

4 MATERIAL UND METHODE

4.1 Versuchsanordnung

Bei sechs Hunden wurden an jeweils vier Unterkieferprämolaren Wurzelkanalbehandlungen unter Narkose durchgeführt. Dabei erfolgte intraoperativ eine iatrogene Perforation in der Furkation, die unverzüglich entweder mit einem experimentellen Kalziumphosphatzement oder mit Mineralischem Trioxidaggregat (MTA) gefüllt wurde. Zum Verschluss der Trepanationsöffnungen diente ein chemisch härtendes Komposit.

Nach einem Zeitraum von etwa zwölf Wochen wurden die Tiere geopfert. Die Untersuchung der Biokompatibilität der beiden Zemente gegenüber dem angrenzenden Parodont erfolgte röntgenologisch und histologisch.

Die Versuche wurden an einer Tierklinik in Istanbul, Türkei, in Zusammenarbeit mit der zahnmedizinischen Fakultät der Universität Istanbul durchgeführt und waren von der dortigen Ethikkommission überprüft und genehmigt worden. Die Prinzipien des Labortierschutzes (NIH publication No. 86-23, revised 1985) wurden beachtet und eingehalten.

4.1.1 Anatomie des Hundegebisses

Die Entwicklung der Zähne beginnt im Fötus mit der Anlage der Milchzähne. Die Welpen werden ohne Zähne geboren. Der Zahndurchbruch beginnt im Alter von etwa zwei Wochen und ist nach rund acht Wochen abgeschlossen. Die zweite Dentition ist im Alter von durchschnittlich sieben Monaten beendet. Nicht alle Zähne haben zwei Generationen. Die Molaren und die ersten Prämolaren haben keine entsprechenden „Vorgänger“ sondern stoßen direkt als bleibende Zähne durch. Jedoch wird der P1 hin und wieder auch als persistierender Milchzahn angesehen. Jeder Kieferquadrant besitzt drei Incisivi (I), einen Caninus (C), vier Prämolaren (P) sowie drei Molaren (M) im Unterkiefer bzw. zwei im Oberkiefer. Somit besteht ein voll entwickeltes Hundegebiss aus 42 Zähnen, wobei diese Zahl vor allem bei kurzschädelligen Rassen auch nach unten abweichen kann (KOCH 2001).

4.2 Operationsvorbereitung und -ablauf

4.2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten sechs mischrassige Hunde im Alter von ein bis vier Jahren und einem Körpergewicht von 10 bis 15 kg, die zugleich in einer chirurgischen Studie integriert waren. Sie wurden von der experimentellen Abteilung der Tierklinik der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Istanbul, Türkei, bezogen. Die Hunde wiesen keine allgemeinen Erkrankungen auf.

4.2.2 Narkose

Zur Anwendung kam eine Kombinationsnarkose bestehend aus 20 mg/10 kg Körpergewicht Xylazin (Rompun[®]; Bayer, Leverkusen, Deutschland) und 30 mg/10 kg Ketamin (Ketanest[®]; Parke-Davis, Berlin, Deutschland). Die Narkose wurde durch das Nachinjizieren mit Ketamin aufrechterhalten. Die Tiere wurden auf der Seite liegend auf dem Operationstisch gelagert und fixiert. Die Narkoseführung sowie die Kontrolle der Vitalfunktionen erfolgten von einem ausschließlich hierfür zuständigen Tierarzt (Abb. 4.1).



Abb. 4.1: Studienhund während der Narkose.

4.2.3 Zahnbehandlung

4.2.3.1 Verwendete Zähne

Die Wurzelkanalbehandlungen wurden bei allen sechs Hunden an den zweiten und dritten Unterkieferprämolaren sowohl rechts- als auch linksseitig durchgeführt (Abb. 4.2). Die P2 und P3 haben in der Regel – bezogen auf ein und denselben Hund – eine annähernd gleiche Größe und besitzen jeweils eine mesiale und distale Wurzel, wodurch insgesamt eine gute Vergleichbarkeit gewährleistet ist. Alle verwendeten Zähne waren kariesfrei und parodontologisch unauffällig. Die Behandlung erfolgte unter relativer Trockenlegung. Der Speichelfluss war aufgrund der Narkose nahezu vollständig unterdrückt.



Abb. 4.2: Unterkieferansicht von links. Von links nach rechts sind C, P1, P2, P3 sowie das mesiale Drittel von P4 zu sehen.

4.2.3.2 Trepanation und Perforation

Nach der Desinfektion der Zahnkrone (Chlorhexidindiglukonat 0,2 %; Apotheke des UKBF, Berlin, Deutschland) erfolgte die Trepanation der Prämolaren mit einer sterilen, grün beringten Diamantbirne der ISO-Größe 012 (Komet[®]; Gebr. Brasseler, Lemgo, Deutschland) unter permanenter Wasserkühlung (Abb. 4.3). Daraufhin wurde die Vitalexstirpation mittels Hedströmfeilen (VDW, München, Deutschland) durchgeführt (Abb. 4.4). Als Spüllösungen dienten Natriumhypochlorit (1 %, Apotheke des UKBF) und Chlorhexidindiglukonat (0,2 %);

die Trocknung der Wurzelkanäle erfolgte mit sterilen Papierspitzen (Roeko, Coltène/Whaledent GmbH & Co. KG, Langenau Deutschland).

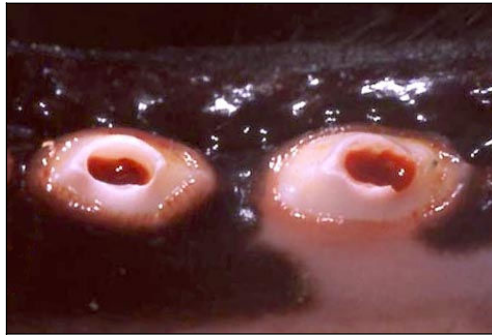


Abb. 4.3: Trepanationsöffnung mit gut sichtbarer Pulpablutung (links P2, rechts P3).



Abb. 4.4: Vitalexstirpation mit Hedströmfeile.

Danach wurde mit einem sterilen Rosenbohrer der ISO-Größe 012 (Komet[®]; Gebr. Brasseler) eine Perforation in der Bifurkation bis zum Sichtbarwerden einer leichten Blutung erzeugt. Damit sollte eine praxisnahe Behandlungssituation simuliert werden, bei der es während der Suche nach den Kanaleingängen zu Perforationen im Pulpakammerboden kommen kann. Die Perforation wurde mit isotoner Kochsalzlösung (Apotheke des UKBF) gespült und mit Papierspitzen getrocknet (Abb. 4.5).



Abb. 4.5: Trepanationsöffnungen nach Blutstillung und Trocknung. Jeweils sind in der Mitte die Perforation und links und rechts davon die beiden Wurzelkanäle zu sehen.

4.2.3.3 Füllungsmaterialien

Für die Füllung der Perforationen kamen zwei verschiedene Zemente zum Einsatz. Alle zweiten Prämolaren auf der linken und alle dritten Prämolaren auf der rechten Unterkieferseite wurden mit ProRoot™ MTA (siehe Kapitel 2.2) gefüllt. Alternierend dazu erfolgte die Perforationsversorgung an den dritten Prämolaren linksseitig und zweiten Prämolaren rechtsseitig mit einem experimentellen Kalziumphosphatzement (Augmentech AT, Wetzlar, Deutschland). Dessen Pulver setzte sich aus:

- Trikalziumphosphat,
- Magnesiumphosphat,
- Magnesiumhydrogenphosphat und
- Strontiumkarbonat zusammen.

Die Anmischflüssigkeit bestand aus einer wässrigen Lösung von Diammoniumhydrogenphosphat. Beide Zemente wurden nach den jeweiligen Herstellerangaben angemischt, mit einem planen Zementstopfer (A. Deppeler S. A., Rolle, Schweiz) aufgenommen, in die Perforationsstelle eingebracht und anschließend verdichtet. Somit ergab sich für jeden der sechs Hunde im Unterkiefer folgendes Therapieschema:

- P2 links: MTA
- P3 links: Kalziumphosphatzement
- P2 rechts: Kalziumphosphatzement
- P3 rechts: MTA

4.2.3.4 Wurzelkanalaufbereitung, -füllung und Trepanationsverschluss

Im Anschluss an die Perforationsversorgung wurden die Wurzelkanäle mit Hilfe von Reamern (VDW, München, Deutschland) und Hedströmfeilen (VDW) unter Spülung mit Natriumhypochlorit und Chlorhexidinglukonat in Step-back-Technik aufbereitet (apikale Masterfeile ISO-Größe 35, elektrometrische Längenkontrolle mit Root ZX®; J. Morita Europe GmbH, Dietzenbach, Germany), mit Papierspitzen getrocknet und gefüllt. Als Wurzelkanalfüllmaterial diente bei allen Zähnen der oben genannte experimentelle Kalziumphosphatze-

ment. Dieser wurde mit einem Lentulo (VDW) in die Kanäle appliziert und mit einem Wattepellet (Roeko, Coltène/Whaledent GmbH & Co. KG) glatt abgezogen (Abb. 4.6 und 4.7).



Abb. 4.6: Applikation des Kalziumphosphatzements in die Wurzelkanäle mittels Lentulo.



Abb. 4.7: Blick auf Perforationen und Wurzelkanäleingänge nach Überschussentfernung des Füllmaterials.

Nach dem Abbinden des Zements erfolgte die Konditionierung der Trepanationskavität mittels 34,5 %igem Phosphorsäureätzgel (Cica[®]; Promedica, Neumünster, Deutschland) (Abb. 4.8) und Clearfil[®] New Bond (Kuraray Co. Ltd., Osaka, Japan). Als Füllmaterial kam Clearfil[®] Core New Bond zur Anwendung (Abb. 4.9). Durch das leichte Einkürzen wurde eine Nonokklusion der betreffenden Prämolaren erzielt, um eine Überbelastung zu vermeiden.

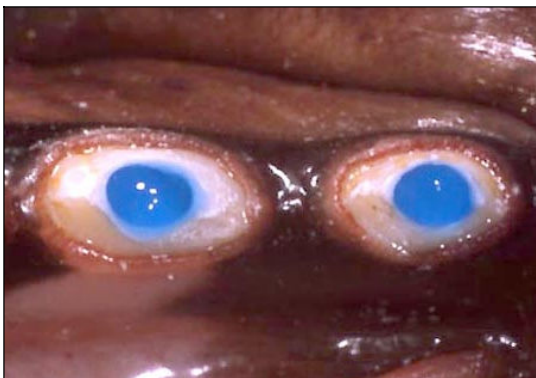


Abb. 4.8: Konditionierung mit Phosphorsäureätzgel.



Abb. 4.9: Verschluss der Trepanationsöffnung mit Clearfil[®] Core New Bond.

4.2.4 Postoperativer Verlauf

Über den gesamten Beobachtungszeitraum nach der Behandlung bis zur Euthanasie wurden die Versuchstiere in der veterinärmedizinischen Klinik der Universität Istanbul unter kontinuierlicher Kontrolle von Körpergewicht und Futteraufnahme gehalten. Die Tötung erfolgte bei den Hunden eins bis vier (Nummerierung entsprechend der Behandlungsreihenfolge) nach 86 Tagen, bei den Hunden fünf und sechs nach 81 Tagen durch eine Überdosis Natrium-Pentobarbital (Narcoren®; Merial, Hallbergmoos, Deutschland). Anschließend wurden die Unterkiefer exartikuliert, von umliegendem Gewebe befreit (Abb. 4.10) und in gepuffertem Formaldehyd (4 %; Merck KG, Darmstadt, Deutschland) fixiert.



Abb. 4.10: Exartikulierter und von umliegendem Gewebe befreiter Unterkiefer.

4.3 Untersuchungsverfahren

4.3.1 Röntgendiagnostik

Nach Durchtrennung der Unterkiefer in der Median-Sagittal-Ebene wurden mit einem zahnärztlichen Röntgengerät (Heliodent MD; Siemens AG, Berlin/München, Deutschland) von den zweiten und dritten Prämolaren Röntgenaufnahmen (Zahnfilm Kodak[®] Ultra-speed; Eastman Kodak Company, Rochester, USA) in Rechtwinkeltechnik angefertigt.

4.3.2 Histologische Untersuchung

4.3.2.1 Trenn-Dünnschliff-Technik

Die Trenn-Dünnschliff-Technik ist eine Methode zur Erstellung von Schliffpräparaten bis zu einer Schichtdicke von 10 µm. Dies gilt insbesondere für nicht schneidbare Gewebe (z. B. Knochen, Schmelz, Dentin, Metall- oder Keramikimplantate), um auch an diesen histologische, mikroradiografische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchführen zu können (DONATH 1988).

Hierzu wurden mittels einer Bandsäge (Diamantbandsäge Exakt 300 CL; Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) die zu untersuchenden Prämolaren mit angrenzendem Knochengewebe aus den Unterkiefern in solch einer Weise herausgetrennt, dass quaderförmige Probekörper (Größe ca. 20 × 13 × 4 mm) entstanden. Daraufhin erfolgte die Kunststoffeinbettung:

- Spülung mit Leitungswasser (3 Tage)
 - Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (70, 80, 90, 96, 100 %iges Ethanol, Merck KG) (insgesamt über 14 Tage)
 - Entfettung in Ether-Chloroform (Merck KG) (3 Tage)
 - Lagerung in 100 %igem Ethanol (7 Tage)
 - Infiltrierung von Methylmethakrylat-Monomer, Merck 800590 (Merck KG) (5 Tage)
-

- Infiltrierung von Methylmethakrylat-1-Lösung: 900 ml Methylmethakrylat, Merck 800590; 90 ml Phtalsäuredibutylester, Merck 800919; 15 g α , α -Azoisobutyronitril, Aldrich A 9640-17; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) (3 Tage)
- Infiltrierung von Methylmethakrylat-2-Lösung (4 Tage)
- Polymerisation: Einlegen der Probekörper in verschließbare Glasröhrchen (Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland) mit frischem Methylmethakrylat (Abb. 4.11), Lagerung im Wasserbad bei Zimmertemperatur (10 Tage), Aushärtung im Wasserbad im Brutschrank (RVT 360; W. C. Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 38 °C (Glasröhrchen verschlossen, 3 Tage), Nachhärtung im Brutschrank (Glasröhrchen offen, 1 Tag)

Die Glasröhrchen wurden zerschlagen, die gewonnenen Kunststoffblöcke getrimmt und auf Präparatehaltern parallel zur gewünschten Schnittebene mit Technovit® 3040 (Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) befestigt (Abb. 4.12).



Abb. 4.11: Glasröhrchen mit noch flüssigem Methylmethakrylat und Probekörper.



Abb. 4.12: Auf Präparatehalter fixierter Methylmethakrylatblock.

Danach konnten die einzelnen Sägeschnitte mit einer Innenlochkreissäge (Sägemikrotom Leitz® 1600; Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland) angefertigt werden (Abb. 4.13). Nach jedem Schnitt wurde auf die entstandene plane Fläche mittels Sofortklebstoff (Instantbond®; Instantbond Klebstoffe GmbH, Berlin, Deutschland) ein Plexiglasobjektträger (Dia-Plus Walter Messner GmbH, Oststeinbek, Deutschland) geklebt (Abb. 4.14), sodass man nach

dem folgenden Schnitt ein auf dem Objektträger fixiertes Präparat erhielt. Die entstandenen Präparate hatten eine durchschnittliche Dicke von 60 μm .



Abb. 4.13: Innenlochkreissäge mit eingespanntem Präparatehalter.

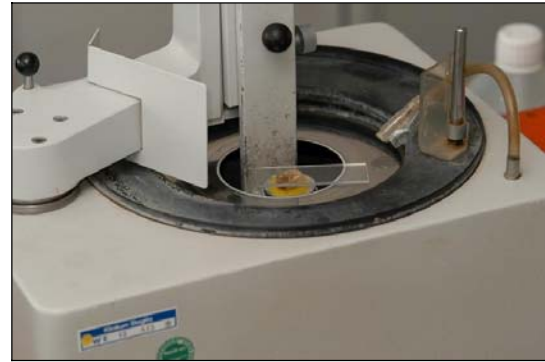


Abb. 4.14: Nach Aufkleben des Plexiglasobjektträgers.

Daraufhin wurden die Präparate mit dem Mikroschleifsystem Exakt 400 CS (Nassschleifpapier der Körnungen P 1200, P 2500, P 4000, Abb. 4.15) bis zum Erreichen der Mikroplanparallelität geschliffen und poliert. Die Dicke der fertig gestellten Dünnschliffe betrug annähernd 20 μm .



Abb. 4.15: Mikroschleifsystem 400 CS.

4.3.2.2 Mikroskopische Untersuchung

Zur histologischen Auswertung wurden die Schliffpräparate mit Hämalaun-Eosin gefärbt. Der Ansatz der Färbelösung erfolgte direkt vor dem Anfärbvorgang im Pathologielabor. Die verwendeten Reagenzien (Hämatoxylin und Eosin) wurden von der Firma Merck bezogen.

Anschließend konnten die Präparate mit einer flexiblen Folie (Coverfilm; Vogel GmbH & Co. KG, Gießen, Deutschland) unter Verwendung eines Eindeckmediums (Assistent-Histokitt; Chemi-Teknik A/S, Oslo, Norwegen) eingedeckt werden. Als Mikroskop kam das BX 40 von Olympus (OLYMPUS Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) zur Anwendung. Die Fotografien der histologischen Präparate wurden mit einer Digitalkamera (DP 10; OLYMPUS Deutschland GmbH) angefertigt.

4.4 Auswertungsmethoden

4.4.1 Röntgenauswertung

Die Auswertung der Röntgenaufnahmen erfolgte verblindet durch einen klinisch erfahrenen Zahnarzt. Entsprechend der Größe der furkalen Aufhellung wurde folgende Einteilung vorgenommen:

- Grad 1: o. B.
- Grad 2: kleine Aufhellung
- Grad 3: mittlere Aufhellung
- Grad 4: große Aufhellung

4.4.2 Histologische Auswertung

Für die histologische Untersuchung wurde von jedem Zahn jeweils das Schliffpräparat ausgewählt, welches die größte Kontaktzone zwischen dem Füllmaterial und dem Parodontium aufwies. Die Auswertung der Präparate erfolgte ebenfalls verblindet durch einen erfahrenen Pathologen. Beurteilt wurden:

- Zellzahl gesamt
 - Granulozyten
 - Lymphozyten
 - Plasmazellen
 - Makrophagen
 - Eosinophile Granulozyten
 - Fibroplasie
 - Knochenumbau
-

Die Bewertung des Parameters „Zellzahl gesamt“ sowie die der einzelnen Zelltypen (Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen Makrophagen, Eosinophile Granulozyten) wurde nach allgemein üblichen Methoden vorgenommen (ORSTAVIK & MJÖR 1992):

- Grad 1: keine Zellen nachweisbar
- Grad 2: mild (vereinzelte Entzündungszellen)
- Grad 3: moderat (örtlich begrenzte Anhäufung von Entzündungszellen)
- Grad 4: stark (Infiltrat von hoher Dichte an Entzündungszellen)

Die Parameter „Fibroplasie“ und „Knochenumbau“ wurden in ähnlicher Weise in vier Grade eingeteilt:

- Grad 1: o. B.
- Grad 2: mild
- Grad 3: moderat
- Grad 4: stark

Anhand der Zellzusammensetzung (Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen) fand eine qualitative Einordnung des entzündlichen Geschehens statt.

4.4.3 Statistik

Für die statistische Auswertung wurden die Parameter

- Zellzahl gesamt (unabhängig vom Zelltyp, als allgemeines Maß für den Entzündungsgrad),
- Fibroplasie und
- Knochenumbau verwendet.

Alle ermittelten Werte wurden in dem Computerprogramm SPSS 11.5 für Windows erfasst und statistisch ausgewertet. Die Überprüfung, ob Ergebnisse als statistisch signifikant betrachtet werden dürfen, wurde im Fall des Parameters „Zellzahl gesamt“ mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson, bei den Parametern „Fibroplasie“ und „Knochenumbau“ anhand des Mantel-Haenszel-Chi-Quadrat-Tests (Zusammenhang linear-mit-linear) vorgenommen. Ein Unterschied wird (bei beiden Tests) dann als statistisch signifikant definiert, wenn die

Wahrscheinlichkeit p für sein Auftreten kleiner oder gleich der kritischen Irrtumswahrscheinlichkeit α von 5 % ist ($p \leq 0,05$).
