

4 Material und Methode

4.1 Herstellung der Schmelzproben

Für diese Untersuchung wurden 33 frisch extrahierte Rinderfrontzähne verwendet, die nach Säuberung bis zur weiteren Verarbeitung in 0,9 % Kochsalzlösung (DeltaSelect, Pfullingen, Deutschland) gelagert wurden. Unter ständiger Wasserkühlung wurde die Wurzel mit einer Bandsäge von den Zähnen abgetrennt, anschließend die Pulpa entfernt und zuletzt vier Schmelzproben pro Zahn, in einer Größe von $3 \times 4 \times 3 \text{ mm}^3$ herauspräpariert (Bandsäge Exakt 300cl, Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland). Jeweils fünf bis sechs Schmelzproben wurden mittels einer Silikonform in Kunstharz (Technovit 4071; Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland) eingebettet. Anschließend wurde die oberste Schicht des Schmelzes mit Schleifpapier abgetragen (Schleifpapier, Körnung 1000; diaplus, Oststeinbeck, Deutschland). Durch eine abschließende Politur (Körnung 2500 und 4000, diaplus) wurden die Schmelzoberflächen unter geringem Substanzabtrag standardisiert und zur etablierten Oberfläche parallelisiert (Abbildung 1).

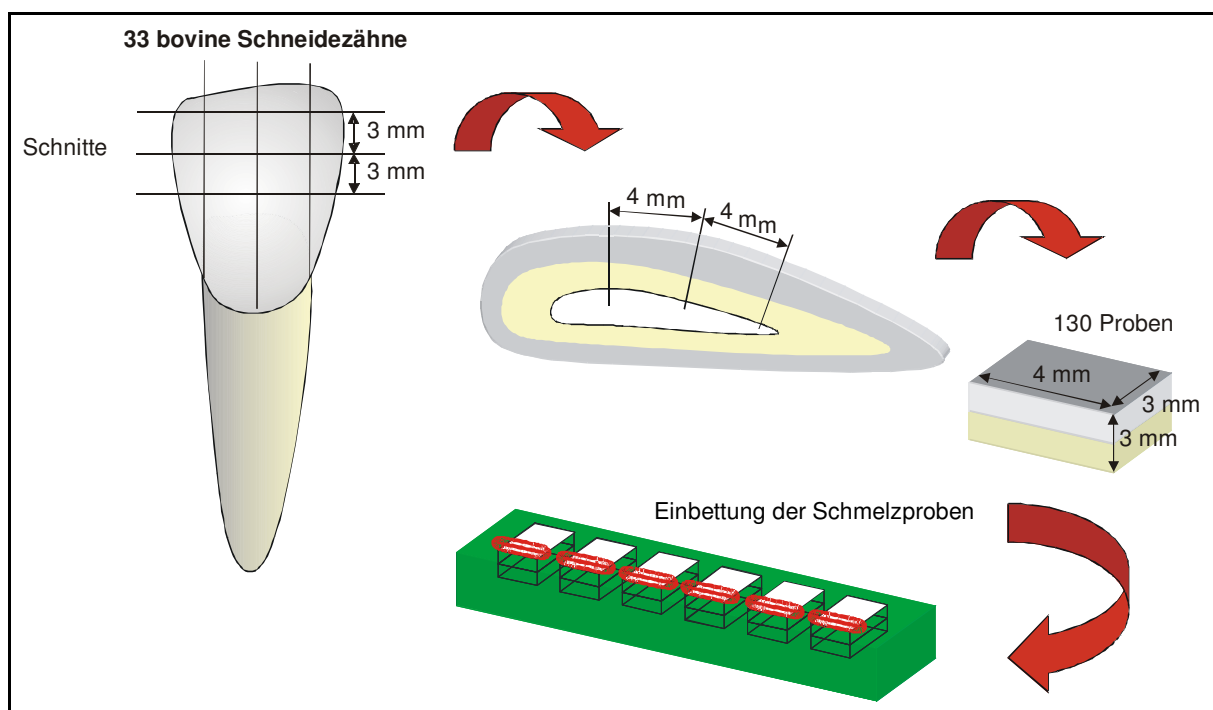


Abbildung 1: Herstellung und Vorbereitung der Schmelzproben.

4.2 Bearbeitung der Schmelzproben

Durch Abdecken des linken Bereichs der Schmelzoberfläche mit Nagellack (Betrix, Frankfurt/Main, Deutschland) wurde eine Vergleichsfläche zur Kontrolle von demineralisiertem und gesundem Schmelz erstellt. Die Schmelzproben wurden zwei Wochen demineralisiert. Für die Demineralisation wurde eine Lösung mit der aus Tabelle 2 ersichtlichen Zusammensetzung verwendet.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Demineralisationslösung nach BUSKES et al. (1985)

Bestandteile	Menge	Konzentration
Kalziumdichlorid-2-hydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	2205 mg	3 mM
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	2040 mg	3 mM
Milchsäure ($\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}$) (90%)	25 ml	50 mM
Kalilauge (KOH) ad pH 5,0	29 ml	10 M
Methylendiphosphonsäure (MHDP)	5,4 mg	6 μM
Thymol ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$)	in Spuren	
Aqua dest (H_2O)	ad 5000 ml	

Die Kalilauge wurde mit 28,055 g Kaliumhydroxidplättchen auf 50 ml Aqua dest. hergestellt.

Die Proben lagerten während der gesamten Demineralisationszeit in einem Wärmeschrank bei 37 °C (Wärmeschrank BR 6000, Heraeus, Hanau, Deutschland). Um die Lösung konstant bei einem pH-Wert von 5,0 zu halten, wurde dieser täglich mit Hilfe eines pH-Meters (pH-Meter CG 840, Schott, Hofheim, Deutschland) kontrolliert. Bei eventuellen Abweichungen wurde bei leichten Erhöhungen mit Milchsäure und bei Abfall mit Kalilauge korrigiert.

Nach Ablauf der zwei Wochen wurden einige Proben unter einem Rasterelektronenmikroskop (Rasterelektronenmikroskop Cam Scan Maxim 2040, Electron Optics LTD, Waterbeach, England) auf ihre Demineralisationstiefe überprüft. Diese musste 70-100 μm betragen, um mit den Untersuchungen fortfahren zu können. Bevor die 130 Schmelzproben gleichmäßig auf die 13 Gruppen verteilt wurden, wurden sie erneut mit Nagellack abgedeckt, um nun einen Vergleich von der gesunden, der demineralisierten und der dem Speichellersatzmittel ausgesetzten Schmelzoberfläche zu erhalten. Dazu wurde die Hälfte der demineralisierten Oberfläche bedeckt.

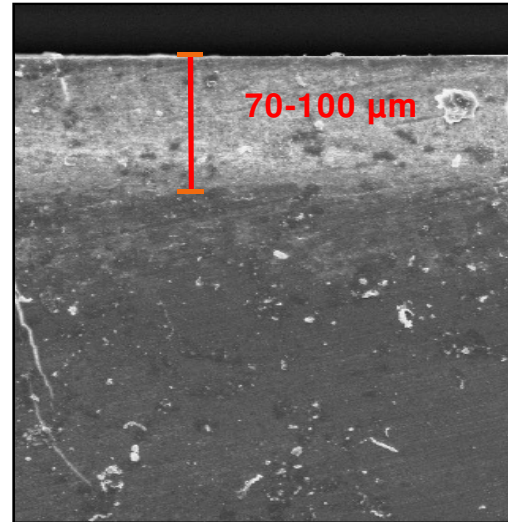


Abbildung 2: REM-Bild einer demineralisierten Schmelzprobe.

4.3 Herstellung der Leinsamenlösungen

Um die Basislösung herzustellen, wurden 50 g Leinsamen auf einem Liter destilliertem Wasser in einem feuerfesten Becherglas über einer Gasflamme erhitzt. Unter ständigem Umrühren wurde dieser Ansatz 20 Minuten gekocht. Anschließend wurde die verdunstete Menge Wasser wieder aufgefüllt und die Schalenreste mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesogen (Wasserstrahlpumpe, Brand, Wertheim, Deutschland). Nach Entfernung der Überreste aus der viskösen Flüssigkeit, wurden anschließend die mit einer Waage (Analysenwaage Typ AG204, Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) abgewogenen Elektrolyte der jeweiligen Gruppen hinzugegeben (Tabelle 3). Die enthaltenen Konservierungsstoffe waren Methyl-4-hydroxybenzoat (E218) und Propyl-4-hydroxybenzoat (E216).

Tabelle 3: Zusammensetzung der verschiedenen Lösungen

Gruppe	Basislösung (g/l)	CaCl ₂ (mg/l)	KH ₂ PO ₄ (mg/l)	NaF (mg/l)	pH
I	Salinum[®]				
II	KCL 1,218 NaCl 0,856 MgCl₂ 0,0244 E218 1,0 E216 0,2 Leinsamen 50 Aqua dest. ad 1 l	-	-	4,4	6,5
III		-	-	4,4	5,5
IV		55,5	-	4,4	6,5
V		55,5	-	4,4	5,5
VI		55,5	111	4,4	6,5
VII		55,5	111	4,4	5,5
VIII		55,5	444	4,4	6,5
IX		55,5	444	4,4	5,5
X		111	222	4,4	6,5
XI		111	222	4,4	5,5
XII		222	444	4,4	6,5
XIII		222	444	4,4	5,5

Abschließend wurden die einzelnen Flüssigkeiten mittels eines Homogenisators (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland) zu einer gleichmäßigen Lösung verrührt.

Für die unterschiedlichen Lösungen wurde der pH-Wert mit Kalilauge und Milchsäure eingestellt, um einen pH-Wert von 5,5 und 6,5 für die einzelnen Gruppen zu erreichen. Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, ergaben sich daraus jeweils die gleichen Elektrolytkonzentrationen bei unterschiedlichem pH-Wert.

In diesen unterschiedlichen Speichersubstituten lagerten die Proben bei einer zweimal täglichen Erneuerung der Lösung (jeweils nach 12 h) zwei Wochen bei 37 °C (CRT Brutschrank Incubat, Melag, Berlin, Deutschland). Der pH-Wert (pH-Meter CG 840, Schott, Hofheim, Deutschland) wurde alle 24 Stunden kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert.

4.4 Messung der Elektrolytkonzentrationen der verwendeten Lösungen

Mittels eines speziellen Ionenmeters (Orion Auto chemistry System 960, Fisher Scientific, Ulm, Deutschland) können unterschiedliche Elektrolytkonzentrationen in einer Lösung ermittelt werden.

4.4.1 Fluoridbestimmung

Die Fluoridkonzentration wurde mit einer Fluoridelektrode (Typ 96-09 BN, Fisher Scientific) ermittelt. TISAB III (Fisher Scientific) wurde für die Messung der Ionenkonzentration der unterschiedlichen Lösungen verwendet. Die Elektrode wurde für die Untersuchung mit 0,1 M Fluoridlösung (Fisher Scientific) standardisiert.

4.4.2 Kalziumbestimmung

Bei dieser Untersuchungsmethode wurde eine Kalziumelektrode (Typ 9700 BN, Fisher Scientific) und eine 4 M Kaliumchloridlösung (Kaliumchlorid, Merck) zur Bestimmung der Konzentration verwendet. Die Elektrode wurde mit einer 0,1 M Kalziumchloridlösung (Kalziumchlorid, Merck) standardisiert.

4.4.3 Phosphatbestimmung

Für die Bestimmung der Phosphatkonzentration wurde ebenfalls die Fluoridelektrode (Typ 96-09 BN, Fisher Scientific) eingesetzt. Zusätzlich wurde 2-Propanol (Merck, Darmstadt, Deutschland), Aqua dest. und 0,1 M Lanthannitrat (Lanthannitrat - Hexahydrat, Merck) benutzt. Zur Standardisierung der Elektrode wurde 0,1 M Fluoridlösung verwendet.

4.5 Untersuchung des Sättigungsgrades

Um den Sättigungsgrad (DS= degree of saturation) der unterschiedlichen Speicheleratzmittel zu bestimmen, wurde das Computerprogramm ION-PRODUCT[®] verwendet. Dieses Programm berechnet das Maß der Ionen (IAP= ionic activity product) und deren Löslichkeitsprodukt (K_s = solubility product) und stellt damit den Grad der Sättigung dar (SHELLIS 1988).

$$DS = IAP / K_s$$

Mittels Eingabe der unterschiedlichen Elektrolytkonzentrationen berechnet das Programm das de- bzw. remineralisierende Potential wässriger Lösungen.

4.5.1 Berechnung der Sättigungsgrade der angesetzten Speicheleratzmittel

In Tabelle 4 sind die zugegebenen Elektrolyte in mM aufgeführt; zusätzlich ist der Sättigungsgrad (DS) der verschiedenen Lösungen angegeben. Die unterschiedlichen Kalzium-, Phosphat- und Fluoridverbindungen, welche in der Lösung gebildet werden, wurden dargestellt. Dabei stellt ein Sättigungsgrad >1 eine übersättigte Lösung dar.

Tabelle 4: Die der Lösungen zugegebenen Fluorid-, Kalzium- und Phosphatkonzentrationen in mM und die zugehörigen berechneten Sättigungsgrade

Gruppe	DS				Ca (mM)	PO ₄ (mM)	F (mM)	pH
	OCP	HAP	FA	CaF ₂				
I	-	-	-	-	Salinum [®]			
II	-	-	-	-	-	-	0,1	6,5
III	-	-	-	-	-	-	0,1	5,5
IV	-	-	-	0,3	0,5	-	0,1	6,5
V	-	-	-	0,3	0,5	-	0,1	5,5
VI	0,7	3,1	10,8	0,3	0,5	0,8	0,1	6,5
VII	0,2	0,6	2,6	0,3	0,5	0,8	0,1	5,5
VIII	1,1	4,7	16,4	0,31	0,5	3,2	0,1	6,5
IX	0,3	0,9	4,1	0,31	0,5	3,2	0,1	5,5
X	1,2	5,6	19,5	0,39	1	1,6	0,1	6,5
XI	0,3	1,1	4,8	0,40	1	1,6	0,1	5,5
XII	2,2	9,9	34,4	0,48	2	3,2	0,1	6,5
XIII	0,6	1,9	8,6	0,49	2	3,2	0,1	5,5

OCP= Oktakalziumphosphat, HAP= Hydroxyapatit, FA= Fluorapatit, CaF₂= Kalziumfluorid

4.6 Viskositätsbestimmung

Die Viskosität einer Flüssigkeit wurde mit Hilfe eines Kapillarviskosimeters nach Ubbelohde ermittelt (Schott, Hofheim, Deutschland).

An einem Kapillarviskosimeter wird der Druckabfall bei konstanter laminarer Strömung längs einer Kapillare gemessen. Die treibende Kraft kann, wie beim Ubbelohde-Viskosimeter, die Schwerkraft sein. Dabei werden die Lösungen zuerst bei 3000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert (Ultrazentrifuge L 70, Beckmann Coulter,

Krefeld, Deutschland). Die Messungen werden alle bei 37 °C mit Hilfe eines temperierten Wasserbades durchgeführt. Die zu untersuchende Lösung wird von einem tiefergelegenen Reservoir durch eine Kapillare in ein höher gelegenes Reservoir gesaugt. Hat die Lösung eine festgelegte Höhe erreicht, wird die Saugkraft abgeschaltet. Die Flüssigkeit fließt nun unter dem Einfluss der Gravitationskraft in das untere Reservoir zurück. Dabei wird die Zeit gemessen, in der ein bestimmtes Volumen die Kapillare passiert hat.

4.7 Vorbereitung der Schmelzproben für die Mikroradiografie

Nach Abschluss der In-vitro-Exposition wurden die Proben senkrecht zu der Oberfläche geschnitten (Bandsäge Exakt 300cl, Exakt, Norderstedt, Deutschland) und die daraus erzeugten Schnittoberflächen poliert (Körnung 2500 und 4000, Exakt). Mit Hilfe von Sekundenkleber (Henkel, Düsseldorf, Deutschland) wurden die Proben auf durchsichtige Plexiglas-Objektträger (diaplust, Oststeinbek, Deutschland) geklebt.

Unter ständiger Wasserkühlung mit einer 200 µm dicken, diamantierten Bandsäge (Bandsäge Exakt 300cl, Exakt) wurden Schnitte von ungefähr 300 µm Dicke erstellt. Die Vorschubkraft des Probentisches betrug 50 g und die Schnittgeschwindigkeit der Säge wurde auf 200 m/min eingestellt.

Mit gewässertem Schleifpapier mit aufsteigender Körnungszahl von 1200, 2500 und 4000 (Exakt) erfolgte die definitive Parallelisierung und Glättung mit einer Mikroschleifapparatur (Schleifsystem Exakt 400cs, Exakt). Die abschließende Schliffdicke der Proben betrug 100 µm, die mit einem digitalen Mikrometer (Mikrometerschraube, Mitutoyo, Neuss, Deutschland) bei einer Genauigkeit von 1 µm überprüft wurde. Dadurch waren die Proben für die mikroradiografische Untersuchung vorbereitet.

Nach diesen Vorbereitungen wurden eventuelle im Randbereich der Proben befindliche Kunstharzreste entfernt. Anschließend wurden die Proben auf spezielle Probenhalter (TMR-Probenhalter, Plano, Wetzlar, Deutschland) mittels Leukofix (Beiersdorf, Hamburg, Deutschland) fixiert (Abbildung 3).

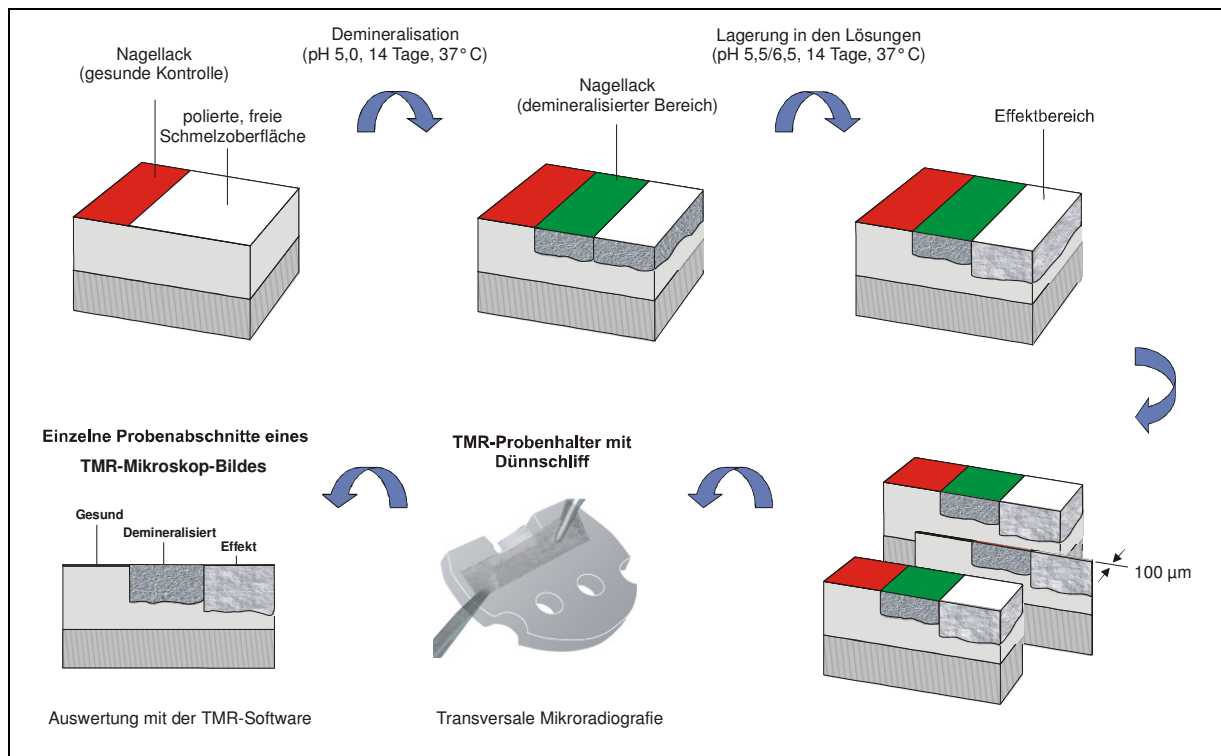


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Lagerung der Proben und der Dünnschliffpräparation für die mikroradiografische Auswertung (TMR).

4.8 Einführung in die transversale Mikroradiografie

Die Mikroradiografie ist eine Standardmethode für die qualitative und quantitative Auswertung von Kariesstudien. Mit der transversalen Mikroradiografie ist es möglich, den Mineralverlust ($\text{Vol.}\% \times \mu\text{m}$) und die Läsionstiefe (μm) einer Demineralisation zu bestimmen.

Die Grundlagen zur Auswertung dieser Untersuchung waren die während der Versuchsdurchführung entstandenen unterschiedlich bearbeiteten Schmelzbereiche. In diesem Fall war es der „gesunde“ Kontrollbereich, die demineralisierte Oberfläche und die den Speichersatzlösungen ausgesetzte Oberfläche. Dabei diente der Mineralgehalt der unbehandelten, intakten Schmelzoberfläche als Grundlage für die Berechnung des Mineralverlustes und der Läsionstiefe. Bei der Messung wurden anschließend der demineralisierte und dem Speichersatzmittel ausgesetzte Bereich einer Probe festgehalten.

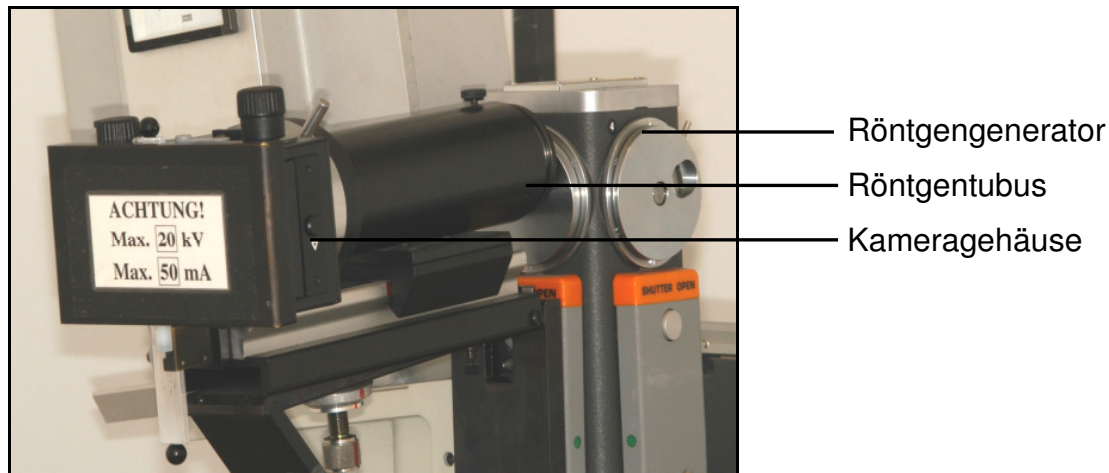


Abbildung 4: Mikroradiografisches Gerät zur Herstellung der Aufnahmen.

4.8.1 Herstellung der Mikroradiogramme

Für die mikroradiografische Untersuchung der Schmelzproben wurden Aufnahmen mit einem speziellen Kameragehäuse durchgeführt (Abbildung 4). Die Probenhalter wurden, um die Läsionen mikroradiografisch darzustellen, mit den darin befindlichen Schmelzproben in die Röntgenröhre des Röntgenstrahlgenerators montiert. Dieses Gehäuse war an der „Objektivseite“ mit dem Röntgentubus des Röntgengenerators (Röntgenstrahlgenerator PW 1730/10, Philips, Eindhoven, Niederlande) gekoppelt. In dem Kameragehäuse war auf Filmhöhe eine Aluminium-Eichtreppe, bestehend aus reinem Aluminium, für die transversale Mikroradiogramme montiert. Diese setzte sich aus zwei separaten Treppen zusammen, die jeweils aus zehn Stufen mit einer Breite von einem Millimeter bestand. Die Aluminium-Eichtreppe diente zur Kalibrierung des Computers für die Auswertung der mikroradiografischen Filme. Links neben dieser Eichtreppe befand sich ein Aluminiumschlitten, der für die Aufnahme der TMR-Probenhalter (TMR Probenhalter, Plano, Wetzlar, Deutschland) benötigt wurde (Abbildung 5). Die Aufgabe des Aluminiumschlittens bestand darin, die exakte Position der Schmelzproben zu der Aluminium-Eichtreppe während der mikroradiografischen Aufnahme zu gewährleisten. Zur Erstellung der Mikroradiogramme diente ein hochauflösender, holografischer Film (high speed holographic film SO 253, Kodak, Stuttgart, Deutschland), der in einer lichtundurchlässigen Kassette auf eine handelsübliche Filmrolle manuell aufgespult wurde. Der Probenhalter mit der Schmelzprobe wurde zunächst vorsichtig getrocknet und anschließend in den Probenträgerhalter des Aluminiumschlittens eingelegt, dadurch hatten die Proben direkten Kontakt zu den unmittelbar dahinter befindlichen

Film. Die Schmelzprobe auf dem Probenhalter wurde somit zusammen mit der Eichtreppe durch Röntgenstrahlen auf den Film projiziert. Die Röntgenstrahlen wurden dabei in einer vertikal montierten Röntgenröhre (PW 1730/10, Phillips, Eindhoven, Niederlande) von einer Kupferanode mit Nickelfilterung emittiert. In Vorversuchen war eine Belichtungszeit von 20 Sekunden, eine Röhrenspannung von 20 kV und ein Röntgenstrom von 40 mA definiert worden. Um die Proben auszutauschen, konnte der Aluminiumschlitten problemlos (ohne den Film zu belichten) bei geschlossenem Kameragehäuse herausgezogen werden (Abbildung 5).

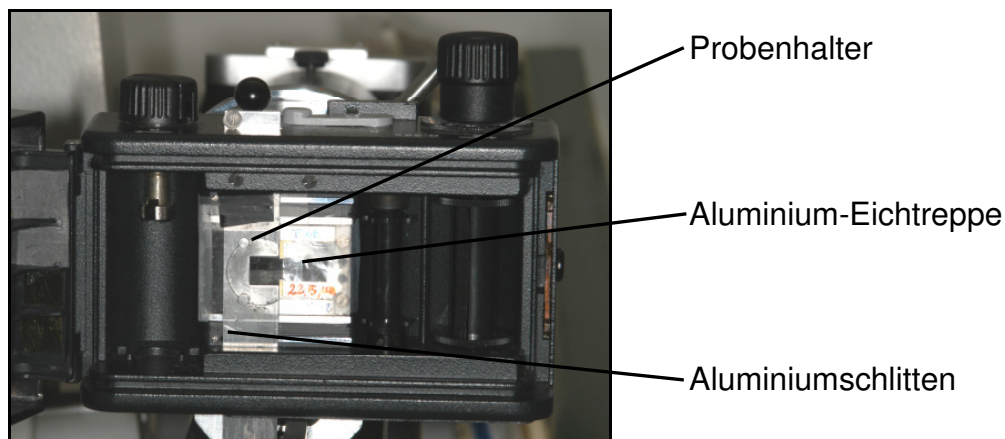


Abbildung 5: Aufbau innerhalb der Kamera.

Nach der Entwicklung der mikroradiografischen Aufnahmen, wurden diese mit einem Universalmikroskop (Durchlichtmikroskop 60318, Zeiss, Oberkochen, Deutschland), an dem eine Videokamera (CCD Videokamera Modul XC77CE, Sony, Tokio, Japan) angeschlossen war, untersucht. Mit dem Computerprogramm Transversal Micro Radiography (TMR für Windows, Version 2.0.27.2; Inspektor Research Systems BV, Amsterdam, Niederlande) erfolgte die Berechnung der Läsionstiefe und des Mineralverlustes.

4.9 Statistische Auswertung

Die im Rahmen der mikroradiografischen Untersuchung ermittelten Mineralverluste und Läsionstiefen nach der Demineralisation und nach Lagerung in den Speichelsubstituten wurden der Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen. Die Einzeltests zwischen den Gruppen erfolgten mit einem korrigiertem post-hoc Test nach BONFERRONI. Der nach Lagerung in den Lösungen veränderte Mineralverlust der demineralisierten Schmelzproben ($d_{\min} = \min.d - \min.e; \text{Vol}\% \times \mu\text{m}$) und die Läsionstiefe ($d_{\text{It}} = \text{It}.d - \text{It}.e$) wurde untersucht. Das allgemeine lineare Modell (ALM) wurde verwendet, um den Effekt der Faktoren Kalzium, Phosphat und pH-Wert auf die Veränderung des Mineralverlustes und der Läsionstiefe zu bestimmen. Unterschiede des Mineralverlustes bzw. der Läsionstiefe vor und nach Lagerung der Proben in den Speichelersatzmitteln wurde mit dem t-Test ermittelt. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt.