

4. Material und Methode

4.1 Präparation der Schmelzproben

Um auf eine Gesamtanzahl von 217 standardisierten und damit vergleichbaren Proben zu gelangen, wurden für die Untersuchung 55 frisch extrahierte Rinderfrontzähne verwendet, die nach behutsamer Säuberung bis zur weiteren Verarbeitung bei 37 °C (CRT Brutschrank Incubat, Melag, Berlin, Deutschland) in 0,9 %ige Kochsalzlösung (NaCl-Lösung 0,9 %, DeltaSelect, Pfullingen) gelagert wurden. Aus den Labialflächen wurden daraufhin jeweils vier Schmelzproben ($3 \times 4 \times 2 \text{ mm}^3$) (Abb. 5) unter Wasserkühlung herauspräpariert (Bandsäge Exakt 300cl, Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland). Diese wurden

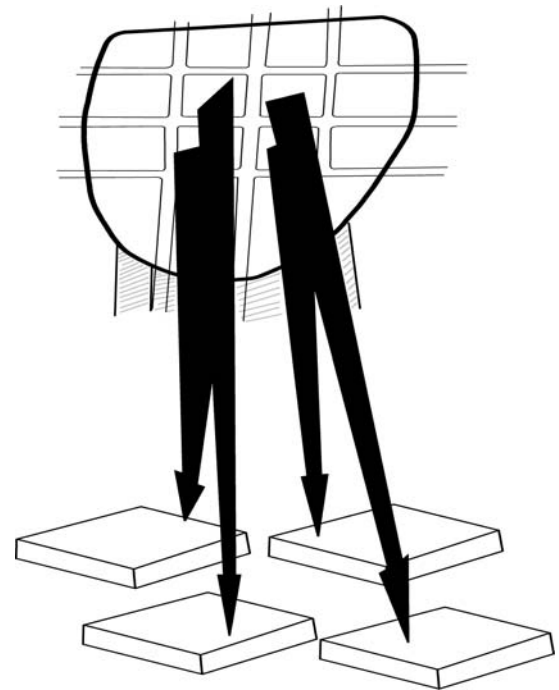


Abb. 5: Vier aus der labialen Zahnfläche herauspräparierte Schmelzproben.

anschließend mit Hilfe von Silikonformen in Kunstharz (Technovit 4071; Kulzer; Wehrheim, Deutschland) zu Gruppen à sechs Stück eingebettet. Nach vollständiger Aushärtung des Kunstharzes wurden die nach außen zeigenden Schmelz- und Kunstharzoberflächen mit einer Poliermaschine (Poliermaschine Phoenix Alpha, Buehler, Düsseldorf, Deutschland) und Schleifpapier (Schleifpapier: Körnung 1200, 2400, 4000; Exakt, Norderstedt, Deutschland) zunehmender Körnung unter geringem Substanzabtrag standardisiert geglättet und zur etablierten Oberfläche parallelisiert. Dabei wurden etwa 300 µm der äußeren Schmelzschicht entfernt. Die Umdrehungszahl der Poliermaschine war auf 300 U/min eingestellt. Der äußere Bereich der hochglanzpolierten Schmelzoberfläche wurde anschließend mit Nagellack abgedeckt, um später als Referenzwert gegenüber den de- und remineralisierten Nachbarflächen zu dienen (Abb. 6). Die 217 in Kunststoff eingebetteten Proben wurden bis zu Beginn der Demineralisationsphase bei 37 °C in 0,9 %iger Kochsalzlösung gelagert.

4.2 Demineralisation der Proben

Die standardisiert hergestellten Schmelzproben wurden für zwei Wochen (n = 190) bzw. vier Wochen (n = 27) bei 37 °C in einem Wärmeschrank (Wärmeschrank BR 6000, Heraeus, Hanau, Deutschland) demineralisiert. Als Demineralisationsmedium diente eine spezielle Lösung [BUSKES et al. 1985] (Tab.8). Dabei wurde der pH-Wert (5,0) täglich mit Hilfe eines pH-Meters kontrolliert (pH-Meter CG 819, Schott, Hofheim, Deutschland) und im Falle einer Abweichung korrigiert (Zugabe von Milchsäure bei Erhöhung, KOH bei Erniedrigung), so dass während der zwei- bzw. vierwöchigen Demineralisationsdauer ein konstanter pH-Wert von 5,0 eingehalten werden konnte. Anschließend wurde anhand von vier Proben unter dem Rasterelektronenmikroskop (Rasterelektronenmikroskop Cam Scan Maxim 2040, Electron Optics LTD, Waterbeach, England) die fortgeschrittene und gewünschte Demineralisationstiefe in Höhe von 70-100 µm kontrolliert.

Nach abgeschlossener Demineralisation wurde ein weiterer Bereich jeder Probenoberfläche mit Nagellack abgedeckt (Abb. 6). Bis zur zweiwöchigen Lagerung in den unterschiedlichen Speicheleratzlösungen wurden die Proben wieder in Kochsalzlösung gelagert.

Tab. 8: Zusammensetzung der Demineralisationslösung [BUSKES et al. 1985]

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

4.3 Ansetzen der unterschiedlichen Lösungen

Um die unterschiedlichen Lösungen, basierend auf Magensaftmucin vom Schwein, herzustellen, wurden die einzelnen Bestandteile der verschiedenen Lösungen mit der entsprechenden Menge Aqua dest. mit einem Homogenisator (Ultra - Turrax T25, Janke & Kunkel, IKA[®] - Labortechnik, Staufen, Deutschland) zu einer gleichmäßigen Lösung verrührt. Die genauen Bestandteile der unterschiedlichen Lösungen sind Tabelle 9 zu entnehmen.

4.4 Durchführung des Hauptversuches sowie des Zusatzversuches

Die vorbehandelten Schmelzproben wurden in 19 Gruppen à 10 Proben (Teil 1) bzw. in 3 Gruppen (B1-B3) à 9 Proben (Teil 2) aufgeteilt. In den unterschiedlichen Lösungen lagerten die Proben für 14 Tage bei 37 °C (CRT Brutschrank Incubat), wobei das Lösungsbad zweimal täglich (jeweils nach 12 h) vollständig erneuert wurde (Tab. 9). Der pH-Wert der einzelnen Lösungen wurde dabei vor dem Lösungswechsel jeweils nach 12 Stunden auf einen Wert von pH 5,5 bzw. 6,5 kontrolliert und bei einem Toleranzbereich von $\pm 0,05$ gegebenenfalls durch Zugabe von Milchsäure bei Erhöhung bzw. durch Zugabe von KOH bei Erniedrigung des pH-Wertes korrigiert. Nach Ablauf der zweiwöchigen Versuchsdauer wurden die Proben der unterschiedlichen Gruppen in 19 mit Kochsalzlösung gefüllten Gefäßen gelagert.

4.5 Vorbereitung der Proben für die Mikroradiografie

Im Anschluß an die In-vitro-Exposition wurden die Proben senkrecht zur demineralisierten Oberfläche getrennt (Bandsäge Exakt 300cl, Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland). Die entstandenen Schnittflächen wurden daraufhin mit aufsteigender Körnung poliert (Körnung 2500, 4000) und die Probe an der polierten Schnittfläche mit Hilfe eines Sekundenklebers (Uhu[®], Bühl, Deutschland) auf einen Objektträger aus Plexiglas (diaplust; Oststeinbeck, Deutschland) fixiert. Bei konstanter Wasserkühlung wurden anschließend mit einer 200 µm dicken, diamantierten Bandsäge (Bandsäge Exakt 300cl, Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland)

planparallele Schnitte von ca. 350 µm Dicke hergestellt. Die Vorschubkraft des Probenstisches betrug dabei 50 g, die Schnittgeschwindigkeit der Säge war auf 200 m/min eingestellt.

Tab. 9: Bestandteile und Sättigungsgrade der unterschiedlichen Lösungen

Gruppe	CaCl ₂ [mM]	KH ₂ PO ₄ [mM]	NaF [mM]	pH	Sättigungsgrad in einer wässrigen Lösung					
					theoretisch			gemessen		
					OCP	HAP	FAP	OCP	HAP	FAP
1	Saliva Orthana®			6.7	--	--	--	--	--	--
2	--	--	--	6.5	0	0	0	0	0	0
3	--	--	--	5.5	0	0	0	0	0	0
4	--	--	2	6.5	0	0	0	0	0	0
5	--	--	2	5.5	0	0	0	0	0	0
6	0.5	--	2	6.5	0	0	0	0	0	0
7	(0.17)	--	2	5.5	0	0	0	0	0	0
8	0.5	0.8	2	6.5	0.7	3.1	11	0.4	1.7	6
9	(0.17)	0.8	2	5.5	0.2	0.6	2	0.1	0.3	1
10	0.5	3.2	2	6.5	1.1	4.7	16	0.7	2.6	9
11	(0.17)	3.2	2	5.5	0.3	0.9	4	0.2	0.5	2
12	1	1.6	2	6.5	1.2	5.6	20	0.6	2.6	9
13	(0.25)	1.6	2	5.5	0.3	1.0	5	0.2	0.5	2
14	1	6.4	2	6.5	1.9	8.1	28	1.0	3.8	13
15	(0.25)	6.4	2	5.5	0.5	1.6	7	0.3	0.8	3
16	2	3.2	2	6.5	2.2	9.9	34	1.1	4.5	16
17	(0.47)	3.2	2	5.5	0.6	1.9	9	0.3	0.9	4
18	2	12.8	2	6.5	3.2	13	47	1.6	6.1	21
19	(0.47)	12.8	2	5.5	1.0	2.9	13	0.5	1.3	6
B1	--	--	--		0	0	0	0	0	0
B2	2	2.6	2	5.5	0.5	1.8	8	0.3	0.8	4
B3	20	51	2		3.9	12	5.3	1.8	5.2	23
	(4)									

Die anhand des Computerprogramms ION-PRODUCT® [SHELLIS 1988] berechneten Sättigungsgrade der verschiedenen Speichersatzlösungen werden dargestellt.

Alle Lösungen enthielten zusätzlich Muzin vom Schwein (30 g/l), KCl (16 mM), NaCl (15 mM), MgCl₂ (0,5 mM) sowie Methylhydroxybenzoesäure (6,5 mM) und Propylhydroxybenzoesäure (1 mM).

Ein Sättigungsgrad > 1 bedeutet eine Übersättigung zugunsten des Salzkomplexes und wird dunkel hervorgehoben. Abkürzungen: OCP (Octakalziumphosphat), HAP (Hydroxylapatit), FAP (Fluorapatit); (Kursiv in Klammern: gemessene Kalziumkonzentration.)

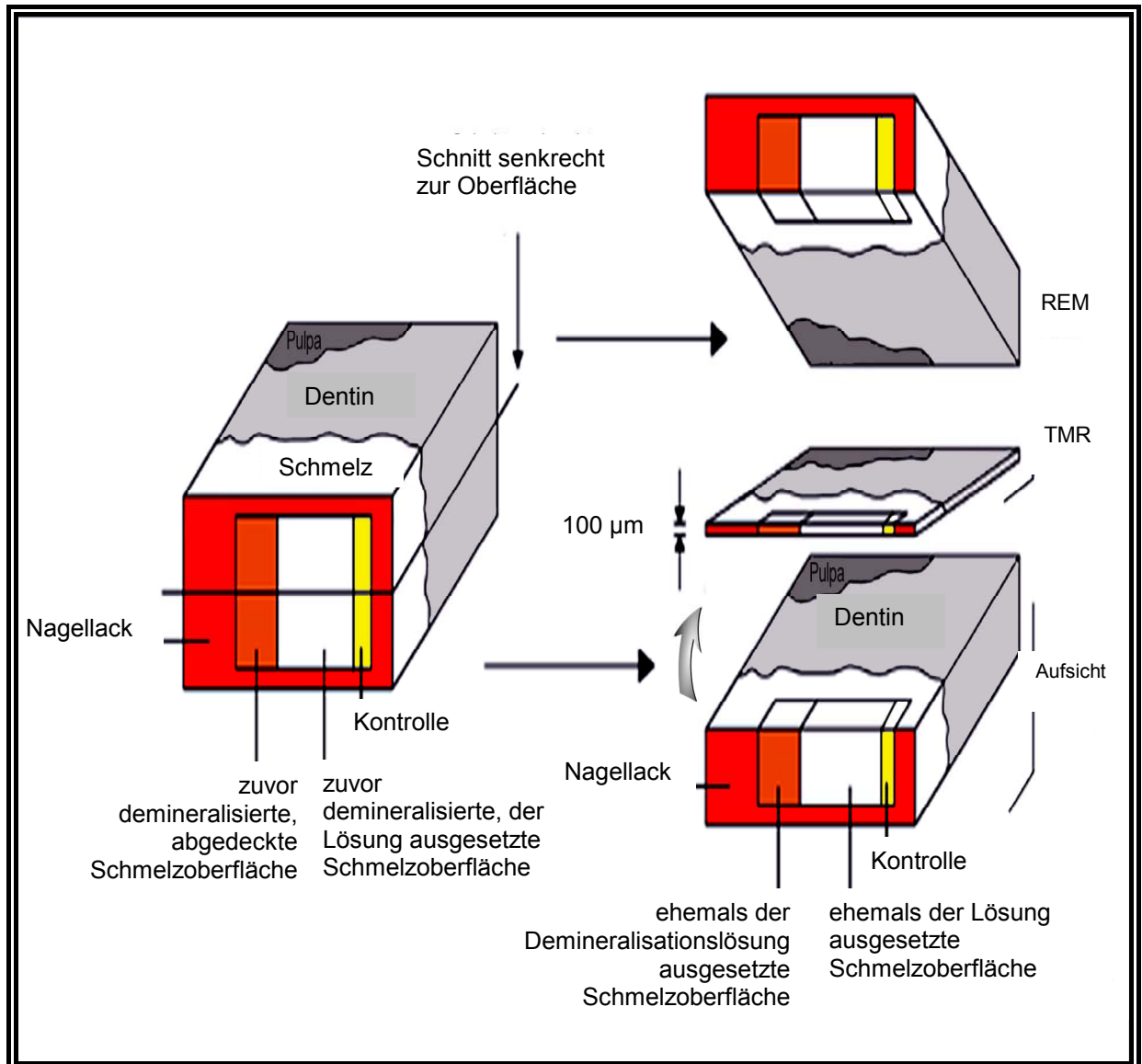


Abb. 6: Schematische Darstellung der Dünnschliffpräparation für die mikroradiografische (TMR) Auswertung.

Die folgende Parallelisierung und Glättung der Proben erfolgte in Anlehnung an frühere Studien [KIELBASSA und SHOHADAI 1999] mit einem gewässerten Schleifpapier (Körnung 1200, 2400 und 4000) in einer Mikroschleifapparatur (Exakt Mikroschleifsystem, Exakt Apparatebau). Die definitive Schliffdicke der Probenschliffe betrug 100 µm. Die Dicke der Proben wurde mit einem digitalen Mikrometer bei einer Genauigkeit von 0,001 mm überprüft (Digimatic Bügelmessschraube, Mitutoyo, Kawasaki, Japan).

4.6 Das Prinzip der Transversalen Mikroradiografie (TMR)

Mit Hilfe der transversalen Mikroradiografie ist man in der Lage, den Mineralverlust (mineral loss) einer Probe (ausgedrückt in Vol.% \times μm) und die Läsionstiefen (in μm) zerstörungsfrei zu bestimmen. Dadurch wird nicht nur der oberflächliche Mineralverlust innerhalb der Probe, sondern auch die Läsionstiefen erkannt und quantifiziert.

Drei unterschiedliche Bereiche innerhalb einer Probe konnten klar voneinander unterschieden werden: Der Originalzustand als Kontrollbereich (gesunder Bereich), die standardisiert demineralisierte Oberfläche und die den Lösungen ausgesetzte Oberfläche, welche als „Effektbereich“ bezeichnet wird. Der Kontrollbereich gab den Mineralgehalt der intakten, unbehandelten Probenoberfläche im Originalzustand wieder und diente als Referenzwert für die Berechnung des Mineralverlustes und der Läsionstiefe. Anschließend wurden die zwei Bereiche erfasst, die den demineralisierten Probenbereich sowie die der einzelnen Lösungen ausgesetzten Bereiche darstellten.

Die mikroradiografischen Aufnahmen wurden in einem speziellen Kameragehäuse vorgenommen, das mit der „Objektivseite“ am Röntgentubus des Röntgengenerators gekoppelt war (Abb. 8). In dem Kameragehäuse war auf Filmhöhe eine Aluminium-Eichtreppe (Step wedge) für transversale Mikroradiogramme montiert, die für die Auswertung der später erfassten Bereiche benötigt wurde. Rechts daneben befand sich ein Aluminiumschlitten zur Aufnahme der TMR-Probenhalter (Abb. 8) (TMR-Probenhalter; Plano, Wetzlar, Deutschland), der die Probe in Beziehung zur Aluminiumeichtreppe während der mikroradiografischen Aufnahmen in einer exakten Position hielt. Der AL-Schlitten wurde bei geschlossenem Kameragehäuse mit eingelegtem Film entnommen und die Probe anschließend gewechselt. Die AL-Eichtreppe diente zur Kalibrierung des Computers für die Auswertung der mikroradiografischen Filme.

Die Probe auf dem TMR-Probenhalter wurde zusammen mit dieser AL-Eichtreppe durch Röntgenstrahlung auf einen hochauflösenden Film (high speed holographic film; Kodak SO 253; Stuttgart, Deutschland) projiziert. Dabei wurden die Röntgenstrahlen in einer vertikal montierten Röntgenröhre (PW 1730, Phillips, Kassel, Deutschland) von einer Kupferanode mit Nickelfilterung emittiert.

4.7 Herstellen der Mikroradiogramme

Die auf ca. 100 µm Dicke parallelisierten Dünnschliffe wurden mit einem Skalpell aus den Kunststoffresten vollständig herausgeschnitten und auf spezielle TMR-Probenhalter (TMR-Probenhalter; Plano, Wetzlar, Deutschland) fixiert. Hierzu diente ein schmaler Klebestreifen (Leukofix, Beiersdorf, Hamburg, Deutschland), der der Probe unterhalb der Probenoberfläche



Abb. 7: Mikrohalter mit Probenfixation vor mikroradiografischer Fotografie.

befindlichen Probe wurde durch kurzzeitiges Trocknen der Proben mittels Druckluft vorsichtig von Kochsalzlösung befreit, getrocknet und im Anschluss in die Röntgenröhre eines speziellen Röntgenstrahlengenerators (PW 1730/10, Philips, Eindhoven, Niederlande) eingeführt (Abb. 8).

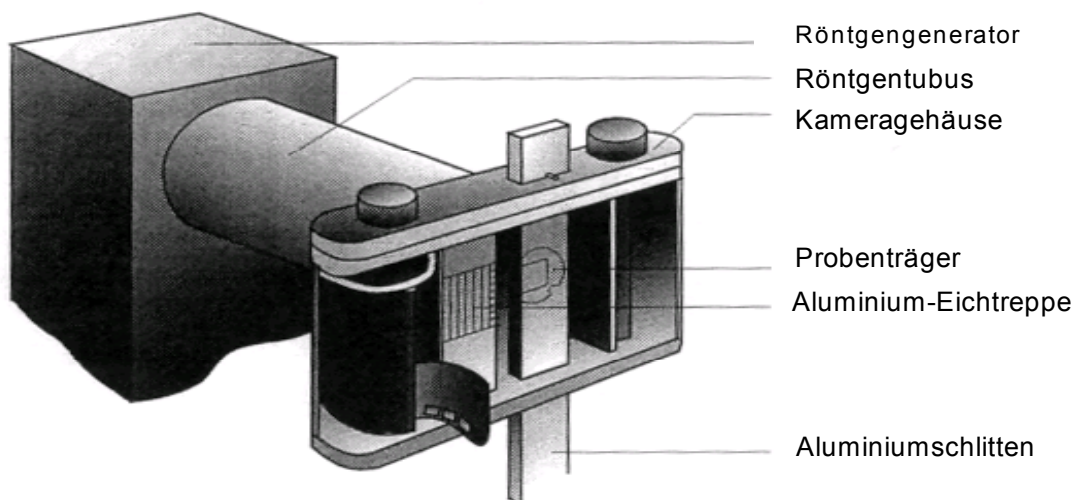


Abb. 8: Röntgentubus mit Kammergehäuse.

Die Belichtung der mikroradiografischen Filme erfolgte bei einer Röhrenspannung von 20 kV, einem Röhrenstrom von 40 mA und einer Belichtungszeit von 20 Sekunden. In Vorversuchen waren diese Einstellungsparameter evaluiert worden. Ein spezieller hochempfindlicher, hochauflösender, holografischer Spezialfilm (high speed holographic film; Kodak SO 253; Stuttgart, Deutschland), der in einer lichtundurchlässigen Kassette auf eine handelsübliche Filmrolle manuell aufgespult wurde, diente dem Erstellen der Mikroradiogramme. Unbelichtet wurde die Filmrolle daraufhin in das Kameragehäuse eingelegt und die Kamera wurde geschlossen. Anschließend wurde der TMR-Probenhalter in den Probenträgerhalter des AL-Schlittens eingelegt und das Kameragehäuse bis zum Anschlag eingeschoben. Die Probenoberfläche war somit parallel zum Film ausgerichtet.

Nach jeder Belichtung wurde der Film bei geschlossenem Kameragehäuse weitertransportiert. Die jeweiligen Proben wurden nach dem Röntgen wieder in Kochsalzlösung aufbewahrt, um ein Austrocknen zu vermeiden.

4.8 Mikroradiografische Auswertung

Nach der Entwicklung wurden die mikroradiografischen Einzelaufnahmen mit einem Durchlichtmikroskop (Durchlichtmikroskop 60318, Zeiss, Oberkochen, Deutschland), an dem eine Videokamera (CCD-Videokamera Modul XC 77CE, Sony, Japan) angeschlossen war, untersucht. Die Berechnung der Läsionstiefe und des Mineralverlustes erfolgte mit dem Programm Transversal Micro Radiography (TMR für Windows, Version 2.0.27.2, Inspektor Research System BV, Amsterdam, Niederlande).

4.9 Kalziummessungen

Die Kalziumkonzentrationen der unterschiedlichen muzinbasierten Lösungen wurden nach Zugabe von 0,5-32 mM Kalzium durch Messungen von Triplets jeder Gruppe gemessen (Orion Auto Chemistry System 960; Fisher Scientific, Ulm, Germany). Dabei wurde eine mit einer 0,1 M CaCl_2 -Lösung (Merck) geeichten Ionenspezifische Elektrode verwendet. Außerdem wurde die Ionenstärke der unterschiedlichen Proben durch Zugabe von NaCl (1:10) (Merck) gewährleistet.

4.10 Statistische Auswertung

Die unterschiedlichen Mineralverluste ($\Delta\text{Min} = \text{min.d} - \text{min.e} ; \text{Vol.}\% \times \mu\text{m}$) und Läsionstiefen ($\Delta\text{Lt} = \text{lt.d} - \text{lt.e} ; \mu\text{m}$), die anhand der mikroradiografischen Untersuchungen ermittelt wurden, wurden der Varianzanalyse unterzogen (ANOVA). Dabei handelte es sich um die zu Beginn des Versuchsablaufes standardisiert demineralisierten Schmelzbereiche und denen in Lösungen ausgesetzten Bereichen. Die Einzelvergleiche zwischen den verschiedenen Gruppen erfolgten nach Bonferroni. Der Vergleich zwischen den Mineralverlusten und Läsionstiefen nach Demineralisation und den Mineralverlusten/Läsionstiefen nach Einwirkung der verwendeten Lösungen innerhalb einer Probe erfolgte mit dem t-Test (SPSS 11.5, SPSS, München, Deutschland).

Der Bonferroni-Test überprüft, ob die unterschiedlichen Ionenkonzentrationen einen signifikanten Einfluss auf den Mineralverlust und die Läsionstiefen hatten. Das Signifikanzniveau wurde mit 5 % festgelegt. Ein Allgemeines Lineares Modell (ALM/GLM) wurde auf den unterschiedlichen Mineralgehalt (ΔMin) und die unterschiedliche Läsionstiefe der Gruppen 4 bis 19 in Bezug auf die Wechselwirkungen der Variablen Kalzium, Phosphat und dem pH-Wert mit einem Signifikanzniveau von 0,05 % angewendet. Der Einfluss der Faktoren Kalzium, Phosphat und Fluorid auf die Variablen ΔMin und ΔLt wurde mit dem Allgemeinen Linearen Modell (ALM) überprüft. Der Vergleich zwischen den zusammengefassten Gruppen gleicher Kalzium-, Phosphat- und Fluorid-Konzentrationen erfolgte mit dem Bonferroni Test.