungen auftrat.

### 2.1.2 In vitro Untersuchungen zur Säurewirkung auf Zähne

Die erosive Wirkung von organischen Säuren in Fruchtsäften ist schon von Miller (1907) beobachtet worden, experimentell belegt und zahlreich bestätigt worden (siehe Schweizer-Hirt et al. 1978, DeSanctis 2001).

Nachfolgend sollen nur einige Untersuchungen erwähnt werden.

In einem In vitro Versuch behandelte Brosowsky (1966) die Oberfläche ( $4\text{mm}^2$ ) gesunder menschlicher Zähne durch Einlegen in Salzsäure bzw. Zitronensäure der Konzentrationen 0,01; 0,1; 1,0 und 2,0n bei  $37^\circ\text{C}$  für 1, 7, 14, 21 und 28 Tage. Als Kriterium für einen Ca-Abbau bestimmte er den Gewichtsverlust der Proben und beurteilte die Proben anhand von histologischen Schnitten. Es zeigte sich, dass Zahnschmelz unter der Einwirkung von Mineralsäure (HCl und organische Säurer (Zitronensäure) angegriffen wird. Der größte Effekt ist bei gleicher Konzentration bei Salzsäure zu beobachten, entsprechend dem Gewichtsverlust und dem gelösten Calcium. Auf pH6,9 eingestellte Salzsäure (Neutralisation durch Natrium-Salz-Bildung) verursacht keine Schäden. Dem gegenüber verursachte auf pH6,9 eingestellte, zur Komplexbildung befähigte organische Säure, deutliche Schmelzschäden.

Oberflächenveränderungen wurden schon bei 0,01n Säure nach einem Tag als Aufrauung des Schmelzes beobachtet. Nach 28 Tagen waren tiefe Krater vorhanden. Bei 0,1n HCl entstanden schon am ersten Tag tiefe Defekte. Mikroskopisch war ein schrittweiser Schmelzabbau und nach Schmelzerstörung im Dentin verminderte Strukturierung mit hervortretenden Dentinkanälchen zu beobachten.

McDonald und Stookey (1973) prüften die Schadwirkung von Karbonsäuren in Nahrungsmitteln an Rinderzähnen in vitro und als Tränke an Ratten (Mischung von: Fumarsäure 0,15%; Zitronensäure 0,15%; Weinsäure 0,15%) und ermittelten in vitro eine hohe Schmelzlösung ( $282\mu\text{g Ca/ml/24Std}$ ) und in vivo einen hohen Erosions-Score.

Schweizer-Hirt et al. (1978) behandelten menschliche Prämolaren 5 min mit Orangensaft (0,9% Zitronensäure, 0,2% Apfelsäure bei pH3,4; bei  $38^\circ\text{C}$ ) und bestimmten die Härte des Schmelzes (Knoop-Härte) und beurteilten die Oberfläche anhand von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen. Eine Behandlung der Proben mit Orangensaft senkte die Härte der Schmelzanschliffe um durchschnittlich 17%. Morphologisch verschwindet das „Honigwabenmuster“, und besonders am Schmelzrand zeigt der Schmelz eine ausgeprägte Prismenkopfstruktur.

Davis und Winter (1980) behandelten menschliche Schneidezähne für jeweils 3 min bei  $25^\circ\text{C}$  mit Wasser, angesäuert mit Phosphorsäure, Salzsäure bzw. Zitronensäure auf pH-Werte von 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; und 5,0. Bei allen Säuren wurden bei  $\text{pH}<2$  tiefe Schmelzschäden registriert. Größte Schäden traten bei Phosphorsäure und Salzsäure von pH1,5 auf. Der Zahnabrieb nahm nach Säureeinwirkung exponentiell zu.

Noack (1989) untersuchte die Zahnhartsubstanzdefekte, die durch 5minütige Einwirkung von Zitronensaft (pH2,3) an erodierten und gesunden menschlichen oberen Schneidezähnen mit rasterelektronenmikroskopischer Beurteilung.

Die Reaktion auf die Zitronensaftbehandlung schwankte bei gesunden Zähnen zwischen kaum wahrnehmbaren Veränderungen und massiven Ättschäden im Schmelz. Deutlich sichtbar waren selektiv gelöste Prismenenden neben einer allgemeinen Zunahme der Rauhtiefe.

Bei vorliegenden Erosionen stellte sich der Schmelz am Rande von Erosionen als „verschneite Oberfläche“ mit Wabenstruktur - als Folge einer Rekristallisierung - dar. Nach Säurebehandlung wurde das ursprüngliche Ätzmuster wieder freigelegt. Dentin zeigte deutliche Abrasionsspuren in Form von Wellen und Kratzern. Der Dentinbereich zeigte stärkeren Verschleiß als der umgebende Schmelz. Durch Säureeinwirkung wurde die überwiegende Anzahl der Dentinkanäle eröffnet und vor allem peritubuläres Dentin herausgelöst, so dass die Kanaleingänge erweitert wurden. Der Dentinbereich zeigte eine charakteristische wellige Oberfläche.

Meurman et al. (1991) untersuchten die Erosion von Dentin auf menschlichen Molaren durch Getränke, die Phosphorsäure (pH 2,6), Apfelsäure (pH 3,4) und Zitronensäure (pH 2,8) enthalten durch Einlegen für 30 Sekunden bis 60 Minuten. Freiliegende Dentinkanälchen wurden bei allen Säuren schon nach 30 Sekunden Immersion beobachtet. Eine Immersion für 60 Sekunden führte zur Auflösung peri- und intertubulären Dentins. Eine längere Immersion führte zur Aushöhlung der Tubulaöffnungen durch Zerstörung des peritubulären Dentins. Rauheit und Porosität der Oberfläche wurde im intertubulären Bereich beobachtet.

## 2.2. Kauwerkzeuge der Maus

### 2.2.1 Zahnformel und Zahnbild der Maus

Das Gebiss der Maus besteht aus 16 Zähnen und setzt sich wie folgt zusammen

	Zähne	Incisivi	Canini	Prämolaren	Molaren
Maus	16	1/1	0/0	0/0	3/3

Daraus ergibt sich die Zahnformel  $\frac{1003}{1003}$ .

Die Schneidezähne (Nagezähne) sind lang und gebogen (10-11mm), der Durchmesser beträgt 0,9 mm (Braikoff 1927), und ihre Wurzeln reichen weit nach caudal in Richtung der Wurzeln der maxillaren bzw. mandibularen Molaren. Die scharfe Spitze des unteren Schneidezahnes liegt leicht hinter der stumpfen Ecke des oberen Schneidezahnes bei geschlossenem Maul. Die Schneidezähne wachsen lebenslang und die Wurzelspitze bleibt offen. Ständig wird basal neues Dentin (9 bis 12µm täglich) (Spreter von Kreudenstein 1939) und neuer Zement gebildet und somit der Zahn permanent in Richtung Mundhöhle vorgetrieben. Nur die labiale konvexe Fläche der Schneidezähne ist mit Schmelz bedeckt. An der lingualen konkaven Seite fehlt der Schmelzbelag bis auf geringe Spuren. Das Dentin ist nur mit Zement bedeckt (Hummel et al. 1966). Da Dentin weniger hart ist als Schmelz, entsteht durch den uneinheitlichen Zahnabrieb eine scharfe Schmelzkante (Wood 1962). Das unterschiedliche Wachstum von Schmelz und Dentin begründet auch die gebogene Form der Schneidezähne (Sachse 1894 zit. Schroll 2004). Da im Gebiss der Maus Canini und Prämolare fehlen, folgt im Kiefer ein zahnfreier Raum – Diastema – vor den Molaren.

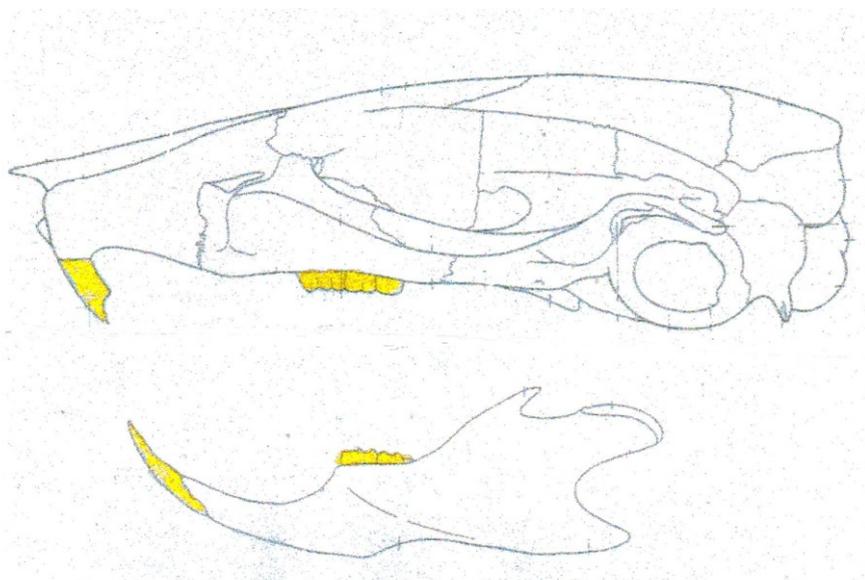


Abb. 1: Schematische Darstellung des Mäuseschädels nach Cook (1965)

Vorübergehend verbindet während der embryonalen Entwicklung eine Zahnlamelle Schneidezähne und Molaren. Im Bereich des später zahnlosen Diastema sind beim Embryo im Zellbild Spuren von Zahnanlagen beobachtet worden, die sich später zurückbilden. Diese Spuren von Zähnen wurden zuerst von Woodward (1894), später von Peters und Strassburg (1969) und Fitzgerald (1973) beschrieben. Sie wurden zunächst nur im Oberkiefer mit maximaler Entwicklung am Tag 15,5 post conceptionem beobachtet, später jedoch auch Unterkiefer mit maximaler Ausbildung am Tag 12,5-13,5 registriert (Viriot et al. 2000, Moss-Salentijn 1975, Moss-Salentijn 1978, Peterkova et al. 2002).

Bei diesen rudimentären Zahnanlagen wird kein Schmelzorgan gebildet. Lediglich irregulär geformtes Dentin erscheint. Noch vor der Geburt degenerieren die Odontoblasten und das Dentin verschwindet durch Resorption (Apoptosis) (Peterkova et al. 2003).

Die drei Molaren der Maus sind echte Molaren, denn sie haben keine Vorläufer im Milchgebiss. Ein Zahnwechsel erfolgt nicht (Mahn 1890). In dieser Reihe ist der erste Molar der größte Zahn, der dritte Molar der kleinste.

Die Molaren sind durch lebenslanges Wachstum hohe prismatische Zähne, die durch die Intensität der Schmelzfaltung wie aus zahlreichen Lamellen zusammengesetzt erscheinen (Peyer 1963). Durch Längs- und Querfurchen eines jeden Molaren - wobei besonders die Querfurchen tief einschneiden - ist die Kaufläche in eine bestimmte Anzahl von Höckern gegliedert. Die Kronen sind nicht von einer ununterbrochenen Schmelzlage bedeckt. Mäuse haben eine teilweise schmelzlose Kaufläche, auf der das Dentin frei liegt. Bei Abrieb vergrößert sich die schmelzfreie Kaufläche. Ein peripherer Schmelzreif und isolierte Schmelzinseln sind auch bei alten Tieren zu finden. An Krone und Wurzel befindet sich kein Zement. „Es kommt an den Molaren Zement überhaupt nicht vor“ (Mahn 1890).

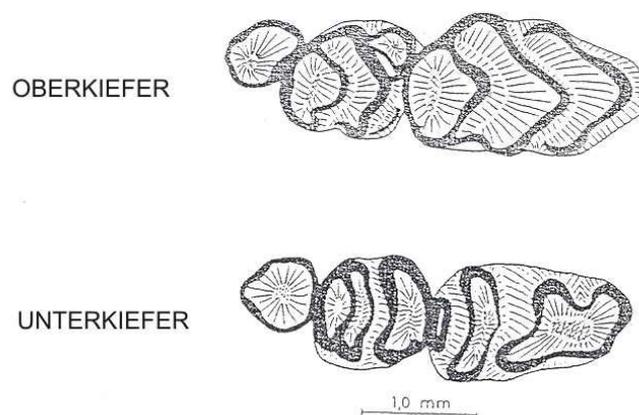


Abb. 2: Ansicht der Kronen der linken Molaren in Ober- und Unterkiefer ein Jahr alter C3H Mäuse. Die freien Schmelzkanten sind schwarz gezeichnet nach Gaunt (1961)

Nach Cohn (1957) sind schmelzfreie Bereiche typisch für die Molaren von Nagetieren und entstehen vor der Geburt als Ergebnis der Unfähigkeit bestimmter Ameloblasten zu differenzieren. Die Unfähigkeit solcher Zellen Schmelz zu bilden ist für die schmelzfreien Bereiche verantwortlich. Nach Braikoff (1927) sind die Höcker der Molaren der Maus kurz und flach. Die Oberkiefermolaren haben 3, die Unterkiefermolaren 5, 4 bzw. 3 Höcker ( $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ). Die Länge der Zahnreihe der Molaren beträgt 7 mm, die Breite der Kaufläche des ersten Molaren 0,35 mm. Bhaskar et al. (1948) vermittelt für die Oberkiefermolaren 5; 4; 3/4 und die Unterkiefermolaren 7; 5; 3 Höcker.

Gaunt (1956) bezeichnet das Kronenbild der Mäusemolaren als triserial. Die Krone des ersten maxillaren Molaren ist dreigeteilt durch zwei transversale Spalten und zudem zwei longitudinale Furchen. Die vordere Höckergruppe fehlt bei den zweiten und dritten Oberkiefermolaren. Folgen der schmelzfreien Bereiche sind „apical pits“ (Gruben an der Kronenspitze) an der hinteren Fläche der Höcker im Oberkiefer.

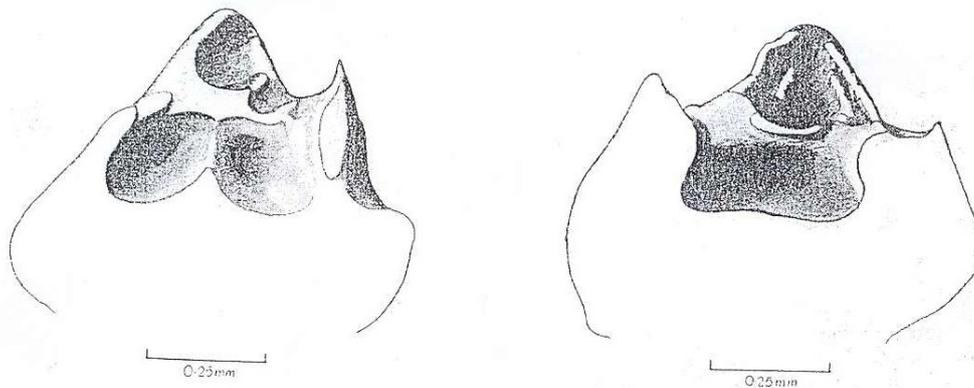
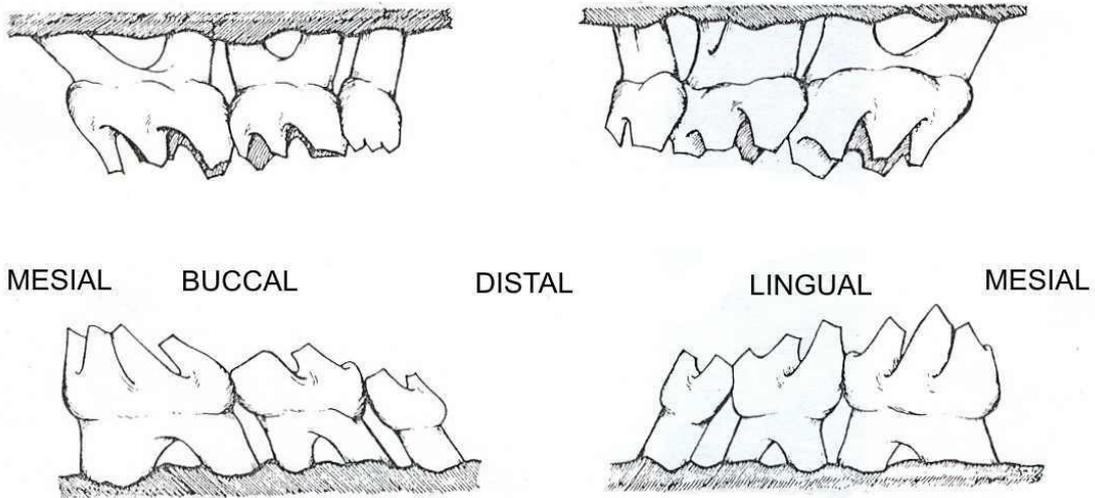


Abb. 3: Hintere Fläche von Höcker 1 und 2 des ersten Oberkiefermolaren nach Gaunt (1956)

In Seitenansicht sind die Oberkiefermolaren nach hinten geneigt, die Unterkiefermolaren sind nach vorn geneigt mit schmelzfreien Bereichen auf der Vorderseite der Höcker. Bei den Oberkiefermolaren ist die linguale Seite der Krone niedriger, bei den Unterkiefermolaren die bukkale Seite der Krone.

Die Mahlbewegung der Zähne ist bei Nagetieren von vorn nach hinten und von hinten nach vorn. Im Oberkiefer ist der Abstand der gegenüberliegenden Molaren im Verhältnis kleiner als im Unterkiefer. Dadurch werden die Kauflächen im Oberkiefer nach lingual abgerieben, während sie nach labial länger sind. Im Unterkiefer ist der höchste Punkt eines Molaren lingual und sein niedrigster labial (Schroll 2004).

## Oberkiefer



## Unterkiefer

Abb. 4: Zahnstellung der Molaren in Ober- und Unterkiefer nach Gustafson et al. 1987

Die Angaben über die Anzahl der Wurzeln der einzelnen Molaren sind uneinheitlich. Mahn (1890) beschreibt im Oberkiefer für  $M^1$  und  $M^2$  je drei und für  $M^3$  zwei Wurzeln und im Unterkiefer für  $M_1$ ,  $M_2$  zwei und  $M_3$  eine Wurzel. Braikoff (1927) berichtet über 3; 4; 3 Wurzeln im Oberkiefer und 2; 2; 3 Wurzeln im Unterkiefer. Bhaskar et al. (1948) beschreiben 3; 3; 2 Wurzeln im Oberkiefer und 2; 2; 1 Wurzeln im Unterkiefer. Cohn (1957) registriert 3; 3; 3 Wurzeln im Oberkiefer und 2; 2; 1 Wurzeln im Unterkiefer.

## 2.2.2 Zahnentwicklung und altersbedingte Veränderungen

Zur Odontogenese der Maus soll auf das Handbuch von Rugh (1968) und die zusammenfassende Darstellung in der Dissertation von Schroll (2004) verwiesen werden, der die folgende Tabelle entnommen ist.

Tab. 1: Chronologie der Odontogenese im Mäuseembryo nach Ruch (1978)

Die Ziffern entsprechen dem jeweiligen Embryonaltag

	Schneidezähne		1. Molare		2. Molare		3. Molare	
	inferior	superior	inferior	superior	inferior	superior	inf.	super.
<b>Zahnleiste</b>	12,5. – 13.		11. – 13.					
Knospens- stadium	13. – 14.		13. – 14.		16. – 18.	17. – 18.	18. – 23.	
<b>Glocken- stadium</b>	14. – 16,5.		14. – 18.	14. – 19.	18. – 20.	18. – 21.		
Odonto- blasten	16,5. – 17.	17. – 18.	18. – 19.	19. – 20.	20. – 21.	21. – 22.		
<b>Amelo- blasten</b>	17. – 18.	18. – 19.	19. – 20.	20. – 21.	21. – 22.	22. – 23.		
Prädentin	17. – 18.	18. – 19.	19. – 20.	20. – 21.	21. – 22.	22. – 23.		
<b>Schmelz</b>	18. – 23.	19. – 23.	20. – 23.	21. – 23.	22. – 23.	23.		
Dentin	18. – 23.	19. – 23.	20. – 23.	21. – 23.	22. – 23.	23.		

Auf den für die Fragestellung relevanten Zeitpunkt der Eruption der Zähne im Verlauf der Odontogenese soll kurz eingegangen werden.

Bhaskar et al. (1948) beschreiben den Durchbruch der Incisivi am 10. Lebenstag, des ersten Molaren am 15., des zweiten Molaren am 15. bis 20. und des dritten Molaren am 28. Lebenstag. Cohn (1957) gibt für den Durchbruch des ersten Molaren den 16. bis 17. Lebenstag, des zweiten Molaren den 18. oder 19. und für den dritten Molaren den 28. bis 29. Lebenstag an.

Neuere Berichte über die Zahnentwicklung der Maus, wie von Dassule und MacMahon (1998) für Swiss Mäuse und von Gaete et al. (2004) für ICR Mäuse, stimmen mit der obigen Tabelle weitgehend überein.

Über Veränderungen der Zähne der Maus im Verlaufe des Lebens berichten Robins und Rowlett (1971) bei C57 BL Mäusen bis zu einem Alter von 36 Monaten. Schäden wurden besonders an den Incisivi ab einem Alter von 20 Monaten festgestellt und erreichen an den maxillaren Incisivi ab einem Alter von 30 Monaten 100%. Schmelzschaeden (longitudinale Rillen), Farbveränderungen des Schmelzes und Zahnbruch oder Zahnverlust wurden beobachtet. Demgegenüber waren die Molaren auch bei alten Tieren normal, aber durch starken Abrieb charakterisiert. Dieser Befund ist überraschend, da Incisivi kontinuierlich wachsen und Abrieb durch Nachwachsen ausgeglichen wird, während die Molaren diese Fähigkeit nicht im gleichen Maße haben (Schour und Massler 1942).

Über altersbedingte Veränderung im Periodontium berichten Baer und Bernick (1957) und Gustafson et al. (1987). In beiden Studien wurde eine mit dem Alter zunehmende Knochenresorption beobachtet.

### 2.2.3 Die Zähne keimfreier Mäuse

Baer und Newton (1960) verglichen die Zähne von konventionellen Mäusen mit denen von keimfreien Mäusen (Swiss), sowie von keimfreien Mäusen, die konventionalisiert wurden. Die Gingiva aller Gruppen war in Farbe, Position und Kontur gleich. Bei ein bis drei Monaten alten Tieren reichte der Alveolarknochen bis etwa an die Zementschmelzgrenze. Bei sechs bis acht Monate alten Tieren war die Wurzel mehr oder weniger frei (bis zur Hälfte der Wurzel freiliegend). Sie kamen zu dem Schluss, dass auch bei keimfreien Tieren ab einem Alter von vier Monaten in einer Häufigkeit von 30 bis 100% von einer „peridontal disease“ ausgegangen werden muss. Auflagerungen (Calculi) wurden besonders auf den Kronen der maxillaren Molaren (am meisten auf der mesolingualen Fläche des ersten Molaren) beobachtet (Baer und Newton 1959). Als Erklärung wird angenommen, dass auch Körperzellen Esterasen bilden, die Fettsäureester hydrolysieren und Fettsäuren freisetzen, die eine Carbonat- und Phosphatbildung bewirken könnten. Da die Calculi sich mit Alizarin Red rot färben wird geschlossen, dass sie Calcium enthalten.

Eine Bildung von Zahnstein wurde auch bei keimfreien Ratten (Theilade et al. 1964) nachgewiesen. Es wurde angenommen, dass organisches Material nichtbakteriellen Ursprungs als Matrix für die Ablagerung von Mineralstoffen aus dem Speichel dienen könnte. Bei vergleichenden Untersuchungen der Zähne keimfreier und konventioneller Mäuse (Baer et al. 1964) wurden keine Unterschiede beobachtet. Der alveolare Knochenverlust war nicht unterschiedlich. Bei intaktem Zement wurde kein Epithelverlust und keine Taschenbildung beobachtet. War die Zementschicht dünn oder resorbiert, trat Taschenbildung auf, bei keimfreien und konventionellen Mäusen. Der Einfluss einer bakteriellen Besiedlung wurde als unbedeutend eingestuft. Als Ursache wurde eine Cementopathie vermutet.

Im Gegensatz zu den anderen Untersuchungen beobachteten Kato et al. (1977) und Yanagawa (1979) in vergleichenden Untersuchungen zwischen konventionellen und keimfreien Mäusen auch bei keimfreien Tieren eine geringgradige Ausbildung von Zahnbelag (Plaque). Dieser Befund stellte die bisherige Definition von Zahnbelag – als durch Bakterien erzeugter Belag auf Zähnen – in Frage.

### **3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN**

#### **3.1 Material und Methoden**

##### **3.1.1 Versuchstiere**

Für die Untersuchungen wurden keine Tierversuche durchgeführt und keine Versuchstiere getötet. Das benötigte Untersuchungsmaterial (Ober- und Unterkiefer von Mäusen) wurde in der Einrichtung aus anderen Untersuchungen gewonnen: Kontrollgruppen von Ernährungsversuchen (G0356/96), diagnostischen Untersuchungen in Quarantäne und Haltung sowie Keimfreikontrollen von gnotobiotischen Tieren (G0138/00).

- Kriterien für die Verwendung waren:
- Mäusestamm BALB/c,
- männliche Tiere in einem
- Alter von 10-12 Wochen und eine

Tränke entweder mit Leitungswasser oder Tränke mit angesäuertem Leitungswasser seit dem Absetzen (3. Lebenswoche) jeweils für konventionelle und keimfreie Tiere.

Dementsprechend kam das Untersuchungsmaterial für konventionelle Tiere mit Leitungswasser getränkt aus Kontrollgruppen von Fütterungsversuchen, das konventioneller Tiere mit angesäuertem Leitungswasser getränkt aus Gesundheitskontrollen der Quarantänehaltung, das keimfreier Tiere mit Leitungswasser getränkt aus Zuchtisolatoren und das von keimfreien Tieren getränkt mit angesäuertem Tränkwasser aus Vorratshaltungsisolatoren, die für eine bakterielle Besiedlung (Assoziation) vorgesehen waren.

Die für die ursprünglichen Untersuchungen nicht benötigten Köpfe der Mäuse wurden in PVC Folie eingeschweißt und bis zur Entscheidung über die Verwendbarkeit bzw. bis zur Verwendung in dieser Untersuchung bei minus 20°C gelagert.

##### **3.1.2 Haltung der Tiere**

Die Haltung der Tiere erfolgte entsprechend den Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde (1974, 1978) bzw. dem Standard der Gnotobioteknik (Heine 1968) in Makrolonkäfigen Typ 2 auf Weichholzgranulateinstreu und einer Besatzdichte von 5 Tieren pro Käfig.

Die Fütterung erfolgte ad libitum mit pelletiertem Alleinfutter (ssniff MZ-autoklavierbar), welches für die keimfreien Tiere bei 135°C für 5 Minuten autoklaviert wurde. Die Härte der Futterpellets (comprehensive strength) (Wang et al. 2003) betrug 50 gf/mm<sup>2</sup> vor bzw. 60 gf/mm<sup>2</sup> nach dem Autoklavieren (Sako et al. 2002).

Die Kontrolle der Keimfreiheit der Isolatortiere wurde mikrobiologisch nach Wagner (1959) und unter Berücksichtigung von Keimfrei-Charakteristika, wie Blinddarmgröße und Redox-Potential im Blinddarm (Juhr 1985), überprüft. Alle Tiere waren in CO<sub>2</sub>-Narkose durch Herzpunktion entblutet und durch CO<sub>2</sub> Überdosis getötet worden.

Die Tränke der Tiere erfolgte ad libitum, als Flaschentränke mit Leitungswasser bzw. mit angesäuertem Leitungswasser, das für die keimfreien Tiere autoklaviert (121° C für 20 Minuten) wurde.

### **3.1.3 Ansäuerung des Tränkwassers**

Die Ansäuerung des Tränkwassers auf pH2 erfolgte vor der Verwendung im Tierraum (konventionelle Tiere), bzw. im Isolator (keimfreie Tiere) durch Zusatz von 5 ml Salzsäure (37%) auf 10 Liter Leitungswasser.

### **3.2 Versuchsgruppen**

Das verfügbare Material wurde unter Berücksichtigung der Kriterien folgenden Gruppen zugeordnet:

1. Konventionelle Tiere (Leitungswassertränke)
2. Konventionelle Tiere (Leitungswassertränke angesäuert)
3. Keimfreie Tiere (Leitungswassertränke autoklaviert)
4. Keimfreie Tiere (Leitungswassertränke autoklaviert, angesäuert).

Da von keimfreien Tieren, getränkt mit Leitungswasser bzw. angesäuertem Leitungswasser, jeweils nur 10 Proben verfügbar waren wurden auch die Gruppen mit konventionellen Tieren auf jeweils 10 Tiere beschränkt.

### **3.3 Probenbearbeitung**

Nach Auftauen der Probe erfolgte eine Präparation zur Freilegung von Ober- und Unterkiefern durch Entfernung von Haut und Muskelgewebe.

### 3.3.1 Bestimmung von Zahnbelag

Zur Bestimmung von Plaque (Zahnbelag) wurden die rechten Oberkieferzähne in situ mit jeweils einem Tropfen 1%iger wässriger Brillantgrün-Lösung für 10 Sekunden gefärbt und danach reichlich mit Aqua dest. gespült. Brillantgrün-Lösung wurde wegen der Vergleichbarkeit mit Versuchen an Ratten von Karle et al. (1980) verwendet. Nach der Färbung wurde an den Molaren jeweils die linguale und okklusale Fläche beurteilt.

Der Grad des Plaquebefalls wurde wie folgt beurteilt (modifiziert nach Silness und Løe 1964).

Score	Kriterien
0	keine Plaque
1	moderate Ablagerungen an Gingiva-Zahngrenze
2	massive Ablagerung mit Ausdehnung auf den Zahn

Die Beurteilung je Zahn und Plaquefläche wurde wie folgt vorgenommen

Plaque - Index pro Zahn = Summe Score

Plaque - Index pro Tier = Summe Score pro Einzelzahn

Plaque - Index pro Gruppe = Summe Index je Tier : 10

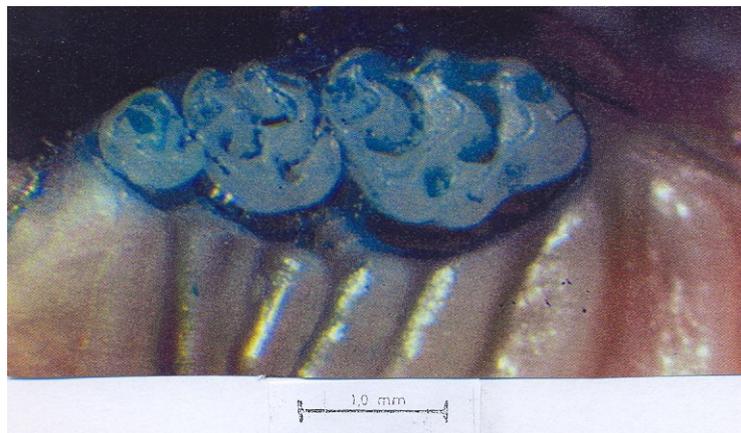


Abb. 5: Molaren des rechten Oberkiefers gefärbt mit Brillantgrün

### 3.3.2 Zahnhartsubstanzdefekte – Severity Index nach Radike und Muhler (1953)

Die Molaren des linken Ober- und Unterkiefers wurden zur Ermittlung von Zahnhartsubstanzdefekten mit jeweils einem Tropfen Schiff's Reagenz (fuchsin-schweflige Säure) für 10 sec. behandelt und danach reichlich mit Aqua dest. gespült. Bei Behandlung mit Schiff's Reagenz bleiben nach König (1965) gesunder Schmelz und gesundes Dentin ungefärbt, während sich kariös entkalkte Hartsubstanzen intensiv rot färben.

Die Beurteilung erfolgte durch Ermittlung des Schweregrades des Schadens nach dem SI (Severity Index) Radike und Muhler (1953). Die mit Schiff's Reagenz behandelten linken Molaren des Ober- und Unterkiefers wurden stereomikroskopisch

von okklusal, lingual und bukkal zur Abschätzung von Schäden untersucht. Als Befunde galten

0	keine Schäden
1	weniger als $\frac{1}{4}$ der Krone geschädigt
2	$\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ der Krone geschädigt
3	mehr als die Hälfte der Krone geschädigt

Je drei Flächen pro Zahn von 6 Molaren wurden als Summe pro Tier errechnet. Die Summe der Einzelzahnbeurteilung ergab den Zahnschaden pro Tier.



Abb. 6: Oberkiefer links gefärbt mit Schiffs Reagenz

### 3.3.3 Bestimmung von Erosionen und Abrieb (nach Sorvari et al. 1988)

Die linguale Seite der linken Molaren von Ober- und Unterkiefer wurden unter gleichzeitiger Aufnahme einer Mikrometerfolie (2mm) auflichtmikroskopisch fotografiert.

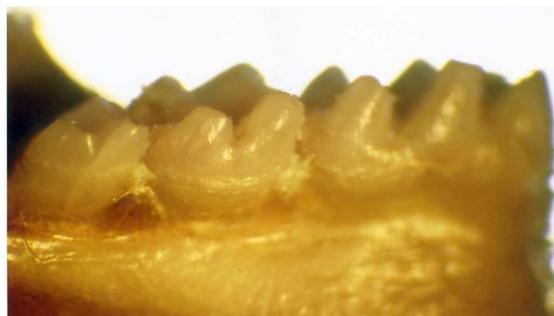


Abb. 7: Unterkiefer links von lingual

Die Fotos wurden in einen Computer eingescannt und die Bilder mit der Software Lucia G-Nikon vermessen.

Dazu wurde

1. Die Gesamtfläche (mm<sup>2</sup>)
2. freiliegendes Dentin und
3. die erodierte Schmelzfläche ermittelt.

Unter Berücksichtigung der Mikrometerskala wurde die jeweilige Fläche berechnet. Reduktionen der Gesamtfläche wurden als okklusaler Abrieb beurteilt.

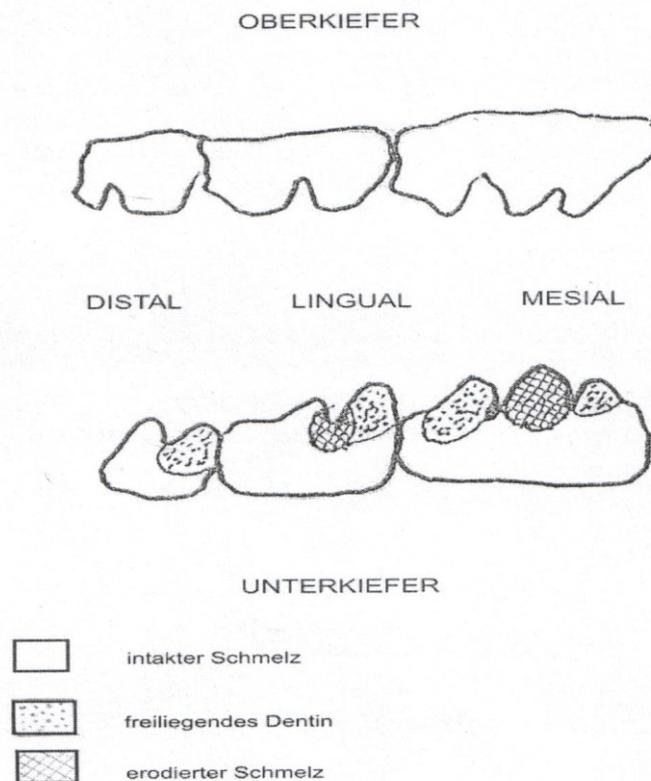


Abb. 8: Flächenmessung zur Ermittlung von Zahnhartsubstanzdefekten

### 3.3.4 Fissurentiefe nach Karle et al. (1980)

Der linke Unterkiefer wurde nach Abschluss der Beurteilung des Zahnhartsubstanzverlustes durch die Behandlung mit Schiffs Reagenz für die Histologie in Technovit 9100 (Heraeus Kulzer, Wehrheim) eingebettet. Dabei wurde die bukkale niedrigere Seite so auf den Boden der Kammer gelegt, dass sie nach Aufblocken zuerst geschnitten wurde. Die Aufblockung erfolgte auf einem Histoblock mit Technovit 3040 derart, dass sich die sagittale Achse der Molarenreihe genau parallel zur Schnittebene befand. Unter Einsatz eines Exakt-Dünnschliffsystems wurde schichtweise abgehobelt und die erzielte Schnittfläche auflichtmikroskopisch beurteilt. Im Bereich der Zahnmitte wurden mit einem Leitz Sägemikrotom 50 µm Schnitte hergestellt.

Zur Bestimmung der Fissurentiefe wurden die geschliffenen Blöcke mit Auflicht, die Schnitte mit Durchlicht mikroskopiert.

Mit Okular 5x und Messokular 12,5x wurde mit einem Leitz Mikrometer (2mm in 200 Teilstrichen) das Okular geeicht. Sechs Fissuren der Molaren des linken Unterkiefers entsprechend der folgenden Abbildung (Gustafson et al. 1987) wurden vermessen.

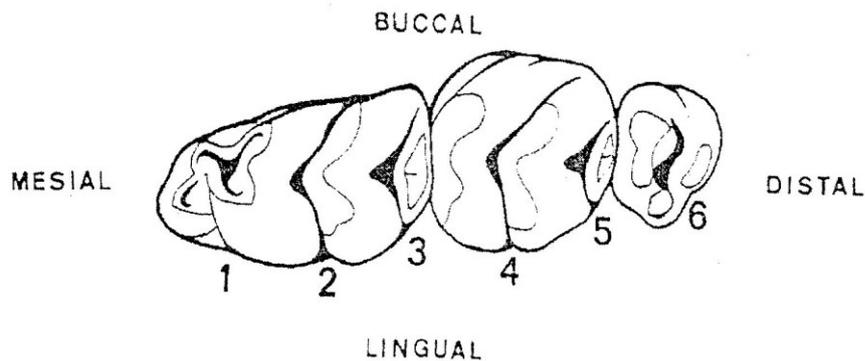


Abb. 9: Vermessene Fissuren der Molaren des linken Unterkiefers

### 3.3.5 Raster-Elektronenmikroskopie

Der rechte Unterkiefer wurde mit Glutaraldehyd (2%ig) fixiert, luftgetrocknet und bei Raumtemperatur gelagert. Aus jeder Untersuchungsgruppe wurden drei Tiere zufällig ausgewählt.

Die Unterkiefer wurden auf einem Objekthalter in „natürlicher Stellung“ mit Uhu-hart aufgeklebt. Nach Bedampfung mit Palladium-Gold (300Å) (Hummer-Junior, Siemens) erfolgte die elektronenmikroskopische Untersuchung im Bundesamt für Materialprüfung Berlin (Elektronenmikroskop 15kV).

Die Präparate wurden im Raster-Elektronenmikroskop betrachtet und fotografiert.

### 3.3.6 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde, entsprechend der Empfehlung des Instituts für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München auf online verfügbare Rechenprogramme zurückgegriffen.

Zum Vergleich der Mittelwerte mehrerer unabhängiger Stichproben wurden folgende nicht parametrische Tests angewandt :

Einfache Varianzanalyse : <http://faculty.vassar.edu/lowry/anova1u.html>

Rangvariationsanalyse : <http://faculty.vassar.edu/lowry/kw4.html>

Friedman-Test <http://faculty.vassar.edu/lowry/fried4.html>

Dunnett's Test <http://texasoft.com>

## 4. ERGEBNISSE

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen zur Schädigung der Zähne von Mäusen durch Verabreichung von mit Salzsäure angesäuertem Tränkwasser im Vergleich der Untersuchungsgruppen

Gruppe 1. Konventionelle Tiere (Leitungswassertränke) (C/LW)

Gruppe 2. Konventionelle Tiere (Leitungswassertränke, angesäuert) (C/AW)

Gruppe 3. Keimfreie Tiere (Leitungswassertränke, autoklaviert) (GF/LW)

Gruppe 4. Keimfreie Tiere (Leitungswassertränke, autoklaviert, angesäuert) (GF/AW) dargestellt.

### 4.1 Bestimmungen von Zahnbelag

Die Bestimmung von Zahnbelag (Plaque) an den rechten Oberkiefermolaren nach der Methode von Silness und Løe (1964) ergab die in der folgenden Tabelle (Tabelle 1) dargestellten Ergebnisse.

Auf der Basis der Scores lingual und bukkal pro Zahn, werden Scores pro Zahn, pro Tier, pro Gruppe und Mittelwert und Standardabweichung pro Gruppe angegeben.

Es ist ersichtlich, dass die Gruppe 1 (C/LW) mit einem durchschnittlichen Plaque-Index von  $8,4 \pm 1,7$  auffällt, der im Vergleich zu den Gruppen 2, 3 und 4 statistisch signifikant ist.

Verabreichung von angesäuertem Tränkwasser führt zu einer geringeren Ausbildung von Zahnbelag in Gruppe 2 (C/AW) bei einem durchschnittlichen Plaque-Index von  $4,0 \pm 1,2$ .

Bei keimfreien Tieren der Gruppe 3 (GF/LW) wurde ein durchschnittlicher Plaque-Index von  $5,0 \pm 0,9$  ermittelt.

Verabreichung von angesäuertem Tränkwasser an keimfreie Tiere der Gruppe 4 (GF/AW) ergab einen durchschnittlichen Plaque-Index von  $3,6 \pm 1,7$ .

Tab. 2: Plaquebestimmung nach Silness und Loe (1964)

Gruppe1 C/LW	M <sup>1</sup>		M <sup>2</sup>		M <sup>3</sup>		Σ			Gesamt
	ling	buc	ling	buc	ling	buc	M <sup>1</sup>	M <sup>2</sup>	M <sup>3</sup>	Σ
1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	6
2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	6
3	1	1	1	1	1	0	2	2	1	5
4	1	2	1	2	1	0	3	3	1	7
5	2	1	2	1	1	1	3	3	2	8
6	2	2	2	2	1	2	4	4	3	11
7	1	2	1	2	1	2	3	3	3	9
8	2	2	2	1	1	1	4	3	1	8
9	1	2	1	2	1	0	3	3	1	7
10	1	1	1	1	1	1	2	3	2	7

84 /10=8,4±1,7

1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	6
2	1	0	1	0	0	0	1	1	0	2
3	0	1	0	1	1	1	1	1	2	4
4	1	1	1	1	0	1	2	2	1	5
5	0	1	1	1	0	1	1	2	1	4
6	0	1	0	1	0	1	1	1	1	3
7	1	1	1	1	0	1	2	2	1	5
8	0	1	0	1	0	1	1	1	1	3
9	1	1	1	1	1	0	2	2	1	5
10	0	1	0	1	0	1	1	1	1	3

40 /10=4,0±1,2

1	1	2	1	1	1	1	3	2	2	7
2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	6
3	1	0	1	1	1	0	1	2	1	4
4	0	1	0	1	1	1	1	1	2	4
5	0	1	1	1	1	0	1	2	1	4
6	0	1	1	1	1	1	1	2	2	5
7	0	1	1	1	1	1	1	2	2	5
8	1	1	1	1	1	0	2	2	1	5
9	0	1	1	2	1	0	1	3	1	5
10	1	1	0	1	1	1	2	1	2	5

50 /10=5,0±0,9

1	2	2	1	2	1	0	4	3	1	8
2	1	0	1	0	0	1	1	1	1	3
3	1	1	0	1	0	1	2	1	1	4
4	1	0	1	0	0	0	1	1	0	2
5	1	0	1	0	0	0	1	1	0	2
6	1	0	1	0	0	0	1	1	0	2
7	0	1	1	0	1	1	1	1	2	4
8	0	1	1	1	0	1	1	2	1	4
9	1	0	1	1	0	1	1	2	1	4
10	1	1	0	0	1	0	2	0	1	3

36 /10=3,6±1,7

Der Vergleich der 4 Gruppen erwies in der einfachen Varianzanalyse deutliche Unterschiede F 8.88 P 0.000154. Im Tukey HSD Test waren die Gruppen

- 1 zu 2      P < .01
- 1 zu 3      P < .05
- und 1 zu 4      P < .01 signifikant unterschiedlich.

Die folgenden Bilder veranschaulichen beispielhaft die Plaqueausbildung bei den verschiedenen Versuchsgruppen (M<sup>1-3</sup> von lingual).



Abb. 10: Gruppe 1, Tier 6



Abb. 11: Gruppe 2, Tier 1

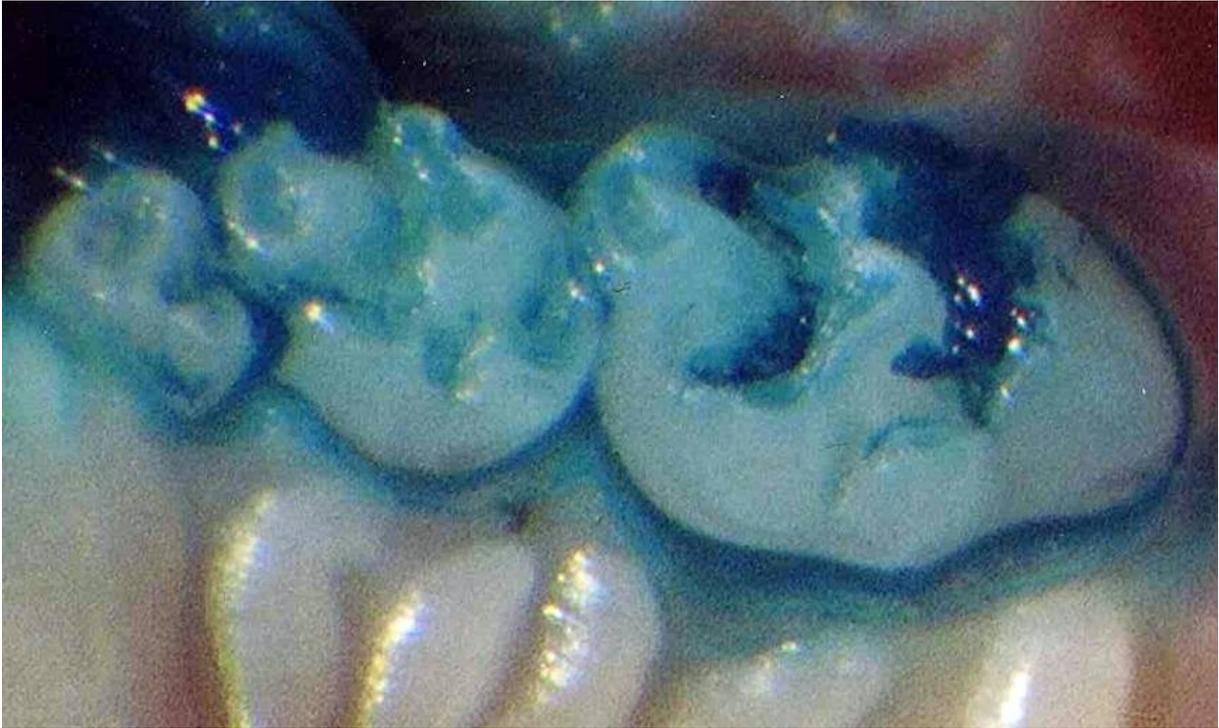


Abb. 12: Gruppe 3, Tier 2

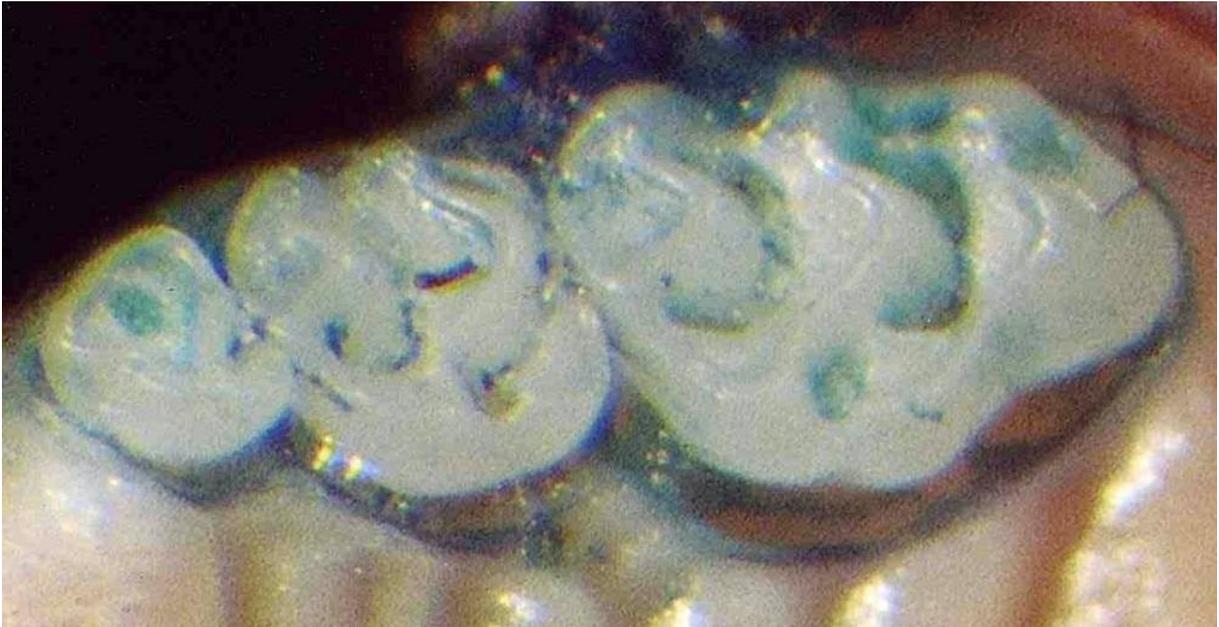


Abb. 13: Gruppe 4, Tier 1

## 4.2 Zahnhartsubstanzdefekte - Severity-Index

Die Untersuchung der linken Molaren des Oberkiefers ( $M^{1-3}$ ) und Unterkiefers ( $M_{1-3}$ ) nach der Methode von Radike und Muhler (1953) zur Berechnung eines Schweregrad- (Severity-) Index ergab die in der folgenden Tabelle (Tabelle 2) dargestellten Ergebnisse. Dabei sind die Beurteilung pro Zahn, pro Tier und Mittelwert und Standardabweichung pro Gruppe angegeben.

Es ist ersichtlich, dass bei Verabreichung von Leitungswasser (Gruppe 1 C/L) ein durchschnittlicher Severity-Index von  $3,3 \pm 1,4$  ermittelt wurde.

Tränke mit angesäuertem Wasser (Gruppe 2 C/AW) ergab einen durchschnittlichen Severity-Index von  $7,9 \pm 1,5$ .

Bei keimfreien mit Leitungswasser getränkten Tieren (Gruppe 3 GF/LW) wurde ein durchschnittlicher Severity-Index von  $2,3 \pm 1,0$  errechnet.

Verabreichung von angesäuertem Tränkwasser an keimfreie Tiere (Gruppe 4 GF/AW) ergab einen durchschnittlichen Severity-Index von  $6,9 \pm 1,3$ .

**Tab. 3: Severity Index nach Radike und Muhler (1953)**

**Gruppe 1  
C/LW**

Tiernr.	M <sup>1</sup>	M <sup>2</sup>	M <sup>3</sup>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	Σ
1	1	1	0	1	1	0	4
2	0	0	0	1	1	0	2
3	0	1	0	2	1	0	4
4	0	1	1	2	1	1	6
5	0	1	0	1	1	0	3
6	0	0	0	1	0	0	1
7	1	1	0	1	1	0	4
8	1	0	1	1	1	0	4
9	0	1	0	1	0	0	2
10	1	0	0	1	0	1	3

33 /10=3,3±1,4

**Gruppe 2  
C/AW**

Tiernr.	M <sup>1</sup>	M <sup>2</sup>	M <sup>3</sup>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	Σ
1	1	0	1	2	1	1	6
2	1	1	1	2	1	2	8
3	1	2	2	2	1	2	10
4	1	1	2	2	2	1	9
5	1	1	1	2	2	1	8
6	1	1	1	2	2	2	9
7	2	1	1	2	2	1	9
8	1	0	0	2	1	1	5
9	1	0	0	2	2	2	7
10	1	0	0	2	2	3	8

79 /10=7,9±1,5

**Gruppe 3  
GF/LW**

Tiernr.	M <sup>1</sup>	M <sup>2</sup>	M <sup>3</sup>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	Σ
1	0	0	0	1	0	0	1
2	0	0	0	1	0	1	2
3	0	0	0	0	0	1	1
4	0	0	0	1	1	0	2
5	0	1	1	1	0	1	4
6	0	0	1	1	0	0	2
7	0	0	1	1	1	1	4
8	0	0	1	0	1	1	3
9	0	1	0	0	1	0	2
10	0	0	1	0	0	1	2

23 /10=2,3±1,0

**Gruppe 4  
GF/AW**

Tiernr.	M <sup>1</sup>	M <sup>2</sup>	M <sup>3</sup>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	Σ
1	1	1	0	2	1	0	5
2	1	1	1	1	2	1	7
3	2	1	0	2	0	0	5
4	1	2	1	1	1	0	6
5	1	1	1	2	2	1	8
6	1	2	0	2	1	1	7
7	1	1	1	2	2	0	7
8	1	1	0	2	2	1	7
9	1	1	1	2	2	2	9
10	1	1	1	2	1	2	8

69 /10=6,9±1,3

Der Vergleich der 4 Gruppen in der einfachen Varianzanalyse zeigt deutliche Unterschiede (F41.55 P< .0001). Im Tukey HSD Test waren die Gruppen

1 zu 2

1 zu 4

2 zu 3 und

3 zu 4 signifikant (P < .01) unterschiedlich.

Die folgenden Bilder veranschaulichen beispielhaft Zahnhartsubstanzdefekte bei den verschiedenen Versuchsgruppen (M<sup>1-3</sup>, Kaufläche von lingual).

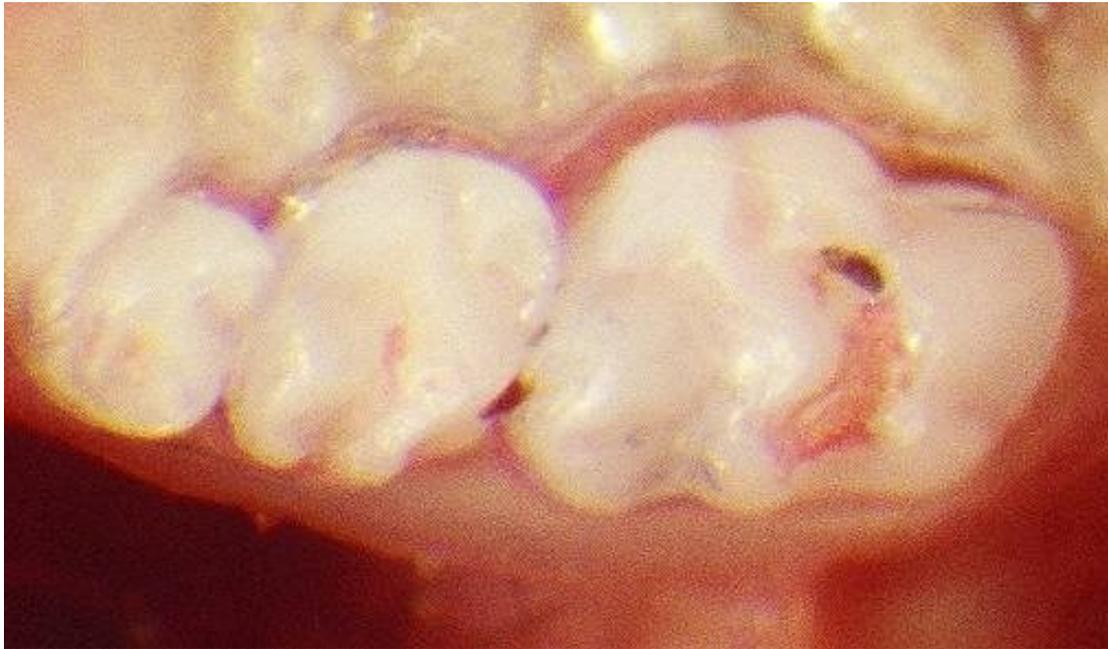


Abb. 14: Gruppe 1, Tier 4

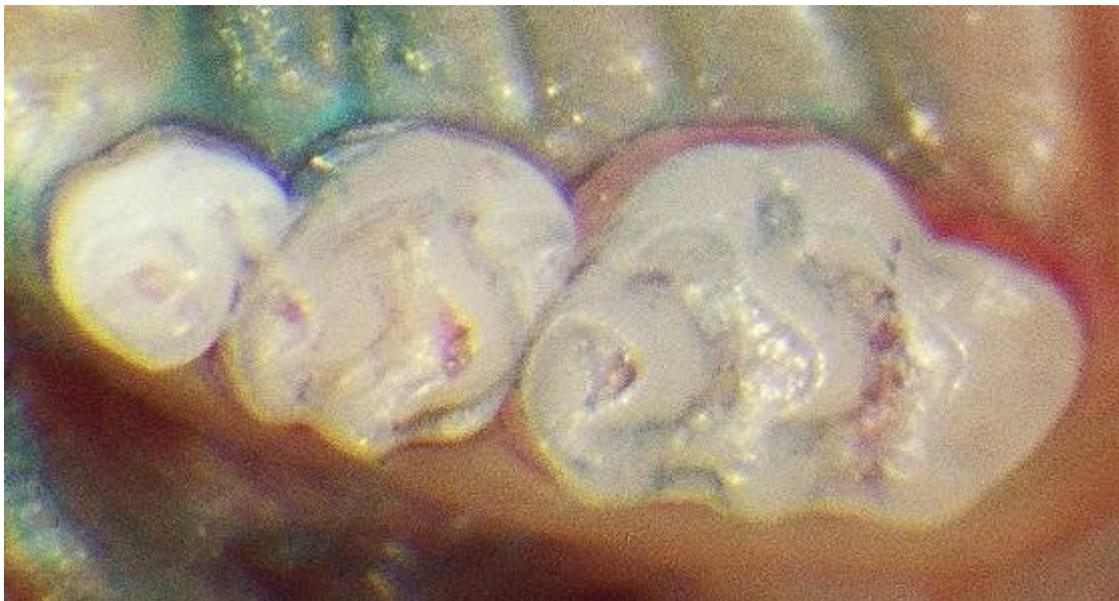


Abb. 15: Gruppe 2, Tier 3



Abb. 16: Gruppe 3, Tier 7



Abb. 17: Gruppe 4, Tier 5

### 4.3 Bestimmung von Erosionen und Abrieb

Die Vermessung der lingualen Seite der linken Molaren von Oberkiefer und Unterkiefer zur Bestimmung von freiliegendem Dentin und erodiertem Schmelz nach der Methode von Sorvari et al. (1988) ergab die in den folgenden Tabellen und Abbildungen dargestellten Ergebnisse.

In der Tabelle 3 sind die Mittelwerte für  $M^1$  und  $M_1$  für Gesamtfläche, die Fläche freiliegendes Dentin und die Fläche von erodiertem Schmelz dargestellt.

Setzt man die Gesamtfläche in Beziehung zur Gruppe 1 als Kontrollgruppe, lässt sich ein Schätzwert für den Abrieb bei den Gruppen 2 bis 4 ermitteln (Tabelle 4)

Die Abbildungen 18 und 19 sollen die Ergebnisse der Messungen an  $M^1$  und  $M_1$  veranschaulichen.

Es ist ersichtlich, dass die Aufnahme angesäuerten Tränkwassers den Anteil intakten Schmelzes reduziert (Gruppe 2 und 4).

**Tab. 4:**

**Erosion und Abrieb  
(Sorvari et al. 1988)**

Flächenangaben in mm<sup>2</sup>

	<b>M<sup>1</sup></b>	<b>M<sup>1</sup></b>	<b>M<sup>1</sup></b>	<b>M<sub>1</sub></b>	<b>M<sub>1</sub></b>	<b>M<sub>1</sub></b>
	Gesamtfläche mm <sup>2</sup>	Dentin	erodierter Schmelz	Gesamtfläche	Dentin	erodierter Schmelz
<b>Gr. 1 C/LW</b>	1,420	0,142	0,142	1,048	0,105	0,105
<b>Gr. 2 C/AW</b>	1,230	0,246	0,212	0,998	0,200	0,150
<b>Gr. 3 GF/LW</b>	1,365	0,140	0,146	1,005	0,100	0,100
<b>Gr. 4 GF/AW</b>	1,199	0,310	0,190	0,907	0,225	0,135

<b>M<sup>1</sup></b>	- linker Oberkiefer
<b>M<sub>1</sub></b>	- linker Unterkiefer

**Tab. 5: Abrieb in Prozent gegenüber Kontrollgruppe (Gruppe 1)**

	M <sub>1</sub> Unterkiefer	M <sup>1</sup> Oberkiefer
Gruppe 2	4,96	12,67
Gruppe 3	4,29	3,87
Gruppe 4	13,64	15,49

Abb. 18: Erosion und Abrieb ( $M_1$  Unterkiefer)

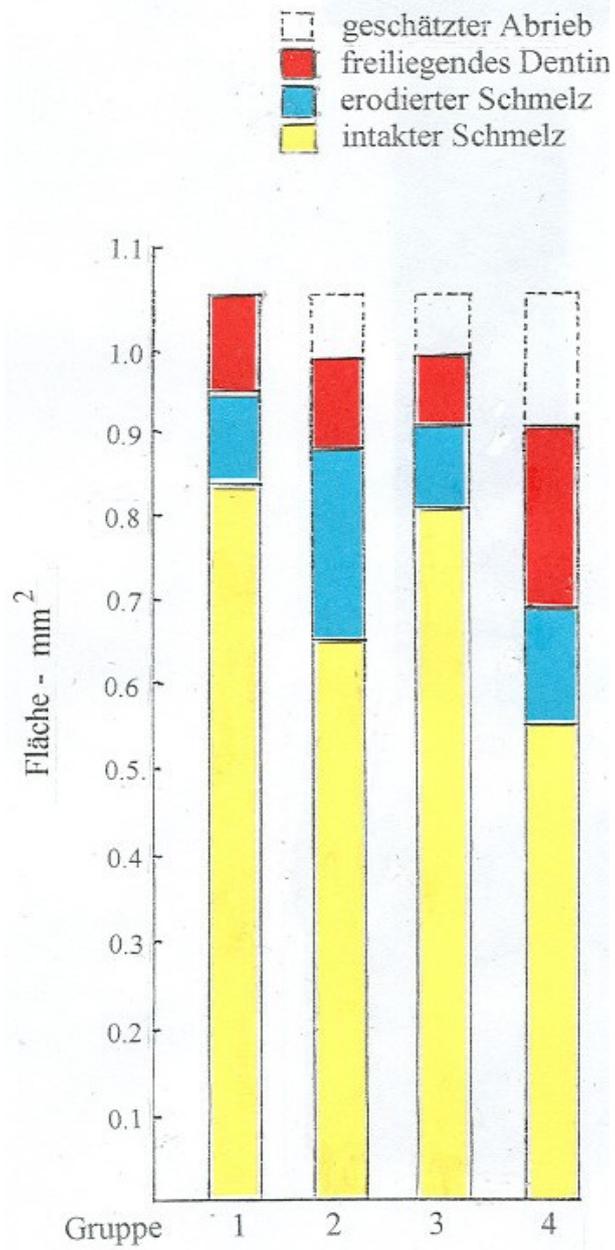
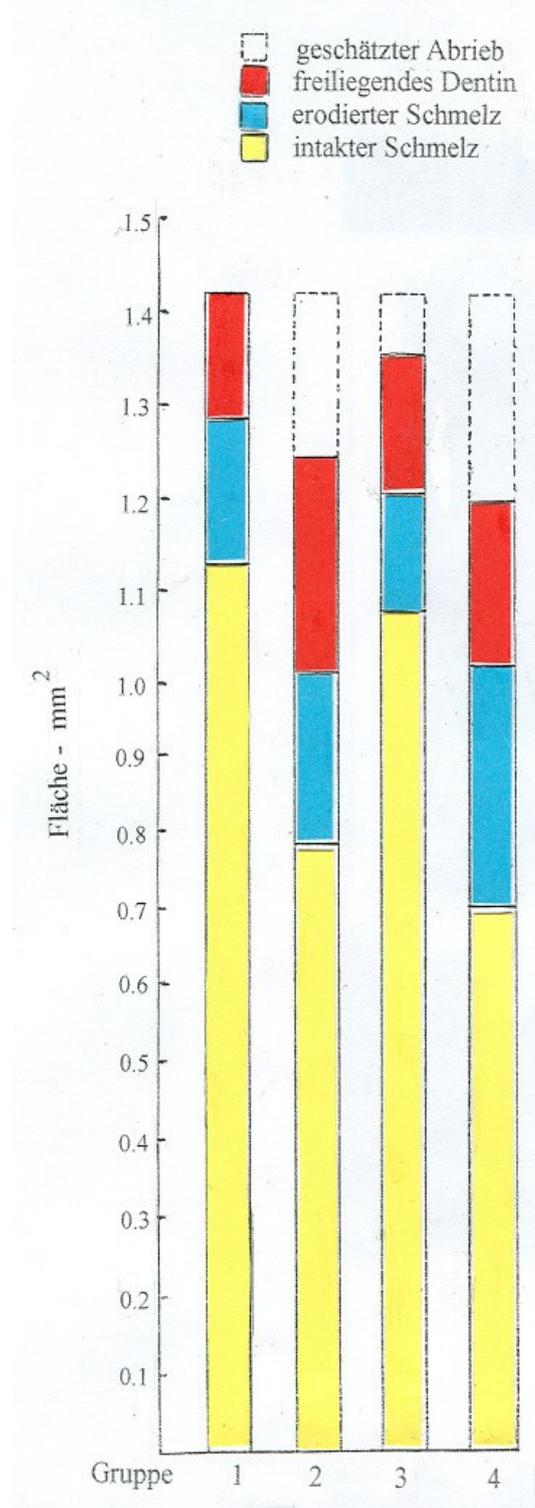


Abb. 19: Erosion und Abrieb (M<sup>1</sup> Oberkiefer)



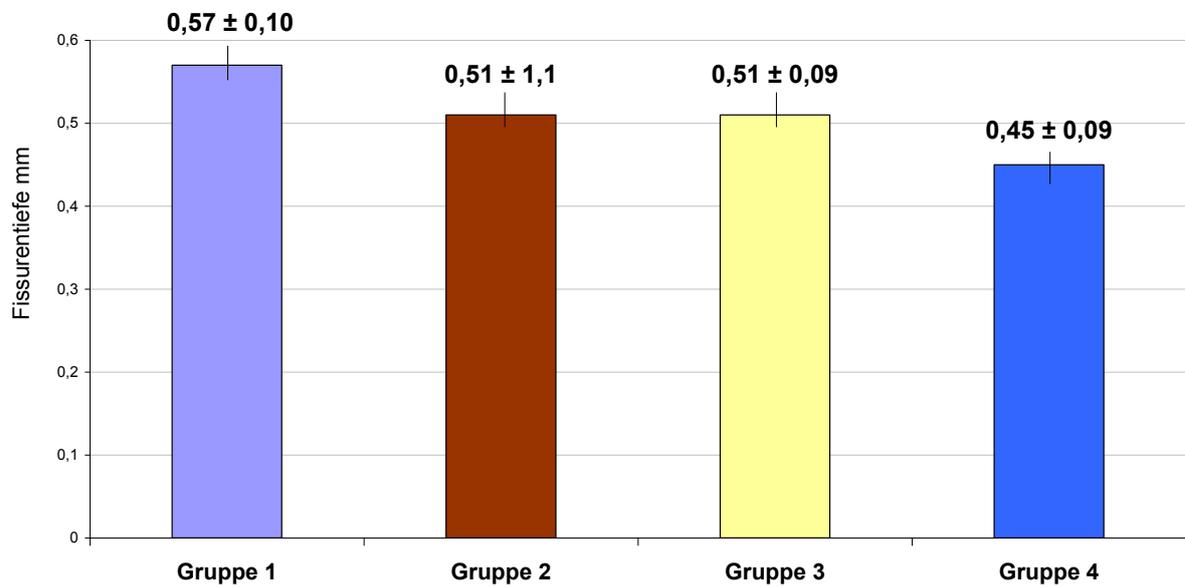
#### 4.4 Fissurentiefe

Die Ergebnisse der Messung der Tiefe der Fissuren der Molaren des linken Unterkiefers an Sagittal-Schnitten sind in Tabelle 6 als Mittelwerte pro Gruppe (in mm) dargestellt.

An  $M_1$  wurden 3 (1-3), an  $M_2$  2 (4 u. 5) und an  $M_3$  eine Fissur (6) vermessen.

Daraus und aus der Abbildung 20 ist ersichtlich, dass Verabreichung von angesäuertem Tränkwasser bei konventionellen und keimfreien Mäusen die Tiefe der Fissuren verringert, was auf erhöhten Abrieb schließen lässt.

**Abb. 20:** Fissurentiefe an den Molaren des linken Unterkiefers



**Tab. 6: Fissurentiefe der Molaren des linken Unterkiefers**  
Durchschnittswerte pro Fissur

Fissur Nr.	M <sub>1</sub>			M <sub>2</sub>		M <sub>3</sub>	Summe
	1	2	3	4	5	6	
<b>GR. 1</b>							
<b>C/LW</b>	0,55	0,70	0,52	0,66	0,62	0,40	0,57±0,1
<b>GR. 2</b>							
<b>C/AW</b>	0,49	0,66	0,50	0,60	0,50	0,32	0,51±1,1
<b>GR. 3</b>							
<b>GF/LW</b>	0,52	0,65	0,49	0,59	0,54	0,38	0,52±0,09
<b>Gr. 4</b>							
<b>GF/AW</b>	0,47	0,59	0,38	0,50	0,48	0,32	0,45±0,09

Der Gruppenvergleich im Friedman-Test zeigt mit Chi-Quadrat 15-35 und P=0.0015 einen deutlichen Unterschied.

Die folgenden Bilder veranschaulichen beispielhaft Abrieb und Abnahme der Fissurentiefe bei Verabreichung von angesäuertem Tränkwasser ( $M_1$  Fissur 1-3) Aufnahmen von Schnitten (Durchlicht)



Abb. 21: Gruppe 1 (Tier 2) ausgeprägte weitgehend intakte Fissuren an  $M_1$

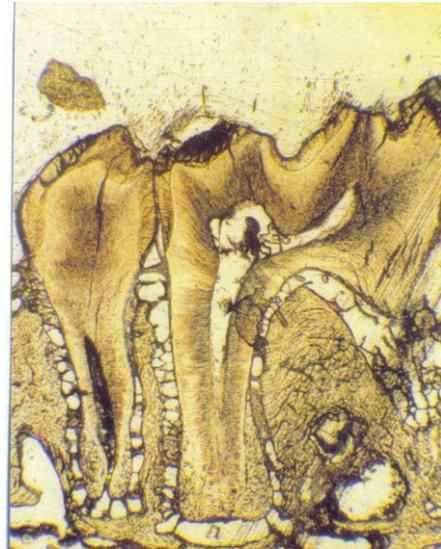
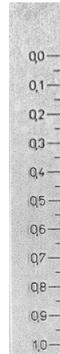


Abb. 22: Gruppe 2 (Tier 6) deutlicher Abrieb und Abnahme der Fissurentiefe

Die folgenden Aufnahmen von Schliffen dienen zur Veranschaulichung unterschiedlichen Abriebs (Auflicht)

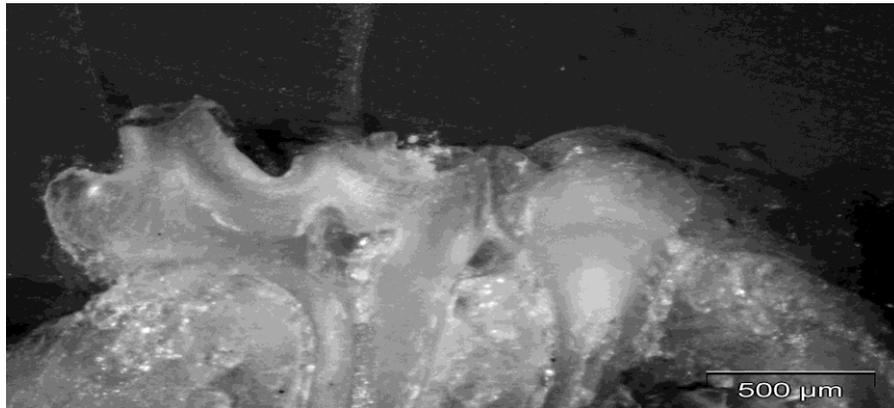


Abb. 23: Gruppe 1 Tier 3

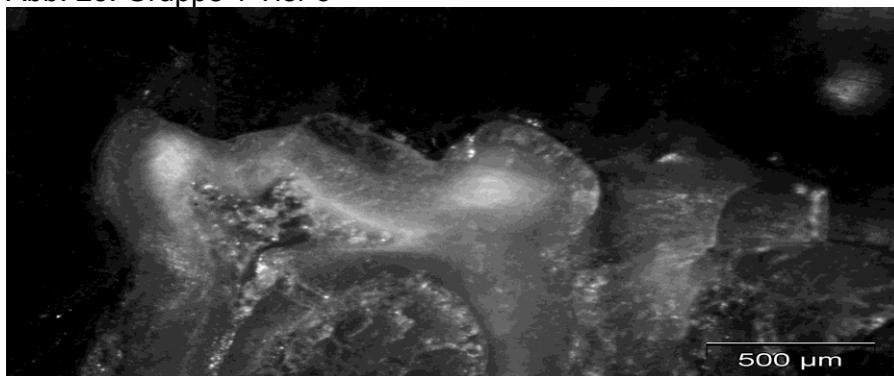


Abb. 24: Gruppe 2 Tier 5



Abb. 25: Gruppe 3 Tier 4

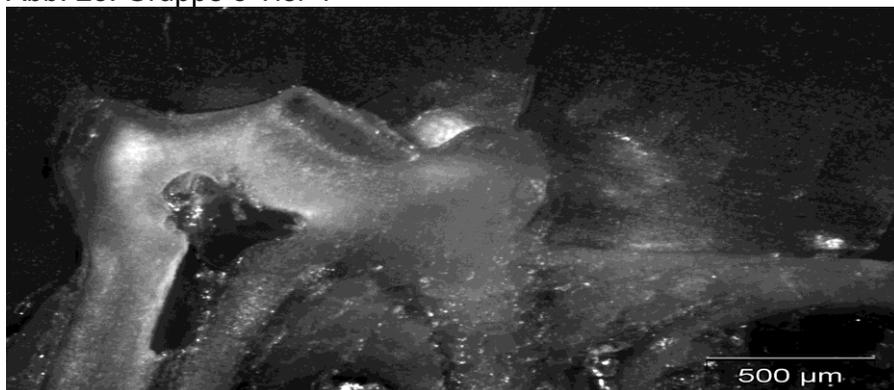


Abb. 26: Gruppe 4 Tier 8

#### 4.5 Raster-Elektronenmikroskopie

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden von den rechten Unterkiefern erstellt. Dabei wurde die Molarenreihe von lingual, die distale Höckerfläche von M<sub>1</sub> sowie die Gruben an der Höckerspitze aufgenommen. Der Schneidezahn wurde von lingual und labial aufgenommen.

Eine Übersicht der Befunde zeigt die folgende Tabelle.

**Tab. 7: Zahnhartsubstanzdefekte an Molaren und Incisivi des rechten Unterkiefers**

Gruppe	Tier-Nr.	Molaren		Incisivi
		Schmelz distale Höckerfläche	Dentin Grubenfläche	Schneidefläche lingual
1	1	G	Ds	A
	2	G	Ds	A
	7	G		A
2	2	G S-	Ds Df	A+ Dm
	5	G S-	Ds Df	A+ Dm
	8	G	Ds	A Dm
3	2	G	Ds	A
	6	G		A
	9	G	Ds	A+ Dm
4	2	G	Ds Df	A+ Dm
	6	G S-	Ds Df	A+ Dm
	9	G S-	Ds Df	A+ Dm

- G = Gebrauchsspuren
- S- = fehlender Schmelz
- Ds = Dentinkanäle sichtbar
- Df = Dentinkanäle freiliegend
- A = Abrieb
- A+ = starker Abrieb
- Dm = Demineralisierung

#### **4.5.1 Befunde an den Molaren**

Die Raster-elektronenmikroskopische Untersuchung der Molaren des rechten Unterkiefers ergab bei den mit angesäuertem Wasser getränkten Tieren (Gruppe 2 und 4) deutliche Unterschiede zu Tieren, die mit Leitungswasser getränkt wurden (Gruppe 1 und 3).

An den Molaren der Gruppe 2 und 4 fällt eine Abflachung der Kronenränder sowie eine deutlich sichtbare Schmelz-Dentin Grenze auf, die bis zur Spaltbildung geht. An den palatinalen Höckerflächen besonders des ersten und zweiten Molaren sind deutliche Ätzspuren am Schmelz sichtbar.

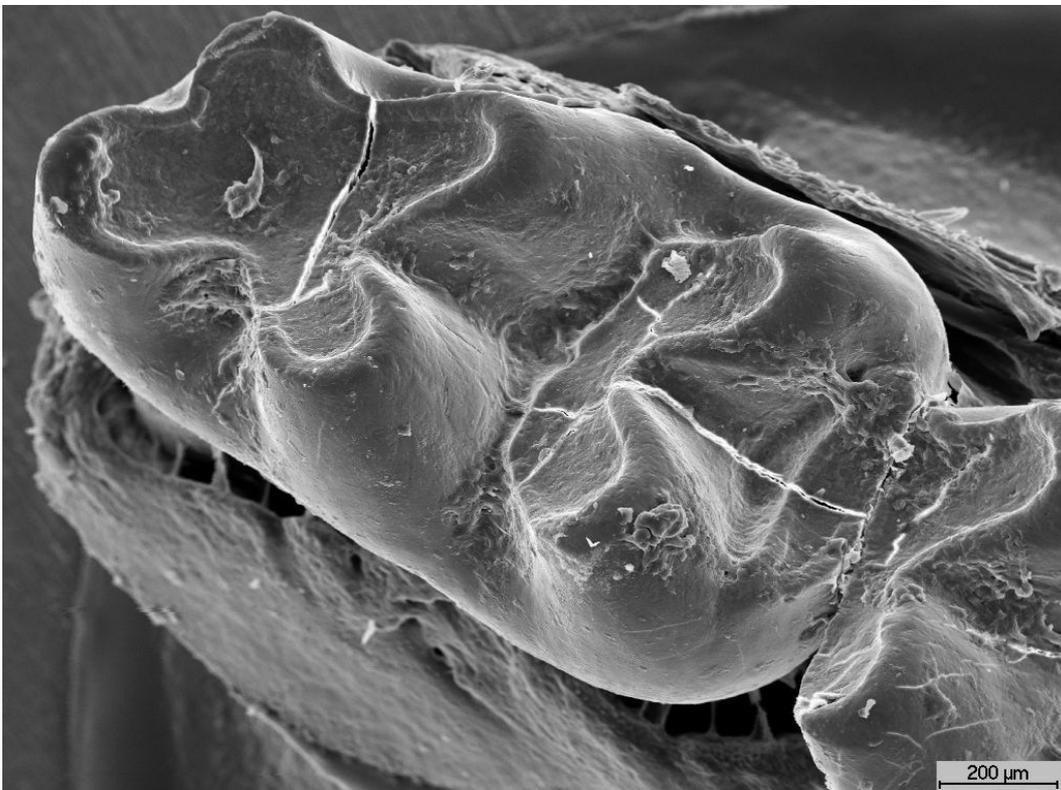
Aus einer glatten Schmelzoberfläche wird eine raue Oberfläche mit Prismenkopfstruktur. Die Schäden am Dentin sind nicht so deutlich ausgeprägt. Die Oberfläche ist aufgeraut und Dentinkanäle sind sichtbar bzw. eröffnet.

Auf den folgenden Seiten sind die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Molaren eines Tieres je Gruppe wiedergegeben. Auf den oberen Fotos ist die gesamte Molarenreihe und auf den unteren jeweils der erste Molar abgebildet. Danach folgen Abbildungen als Beispiel zu den Schmelzschäden (Abb. 35 und 36) und Schäden am Dentin (Abb. 37 bis 40).



	Probe: Kontrollgruppe / 1	Vergrößerung : 35
	Bild : 044403	Hochspannung/kV: 20,0
	Datum: 25.11.04 12:40:47	Format: 1024 x 768

Abb. 27: Molarreihe des rechten Unterkiefers **Gruppe 1** Tier 1



	Probe: Kontrollgruppe / 1	Vergrößerung : 70
	Bild : 044404	Hochspannung/kV: 20,0
	Datum: 25.11.04 12:45:19	Format: 1024 x 768

Abb. 28: M<sub>1</sub> des rechten Unterkiefers **Gruppe 1** Tier 1

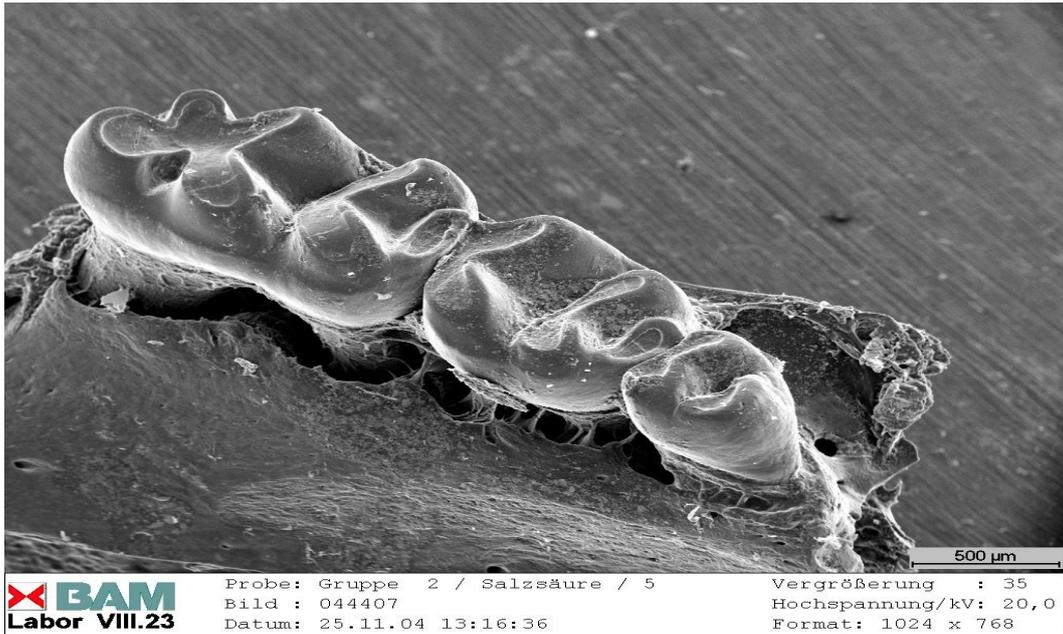


Abb. 29: Molarreihe des rechten Unterkiefers Gruppe 2 Tier 5

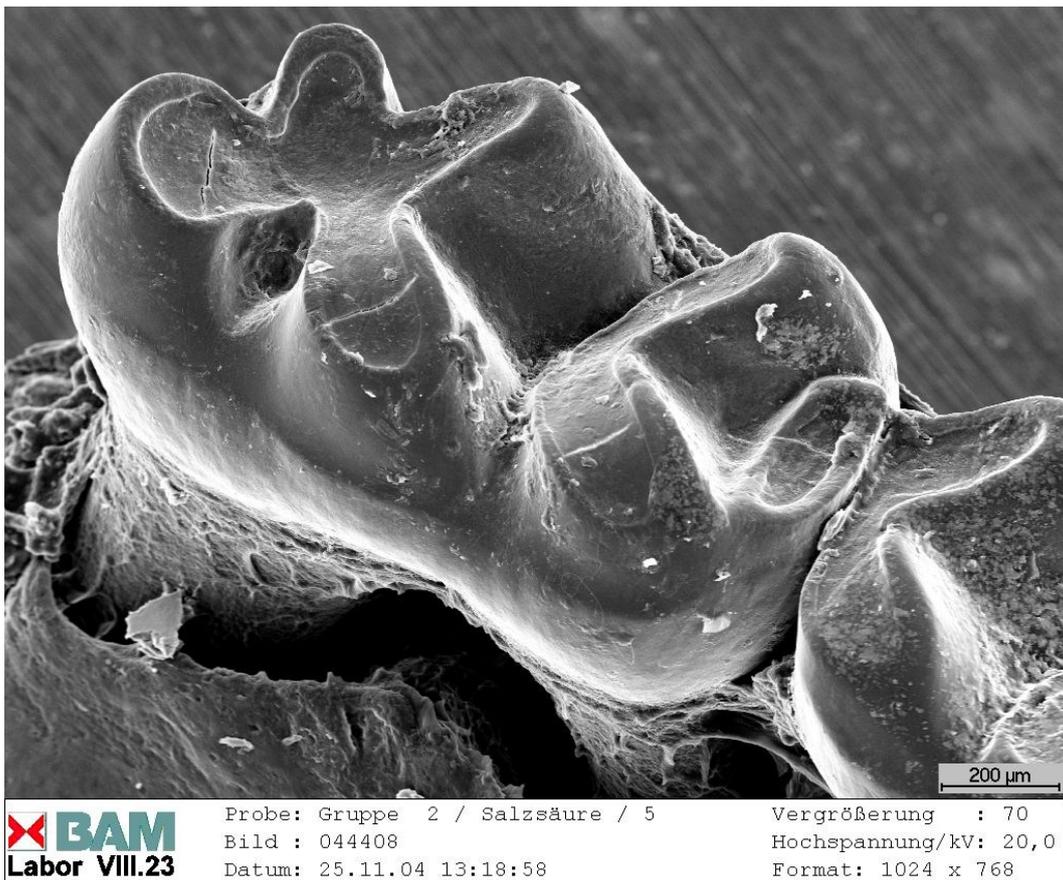


Abb. 30: M<sub>1</sub> des rechten Unterkiefers Gruppe 2 Tier 5

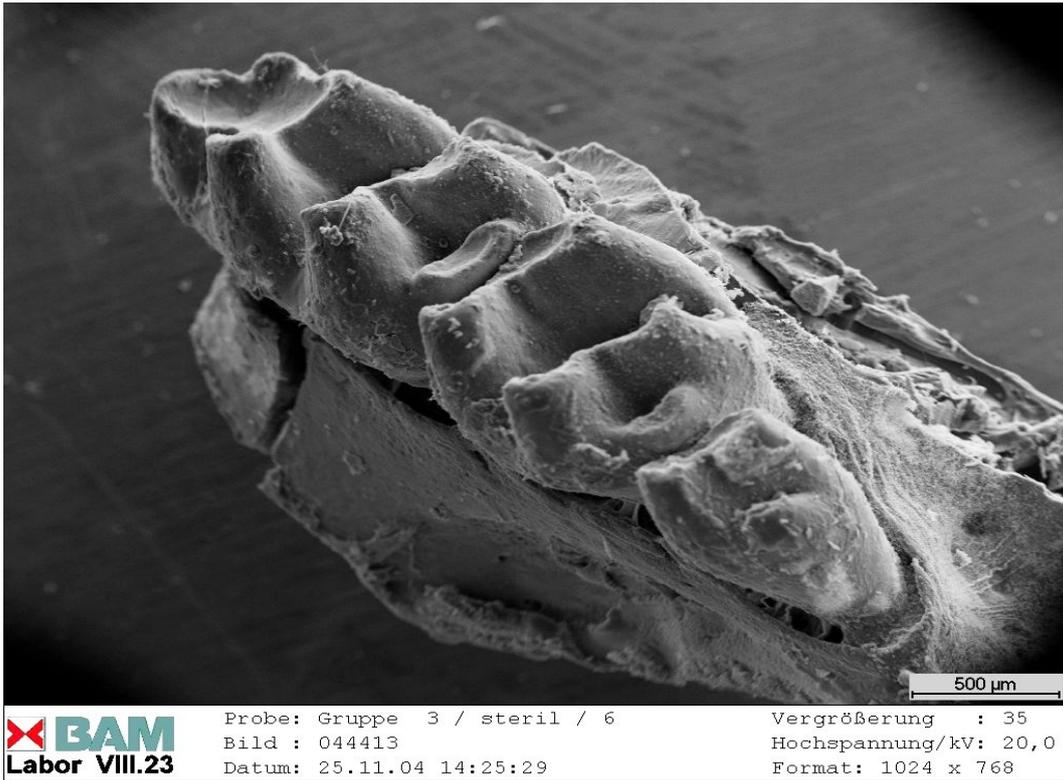


Abb. 31: Molarreihe des rechten Unterkiefers Gruppe 3 Tier 6

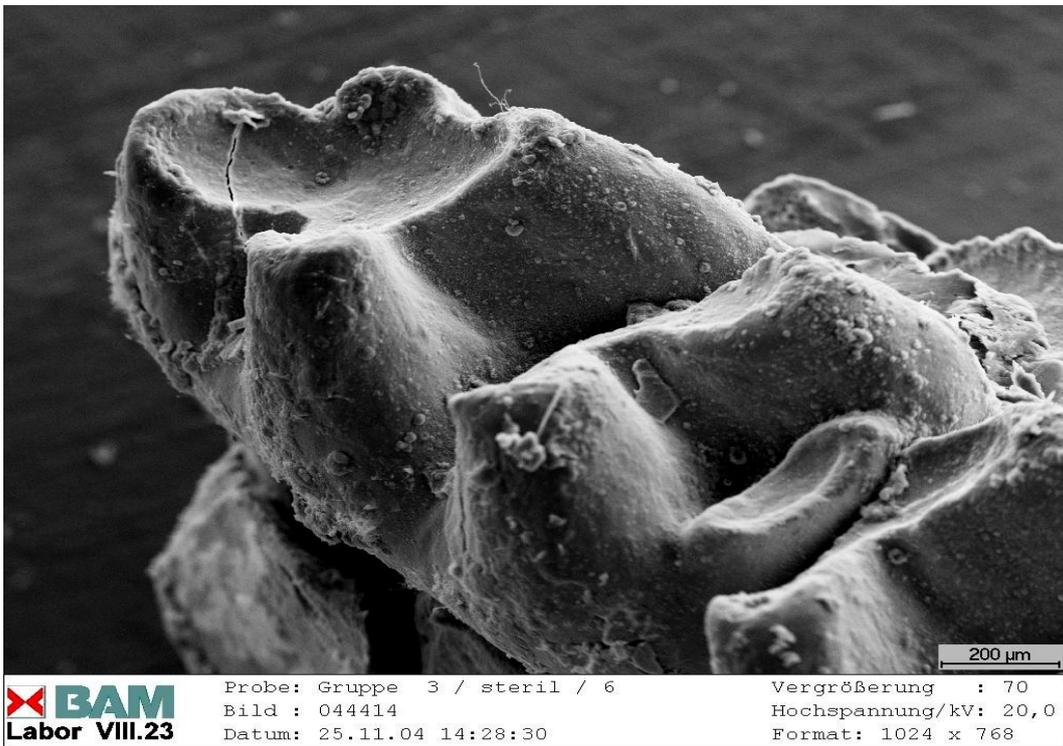


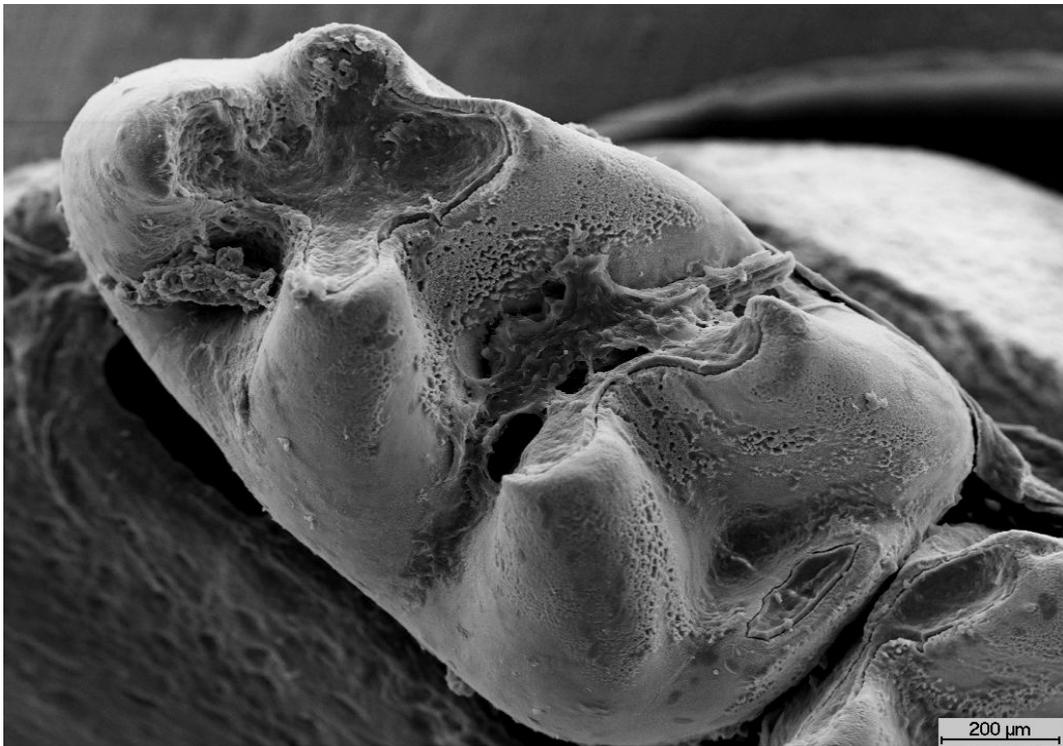
Abb. 32: M<sub>1</sub> des rechten Unterkiefers Gruppe 3 Tier 6



**BAM**  
Labor VIII.23

Probe: Gruppe 4 / steril +Salzsäure / 2 Vergrößerung : 35  
 Bild : 044415 Hochspannung/kV: 20,0  
 Datum: 25.11.04 14:48:30 Format: 1024 x 768

Abb. 33: Molarreihe des rechten Unterkiefers **Gruppe 4 Tier 2**



**BAM**  
Labor VIII.23

Probe: Gruppe 4 / steril +Salzsäure / 2 Vergrößerung : 70  
 Bild : 044416 Hochspannung/kV: 20,0  
 Datum: 25.11.04 14:51:04 Format: 1024 x 768

Abb. 34: M<sub>1</sub> des rechten Unterkiefers **Gruppe 4 Tier 2**

## Schäden am Schmelz

Die folgenden Abbildungen von Schmelz der distalen Höckerfläche veranschaulichen beobachtete Schädigungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Gruppe 1).

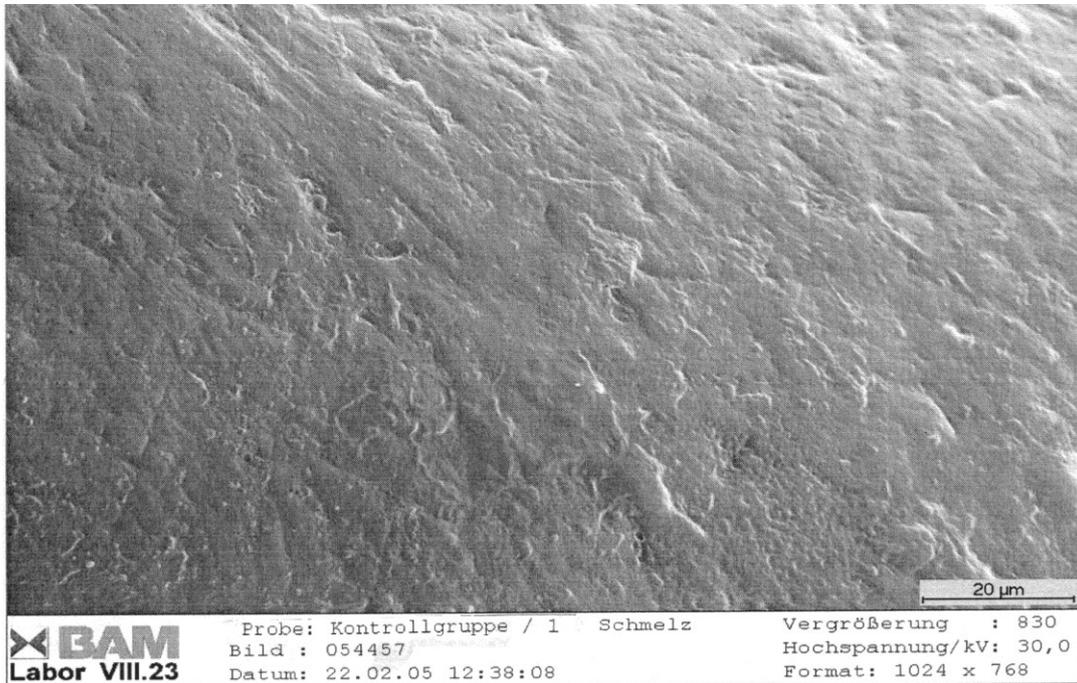


Abb. 35: Gruppe 1 Tier 1

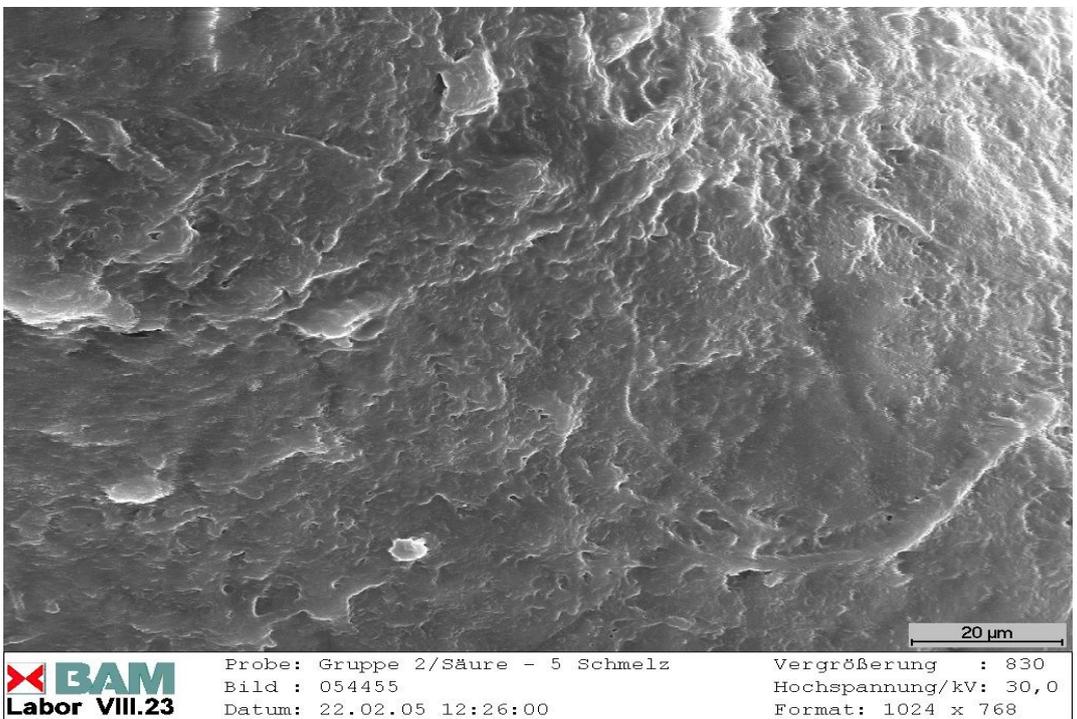


Abb. 36: Gruppe 2 Tier 5

## Schäden am Dentin

Die folgenden Abbildungen veranschaulichen Schäden am Dentin in der Grubenfläche im Vergleich zur Kontrollgruppe (Gruppe 1).

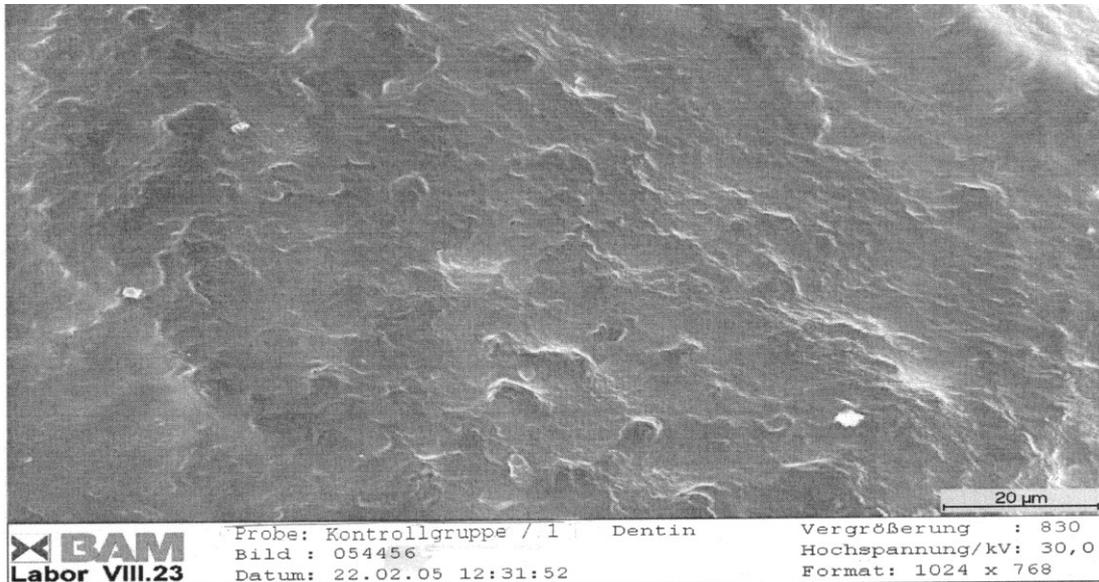


Abb. 37: Gruppe 1 Tier 1

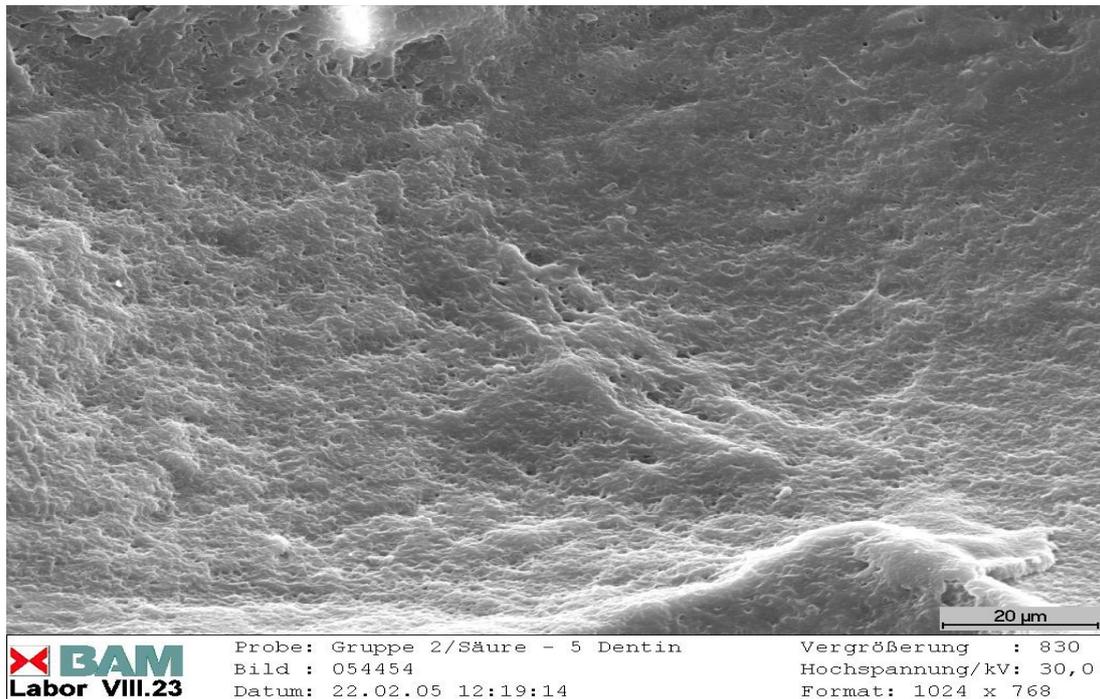


Abb. 38: Gruppe 2 Tier 5 (Dentinkanäle freiliegend)

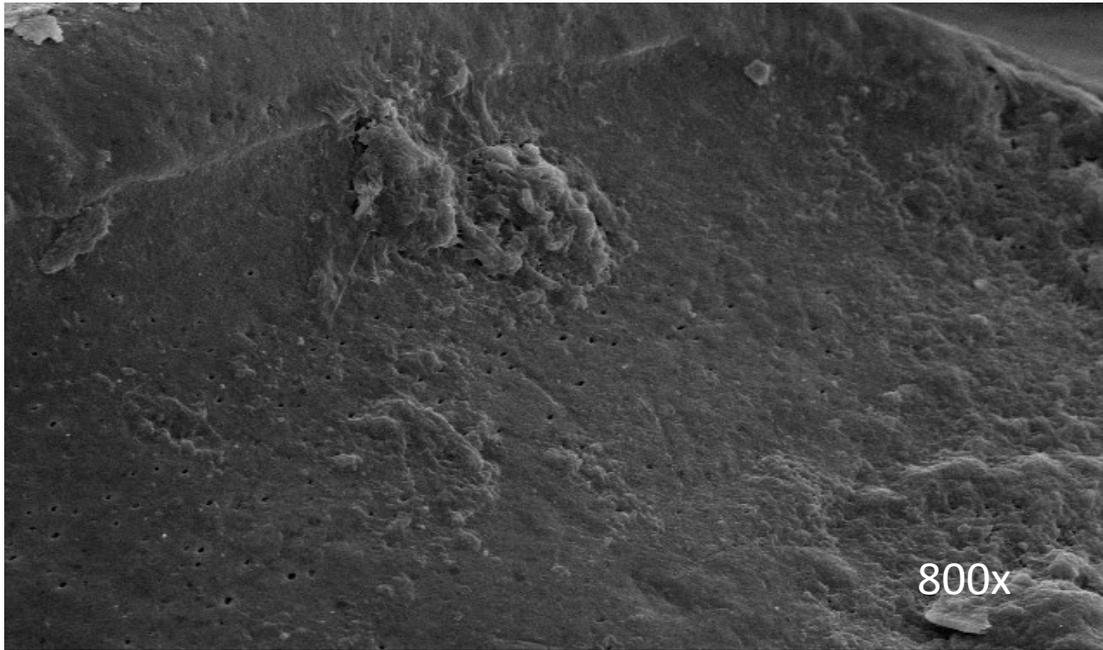


Abb. 39: **Gruppe 3** Tier 6 (Dentinkanäle sichtbar)

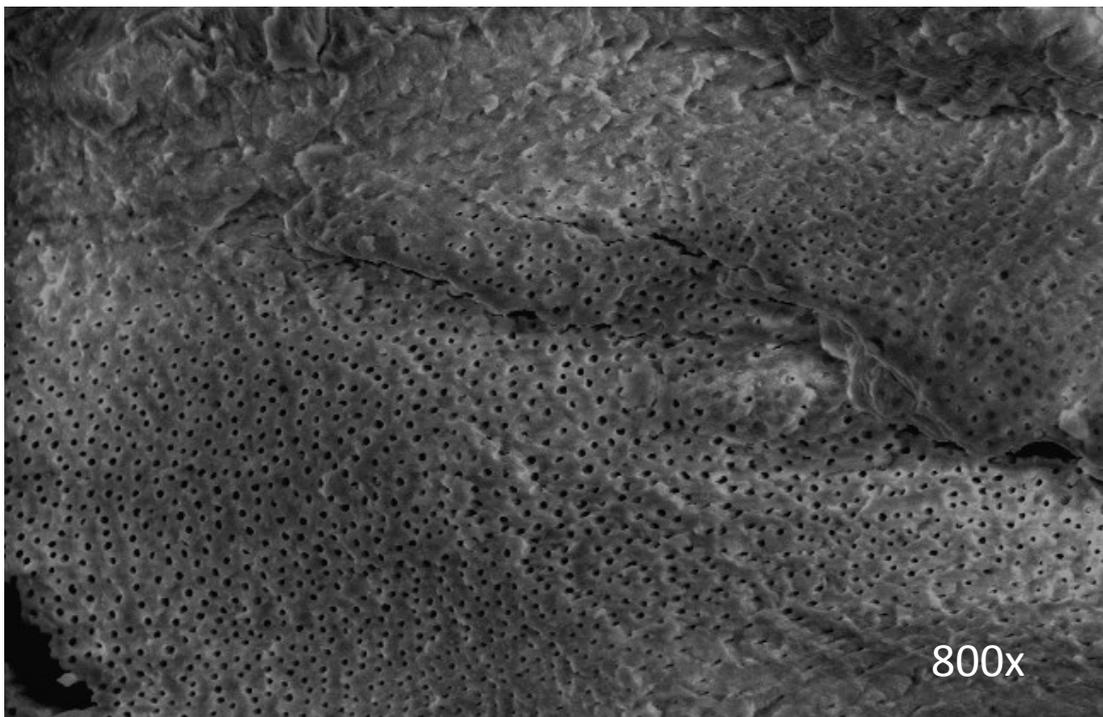


Abb. 40: **Gruppe 4** Tier 2 (Dentinkanäle überwiegend eröffnet)

#### **4.5.1 Befunde an den Incisivi**

An den Schneidezähnen wurden bei Verabreichung von Leitungswasser (Gruppe 1 und 3) in der breiten lingualen Schmelzschicht (Schneidefläche) Prismenzylinder sichtbar.

Bei der Verabreichung von angesäuertem Tränkwasser (Gruppe 2 und 4) wurden darüber hinaus flächig freiliegende Prismenzylinder sichtbar, die deutliche Demineralisation (Ätzung) zeigten.

Das lingual angrenzende Dentin sowie die bukkale und labiale Schmelzschicht zeigten bei Verabreichung von angesäuertem Tränkwasser (Gruppe 2 und 4) nur geringgradige Veränderungen.

Die folgenden Seiten zeigen die Aufnahmen der Incisivi.

Weil die beobachteten Schäden durch angesäuertes Tränkwasser bei konventionellen und keimfreien Tieren nahezu identische Auswirkungen hatten, sind beispielhaft Abbildungen von Gruppe 1 und 2 wiedergegeben.

Abb. 41: Schneidefläche des rechten Unterkieferschneidezahns Gruppe 1 Tier1  
A: 500x; B:1.50 KX; C: 5.00 KX

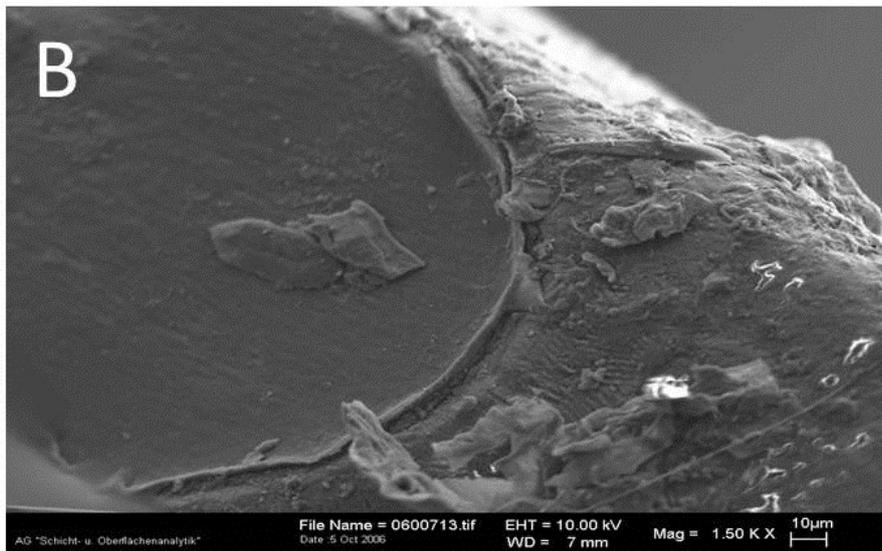
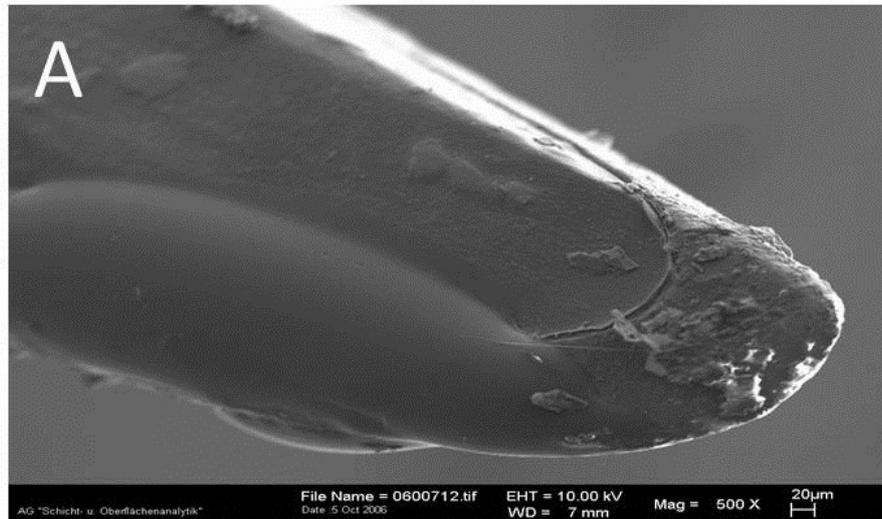
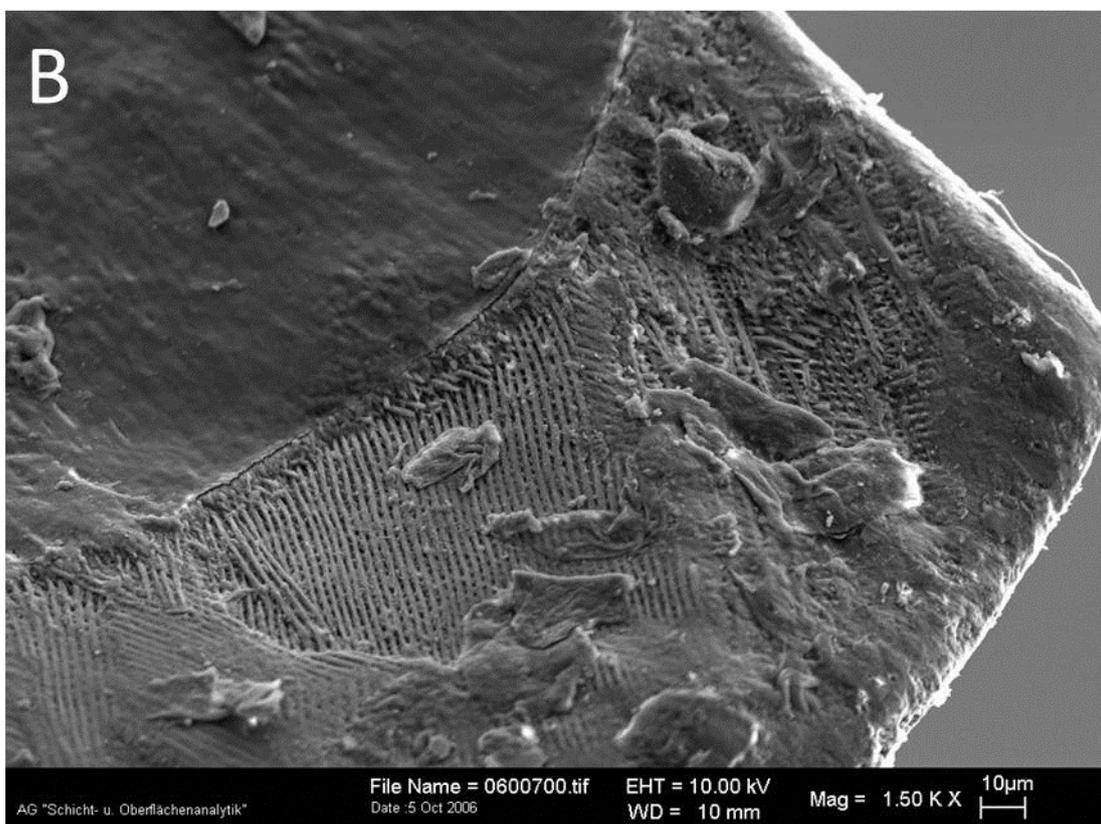
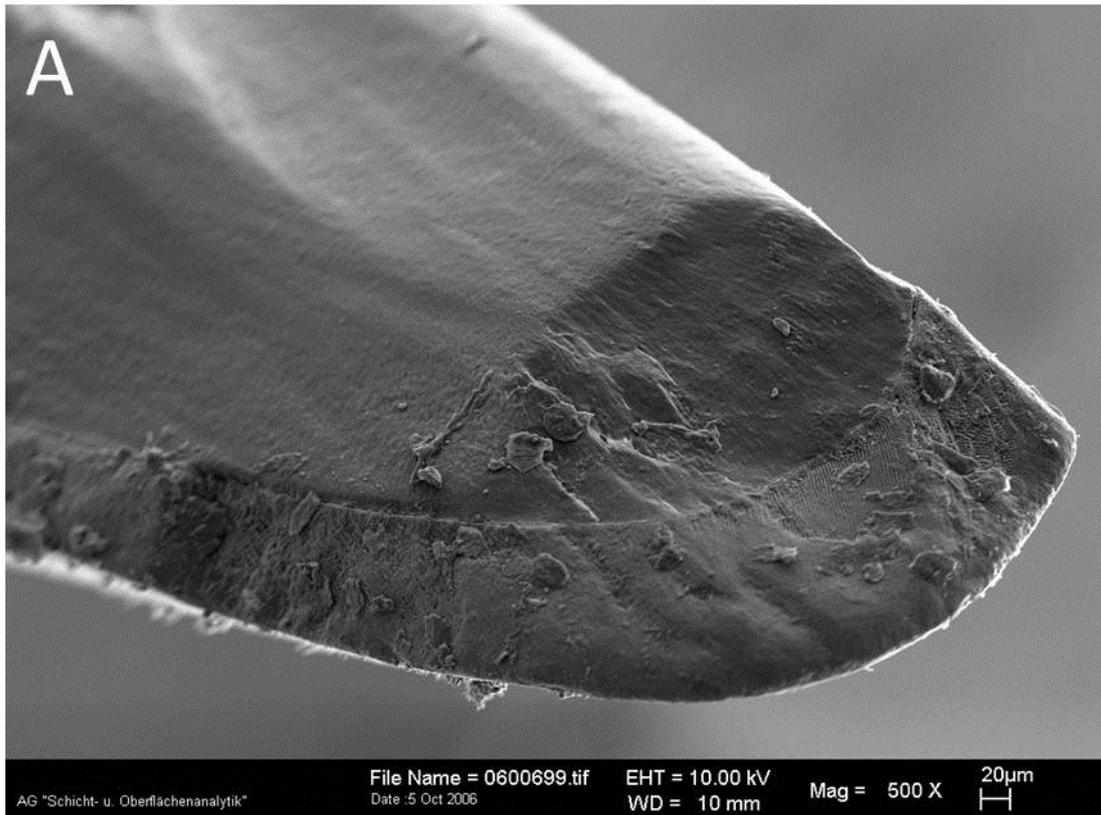


Abb. 42: Schneidefläche des rechten Unterkieferschneidezahns Gruppe 2 Tier 5  
A: 500x; B: 1.50 KX; C: 5.00 KX; D: 20.00KX



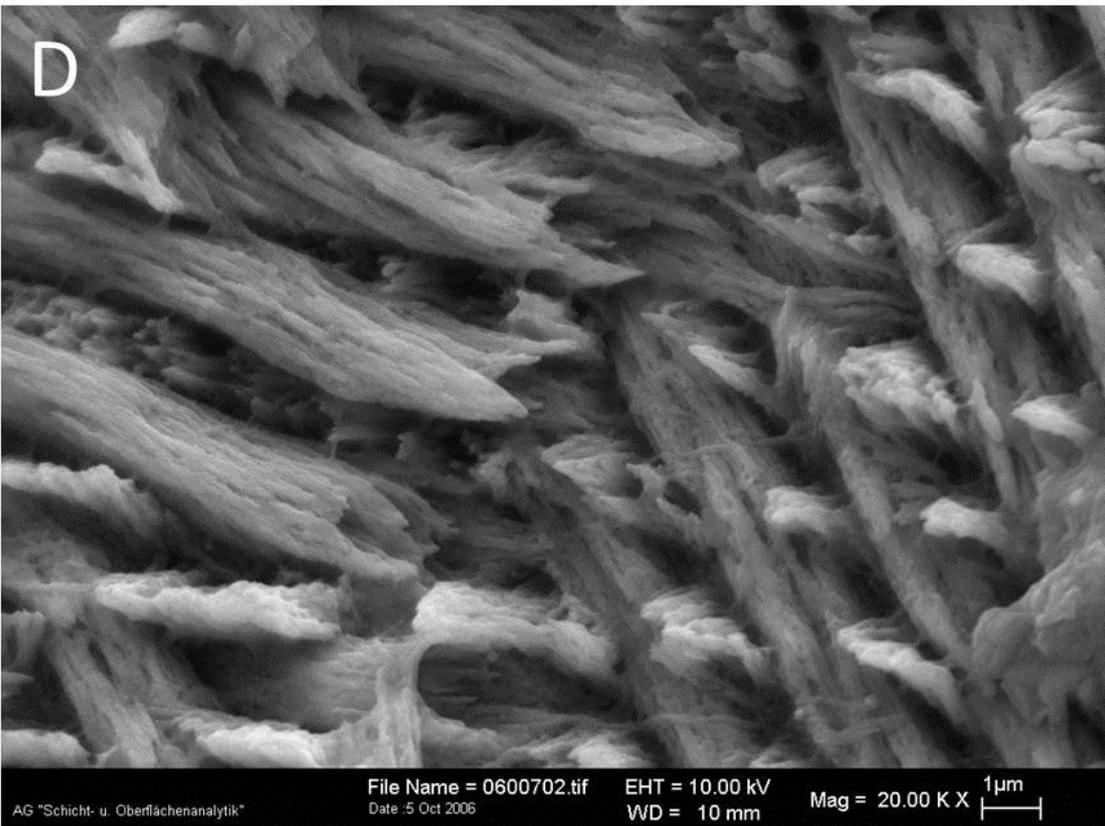
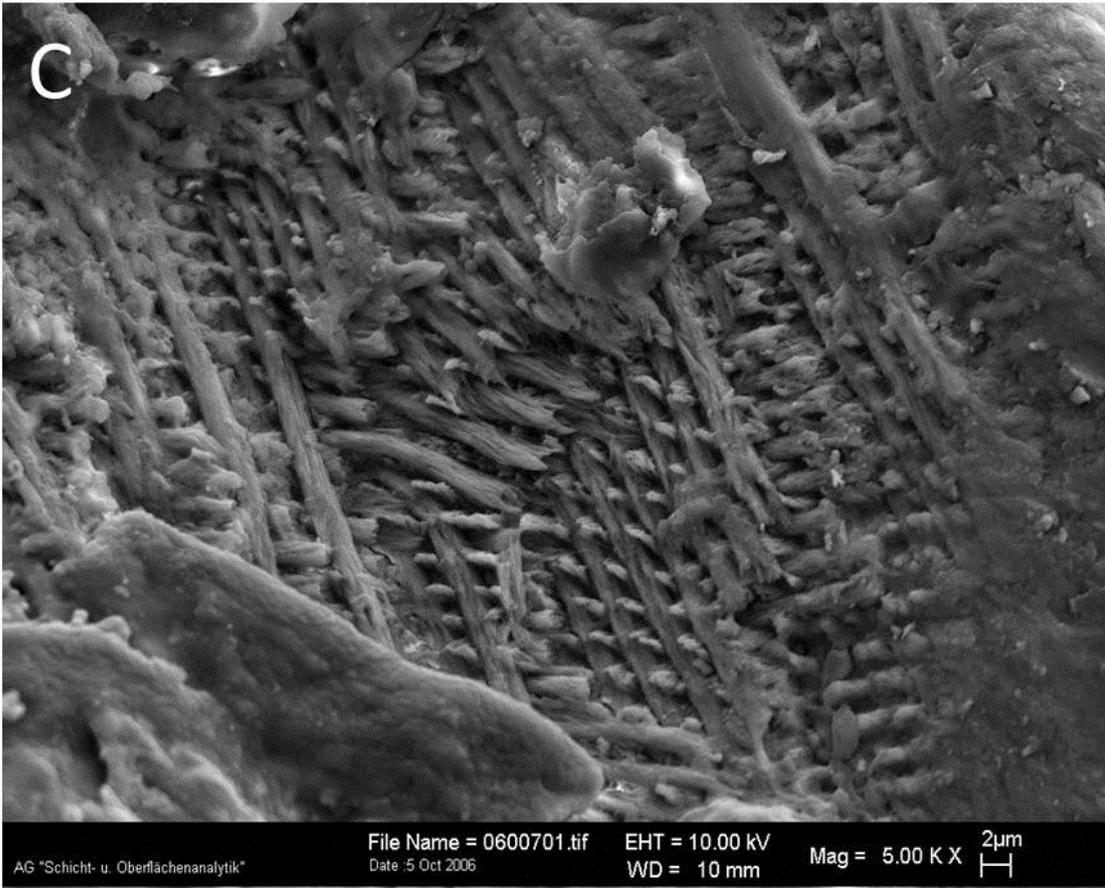




Abb. 43: rechter Unterkieferschneidezahn labiale Fläche Gruppe 1 Tier 1



Abb. 44: rechter Unterkieferschneidezahn labiale Fläche Gruppe 2 Tier 5

## 5. DISKUSSION

Der Grund für die Übertragung des Themas dieser Arbeit waren die bisher vorliegenden widersprüchlichen Befunde zur Schädigung von angesäuertem Tränkwasser auf die Zähne von kleinen Versuchstieren. Angesäuertes Tränkwasser wird seit Jahren als eine hygienische Maßnahme in Zucht, Haltung und während der Experimente bei Mäusen und Ratten eingesetzt. Zahnschäden durch Säure wurden bisher *in vitro* und *in vivo* von einer Reihe von Untersuchern festgestellt (Rosebury (1938), McClure (1943), Bieri et al. (1946), Muller und Gortner (1949), König et al. (1961), Sharawy et al. (1967), Karle et al. (1980)).

Keine Schädigung der Zähne durch angesäuertes Tränkwasser stellten u.a. Tolo und Erichsen (1969) und Ladeburg und Juhr (1983/84) fest.

Im Hinblick auf zu wählende Untersuchungsparameter erschien eine Orientierung an vorliegenden Untersuchungen sinnvoll. So wurden bewährte Methoden – die auch in neueren Untersuchungen (Seemann 2005) Anwendung fanden – übernommen.

1. Bestimmung von Zahnbelag durch Brillantgrün-Färbung (Karle et al. 1980)
2. Auffindung von Zahnhartsubstanzdefekten durch Färbung mit Schiff's Reagenz zur Sichtbarmachung entkalkter Zahnhartsubstanz (König 1965) als Grundlage für die Berechnung eines Severity-Indexes nach Radicke und Muhler (1953) und zur
3. Bestimmung von Erosionen und Abrieb nach Sorvari et al. (1988).
4. Messung der Fissurentiefe nach Karle et al. (1980)
5. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung auf Ätزشäden entsprechend Noack (1989) und Meurman et al. (1991).

### Zu 1: Zahnbelag

Zahnbelag wurde in allen Untersuchungsgruppen festgestellt. Dieser war in Gruppe 1 am stärksten ausgeprägt (Index 8,4). Tränke mit angesäuertem Wasser (Gruppe 2) reduzierte die Plaquebildung (Index 4,0). Bei keimfreien Tieren der Leitungswassergruppe (Gruppe 3) wurde ein Index von 5,0, bei Verwendung angesäuerten Wassers (Gruppe 4) von 3,6 ermittelt.

Bei Betrachtung der Abbildungen fällt auf, dass Zahnbelag vor allem in den Fissuren und an der Zahn-Gingiva-Grenze zu beobachten ist.

Der reduzierte Befall mit bakterieller Plaque in Gruppe 2 gegenüber Gruppe 1 könnte auf die antibakterielle Wirkung des angesäuerten Tränkwassers zurückzuführen sein.

Der Befund von Zahnbelag bei keimfreien Mäusen bestätigt die Beobachtung von Kato et al. (1977) und Yanagawa (1979), die auch bei keimfreien Mäusen Zahnbelag in geringgradiger Ausbildung beobachteten.

Diese Befunde stellen die bisherige Definition von Plaque – durch Bakterien bewirkter Belag von Zähnen - in Frage. Berücksichtigt man die Tatsache, dass Plaque in den Fissuren der Nagetierzähne sekundärer Natur sind – durch die Ernährung (Nahrungsinhaltsstoffe) erworben – Jurkschat und Schuster (1979), ist

das Vorkommen auch bei keimfreien Mäusen zu erwarten gewesen. Unterstützt wird diese Überlegung dadurch, dass der Zahnbelagsbefall zwischen den Gruppen 3, 4 (keimfrei) und 2 (konventionell, angesäuert) keinen statistisch signifikanten Unterschied aufwies.

#### Zu 2: Zahnhartsubstanzdefekte

Für den Verlust von Zahnhartsubstanz durch Säuren ohne Beteiligung von Bakterien wird der Begriff Erosion verwendet (Eccles (1979), DeSanctis (2001)). Derartige Schäden sollten durch die Bestimmung eines Severity-Indexes, durch Vermessung der Zahnoberfläche sowie der Fissurentiefe ermittelt werden.

Nach König (1965) bleiben bei Behandlung mit Schiff's Reagenz gesunder Schmelz und gesundes Dentin ungefärbt, während sich entkalkter Schmelz und entkalktes Dentin rot färben. Der Severity-Index oder Schädigungsindex als ein Mittel zur Bestimmung der Zahnhartsubstanzdefekte ergab bei den konventionellen Tieren mit Leitungswassertränke (Gruppe 1) einen Index von 3,9. Im Vergleich dazu lag der Index bei konventionellen Tieren mit angesäuertem Wasser als Tränke (Gruppe 2) bei 7,9, wies also auf deutliche Zahnhartsubstanzdefekte hin. Eine Indexerhöhung wurde auch bei keimfreien Tieren beobachtet, von Index 2,3 bei Leitungswassertränke (Gruppe 3) auf 6,9 bei Tränke mit angesäuertem Wasser (Gruppe 4).

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob ein Unterschied in der erosiven Schädigung zwischen konventionellen und keimfreien Tieren zu erwarten gewesen wäre. Bakterielle Beläge auf den Zähnen stellen eine Diffusionsbarriere dar und können somit die darunter befindliche Zahnhartsubstanz vor einem erosiven Angriff bis zu einem gewissen Grad schützen. Beim Menschen weisen erosive Defekte daher in der Regel keinen deutlichen Plaquebefall auf, bzw. erscheint ein gleichzeitiges Vorliegen von Karies und Erosionen an einer Zahnfläche unwahrscheinlich (Lussi 1996). Durch die postulierte antibakterielle Wirkung des stark angesäuerten Tränkwassers in der vorliegenden Untersuchungen waren deutlich geringere Zahnbeläge in Gruppe 2 gegenüber Gruppe 1 zu verzeichnen und vergleichbar mit der Belagsmenge keimfreier Tiere. Diese Überlegungen könnten erklären, warum konventionelle und keimfreie Tiere einen vergleichbaren Erosionsbefall aufweisen.

#### Zu 3: Erosionen und Abrieb

Die planimetrische Vermessung der Zahnfläche (Gesamtfläche, freiliegendes Dentin und erodierter Schmelz) an den linken  $M^1$  und  $M_1$  ergab bei Tränke mit angesäuertem Wasser (sowohl bei Gruppe 2 als auch Gruppe 4) eine deutliche Reduzierung der Gesamtfläche, die nach Sorvari et al. (1988) als Abrieb definiert wird.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (Gruppe 1) wird bei Gruppe 2 ein Abrieb von 12 % und bei Gruppe 4 ein Abrieb von 15 % am  $M^1$  beobachtet. Dabei fällt auf, dass die Flächenreduzierung besonders durch eine Abnahme des Anteils intakten Schmelzes verursacht ist.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Davis und Winter (1980) bei Zähnen von Menschen nach dreiminütiger Behandlung mit Salzsäure von pH2 und schlossen daraus, dass bei derartigen Schmelzschäden der Zahnabrieb exponentiell zunimmt.

#### Zu 4: Fissurentiefe

Die Zunahme des Abriebs an den Zähnen wird auch durch Messungen der Tiefe der Fissuren belegt. Die Messung der Tiefe der Fissuren ergab im Vergleich von Gruppe 2 zu Gruppe 1 eine Abnahme der Tiefe von 10,5 %, im Vergleich von Gruppe 4 zu Gruppe 3 von 11,8 %. Auch Karle et al. (1980) beobachteten bei Ratten die mit auf pH2,2 angesäuertem Wasser getränkt wurden erhebliche Schäden an der linguale Kronenseite der Molaren, besonders an den Unterkiefern. Erosionen und Abrasionen der Schmelzschicht führten zur Bildung einer einseitigen Platte von lingual nach bukkal und damit zum Verlust der Fissuren.

#### Zu 5: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der rechten Molarenreihe und des Schneidezahns des Unterkiefers ergab bei Tieren, die mit angesäuertem Wasser getränkt wurden (Gruppe 2 und 4) deutliche Unterschiede zu Tieren der Leitungswassergruppen (Gruppe 1 und 3). An den Molaren fallen eine Abflachung der Kronenränder sowie eine deutlich sichtbare Schmelz-Dentin-Grenze auf, die bis zu Aufbrüchen (Spalten) geht.

An den palatinalen Höckerflächen (besonders des 1. und 2. Molaren) sind deutliche Ätzspuren am Schmelz sichtbar. Die sonst glatte Schmelzoberfläche wird zu einer Prismenkopfstruktur. Die Schäden am Dentin sind demgegenüber geringgradiger: Aufrauung, Sichtbarwerden der Dentinkanäle und offene Dentinkanäle sind zu beobachten.

An den Incisivi sind bei allen Tieren (Gruppe 1 - 4) in der breiten Schmelzschicht der Schneidefläche Schmelzzylinder sichtbar. Bei Tränke mit angesäuertem Wasser sind jedoch flächig freiliegende Prismenstrukturen sichtbar, die deutliche Demineralisation zeigen. Die labiale Schneidezahnfläche zeigt nur geringgradige Aufrauung. Das linguale Dentin der Schneidefläche zeigt besonders an der Schmelz-Dentin-Grenze leichte Ätzschäden.

Diese Befunde entsprechen früheren Untersuchungen zu Säure-bedingten Zahnhartsubstanzschäden. Schweizer-Hirt et al. (1978) stellten bei Säurebehandlung menschlicher Zähne das Verschwinden der Honigwabenstruktur und Auftreten von Prismenkopfstruktur fest. Härtemessungen des Schmelzes ergab bei säurebehandelten Proben eine Abnahme der Härte um 17 %.

Noack (1989) beschrieb massive Ätzschäden am Schmelz menschlicher Schneidezähne nach Säurebehandlung, die als Auflösung der Prismenenden sichtbar wurde. Das Dentin zeigte deutliche Abrasionsspuren in Form von Wellen und Kratzern. Der überwiegende Teil der Dentinkanäle war eröffnet, peritubulares Dentin herausgelöst und die Kanäleingänge erweitert.

Meurman et al. (1991) beobachteten an Molaren des Menschen bei Säureeinwirkung neben freiliegenden Dentinkanälen die Auflösung peri- und intertubulären Dentins sowie Aushöhlung der Tubularöffnungen durch Zerstörung des peritubulären Dentins.

Schlussfolgerungen:

Aus den vorliegenden Untersuchungen kann geschlossen werden, dass die Verabreichung von mit Salzsäure auf pH2 angesäuertem Wasser als Tränke als hygienische Maßnahme in Zucht und Haltung von Mäusen allenfalls kurzzeitig eingesetzt werden sollte, da mit Ätزشäden an den Zähnen zu rechnen ist. Dieses würde bei kariologisch relevanten Fragestellungen von Bedeutung sein und betrifft gleichermaßen konventionelle wie keimfreie Tiere. Da das angesäuerte Tränkwasser jedoch ebenfalls eine Auswirkung auf bakterielle Zahnbeläge besitzt, sind auch parodontologisch orientierte Fragestellungen beeinflusst.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob und welche Schäden durch eine Ansäuerung des Tränkwassers mit Salzsäure auf pH2, welche als hygienische Maßnahme zum Erhalt der Wasserqualität angewandt wird, an den Zähnen von konventionellen und keimfreien Laboratoriumsmäusen auftreten.

Vier Versuchsgruppen zu je 10 Tieren wurden eingesetzt.

Gruppe 1 : Konventionelle Tiere (Leitungswassertränke)

Gruppe 2 : Konventionelle Tiere (Leitungswassertränke, angesäuert)

Gruppe 3 : Keimfreie Tiere (Leitungswassertränke, autoklaviert)

Gruppe 4 : Keimfreie Tiere (Leitungswassertränke, autoklaviert, angesäuert)

Die Tränke mit angesäuertem Wasser erfolgte über einen Zeitraum von 7 – 9 Wochen.

Als Untersuchungsparameter wurden gewählt:

1. Bestimmung von Zahnbelag (Plaque-Index nach Silness und Loe (1964))
2. Zahnhartsubstanzdefekte (Severity-Index nach Radike und Muhler (1953))
3. Bestimmung von Erosionen und Abrieb (Sorvari et al. 1988)
4. Fissurentiefe nach Karle et al. (1980) und
5. Raster-Elektronenmikroskopie der (Unterkiefer)-Molaren und Incisivi.

Zahnbelag wurde in allen Gruppen beobachtet. Konventionelle mit Leitungswasser getränkte Tiere hatten einen mittleren Plaque-Index von 8,4, Tränke mit angesäuertem Wasser bewirkte einen durchschnittlichen Plaque-Index von 4,0.

Bei keimfreien Tieren getränkt mit Leitungswasser wurde ein Plaque-Index von 5,0, bei angesäuertem Tränkwasser von 3,6 ermittelt.

Zahnhartsubstanzdefekte wurden bei konventionellen Tieren mit Leitungswassertränke mit einem Severity-Index von 3,3 beurteilt. Angesäuertes Tränkwasser ergab einen Index von 7,9. Auch bei keimfreien Tieren erhöhte Tränke mit angesäuertem Wasser den Severity-Index auf 6,9, gegenüber Tränke mit Leitungswasser (Index 2,3).

Erosionen stellten sich besonders als Abnahme intakten Schmelzes dar. Auffällig ist ein bei Tränke mit angesäuertem Wasser zu beobachtender höherer Abrieb von 12,67 (konventionell) bzw. 15,49 % (keimfrei) gegenüber der Kontrollgruppe (Gruppe 1, konventionell, Leitungswasser-Tränke).

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass bei Tränke mit angesäuertem Wasser (Gruppe 2 und Gruppe 4) an den palatinalen Höckerseiten der Molaren deutliche Ätzspuren am Schmelz und Spaltbildung an der Schmelz-Dentin-Grenze an den Höckerspitzen auftreten.

An den Schneidezähnen sind an der Schneidefläche im Schmelz flächig freiliegende Prismen sichtbar, die deutlich Demineralisation zeigen.

## 7. SUMMARY

### Effects of acidified drinking water on the teeth of laboratory mice

The aim of this investigation was to determine the effects of hydrochloric acid used as hygienic measure in drinking water (pH2) on teeth of conventional and germfree laboratory mice.

Four groups of 10 animals each were used.

Group 1 : Conventional animals (tap water)

Group 2 : Conventional animals (tap water, acidified )

Group 3 : Germfree animals (tap water, sterilized )

Group 4 : Germfree animals (tap water , acidified, sterilized )

The application of acidified drinking water was applied for a period of 7 to 9 weeks.

The following parameters were used to describe the effects on dental hard tissues.

1. Plaque and dental calculus (plaque-index , Silness and Løe 1964)
2. Defects on enamel and dentin (Severity-index, Radike and Muhler 1953)
3. Erosions and wear (Sorvari et al. 1988)
4. Depth of fissures (Karle et al. 1980) and
5. Scanning-electronmicroscopy of lower jaw molars and incisivi.

Dental plaque was found in animals of all groups. Conventional animals having received tap water revealed a Plaque-index of 8,4. The same phenomenon was observed for germfree animals (Plaque-index of 5,0 and 3,6 respectively).

Estimation of defects of enamel and dentin by the Severity-index resulted in 3,3 for the conventional tap water group, 7,9 for the conventional acidified water group. In germfree animals acidified water also elevated the index to 6,9 compared to the tap water group with an index of 2,3.

In both conventional and germfree animals a significantly higher degree of tooth defects and erosions were detected. Conventional animals showed 12,7% and germfree animals showed 15,5% less intact enamel when being exposed to acidified drinking water.

The analysis of scanning electronmicroscopic pictures showed clearly visible etching pattern in group 2 and 4 – mainly on palatal surfaces of molar cusps. Additionally, Gaps at the enamel-dentine interface and denuded enamel rods on incisors could be observed.

In conclusion, acidified drinking water (pH2) used as hygienic measure leads to severe tooth defects in conventional and germfree laboratory mice.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Allenspach-Petrzilka, G.E., Guggenheim, B., Lutz, F., 1987. Morphological aspect of experimental dentinal caries in rats. *Caries Res.* 21, 47-61
2. Baer, P.N., Newton, W.L., 1959. The occurrence of periodontal disease in germfree mice. *J. Dent. Res.* 38, 1238.
3. Baer, P.N., Newton, W.L., 1960. Studies on periodontal disease in the mouse. III. The germfree mouse and its conventional control. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 13, 1134-1144.
4. Baer, P.N., Bernick, S., 1957. Age changes in the periodontium of the mouse. *Oral. Surg.* 10, 430-436.
5. Baer, P.N., Newton, W.L., White, C.L., 1964. Studies on periodontal disease in the mouse. VI. The older germ-free control. *J. Periodont.* 35, 388-396.
6. Bhaskar, S.N., Weinmann, J.P., Schour, I., 1948. The dentition and the alveolar bone of the albino mouse. *J. Dent. Res.* 27, 755-756.
7. Bieri, J.G., McCay, C.M., Restarski, J.S., Gortner, A., 1946. Further studies on in vivo tooth decalcification by acid beverages. *Arch. Biochem.* 11, 33.
8. Braikoff, B.N., 1927. Kauwerkzeuge bei Ratte und Maus. *Deutsche Monatszeitschrift für Zahnheilkunde* 45, 193-203.
9. Brosowsky, A., 1966. Die Wirkung von organischen und Mineralsäuren auf die Zahnhartsubstanz bei verschiedenen pH-Werten. *Dtsch. Zahnärztl. Z.* 21, 1139.
10. Cohn, S., 1957. Development of the molar teeth in the albino mouse. *American J. Anat.* 101, 295-320.
11. Cook, M.J., 1965. *The anatomy of the laboratory mouse.* New York, Academic press.
12. Culp, D.J., Quivey, R.G., Bowen, W.H., Fallon, M.A., Pearson, S.K., Faustoferri, R., 2005. A mouse caries model and evaluation of *Aqp5*<sup>-/-</sup> Knockout Mice. *Caries Res.* 39, 448-454.
13. Dassule, H.R., MacMahon, A.P., 1998. Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Dev. Biol.* 202, 215-227.
14. Davis, W.B., Winter, P.J., 1980. The effect of abrasion on enamel and dentine after exposure to dietary acid. *Br. Dent. J.* 148, 253-256.
15. DeSanctis, S., 2001. Eine Methode zum Monitoring von säurebedingtem Zahnhartsubstanzverlust. *Med.dent. Diss. Gießen.*

16. Fitzgerald, L.R., 1973. Deciduous incisor teeth of the mouse (*Mus musculus*). *Archs. Oral. Biol.* 18, 381-389.
17. Gaete, M., Lobos, N., Torres-Quintana, M.A., 2004. Mouse tooth development time sequence determination for the ICR/Jcl strain. *J. Oral. Sci.* 46, 135-141.
18. Gallusi, G., Grippaudo, G., 1971. Studio sulla carie sperimentale nei topi. *Ann. Stomatol. (Roma)* 20, 317-321.
19. Gaunt, W.A., 1956. The development of enamel and dentine on the molars of the mouse, with an account of the enamel – free areas. *Acta Anat.* 28, 111-134.
20. Gaunt, W.A., 1961. The presence of Apical pits on the lower cheek teeth of the mouse. *Acta Anat.* 44, 146-158.
21. Gaunt, W.A., 1961. The development of the molar pattern of the golden hamster (*Mesocricetus Auratus* W.), together with a re-assessment of the molar pattern of the mouse (*Mus Musculus*). *Acta Anat.* 45, 219-251.
22. Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1974. Planung, Struktur und Errichtung von Versuchstierbereichen tierexperimentell tätiger Institutionen. Empfehlungen des Ausschusses für Standardisierung von Methoden in der Versuchstierhaltung. Basel.
23. Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1978. Hygiene-Empfehlungen für Versuchstierbereiche. Teil 2, Nr.6, 1. Auflage, Basel.
24. Gluhak-Heinrich, J., 2000. Orthodontically stressed periodontium of transgenic mouse as a model for studying mechanical response in bone: the effect on the number of osteoblasts. *Clin. Orthod. Res.* 3, 55-66.
25. Gortner, R.A., Restarski, J.S., Bieri, J.G., McCay, C.M., 1945. Factors influencing the effects of acidic beverages on the teeth of white rats and hamsters. *Arch. Biochem.* 8, 405.
26. Gortner, R.A., McCay, C.M., Restarski, J.S., Schlack, C.M., 1946. Some effects of dietary oxalate on teeth of white rats. *J. Nutr.* 32, 121.
27. Gortner, R.A., Kenisberg, R.K., 1952. Factors concerned with different erosive effects of grapefruit and grapefruit juice on rats' molar teeth. *J. Nutr.* 46, 133.
28. Gustafson, G., Axrup, K., Göthson-Gustafson, F., Wall, S., 1987. Studies on dental and periodontal conditions in normal mice and mice with genetic disorders. *Swed. Dent. J.* 11, 201-222.
29. Hartless, R.L., Wagg, B.J., 1962. Erosive effect of drinking fluids on the molar teeth of the rat. *Arch. Oral. Biol.* 7, 307.
30. Heine, W., 1968. Gnotobiotechnik. Schaper Verlag, Hannover.

31. Hoag, W.G., Strout, J., Meier, H., 1965. Epidemiological aspects of the control of *Pseudomonas* infection in mouse colonies. *Lab. Anim. Care* 15, 217-225.
32. Holloway, P.J., Mellanby, M., Stewart, R.J.C., 1958. Fruit drinks and tooth erosion. *Br. Dent. J.* 102, 305.
33. Hummel, K.P., Richardson, F.L., Fekete, E., 1966. Anatomy. In: *Biology of the Laboratory Mouse*. 2<sup>nd</sup> Edition, McGraw Hill Book Company, New York, Chapter 13, 247-308.
34. Juhr, N.C., 1985. Determination of germfree status. *Tierlaboratorium* 10, 227-230.
35. Jurkschat, U., Schuster, G. 1979. Fissureninhalte bei Nagetiermolaren. *Stomatol. DDR.* 29, 117-121.
36. Karle, E.J., Gehring, F., Deerberg, F., 1980. Trinkwasseransäuerung und ihre schmelzschädigende Wirkung auf Rattenzähne. *Z. Versuchstierkd.* 22, 80-88.
37. Kato, I., 1976. Establishment of plaque-forming *Streptococcus mutans* in germ-free mice. *J. Japan. Assoc. Periodont.* 18, 215-224.
38. Kato, I., Yanagawa, S., Sunada, I., 1977. Establishment of plaque-forming *Streptococcus mutans* in the oral cavity of germ-free mice. *J. Japan. Assoc. Periodont.* 19, 143-146.
39. König, K.G., 1965. Möglichkeiten der Kariesprophylaxe beim Menschen und ihre Untersuchung im kurzfristigen Rattenexperiment. Verlag Hans Huber, Bern Stuttgart.
40. König, K.G., Marthaler, T.M., Mühlemann, H.R., 1961. Effects of some phosphates in a short-period rat caries experiment. *Arch. Oral. Biol.* 3, 258.
41. Ladeburg, M., Juhr, N.C., 1983/1984. Auswirkungen von HCl- und Peressigsäure- Tränkwasserzusatz auf den Zahnschmelz von Ratten. *Tierlaboratorium* 9, 233-241.
42. Les, E.P., 1968. Effect of acidified-chlorinated water in reproduction in C3H/HeJ and C57bl/6J mice. *Lab. Anim. Care* 18, 210-213.
43. Lussi, A., 1996. Dental erosion clinical diagnosis and case history taking. *Eur. J. Oral Sci.* 104, 191-198.
44. Maeda, N., Arai, S., Ozaki, A., Oowada, T., Takahashi, A., Fujita, H., Mizutani, T., 1995. Experimental dental caries on gnotobiotic inbred mice. *Microbiol Immunol.* 39, 71-73.
45. Mahn, R., 1890. Bau und Entwicklung der Molaren bei Mus und Arvicola. *Morph. Jahrbuch* 16, 652-685.
46. McClure, F.J., 1943. The destructive action, in vivo, of dilute acids and acid drinks and beverages on the rats molar teeth. *J. Nutr.* 26, 251-259.

47. McDonald, J.L., Stookey, G.K., 1973. Laboratory studies concerning the effect of acid-containing beverages on enamel dissolution and experimental dental caries. *J. Dent. Res.* 52, 211-216.
48. McPherson, C.W., 1963. Reduction of *Pseudomonas aeruginosa* and coliform bacteria in mouse drinking water following treatment with hydrochloric acid or chlorine. *Lab. Anim. Care* 13, 737-744.
49. Meurman, J.H., Drysdale, T., Frank, R.M., 1991. Experimental erosion of dentin. *Scan. J. Dent. Res.* 99, 457-462.
50. Miller, W.D., 1907. Experiments and observations on the wasting of tooth tissue variously designed as erosion, abrasion, chemical abrasion, denudation, etc.. *Dent. Cosm.* 49,1.
51. Moss-Salentijn, L., 1975. Studies on dentin. 2. Vestigial lacteal incisor teeth of the rat. *Acta Anat. (Basel)* 92, 329-350.
52. Moss-Salentijn, L., 1978. Vestigial teeth in rabbit, rat and mouse; their relationship to the problem of lacteal dentitions. In: *Development, Function and Evolution of Teeth*. P.M. Butler & K.A. Joysey, Academic Press. London, Eds., 13-29.
53. Muller, R.F., Gortner, R.A., 1949. The influence of sugar content and pH on in vivo decalcification of rat molar teeth by acid beverages. *Arch. Biochem. Biophys.* 20, 153.
54. Mullink, J.W.M.A., Rümke, C., 1971. Reaction on Hexobarbital and pathological control of mice given acidified drinking water. *Z. Versuchstierk.* 13, 196-200.
55. Navia, J. M., 1977. *Animal models in dental research*. University of Alabama Press, Alabama.
56. Noack, M.J., 1989. REM - Untersuchungen an Erosionen der Zahnhartsubstanzen in vivo. *Dtsch Zahnärztl Z.* 44, 517-520.
57. Ooshima, T., Sobue, S., Hamada, S., Kotani, S., 1981. Susceptibility of rats, hamsters and mice to carious infection by *Streptococcus mutans* serotype c and d organisms. *J. Dent. Res.* 60, 855-859.
58. Peterkova, R., Peterka, M., Lesot, H., 2003. The developing mouse dentition – A new tool for apoptosis study. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1010, 453-466.
59. Peterkova, R., Peterka, M., Viriot, L., Lesot, H., 2002. Development of the vestigial tooth primordia as part of Mouse Odontogenesis. *Connective Tissue Research* 43, 120-128.
60. Peters, S., Strassburg, M., 1969. Zur Frage der ersten Dentition bei Kaninchen und Maus. *Z. Säugetierk.* 34, 91-97.
61. Peyer, B., 1963. *Die Zähne*. Springer Verlag, Berlin.

62. Radike, A.W., Muhler, J.C., 1953. The incidence of dental caries in hamsters receiving two different water-soluble fluorides at low concentrations. *J. Dent. Res.* 32, 807-810.
63. Ribeiro Sobrinho, A.P., Carvalho, M.A.R., Farias, L.M., Nicoli, J.R., Bahia, M.G.A., Vieira, E.C., 1996. Implantation in root canals of conventional and germ-free mice by microorganisms prevalent in human endodontic infections. *Second World Congress on Laboratory Animals. Congress on Laboratory Animal Science, Rio de Janeiro.*
64. Ribeiro Sobrinho, A.P., Nicoli, J.R., Carvalho, M.A.R., Farias, L.M., Bambirra, E., Vieira, E.C., 1998. Experimental root canal infections in conventional and germ-free mice. *Jour. Endod.* 24, 405-408.
65. Robins, M.W., Rowlatt, C., 1971. Dental abnormalities in aged mice. *Gerontologia* 17, 261-272.
66. Rosebury, T., 1938. The problem of dental caries. In: *Dental Science and Dental Art.*, ed S.M. Gordon, Lea &Febinger, Philadelphia.
67. Rosen, S., Williams, H.J., 1969. Comparison of caries activity in gnotobiotic rats and mice. *J. Dent. Res.* 48, Suppl. No. 6
68. Ruch, J.V., 1987. Determinisms of odontogenesis. *Revis. Biol. Cellular.* 14, 1-99.
69. Rugh, R., 1968. *The mouse – its reproduction and development.* Burgess Publishing Company, Minneapolis.
70. Sachse, B., 1894. *Beiträge zur Kenntnis der Entwicklung der Schneidezähne bei Mus musculus.* Dissertation Universität Leipzig. (zit. nach Schroll 2004)
71. Sako, N., Okamoto, K., Mori, T., Yamamoto, T., 2002. The hardness of food plays an important role in food selection behaviour in rats. *Behav. Brain Res.* 133, 377-382.
72. Schaedler, R.W., Dubos, R.J., 1962. The fecal flora of various strains of mice. Its bearing on their susceptibility to endotoxin. *J. Exp. Med.* 115, 1149-1160.
73. Schour, I., Massler, M., 1942. The teeth. In: Griffith and Farris, 1942. *The rat laboratory investigations.* Lippincott, Philadelphia, 104-165.
74. Schroll, J., 2004. *Genexpression während der Zahnentwicklung der Maus (Mus musculus) – Literaturstudie.* München, Vet. med. Diss.
75. Schweizer-Hirt, C.M., Schait, A., Schmid, R., Imfeld, T., Lutz, F., Mühlemann, H.R., 1978. Erosion und Abrasion des Schmelzes – Eine experimentelle Studie. *Schweizer Monatszeitschrift Zahnheilkunde* 88, 497-529.
76. Schweizer-Hirt, C.M., Schait, A., Schmid, R., Imfeld, T., Lutz, F., Mühlemann, H.R., 1978. Erosion und Abrasion des Schmelzes – Eine

- experimentelle Studie. Schweizer Monatszeitschrift für Zahnheilkunde 88, 497-529.
77. Seemann, R., 2005. Untersuchungen zur Kariesprävention in einem biofilmbasierten In vitro Modell. Validierung an Beispielen innovativer Präventionsmaßnahmen nach Monoinfektion mit *Streptococcus mutans*. Med. Diss. Freien Universität Berlin.
78. Sharawy, A., Kuo, H.C., Socransky, S.S., 1967. Effects of various acids and their sodium salts on the teeth and periodontium of conventional mice and rats. *Parodontol. Acad. Rev.* 1, 145-153.
79. Silness, J., Loe, H., 1964. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol. Scand.* 22, 121-135.
80. Sorvari, R., Kiviranta, I., 1988. A semiquantitative method of recording experimental tooth erosion and estimating occlusal wear in the rat. *Arch. Oral. Biol.* 33, 217-220.
81. Sorvari, R., Kiviranta, I., Luoma, H., 1988. Erosive effect of a sport drink mixture with and without addition of fluoride and magnesium on the molar teeth of rats. *Scand. J. Dent. Res.* 96, 226-231.
82. Spreter von Kreudenstein, T., 1939. Experimentelle Beiträge zur Pathologie der Zahnhartgewebsentwicklung. H. Meusser, Leipzig.
83. Theilade, J., Fitzgerald, R. J., Scott, D. B., Nylén, M. U., 1964. Electron microscopic observations of dental calculus in germfree and conventional rats. *Arch. oral. Biol.* 9, 97-100.
84. Tober-Meyer, B., Bieniek, H., 1977. Does the acidification of drinking water with HCl have measurable effects upon the experimental animal (rat, rabbit)? 15. Wissenschaftliche Tagung, GV – SOLAS, Neuherberg.
85. Tolo, K.J., Erichsen, S., 1969. Acidified drinking water and dental enamel in rats. *Z. Versuchstierk.* 11, 229-233.
86. Trentin, J.J., van Hoosier, G.L., Shields, J., Stephens, K., Stenback, W.A., 1966. Establishment of a Caesarian derived, gnotobiotic foster nursed inbred mouse colony with observations on the control of *Pseudomonas*. *Lab. Anim. Care* 16, 109.
87. Viriot, L., Lesot, H., Vonesch, J.L., Ruch, J.V., Peterka, M., Peterkova, R., 2000. The presence of rudimentary odontogenic structures in the mouse embryonic mandible requires reinterpretation of developmental control of first lower molar histomorphogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 233-240.
88. Wagner, M., 1959. Determination of germfree status. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 78, 89-101.

89. Wang, L., D'Alpino, P.H.P., Lopes, L.G., Pereira, J.C., 2003. Mechanical properties of dental restorative materials: relative contribution of laboratory tests. *J. Appl. Oral. Sci.* 11, 162-167.
90. Wood, A.E., 1962. The early tertiary rodents of the family Paramyidae. *Trans. Am. Philos. Soc. NS.* 52, 1-261.
91. Woodward, M.F., 1894. On the milk dentition of the Rodentia with a description of a vestigial milk incisor in the mouse (*Mus musculus*). *Anat. Anz.* 9, 619-631.
92. Wynn, W., Haldi, J., 1948. The erosive action of various fruit juices on the lower molar teeth of albino rats. *J. Nutr.* 35, 489.
93. Yanagawa, S., 1979. Dental plaque formation in gnotobiotic and germfree mice. *J. Japan. Assoc. Periodont.* 21, 261-271.

## **DANKSAGUNG**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. N.-C. Jühr für die Übertragung des Themas der Arbeit, die Arbeitsmöglichkeit im Institut, die jederzeit gewährte Unterstützung sowie seine Geduld bis zur Fertigstellung der Arbeit.

Bei Frau Strauß und Frau Bennemann im Bundesamt für Materialprüfung in Berlin bedanke ich mich für die Beschichtung der Proben für die raster-elektronenmikroskopischen-Untersuchungen.

Mein Dank gilt auch Frau Briest (Institut für Veterinäranatomie der FU Berlin) und Frau Dilger (Institut für Pathologie im Klinikum Benjamin Franklin der FU Berlin) für die Einarbeitung in die Einbettung in Kunststoff und die Dünnschlifftechnik.

## **LEBENS LAUF**

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

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich, Marko Kostov, erkläre, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Thema „Einfluss von angesäuertem Tränkwasser auf die Zähne von Mäusen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 25.2.2012