

4 MATERIAL UND METHODE

4.1. Herstellung der Schmelzproben

Für die Untersuchung wurden 27 bleibende Rinderfrontzähne verwendet, welche von frisch geschlachteten Rindern entnommen und nach vorsichtiger Säuberung in 0,9%iger Kochsalzlösung (NaCl-Lösung 0,9 %; Fa. Delta Select, Pfullingen, Deutschland) bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert wurden.

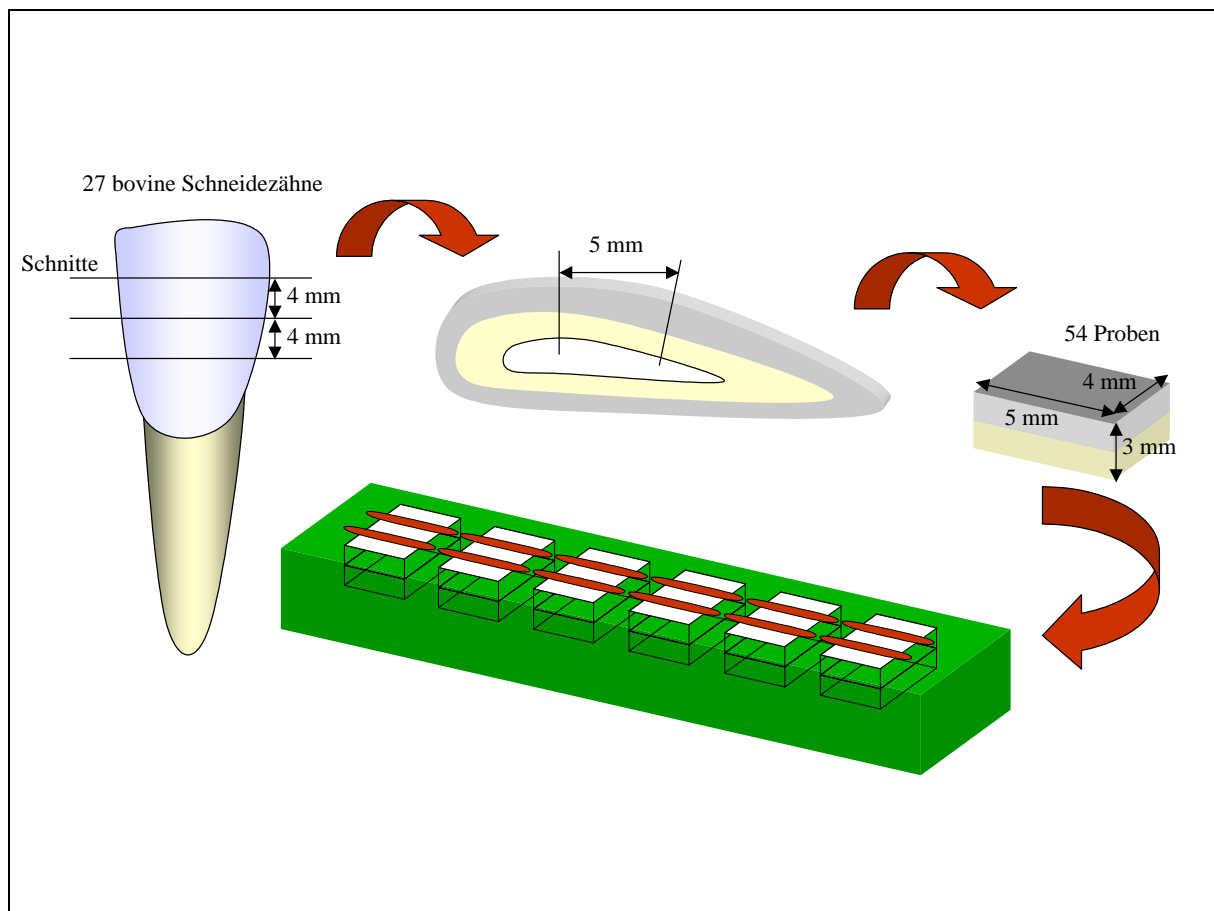


Abb. 3: Herstellung der Schmelzproben.

Aus den Labialflächen wurden jeweils zwei Schmelzproben ($5 \times 4 \times 3 \text{ mm}^3$) unter ständiger Wasserkühlung herauspräpariert (Bandsäge Exakt 300cl; Fa. Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland). Mit Hilfe von Silikonformen wurden jeweils sechs Proben zusammen in Kunstharz (Technovit 4071; Fa. Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) eingebettet (Abb. 3). Nun wurden mittels einer Poliermaschine (Poliermaschine Phoenix Alpha; Fa. Buehler, Düsseldorf, Deutschland) und Schleifpapier aufsteigender Körnung (Schleifpapier Körnung 1200, 2400, 4000; Fa. Exakt Apparatebau) die Probenoberflächen standardisiert und poliert.

Auf den so präparierten Schmelzproben wurden mit Nagellack (Fa. Betrix, Frankfurt/Main, Deutschland) jeweils zwei Streifen abgedeckt, um später als gesunde Kontrolle zu dienen. Bei dieser Aufteilung zeigte jede Probe drei ungeschützte Schmelzflächen (A, B, C).

4.2. Demineralisation der Schmelzproben

Die Proben wurden nun für 14 Tage bei 37 °C (Wärmeschrank BR 6000; Fa. Heraeus Kulzer) einer Demineralisationslösung (Tab. 1), (pH=5,0) ausgesetzt. Mit Hilfe eines pH-Meters (pH-/Redox-/Temperatur-Messgerät GMH 3510; Fa. Greisinger, Regenstauf, Deutschland) wurde täglich der pH-Wert überprüft und im Falle eines Abweichens vom Sollwert mit geringen Mengen Kaliumhydroxidlösung (10 M) nach unten sowie nach oben mit Eisessig korrigiert.

Tab. 1: Zusammensetzung der Demineralisationslösung (Buskes et al. 1985)

Stoff	Ansatz	Konzentration in mmol/l	Molare Masse in g/mol	Menge
CaCl ₂ · H ₂ O	zusammen 5 l	3,0	147,02	2,205 g
KH ₂ PO ₄		3,0	136,09	2,041 g
MHDP		0,006	176,00	5,3 mg
CH ₃ COOH		50,0	60,05	15,012 g
KOH 10M		(ad pH 5)	56,11	ca. 23 ml
Tymol				in Spuren
Aqua dest.			55,6	18

4.3. Versiegelung der initialen Schmelzdemineralisationen

Nach der Demineralisation wiesen die Schmelzproben jeweils drei initiale künstliche Schmelzläsionen (A, B, C) auf, welche durch die vom Nagellack abgedeckten gesunden Flächen sicher abgrenzbar voneinander getrennt waren (Abb. 4). Läsion A diente jeweils als unbehandelte Kontrolle. Um im Folgenden eine Versiegelung der Läsionen B und C zu ermöglichen, wurden diese 5 Sekunden mit 20%igem Phosphorsäuregel (Gluma Etch 20 Gel; Fa. Heraeus Kulzer) geätzt. Danach wurden die Proben mit Wasserspray für 30 Sekunden von allen Säurerückständen gesäubert. Die Proben wurden randomisiert in sechs Gruppen à neun Proben aufgeteilt.

Die Haftvermittler Heliobond, Resulcin Monobond, Excite, Solobond M und Adper Prompt L-Pop sowie der Fissurenversiegler Helioseal (Tab. 2) wurden mittels Microbrush auf die Läsionen B und C aufgetragen, ohne die Materialien in die Läsionen einzumassieren.

Tab. 2: Verwendete Versiegler

Material	konventioneller Einsatz	Hersteller
Helioseal	Lichthärtender Fissurenversiegler	Ivoclar Vivadent; Schaan, Liechtenstein
Heliobond	Lichthärtender Haftvermittler	
Resulcin Monobond	Lichthärtender Haftvermittler	Merz Dental; Lütjenburg, Deutschland
Excite	Einkomponenten-Adhäsiv	Ivoclar Vivadent
Solobond M	Einkomponenten-Adhäsiv	Voco; Cuxhaven, Deutschland
Adper Prompt L-Pop	Selbstätzendes Adhäsiv	3M Espe; Seefeld, Deutschland

Nach 15 (B) bzw. 30 Sekunden (C) wurde überstehendes Material mit einer Watterolle vorsichtig entfernt und der Kunststoff mit einer Blaulichtlampe (Translux CL; Fa. Heraeus Kulzer) nach Herstellerangaben ausgehärtet. Im folgenden Schritt wurde der Nagellack zwischen Läsion A und B vorsichtig mit einem Skalpell entfernt, um eine Kontrollfläche für die Demineralisation von ungeschütztem gesundem Schmelz zu schaffen (Abb. 4).

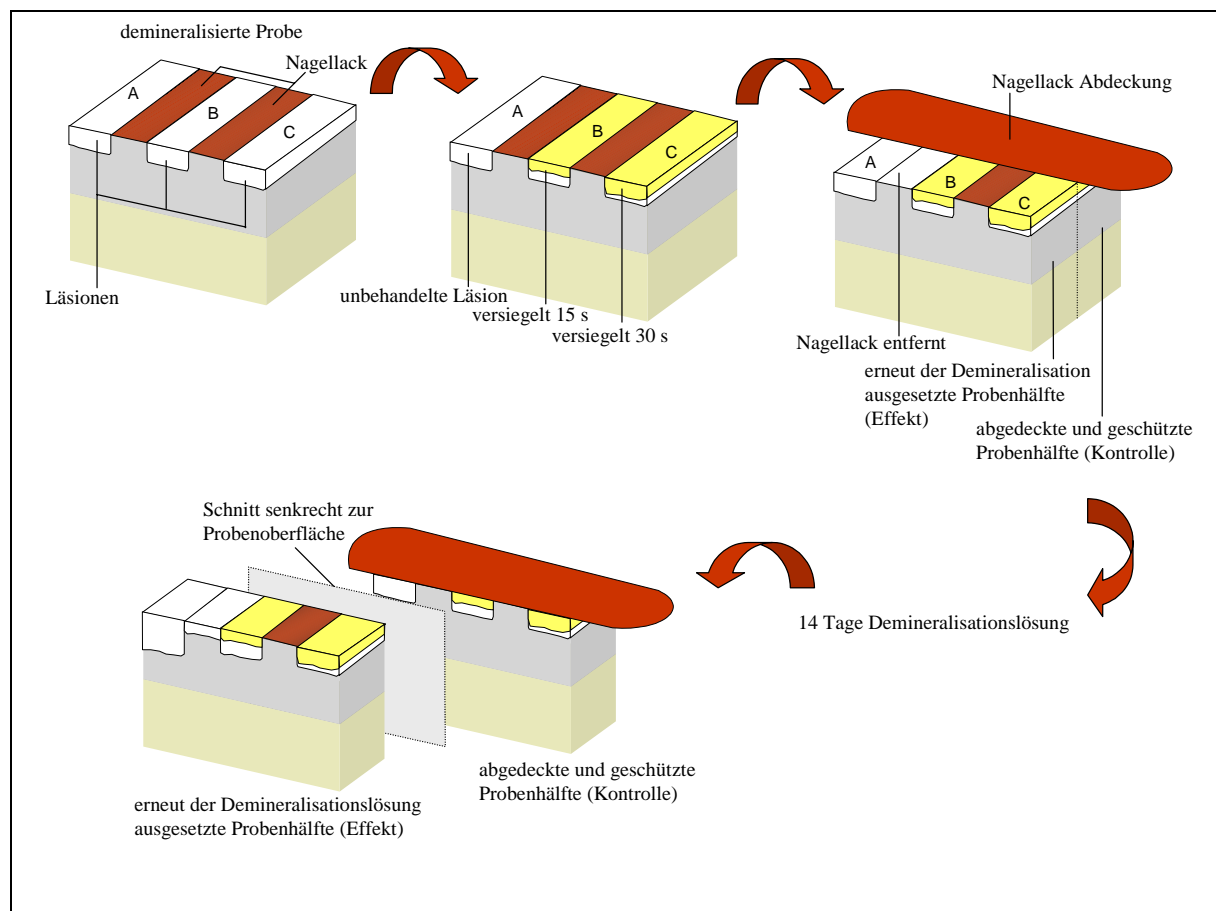


Abb. 4: Behandlung der Läsionen.

4.4. Erneute Säureexposition der Proben

Eine Hälfte der Probe wurde mit säureresistentem Nagellack abgedeckt (Abb. 4) und die Proben für weitere 14 Tage der Demineralisationslösung (siehe oben) pH=5,0 ausgesetzt. Täglich wurde der pH-Wert kontrolliert und nötigenfalls korrigiert.

4.5. Vorbereitung der Proben für die konfokalmikroskopische Untersuchung

Die Proben wurden nun jeweils senkrecht zur Oberfläche entlang des Nagellackes in zwei Hälften getrennt (Bandsäge Exakt 300cl). So entstand eine Hälfte, die durch Nagellack vor weiterer Demineralisation geschützt war (Kontrolle) und eine weitere, welche der Demineralisationslösung ausgesetzt war (Effekt).

Um die kariösen Läsionen für die spätere Untersuchung sichtbar zu machen, wurden die Probenhälften mit einem sehr niedrig viskösen Kunstharz (Spurr 1969); Spurr Harz-Kit; Fa. Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) infiltriert, welchem der Fluoreszenzfarbstoff Rhodaminisothiocyanat (RITC) zugegeben worden war (Tab. 3).

Tab. 3: Zusammensetzung des Kunstharzes für Infiltration der Proben zur Visualisierung mittels CLSM

Bestandteil	Menge	Anteil
ERL 4206	10,0 g	23,6 %
DER 736	6,0 g	14,2 %
NSA	26,0 g	61,3 %
DMAE	0,4 g	0,9 %
RITC	100 µmol/l	

Der fluoreszenzmarkierte Kunststoff vermag unter Überdruck in Mikroporositäten der Probe einzudringen und nach seiner Aushärtung diese in Fluoreszenzmikroskopen sichtbar zu machen (Meyer-Lueckel et al. 2003). Zu diesem Zweck wurden die Proben in Kunststoffschläuchen gestapelt, die an einem Ende mit einem Kunststoffstopfen abgeschlossen und durch Kunststoffringe voneinander separiert waren (Abb. 5). Der gefärbte Kunststoff wurde über die Proben gegossen und die Schläuche mit einem zweiten Stopfen luft- und wasserdicht verschlossen.

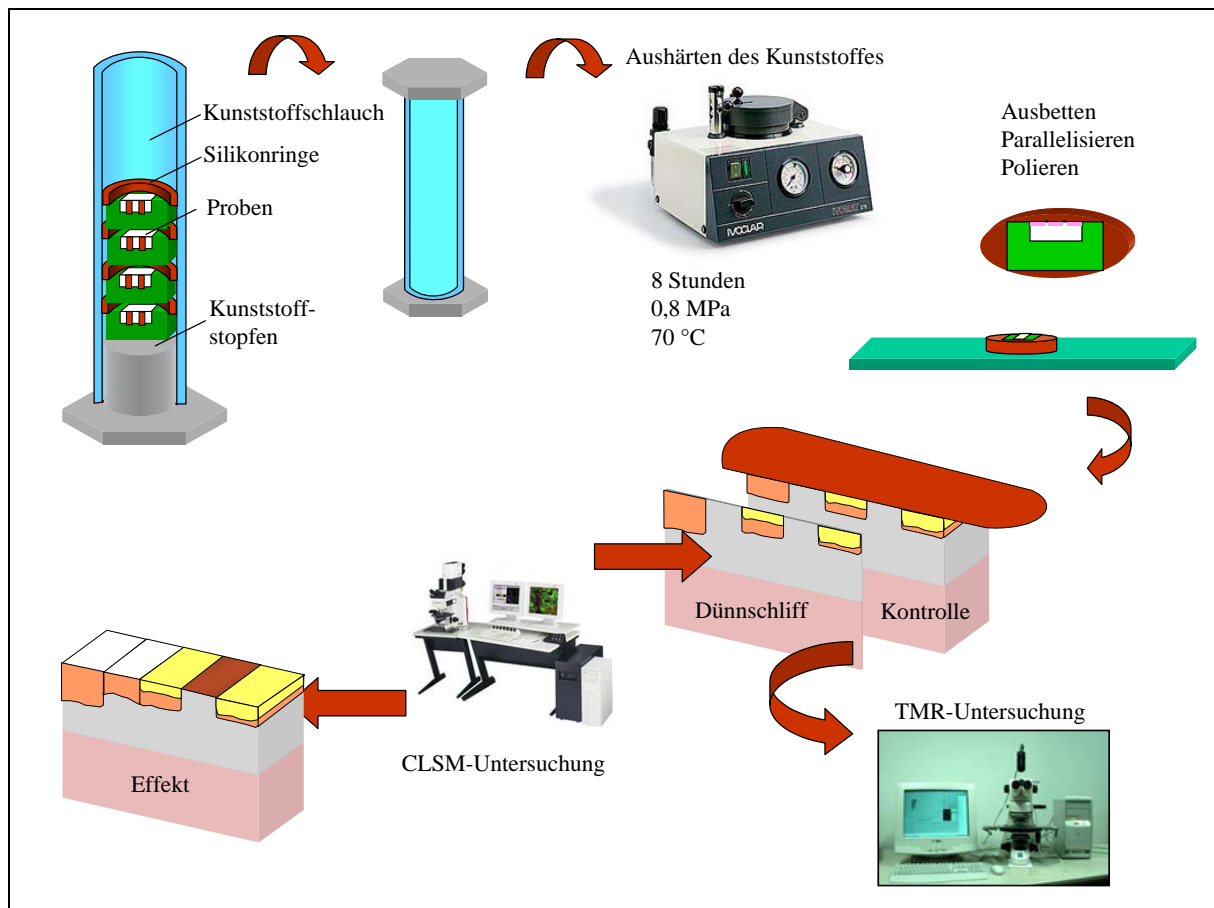


Abb. 5: Behandlung der Proben zur Visualisierung mit dem CLSM und der TMR.

Die Polymerisation des Kunststoffes erfolgte in einem Polymerisationsofen (Ivomat IP3; Fa. Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) bei 70 °C und 0,8 MPa Druck über acht Stunden. Nach dem Ausbetten und Trennen (Bandsäge Exakt 300cl) wurden die Proben mit Schleifpapier (Körnung 500; Fa. Exakt Apparatebau) zunächst grob zur Schnittfläche parallelisiert (Poliermaschine Phoenix Alpha) und mit Sekundenkleber (Fa. Henkel, Düsseldorf, Deutschland) auf Objektträger aus Plexiglas (Fa. diaplus, Oststeinbeck, Deutschland) geklebt. Nun wurden die Proben endgültig mit gewässertem Schleifpapier aufsteigender Körnung (Schleifpapier Körnung 1200, 2500, 4000; Fa. Exakt Apparatebau) parallelisiert und poliert (Exakt Mikroschleifsystem; Fa. Exakt Apparatebau). Die Präparation der Proben erfolgte derart, dass bei der folgenden konfokalmikroskopischen Untersuchung die Schnittebene senkrecht zur Oberfläche betrachtet wurde.

4.6. Konfokalmikroskopische Untersuchung

Die präparierten Proben wurden mit einem Konfokalen Laser Raster Mikroskop (CLSM) (TCS NT; Fa. Leica, Heidelberg, Deutschland) untersucht.

Das konfokale Prinzip basiert auf der Ausblendung von Streulicht durch Lochblenden (Pinholes). Bei herkömmlichen Mikroskopen wird sowohl das gewünschte Licht aus der Fokusebene als auch störendes Streulicht aus Ebenen über oder unterhalb der Fokusebene detektiert. Konfokalmikroskope blenden alle Strukturen außerhalb der Fokusebene aus. Erreicht wird dies durch eine variable Detektionslochblende (Pinhole), die sich im Strahlengang an einer Stelle befindet, an dem Licht aus der Fokusebene erneut gebündelt wird (Abb. 6). Konfokale Mikroskope ermöglichen daher eine zerstörungsfreie, detailreiche Darstellung von Strukturen auch unterhalb der Probenoberfläche bis zu etwa 100 μm Tiefe (Watson 1997). Die Dicke der observierten Schicht hängt neben der Wellenlänge des observierten Lichtes und der numerischen Apertur des Objektivs vom Durchmesser der Lochblende ab.

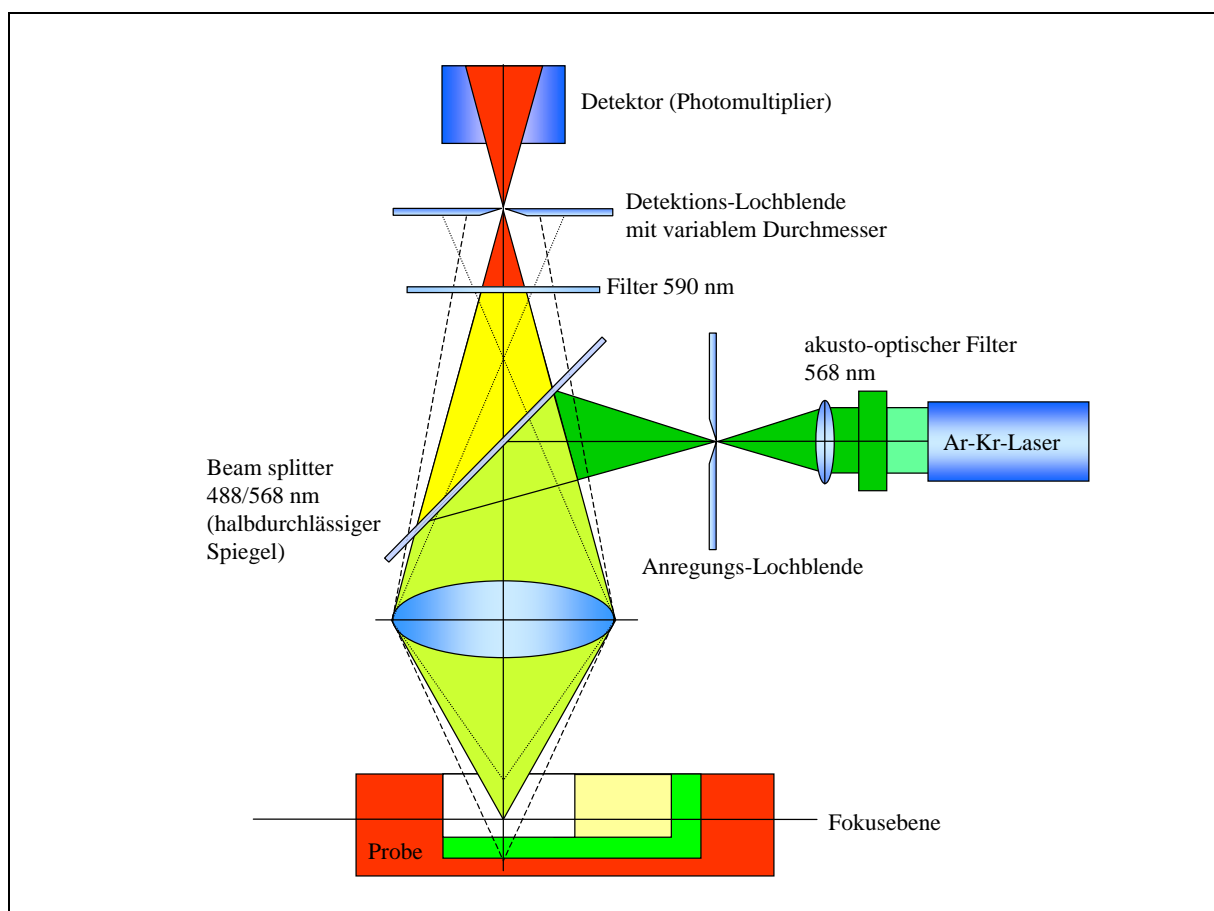


Abb. 6: Schematische Darstellung der Funktionsweise des verwendeten CLSM.

In dieser Studie wurde das CLSM im Fluoreszenzmodus genutzt. Das bedeutet, dass nur das vom Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht, nicht aber das von der Probe reflektierte Licht detektiert wurde. Das Anregungslicht wurde mit einem Argon-Krypton-Laser erzeugt und über einen akusto-optischen Filter (AOTF) sowie einen halbdurchlässigen Spiegel (Beamsplitter) gelenkt (Abb. 6). Das so gewonnene Anregungslicht hatte ein Wellenlängenmaximum bei 568 nm. Die Intensität des Anregungslaserlichtes wurde für die gesamte Dauer der Untersuchung konstant gehalten. Das detektierte Licht wurde durch einen Langpassfilter mit dem Durchlässigkeitsmaximum bei 590 nm geleitet, um nur Fluoreszenzlicht zu detektieren und reflektiertes Licht niedrigerer Wellenlänge auszublenden. Die jeweils observierte Schicht befand sich etwa 10 μm unter der polierten Probenoberfläche. Der Durchmesser der Detektionslochblende wurde mit einer Airyeinheit festgelegt. Sämtliche Aufnahmen wurden über den dynamischen Mittelwert von acht Einzelaufnahmen (Average-Funktion) gewonnen, um ein möglichst hohes Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten und im Tiff-Dateiformat gespeichert.

Untersucht wurden von jeder Probe jeweils die Kontroll- und die Effekthälfte. Von jeder Läsion (A, B, C) wurde eine Aufnahme mit einem 40x Objektiv (numerische Apertur 1,4) mit Ölimmersion (Immersion, Fa. Zeiss, Jena, Deutschland) gewonnen. Diese hatten eine Kantenlänge von $250 \times 250 \mu\text{m}^2$ bei einer Bildauflösung von 1024×1024 Pixel. Die Photomultiplier-amplifikation wurde konstant gehalten.

4.7. Auswertung der gewonnenen Bilder

Die am CLSM gewonnenen Bilder zeigen die initiale Schmelzläsion als rot fluoreszierenden Bereich der Probe. Deutlich ist das Prismenmuster zu erkennen. Versiegelte Bereiche der Läsion erscheinen schwarz, da hier der Fluoreszenzfarbstoff nicht mehr in die Schmelzporositäten eindringen konnte (Abb. 7).

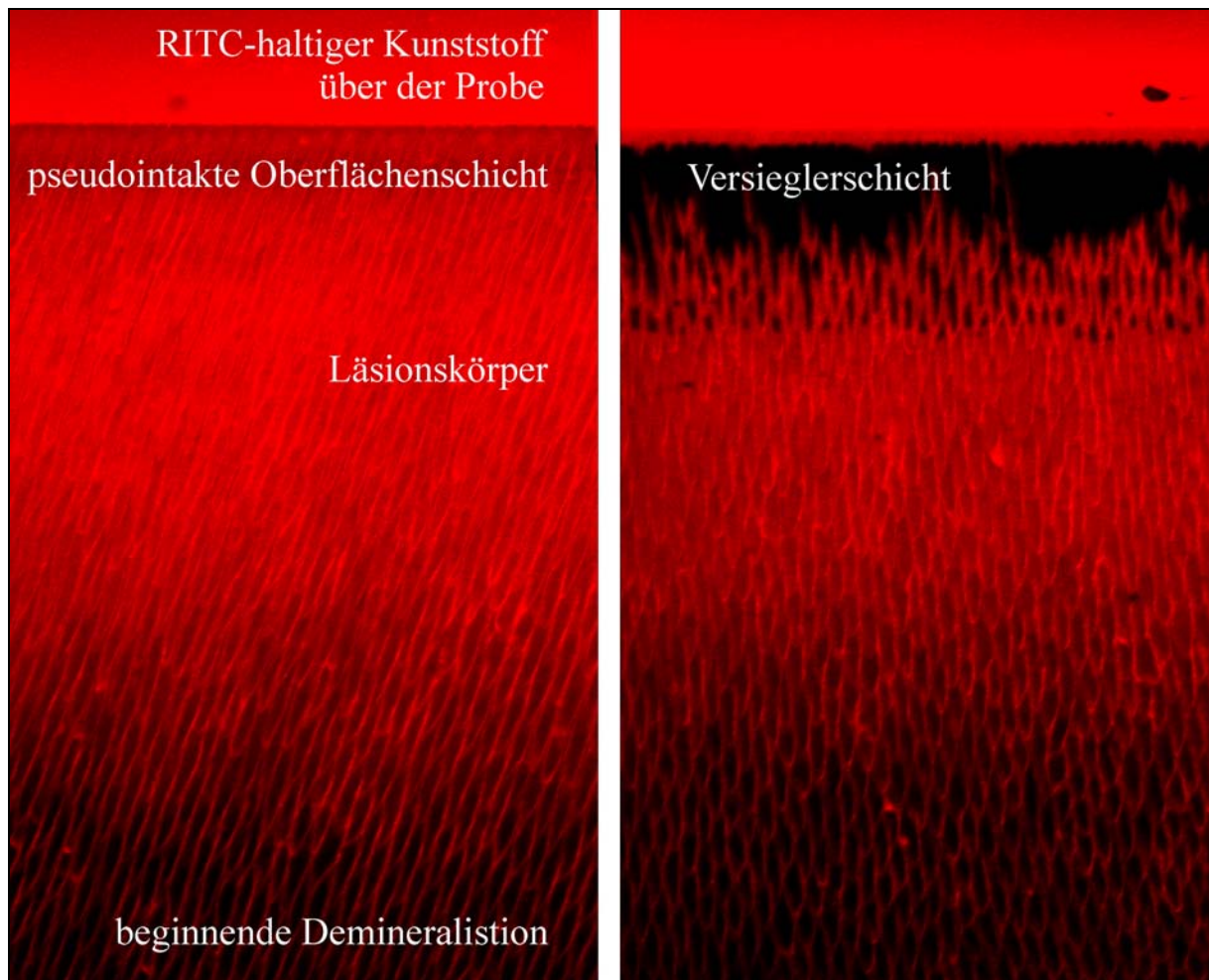


Abb. 7: Typisches Erscheinungsbild einer unbehandelten (links) und einer versiegelten (rechts) initialen Schmelzdemineralisation.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms Image J (National Institutes of Health, Rockville Pike, Maryland, USA) an einem 17“ Röhrenbildschirm (G991; Fa. Acer, Ahrensburg, Deutschland) bei abgedunkeltem Raum. Ermittelt wurden bei jeder Probe die Läsionstiefe, die Penetrationstiefe des Versiegelungskunststoffes sowie die Dicke der Sauerstoffinhibitionsschicht (Abb. 8).

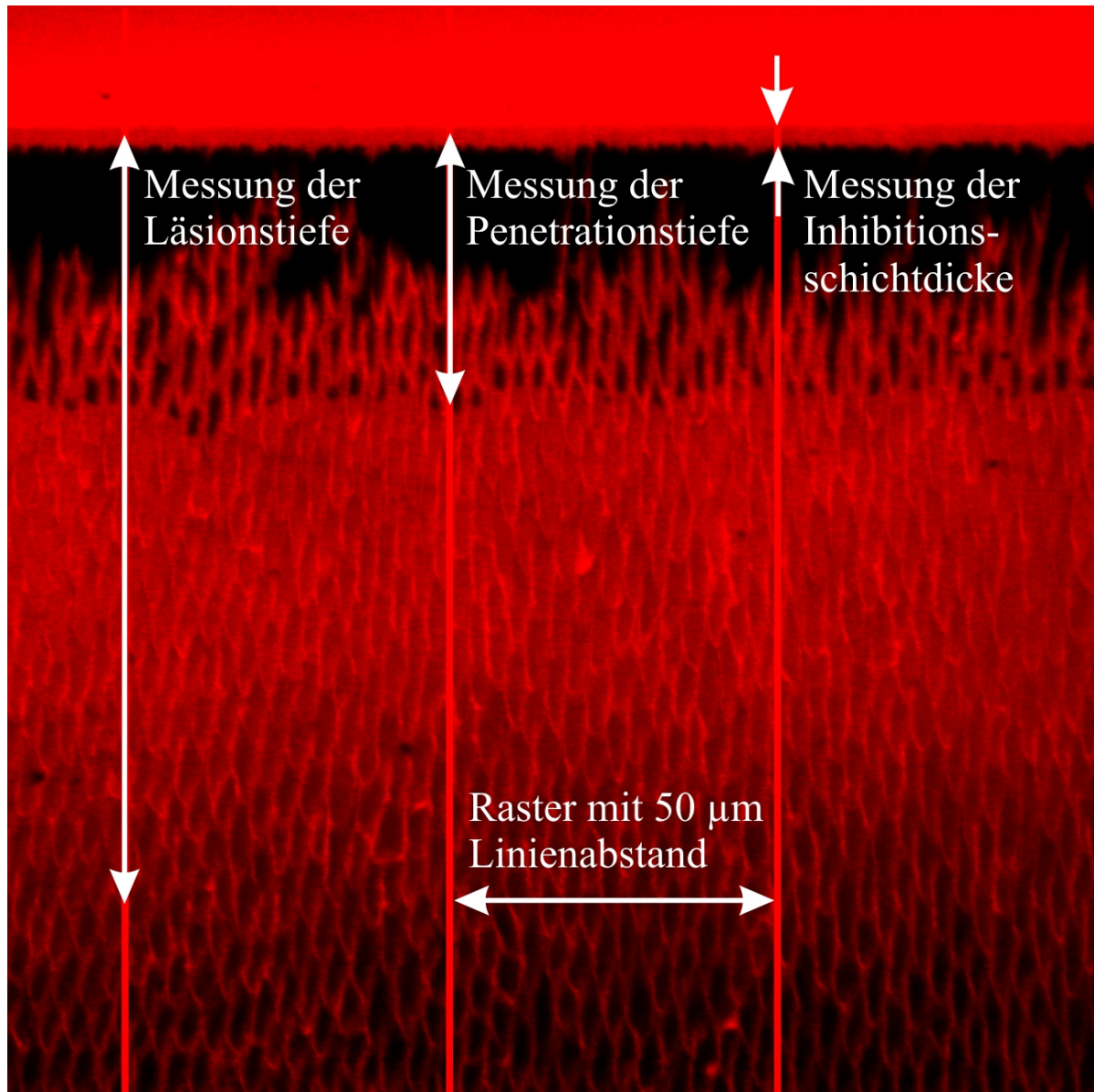


Abb. 8: Mit einem Raster überzogenes Bild einer versiegelten Läsion mit Messpunkten.

Läsionstiefe:

Als Läsionstiefe wurde der Abstand von der Probenoberfläche bis zu der Schicht, in der das Innere der Schmelzprismen nicht mehr von fluoreszierendem Kunststoff ausgefüllt war, definiert.

Penetrationstiefe:

Die Penetrationstiefe wurde als Abstand von der Probenoberfläche zum Ende der Schicht in der nicht fluoreszierende Bereiche (schwarz) zu erkennen sind definiert. Diese wurde anhand von Bildern des Kontrollbereichs ermittelt. Die Werte wurden anschließend in Relation zu der gemessenen Tiefe der jeweiligen Läsion gesetzt.

Sauerstoffinhibitionsschicht:

Als Sauerstoffinhibitionsschicht wurde die Zone zwischen der Probenoberfläche und dem Beginn der nicht fluoreszierenden, versiegelten Schicht definiert. Sie wurde an Bildern der Kontrollgruppe ermittelt.

Die jeweiligen Werte wurden bei jeder Läsion jeweils dreimal im Abstand von 50 µm gemessen und aus diesen drei Messwerten der Mittelwert gebildet. Um definierte Messpunkte zu erhalten, wurde jedes Bild mit einem Raster (50 µm Linienabstand) überlegt.

Güte der Versieglerschicht:

Da die gewonnenen Werte der Penetrationstiefe keine Aussagen über die Homogenität der Kunststoffschicht erlauben, wurde zusätzlich die Qualität der Versiegelung quantitativ erfasst. Hierzu wurde aus den Bildern ein repräsentativer Bereich der Versiegelung (region of interest; ROI) mit der Kantenlänge 100 µm horizontal und der Penetrationstiefe vertikal ausgewertet. Von diesem Bereich wurde mit dem Programm Image J jeweils ein Histogramm erstellt, welches den Anteil der einzelnen Graustufen (im Falschfarnebild rot-schwarz) anzeigt (Abb. 9). Die Werte hieraus wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2000 (Fa. Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleissheim, Deutschland) übernommen. Von jedem Bild wurde die Summe der Pixel mit den Schwarzstufen 0-18 (entspricht ca. 7 % der 256 Graustufen) ermittelt und zur Gesamtanzahl der ausgewerteten Pixel in Relation gestellt (Gl. 6).

$$K(\%) = \frac{\sum_{i=0}^{18} g_i}{\sum_{i=0}^{255} g_i} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 6}$$

$K(\%)$ Kompaktheitswert

g_i Anzahl der Pixel mit dem Grauwert i

$\sum_{i=0}^{18} g_i$ Summe der Pixel mit den Grauwerten 0-18 in der ROI

$\sum_{i=0}^{255} g_i$ Anzahl aller ausgewerteten Pixel der ROI

In zehn repräsentativen ungefüllten Läsionen konnten keine Pixel mit den Graustufen 0 bis 18 nachgewiesen werden. Daher ist auszuschließen, dass bei der Auswertung dieser Graustufen histologische Strukturen das Messergebnis beeinflussen.

Der ermittelte Kompaktheitswert K ist ein Maß für Homogenität der Versiegler­schicht. Geringe Werte deuten auf unvollständige Penetration oder Aushärtung hin, während hohe Werte auf die Ausbildung einer kompakten Versiegler­schicht schließen lassen.

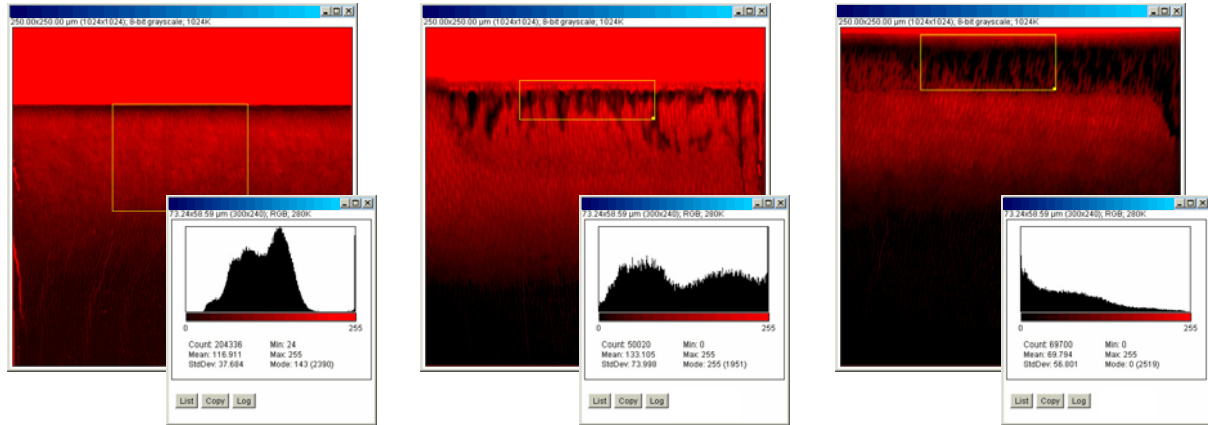


Abb. 9: Erstellung der Histogramme mit dem Programm Image J.

Links: Auswertung einer ungefüllten Läsion. Das Histogramm zeigt keine Pixel der Werte 0-18 (schwarz) an.

Mitte: Auswertung einer versiegelten Läsion, deren Versiegelung unvollständig ist. Das Histogramm zeigt relativ wenige Schwarzwerte, aber viele Werte im roten Bereich.

Rechts: Dichter versiegelte Läsion. Das Histogramm zeigt überwiegend Schwarzwerte.

Progression der Läsionstiefe:

Zur Ermittlung der Progression der Läsionstiefe nach der zweiten Demineralisationsperiode wurde für jede Probe die Differenz der Läsionstiefen der Kontroll- und der Effektgruppe berechnet und zur Läsionstiefe der Kontrollgruppe in Relation gesetzt.

4.8. Mikroradiografische Auswertung

Von jeweils fünf Proben aus jeder Gruppe wurden nach der konfokalmikroskopischen Untersuchung Dünnschliffe angefertigt. Dazu wurden die Proben mit der vorher mikroskopisch observierten Fläche mit Sekundenklebstoff (Fa. Henkel) auf Objektträger aus Plexiglas (Fa. diaplus) fixiert. Anschließend wurden unter ständiger Wasserkühlung mit einer 200 µm dicken, diamantierten Bandsäge (Bandsäge Exakt 300cl) planparallele Schnitte von 300 µm Dicke hergestellt. Diese wurden im Folgenden mit einer Mikroschleifapparatur (Exakt Mikroschleifsystem) und gewässertem Schleifpapier aufsteigender Körnung (1200, 2400 und 4000) parallelisiert, bis die Dicke der Schmelzschliffe 100 µm betrug. Die Dicke der Proben wurde mit einem digitalen Mikrometer überprüft (Bügelmessschraube Digimatic; Fa. Mitutoyo, Kawasaki, Japan). Die so gewonnenen Dünnschliffe wurden auf Probenhalter (TMR Proben-

halter; Fa. Plano, Wetzlar, Deutschland) fixiert und anschließend in den Strahlengang eines speziellen Röntgenstrahlengenerators (PW 1730/10; Fa. Philips, Eindhoven, Niederlande) montiert. Die mikroradiografische Untersuchung erfolgte bei einer Röhrenspannung von 20 kV, einem Röhrenstrom von 40 mA und einer Belichtungszeit von 20 Sekunden. Die Mikroradiogramme wurden auf einem in einem Kameragehäuse aufgespulten Spezialfilm (High Speed Holographic Film SO 253; Fa. Kodak; Stuttgart, Deutschland) erzeugt. Nach Entwicklung des Filmes wurden die Aufnahmen mit einem Durchlichtmikroskop (Durchlichtmikroskop 60318; Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland), an dem eine Videokamera (CCD-Videokamera Modul XC 77CE; Fa. Sony, Tokio, Japan) angeschlossen war, untersucht. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Transversal Micro Radiography (TMR für Windows; Version 2.0.27.2, Fa. Inspektor Research System BV, Amsterdam, Niederlande) auf einem Personalcomputer.

Die Läsionstiefe wurde bei der mikroradiografischen Auswertung als der Abstand von der Probenoberfläche bis zu dem Punkt, an welchem die Mineraldichte 95 % des gesunden Schmelzes betrug festgelegt. Es wurden jeweils die konfokalmikroskopisch ermittelten Läsionstiefen aller drei Läsionen einer Probe mit den entsprechenden mikroradiografisch ermittelten Läsionstiefen verglichen.

4.9. Statistische Auswertung

Die ermittelten Werte wurden zunächst mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Die Werte für die Tiefe der Ausgangsläsionen nach der ersten Demineralisation wurden sowohl zwischen den Materialien (ANOVA) als auch zwischen den Gruppen A, B und C (t-Test) auf signifikante Unterschiede geprüft.

Die Werte der Penetrationstiefe, Sauerstoffinhibitionsschicht, Kompaktheit sowie der Progression der Läsionstiefe nach weiterer Demineralisation wurden zunächst mit der einfaktorischen Varianzanalyse (ANOVA) auf Signifikanzen zwischen den Materialien geprüft. Im Falle einer Signifikanz wurden die einzelnen Gruppen untereinander mit einem post-Hoc-Test (Bonferroni) verglichen. Der Vergleich der Auswirkung einer Behandlung gegen Nichtbehandlung bzw. 15 s Penetrationszeit gegen 30 s Penetrationszeit erfolgte mit dem t-Test (Student) für gepaarte Stichproben.

Die mit der TMR gemessenen Läsionstiefen wurden gegen die am CLSM ermittelten Tiefen mit dem t-Test für gepaarte Stichproben auf Signifikanz geprüft. Die Korrelationsanalyse

zwischen beiden Verfahren erfolgte nach Pearson. Das Signifikanzniveau wurde jeweils auf 5 % festgelegt.