

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Probanden

Als Probanden stellten sich zehn gesunde Personen zur Verfügung. Anamnestisch wurden Allgemeinerkrankungen, die die Speichelfließrate und das Mundhöhlenmilieu beeinflussen könnten und die Einnahme von Medikamenten, ausgeschlossen. An der Studie durften ausschließlich Probanden im Alter zwischen 22 und 50 Jahren, die ein durchschnittliches Kariesvorkommen (DMF-T 5-15) und keinerlei schwerwiegende Parodontalerkrankungen aufwiesen (PBI < 0,5; ST < 4mm), teilnehmen. Alle Probanden wurden hinsichtlich offener und behandlungsbedürftiger Läsionen untersucht und gegebenenfalls vor Beginn der Studie konservierend versorgt.

Aufgrund des In-situ-Studiendesigns mit Verwendung humaner Schmelzproben wurde ein Antrag zur Erteilung eines Votums an die Ethikkommission gestellt. Nach der Zulassung des Antrags zur Durchführung der geplanten Studie erklärten die Teilnehmer schriftlich ihre Einwilligung und erhielten eine Probandeninformation (informed consent), in der sie ausführlich über den Sinn und Zweck der Studie aufgeklärt und hinsichtlich des Verhaltens während der Tragezeit instruiert wurden. Darüber hinaus wurde jeder der Probanden mit der Handhabung der Kunststoffapparatur persönlich vertraut gemacht.

Zusätzlich konnten sich die Probanden jederzeit an eine Bezugsperson wenden, die für Fragen und auftretende Probleme erreichbar war. Alle Probanden nahmen freiwillig an der Studie teil. Es war gewährleistet, dass zu jeder Zeit die Teilnahme ohne Angabe von Gründen abgebrochen werden konnte.

4.2. Schmelzproben

4.2.1. Gewinnung der Schmelzproben

Zur Herstellung der Schmelzproben wurden zur Extraktion indizierte, impaktierte oder noch nicht in die Mundhöhle durchgebrochene und daher auch kariesfreie, humane Weisheitszähne verwendet. Die Zähne wurden in einem Zeitraum von 3 Monaten in verschiedenen Berliner Zahnarztpraxen gesammelt und in 0,9%iger Kochsalzlösung (NaCl-Lösung 0,9 %; Delta Select, Pfullingen, Deutschland), die mit 0,1%iger Thymollösung (Thymol > 99 % ; Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt war, gelagert. Nach vorsichtiger Reinigung wurden aus den Zähnen unter ständiger Wasserkühlung in mehreren Präparationsschritten kleine Schmelzblöcke mit Hilfe einer diamantierten Bandsäge herauspräpariert (Bandsäge Exakt

300cl; Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland). Der erste Sägeschnitt in der Horizontalebene verlief dabei in Höhe der tiefsten Fissur, um das Höcker-Fissurenrelief der Zähne zu entfernen. Parallel dazu erfolgte der zweite Schnitt ca. 1 mm oberhalb der Schmelz-Zement-Grenze, um die Zahnkrone von ihren Wurzeln zu trennen. Nun konnte aus allen geraden oder nur schwach gekrümmten Flächen einer Zahnkrone die endgültige Form $3 \times 3 \times 2 \text{ mm}^3$ herausgeschnitten werden.

4.2.2. Sterilisation der Schmelzproben

Die so vorbereiteten Proben wurden mit Ethylenoxid bei 55 °C bedampft (gassterilisiert) und anschließend für vier Wochen in sterile Kochsalzlösung gelegt, welche täglich ausgewechselt wurde, um auf diese Weise eventuell verbliebene Reste des Ethylenoxids ausdampfen zu lassen (Gelhard et al. 1979).

4.2.3. Vorbereitung der Proben

Alle Proben konnten nun mit Hilfe von Silikonformen in einen kaltpolymerisierenden Kunstharz (Technovit 4071; Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) eingebettet werden. Mittels einer Poliermaschine (Schleif- und Poliermaschine Phoenix Alpha; Wirtz-Buehler, Düsseldorf, Deutschland) wurden diese parallel zur Oberfläche in aufsteigender Reihenfolge der Korngrößen plangeschliffen und poliert (Körnung: 500, 1200, 2500, 4000, Silicon Carbide grinding Paper, Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland).

4.2.4. Einlegen der Proben in die Demineralisationslösung

Die Demineralisationslösung diente zur Erzeugung einer kariesähnlichen Läsion mit intakter Oberflächenschicht. Bei allen Schmelzproben wurde ca. die Hälfte der Oberfläche mit einem Nagellack (Betrix, Frankfurt/Main, Deutschland) bedeckt (Abb. 4), der diesen Probenanteil vor einer Demineralisation schützen und bei späteren Messungen einen Ausgangsreferenzwert liefern sollte.

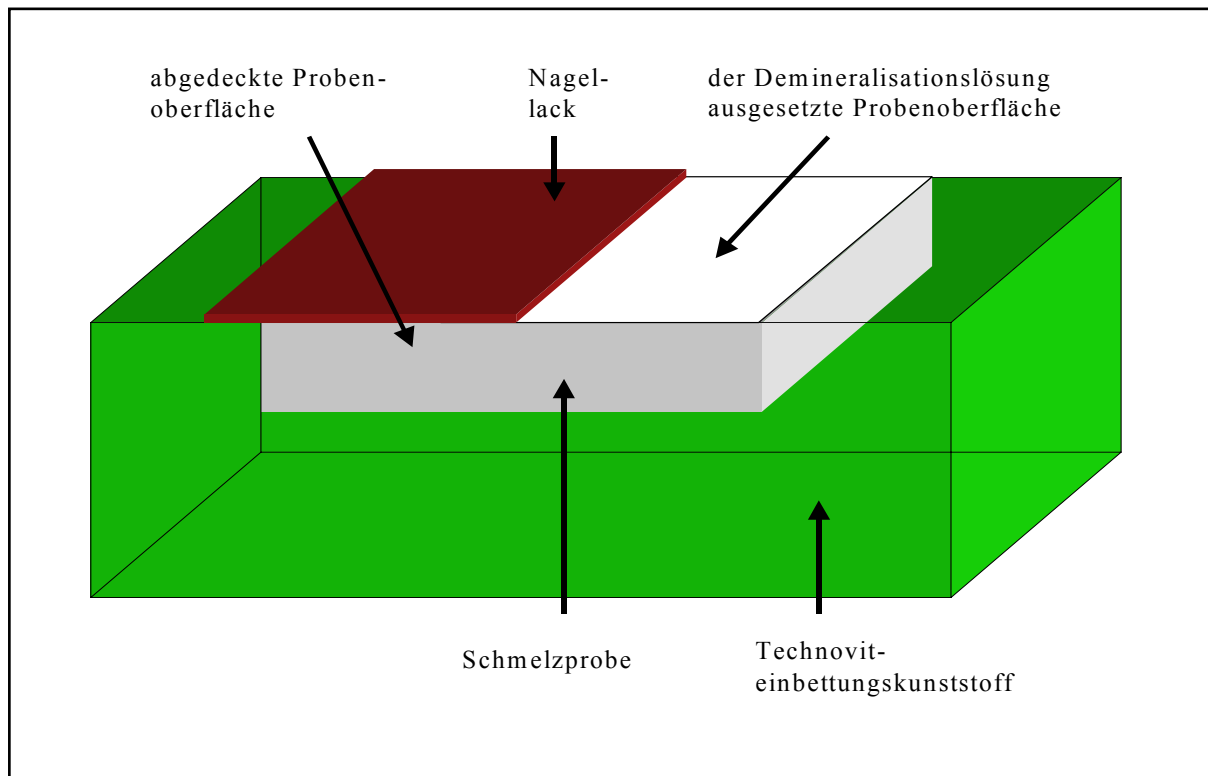


Abb. 4: Schmelzprobe mit unterschiedlichen Bereichen.

Alle Proben wurden gleichzeitig in die Demineralisationslösung (Buskes et al. 1985) gelegt (Tab. 1) und dort bei 37 °C (Wärmeschrank BR 6000; Heraeus, Hanau, Deutschland) für 12 Tage belassen.

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

Inhaltsstoff	Konzentration in mmol/l	Menge	Ansatz
Kalziumchlorid-2-hydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	3,0	2,205 g	zusammen 5 Liter
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	3,0	2,041 g	
Milchsäure (CH_3COOH)	50,0	15,012 g	
Kalilauge (KOH) 10M	ad pH 5	23 ml	
Methyldiphosphonsäure (MHDP) ($\text{CH}_2[\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2]_2$)	0,006	5,3 mg	
Thymol ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$)		in Spuren	
Aqua dest.	55,6	ad 5 Liter	

Für die genaue Mengenbestimmung der Inhaltsstoffe diente eine Analysewaage (Typ AG204; Mettler, Gießen, Deutschland). Der pH-Wert der Lösung wurde täglich überprüft (pH/Redox-/Temperatur-Messgerät GMH 3510; Greisinger, Regenstauf, Deutschland) und im Falle von Sollwertabweichungen mit geringen Mengen Kaliumhydroxidlösung (10 M) nach unten



Abb. 6: Intraorale Apparatur *in situ*,
Sicht auf den Unterkiefer.



Abb. 7: Intraorale Apparatur *in situ*,
Seitenansicht 4. Quadrant.

4.3.2. Anordnung der Proben auf der Unterkieferapparatur

Mit Klebewachs wurden die Probenkörper in den vorgefertigten Mulden befestigt und derart gesichert, dass ein Verschlucken oder Einatmen ausgeschlossen werden konnte. Zwei der vier Proben einer Seite wurden ca. einen Millimeter vertieft, bzw. auf einer Ebene des benachbarten Kunststoffes, in die Apparatur eingelassen. Durch diese Anordnung sollten De- (bei den vertieft eingelassenen Proben) und Remineralisationsprozesse (bei den oberflächlich gelegenen Proben) am Schmelz erfolgen.

Anschließend wurden auf jeder Probe die Hälfte der gesunden und die Hälfte der *in vitro* produzierten, kariesähnlichen Oberflächen mit Nagellack (Fa. Betrix, Frankfurt/Main, Deutschland) bedeckt, um auch hier Vergleiche mit der Ausgangssituation ziehen zu können.

4.4. Keksherstellung

Während der Tragedauer sollten die Probanden systemisch fluoridiert werden, um den lokalen Einfluss des Fluorids auf De- und Remineralisationsprozesse zu untersuchen. Dazu wurden mit Fluorid zubereitete Backwaren verwendet. Ziel war es, den Probanden täglich eine in 6 Gramm fluoridiertem Speisesalz enthaltene äquivalente Menge an Fluorid zukommen zu lassen. Um einen besseren Geschmack und damit eine bessere Compliance zu erhalten, wurde das fluoridierte Salz durch eine zerkleinerte Fluoridtablette substituiert (Fluoretten; 0,5 mg; Aventis, Frankfurt/Main, Deutschland). Jeder Keks, den die Probanden 3 mal täglich zu sich nahmen, enthielt somit exakt 0,5 mg Fluorid. Insgesamt wurden für jeden Probanden 168 Kekse gebacken. 84 enthielten je 0,5 mg Fluorid, die restlichen 84 waren fluoridfrei. Um Verwechslungen ausschließen zu können, bekamen die Probanden zunächst nur die Kekse

zugeteilt, die sie in der ersten Phase konsumieren sollten. Der Rest der Kekse wurde erst zu Beginn der zweiten Phase ausgehändigt. Tabelle 2 zeigt das Rezept für die Herstellung der Vanillekipferlkekse.

Tab. 2: Zusammensetzung der Vanillekipferl

Zutaten	Menge
Weizenmehl (MÜFA, Hamburg, Deutschland)	260 g
Margarine	200 g
Vanilleschoten	1/2
gemahlene Mandeln	100 g
zerkleinerte Fluoridtablette (Fluoretten; Aventis, Frankfurt/Main, Deutschland) (nur für die Effektkekse)	0,5 mg

Die Zutaten wurden zu einem Teig geknetet und für einen Tag lang in Folie verpackt im Kühlschrank bei 8-10 °C aufbewahrt (AEG ÖKO SANTO, Germany). Anschließend wurde dem Teig die gewünschte Menge (ca. 40 g) Portionsweise entnommen und in eine rundliche Form gebracht. Der Teig der Effektkekse wurde dabei mit je einer zerkleinerten Fluoridtablette vermischt. Die Kekse wurden separat auf einem Backblech verteilt und im vorgeheizten Backofen (Siemens HE 48E, München, Deutschland) bei 175 °C gebacken. Nach 8-10 Minuten konnten die Kekse entnommen und nach deren Abkühlung in zwei unterschiedlich markierte Tuppergefäße gelagert werden.

4.5. In-situ-Exposition

Die Studie gliederte sich in zwei In-situ-Perioden von jeweils vier Wochen. Dazwischen wurde eine Auswaschphase (wash-out) von zwei Wochen eingehalten (Abb. 8), in der in jede Apparatur neue Proben eingelassen wurden. Die Festlegung der Reihenfolge der Untersuchungs- und Kontrollperioden erfolgte sowohl für den Probanden als auch für den Untersucher blind.

Zu Beginn der Studie (Tag 0) wurde bei den Probanden eine Zahnreinigung und eine Politur der Zähne mit fluoridfreier Zahnpasta durchgeführt. Darüber hinaus wurden eine intraorale Befunderhebung, eine Bestimmung der Speichelfließrate, der Speichelpufferkapazität, der Anzahl von Strep. mutans und der Laktobazillenanzahl (CRT bakterie; Ivoclar, Vivadent, Lichtenstein) sowie eine Bestimmung der Fluoridkonzentration im Speichel und im Urin vorgenommen. Jeder Proband hatte ein Ernährungsprotokoll zu führen, um anschließend eventuell vorhandene Unterschiede in der Nahrungsaufnahme ausfindig machen zu können.

Eine Liste mit zu vermeidenden fluoridreichen Nahrungsmitteln und Getränken befand sich ebenfalls in der ausgehändigten Probandeninformation und erinnerte daran, während der gesamten Studiendauer darauf zu verzichten. Während der beiden Untersuchungsperioden nahmen die Probanden zusätzlich zur normalen Ernährung dreimal täglich (8 Uhr, 16 Uhr, Mitternacht) ein zuckerfreies Plätzchen von ca. 40 Gramm zu sich. Dies geschah nach den Mahlzeiten. Die Probanden wurden angehalten, nach dem Zerkauen und Schlucken des Kekses die Apparatur sofort wieder in den Mund zu nehmen. Anschließend sollte das Trinken, Essen und Zähneputzen für mindestens 30 Minuten unterbleiben.

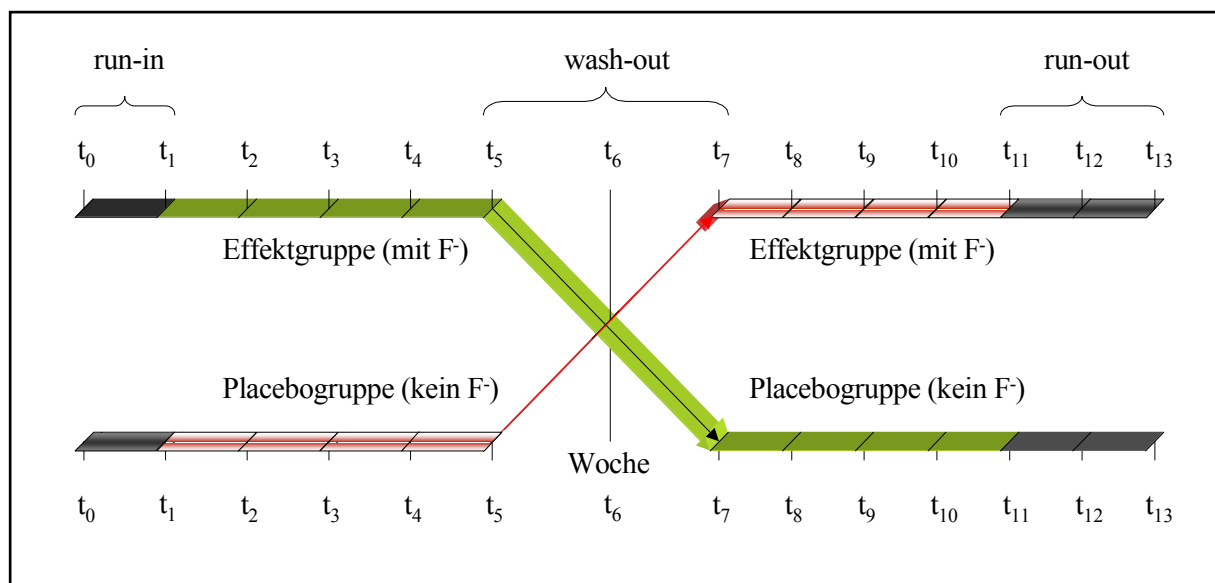


Abb. 8: Zeitlicher Untersuchungsverlauf der Effekt- und Placebogruppe.

Während der Effektphase befanden sich 0,5 mg Fluorid in je einem Keks. Dies entspricht einer zusätzlichen Aufnahme von 1,5 mg Fluorid/Tag. Der Unterschied zwischen diesen und den Placebokeksen konnte weder optisch noch geschmacklich festgestellt werden. Die Kekse wurden von einer unabhängigen Person randomisiert an die Probanden verteilt. Erst nach der mikroradiografischen Auswertung erhielt der Untersucher die Mitteilung, in welcher Phase die einzelnen Probanden fluoridhaltige bzw. fluoridfreie Kekse konsumierten.

Die Apparaturen wurden während der Mahlzeiten und Mundhygienemaßnahmen extraoral und in feuchtem Milieu aufbewahrt (z. B. feuchtes Taschentuch). Zweimal täglich, vorzugsweise während der Malzeiten, erfolgte die Lagerung der Apparaturen in einer 10%igen Zuckerlösung (dreißig Minuten), die als Substrat für die Demineralisation diente. Alle extraoralen Zeiten sowie die Zeiten, in denen die Apparaturen in der Demineralisationslösung lagen, wurden durch den Probanden protokolliert. Zur

Standardisierung der häuslichen Mundhygiene wurde den Studienteilnehmern eine elektrische Zahnbürste (Plaque Removal System, Wutex No. 4000 allproducts.com, Taipei, Taiwan) und fluoridfreie Zahnpasta (NENEDENT, Dentinox, Berlin, Deutschland) ausgehändigt. Auf die zusätzliche Applikation von systemischen und lokalen Fluoridierungsmitteln sowie Mundspülungen mit antimikrobiell wirksamen Substanzen sollte verzichtet werden. Die in den weißen Kunststoffflügeln eingebetteten Probenkörper wurden mit den zur Verfügung gestellten elektrischen Zahnbürsten zweimal täglich für jeweils 20 Sekunden gereinigt. Die Bestimmung der Speichelfließrate sowie des Fluoridgehaltes im Urin und Speichel erfolgte in wöchentlichen Abständen. Darüber hinaus waren von den Probanden keine weiteren Vorgaben zu beachten. Da die Probanden nur für einen sehr kurzen Zeitraum von zwei mal vier Wochen auf zusätzliche Fluoridierungsmaßnahmen verzichten mussten, wurde nach der Studie lediglich eine Intensivfluoridierung mit Fluoridlack (Duraphat; Colgate, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

Nach Ablauf der jeweiligen Phasen wurden bei allen Probanden die durchschnittlichen Tragezeiten ermittelt und, falls erforderlich, noch fehlende Zeiten nachgeholt. Anschließend erfolgte eine vorsichtige Reinigung der Proben und die Aufbewahrung bis zur weiteren Verarbeitung in steriler Kochsalzlösung.

4.6. Speichel- und Urinfluoridmessungen

Für die Urinfluoridmessungen sammelten die Probanden am Tag des Kontrolltermins ihren Mittelstrahl-Morgen-Urin in einem verschließbaren Gefäß. Dieses wurde dem Untersucher übergeben der mit Hilfe einer Fluoridelektrode (Orion Ionplus 94-09, Scientific Instruments, Schwäbisch Gmünd, Deutschland) und eines automatisierten Titrators (Thermo Orion 940, Scientific Instruments ion-analyser, Schwäbisch Gmünd, Deutschland) die Fluoridkonzentration im Urin bestimmte. Zwei Stunden vor dem Termin zur Speichelfluorid- und Speichelmengenbestimmung wurden die Zähne geputzt. Danach wurde nicht mehr geraucht, getrunken oder gegessen. Jeweils um ca. 14.00 Uhr trafen sich alle Probanden, um den Nachmittagskeks zu konsumieren. Vor der Einnahme des Kekses bekam jeder Proband ein Spuckröhrchen, in dem für 10 Minuten die produzierte Speichelmenge gesammelt wurde. Jeder Proband hatte eine Minute Zeit, den Keks zu zerkauen und hinunterzuschlucken. Anschließend wurde wiederum 10 Minuten lang der produzierte Speichel in einem weiteren Behältnis gesammelt, die Speichelmengen notiert und die Speichelfluoridkonzentration mit Hilfe der Fluoridelektrode bestimmt. Hierzu wurde die gewonnene Speichelmenge in ein

Gefäß pipettiert und mit TISAB II im Verhältnis 1:1 verdünnt. Ein Magnetrührer mit Mikrorührstäbchen gewährleistete sowohl die Vermischung der Probenlösung mit TISAB II als auch die Vermischung der mehrmals zugeführten definierten Menge einer Standardfluorideichlösung (0,001 mol/l für Speichel). Aus der zugeführten Menge der Standardlösung in die Probenlösung sowie der Messung der Potentialänderung erfolgte schließlich die Berechnung der Fluoridkonzentration der Probe.

Analog der Speichelfluoridbestimmung wurde der Urinfluoridgehalt mit der Mehrfach-Inkrement-Analyse bestimmt. Hierzu wurde eine 0,01 molare Fluorideichlösung verwendet. Die Probenlösung (10 ml Urin) wurde mit TISAB II im Verhältnis 1:1 verdünnt und während der Eichung und Messungen ständig gerührt. Das weitere Vorgehen erfolgte analog zur Speichelfluoridbestimmung.

4.7. Herstellung von Dünnschliffen

Nach der Beendigung der In-situ-Exposition wurde jede Probe vorsichtig aus den Platten entnommen und in einem kleinen markierten Behälter mit steriler Kochsalzlösung aufbewahrt, so dass ihre Herkunft, Lage, Position und Phase jederzeit nachvollziehbar war. Die Proben wurden anschließend mit der Oberfläche nach unten in eine Silikonform gelegt, in Technovit eingebettet und senkrecht zur Oberfläche in zwei Hälften getrennt (Bandsäge Exakt 300cl). Jede Hälfte beinhaltete dabei vier Probenanteile (1. Effekt auf gesunder Oberfläche, 2. gesunde Oberfläche, 3. *in vitro* erzeugte Kariesläsion, 4. Effekt auf die *in vitro* erzeugte Kariesläsion). Die Schnittfläche einer Hälfte des Probenblocks wurde nun mit Schleifpapier (Körnung 500, 1200, 2500; Fa. Exakt Apparatebau) poliert (Poliermaschine Phoenix Alpha) und mit Sekundenkleber (Henkel, Düsseldorf, Deutschland) auf einen Objektträger aus Plexiglas (Diaplas, Oststeinbeck, Deutschland) geklebt. Dabei wurde der Sekundenkleber nur um die Probe herum auf den Kunststoff gegeben, um die Schmelzprobe später leichter vom Objektträger entfernen zu können. Mit einer diamantierten Bandsäge (Bandsäge Exakt 300cl) konnte nun ein zweiter Sägeschnitt durchgeführt werden, so dass ein planparalleler Probenkörper von ca. 250 µm Dicke auf dem aufgeklebten Objektträger verblieb.

Zuletzt wurden die Proben mit gewässertem Schleifpapier in aufsteigender Körnung (Schleifpapier Körnung 1200, 2500, 4000; Exakt Apparatebau) poliert (Exakt Mikroschleifsystem; Exakt Apparatebau), um eine glatte Oberfläche sowie eine definitive Reduktion der Proben auf eine durchschnittliche Dicke (SD) von 100 (10) µm zu erzielen.

Dies wurde durch wiederholte Messungen mit Hilfe einer digitalen Mikromettermessschraube (Bügelmessschraube Digimatic; Mitutoyo, Kawasaki, Japan) kontrolliert.

4.8. Polarisationsmikroskopische Darstellung

So vorbereitet konnten die Proben unter einem Mikroskop (Durchlichtmikroskop 60318; Zeiss, Oberkochen, Deutschland) betrachtet, und mit Hilfe einer digitalen Fotokamera (Nikon; D100, Düsseldorf, Deutschland) dokumentiert werden.

4.9. Mikroradiografische Darstellung (TMR)

Um die Proben mikroradiografisch darstellen zu können, wurden die Dünnschliffe vorsichtig von den Objektträgern und den sie umgebenden Kunststoff befreit und mit einem schmalen Streifen Leukofix auf speziellen Probenhaltern fixiert (TMR Probenhalter; Plano, Wetzlar, Deutschland). Probe und Probenhalter wurden anschließend in eine Apparatur, bestehend aus einem Röntgenstrahlgenerator (PW 1730/10; Philips, Eindhoven, Niederlande) und einem linsenlosen Fotoapparatgehäuse mit einer Eichtrappe, eingesetzt. Die Anordnung der Probe erfolgte unter Kontakt zu dem sich unmittelbar hinter der Probe befindlichen, hochauflösenden holographischen Film (high speed holographic Film SO-253; Kodak AG, Stuttgart, Deutschland). Dadurch konnte der Objekt/Film-Abstand minimal klein und der Objekt/Fokus-Abstand maximal groß gehalten werden (34 cm). Der Röntgenfilm wurde in ein zur Aufnahme der Probenhalter umgefertigtes Kameragehäuse mit eingebauter Eichtrappe (Aluminium-Stufenkeil) eingespannt. Die Kamera wiederum war an den Röntgentubus des Generators montiert. Die Strahlung durchdrang die Schmelzprobe parallel zur behandelten Oberfläche und senkrecht zur Schnittebene mit einer Intensität von 20 kV und 40 mA. Die Belichtungszeit betrug 15 Sekunden. Die Filmentwicklung verlief nach einem standardisierten Verfahren.

4.10. Mikroradiografische Auswertung

Alle mikroradiografischen Aufnahmen wurden nach der Filmentwicklung mit einem Stereomikroskop (Axioplan; Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit CCD-Sensor (CCD-Videokamera Modul XC77E; Sony, Tokio, Japan) betrachtet und untersucht.

Die densitometrische Berechnung der Läsionstiefe und des Mineralverlustes erfolgte anschließend unter dem Mikroskop mit einer speziellen Software (TMR für Windows, Version 2.0.27.2; Inspektor Research System).

Nach Adjustierung der Lichtintensität wurde zunächst von jeder Probe ein Scan der Aufnahme der Aluminiumeichtreppe mit einer 16-fachen Vergrößerung durchgeführt und gespeichert. Im Computerprogramm sind Dicke und Röntgenabsorption der einzelnen Stufen der Eichtreppe gespeichert, so dass aus den Grauwerten der Probe der Mineralgehalt ($\text{Vol.\%} \times \mu\text{m}$) $\text{vol\%} \times \mu\text{m}$ als Funktion der Tiefe (μm) in Form eines Mikroradiogrammes dargestellt werden kann. Die Mineralverlust- und Läsionstiefenmessungen wurden bei jeder Probe in drei ausgewählten Bereichen durchgeführt. Die erste Messung erfolgte im abgedeckten, nicht dem Mundmilieu ausgesetzten, *in vitro* erzeugten Läsionsbereich. Die Zweite im Bereich des Effektes auf die In-vitro-Läsion und die dritte Messung erfasste den Teil des gesunden Bereiches, der der Mundhöhle ausgesetzt war.

Die im Kontrollbereich ermittelten „Fehlerwerte“ (gesunder Schmelz) wurden von den Werten der Bereiche, die der Demineralisationslösung bzw. dem Mundmilieu ausgesetzt waren, subtrahiert.

4.11. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem computergestützten Statistikprogramm (SPSS Version 11,5, SPSS GmbH München, Deutschland). Alle *in vitro* erzeugten Läsionen wurden hinsichtlich der Mineralverluste ($\Delta\Delta Z = \Delta Z_{\text{Demin}} - \Delta Z_{\text{Effekt}}$; $\text{Vol.\%} \times \mu\text{m}$) und der Läsionstiefenänderungen ($\Delta LD = LD_{\text{Demin}} - LD_{\text{Effekt}}$; μm) untersucht. Die Ergebnisse wurden anschließend unter allen Probanden verglichen (ANOVA) und mit dem Allgemeinen Linearen Modell die Mineralverluste (ΔZ_{Sound} ; $\Delta\Delta Z$) und die Läsionstiefen (LD_{Sound} ; ΔLD) bezüglich der Faktoren ‘Fluorid’ (ja / nein), ‘Putzen’ (ja / nein), ‘Position’ (oberflächlich / vertieft) und Region (Prämolar / Molar) mit einem 5%igen Signifikanzniveau überprüft.

Eine Kontrolle auf signifikante Unterschiede der Speichel- und Urinfluoridkonzentrationen erfolgte mit dem t-Test. Auch hier wurde das Signifikanzniveau auf 5 Prozent festgelegt.