

4. Material und Methode

4.1 Vorbereitung der Schmelz- und Dentinproben

Für die Untersuchung wurden 48 frisch extrahierte Rinderfrontzähne post mortem verwendet, welche nach vorsichtiger Säuberung bis zur weiteren Verarbeitung bei 37 °C (CRT Brutschrank Incubat, Fa. Melag, Berlin, Deutschland) in 0,9 % Kochsalzlösung (NaCl-Lösung 0,9 %, Fa. DeltaSelect, Pfullingen) gelagert wurden. Anschließend wurden aus den Labialflächen jeweils vier Schmelzproben (3x4x3 mm³) (Abb. 3) und aus dem Cervikalbereich jeweils vier Dentinproben unter Wasser-kühlung herauspräpariert (Bandsäge Exakt 300cl, Fa. Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) und in Kunstharz (Technovit

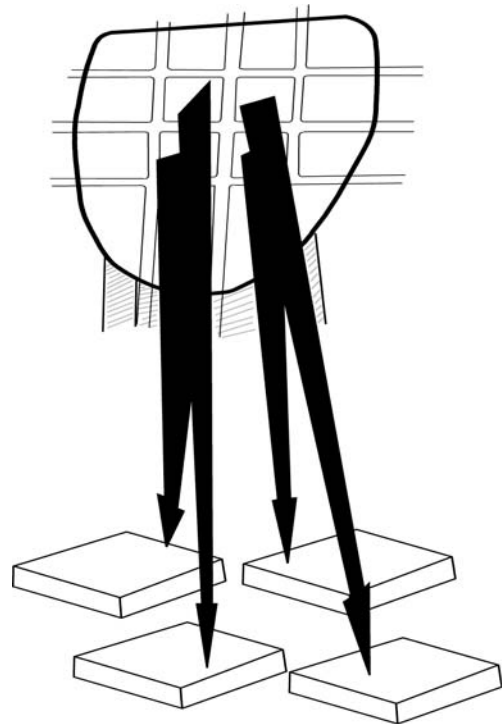


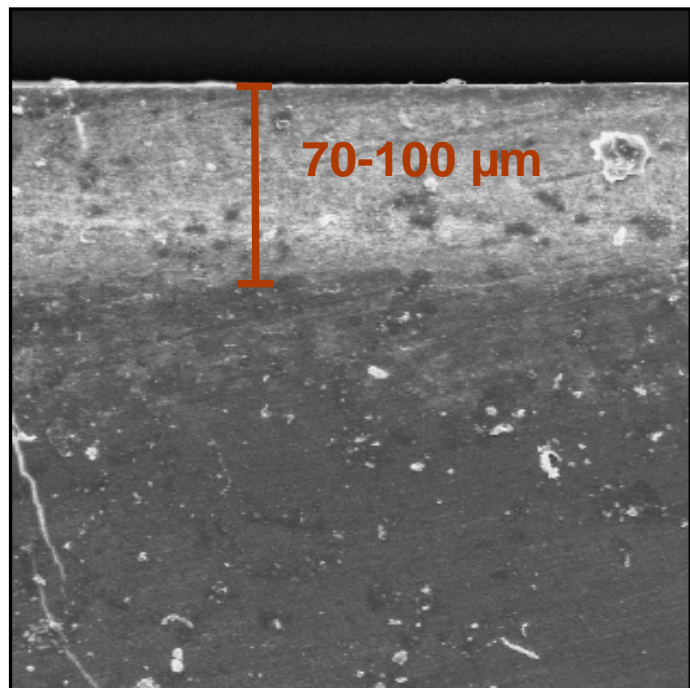
Abb. 3: Vier aus der labialen Zahnfläche herauspräparierte Schmelzproben

4071; Kulzer; Wehrheim, Deutschland) mit Hilfe von Silikonformen zu Gruppen je vier Stück eingebettet. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Oberflächen mit einer Poliermaschine (Poliermaschine Phoenix Alpha, Buehler, Düsseldorf, Deutschland) mit Schleifpapier (Schleifpapier: Körnung 1200, 2400, 4000; Fa. Exakt, Norderstedt, Deutschland) aufsteigender Körnung unter geringem Substanzabtrag standardisiert und zur etablierten Oberfläche parallelisiert. Die Umdrehungszahl der Poliermaschine war auf 300 U/min eingestellt. Der rechte Bereich der Probenoberfläche wurde mit Nagellack abgedeckt, um später als Kontrollwert zu dienen (Abb. 5). Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben in 0,9 % Kochsalzlösung bei 37 °C gelagert.

Tab. 4: Zusammensetzung der Demineralisationslösung nach BUSKES et al. (1985) für Schmelz und Dentin.

Konzentration	Inhaltsstoff	Menge/Schmelz	Menge/Dentin
3 mM	Kalziumdichlorid-2-hydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	2205 mg	2205 mg
3 mM	Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	2040 mg	2040 mg
50 mM	Milchsäure ($\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}$) (90 %)	25 ml	51,65 ml
10 M	Kalilauge (KOH) ad pH 5,0/5,5	29 ml	> 240,00 ml
6 μM	Methyldiphosphonsäure (MHDP)	5,4 mg	5,4 mg
	Thymol ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$)	in Spuren	in Spuren
	Aqua dest (H_2O)	ad 5000 ml	ad 5000 ml

Die zuvor hergestellten Schmelz- und Dentinproben wurden für zwei Wochen bei 37 °C in einem Wärmeschrank (Wärmeschrank BR 6000, Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland) demineralisiert (Tab. 4). Täglich wurde der pH-Wert (5,0) für Schmelz und ein pH-Wert von 5,5 für Dentin mit Hilfe eines pH-Meters kontrolliert (pH-Meter CG 819, Firma Schott, Hofheim, Deutschland) und im Falle einer Abweichung korrigiert (Zugabe von Milchsäure bei Erhöhung, KOH bei Erniedrigung), so dass während der gesamten Demineralisationszeit ein konstanter pH-Wert von 5,0 für Schmelz und 5,5 für Dentin eingehalten werden konnte. Nach zwei Wochen wurde anhand von

**Abb. 4:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme zur Kontrolle der Demineralisationstiefe.

vier Proben unter dem Rasterelektronenmikroskop (Rasterelektronenmikroskop Cam Scan Maxim 2040, Fa. Electron Optics LTD, Waterbeach, England) die Demineralisationstiefe kontrolliert (70-100 μm) (Abb. 4).

Nach abgeschlossener Demineralisation wurde ein weiterer Teil jeder Probenoberfläche mit Nagellack abgedeckt (siehe Abb. 5). Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben wieder in Kochsalzlösung gelagert.

4.2 Herstellung der einzelnen Lösungen und Durchführung der Versuche

Anschließend wurden die Schmelz- und Dentinproben zu 12 Gruppen à 12 Proben bzw. zu 6 Gruppen à 9 Proben aufgeteilt. In den einzelnen Lösungen (Tab. 5) lagerten die Proben für 14 Tage bei 37 °C (CRT Brutschrank Incubat), wobei die Lösungen dreimal täglich (jeweils nach 8 h) erneuert wurden. Der pH-Wert der einzelnen Lösungen wurde täglich kontrolliert (pH 5,5) und gegebenenfalls korrigiert (Zugabe von Milchsäure bei Erhöhung, KOH bei Erniedrigung des pH-Wertes).

Um die Lösungen aus Muzin und Carboxymethylcellulose 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.

Tab. 5: Zusammensetzungen und Konzentrationen der verschiedenen Lösungen (g/l).

Komponenten	Lösungen Versuch 1						Lösungen Versuch 2					
	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
Muzin	—	—	—	—	—	—	30	30	30	—	—	—
CMC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10	10	10
Leinsamen	—	—	—	50	50	50	—	—	—	—	—	—
Sorbitol	—	20	—	—	20	—	—	20	—	—	20	—
Xylitol	—	—	20	—	—	20	—	—	20	—	—	20
KCL	1,21	1,21	1,21	1,21	1,21	1,21	1,21	1,21	1,21	1,21	1,21	1,21
NaCl	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85
MgCl ₂	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Methylparaben	—	—	—	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Propylparaben	—	—	—	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Erläuterung: Carboxymethylcellulose, Fa. Sigma, Steinheim, Deutschland
 Kaliumchlorid 99,5-100,5 %, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
 Leinsamen braun, Fa. Neuform international, Zarrentin, Deutschland
 Magnesiumchlorid >98 % wasserfrei, Fa. Merck, Hohenbrunn, Deutschland
 Methyl-4-hydroxybenzoat min. 99 %, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
 Muzin from porcine stomach Typ III, Fa. Sigma, Steinheim, Deutschland
 Natriumchlorid min. 99,5 %, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
 Propyl-4-hydroxybenzoat min. 99 %, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
 Sorbitol Minimum 98 %, Fa. Sigma, Steinheim, Deutschland
 Xylitol Minimum 99 %, Fa. Sigma, Steinheim, Deutschland

Für die Lösung aus Leinsamen wurden zunächst 50 g Leinsamen zusammen mit einem Liter Aqua dest. in einem hitzefesten Glasgefäß über einer Gasflamme erhitzt. Unter ständigem Umrühren wurde der Ansatz für 20 Minuten gekocht. Anschließend wurden die Schalenreste mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt (Wasserstrahlpumpe, Brand GmbH, Wertheim, Deutschland). Nach Abkühlung wurden die weiteren Zusätze hinzugefügt (Tab. 5). Zum Abschluss wurden die einzelnen Lösungen homogenisiert (Ultra - Turrax T25, Janke & Kunkel, IKA® - Labortechnik).

In Tabelle 6 ist jeweils die Gesamtmenge an Milchsäure angegeben, die benötigt wurde, um den pH-Wert der einzelnen Lösungen über den Zeitraum von 14 Tagen konstant auf 5,5 zu halten.

Tab. 6: Milchsäurezugabe in µl.

Versuch	Nr.	Lösung	Milchsäurezugabe
1	1	Kontrolle	4700 µl
1	2	Sorbitol	2600 µl
1	3	Xylitol	2500 µl
1	4	Leinsamen+K	2700 µl
1	5	Leinsamen+K+S	4800 µl
1	6	Leinsamen+K+X	3200 µl
2	1	Muzin+K	3800 µl
2	2	Muzin+K+S	4500 µl
2	3	Muzin+K+X	3600 µl
2	4	CMC+K	3400 µl
2	5	CMC+K+S	3700 µl
2	6	CMC+K+X	4300 µl

4.3 Vorbereitung der Proben für die Mikroradiografie

Nach Beendigung der In-vitro-Exposition wurden die Proben senkrecht zur demineralisierten Oberfläche geschnitten (Bandsäge Exakt 300cl, Fa. Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland). Die Schnittflächen wurden poliert (Körnung 4000) und die Probe mit Hilfe eines Sekundenklebers (Uhu[®], Bühl, Deutschland) auf Objektträger aus Plexiglas (Fa. diaplus; Oststeinbeck, Deutschland) geklebt. Unter ständiger Wasserkühlung wurden anschließend mit einer 200 µm dicken, diamantierten Bandsäge (Bandsäge Exakt 300cl, Fa. Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) planparallele Schnitte von 300 µm Dicke hergestellt. Die Vorschubkraft des Probentisches betrug dabei 50 g, die Schnittgeschwindigkeit der Säge war auf 200 m/min eingestellt.

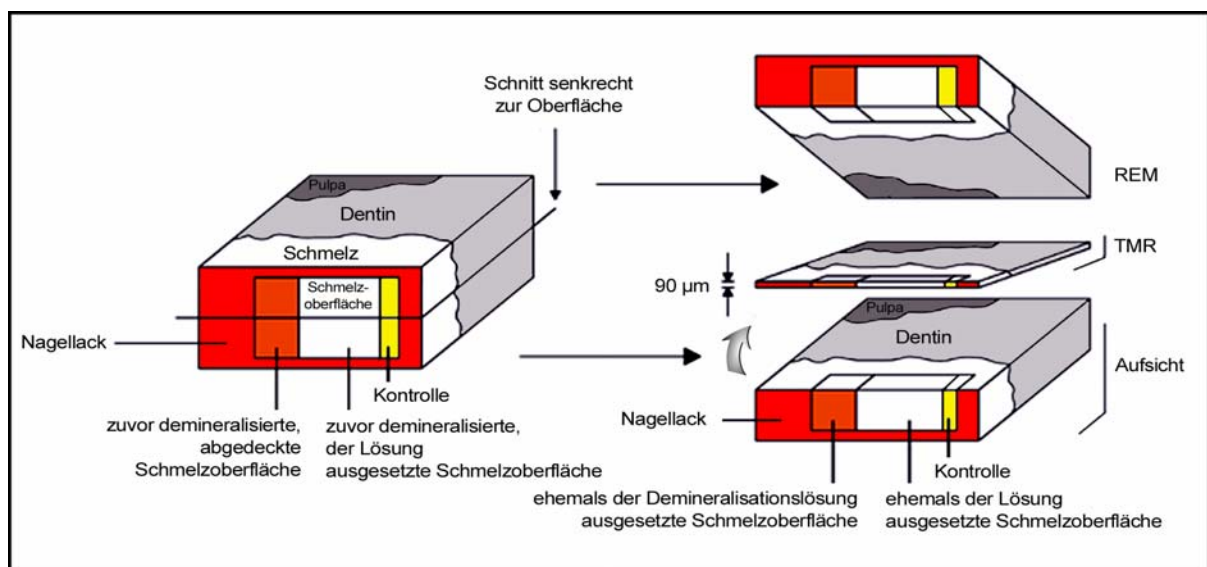


Abb. 5: Schematische Darstellung der Dünnschliffpräparation für die mikroradiografische (TMR) Auswertung. Die rasterelektronenmikroskopische (REM) Beurteilung der verschiedenen Effekte fand an den für die Schliffherstellung nicht benötigten Probenhälften statt.

Die definitive 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 90 µm (Abb. 5). Die Dicke der Proben wurde mit einem digitalen Mikrometer bei einer Genauigkeit von 0,001 mm überprüft (Digimatic Bügelmessschraube, Mitutoyo, Kawasaki, Japan).

4.4 Transversale Mikroradiografie

Die transversale Mikroradiografie kann zerstörungsfrei den Mineralverlust (mineral loss) einer Probe (ausgedrückt in Vol.% x μm) und die Läsionstiefen (in μm) bestimmen. Somit wird nicht nur der oberflächliche Mineralverlust, sondern auch eine etwaige Läsionstiefe miterfasst.

Die zu untersuchenden Proben wiesen drei unterschiedliche Bereiche auf: Den Kontrollbereich (gesunder Bereich), die demineralisierte Oberfläche und die den Lösungen ausgesetzte Oberfläche. Der Kontrollbereich gab den Mineralgehalt der intakten, unbehandelten Probenoberfläche („gesund“) wieder und diente als Grundlage für die Berechnung des Mineralverlust und der Läsionstiefe. Zwei weitere mikroradiografische Bereiche wurden bei jeder Probe erfasst, um den jeweiligen Mineralverlust und Läsionstiefe für den demineralisierten und den den Lösungen ausgesetzten Bereiche festzuhalten. Die Aufnahmen wurden in einem speziellen Kameragehäuse vorgenommen, das mit der „Objektivseite“ am Röntgentubus des Röntgengenerators gekoppelt war (Abb. 7). In dem Kameragehäuse ist auf Filmhöhe eine Aluminium-Eichtreppe für transversale Mikroradiogramme montiert, rechts daneben befand sich ein Aluminiumschlitten zur Aufnahme der TMR-Probenhalter (Abb. 6) (TMR-Probenhalter; Fa. Plano, Wetzlar, Deutschland). Dieser hält die Probe in Beziehung zur Aluminiumeichtreppe während der mikroradiografischen Aufnahmen in einer exakten Position. 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 wird zusammen mit dieser AL-Eichtreppe durch Röntgenstrahlung auf einen hochauflösenden Film (high speed holographic film; Kodak SO 253; Stuttgart, Deutschland) projiziert. Dabei werden die Röntgenstrahlen in einer vertikal montierten Röntgenröhre (PW 1730, Phillips, Kassel, Deutschland) von einer Kupferanode mit Nickelfilterung emittiert.

4.5 Herstellen der Mikroradiogramme

Die vorbereiteten Dünnschliffe wurden von im Randbereich noch haftenden Kunstharzresten befreit und auf Probenhalter (TMR-Probenhalter; Fa. Plano, Wetzlar, Deutschland) fixiert (Abb. 6).

Die einzelnen Probenhalter wurden anschließend mit den getrockneten Schmelz- oder Dentinproben in die Röntgenröhre eines speziellen Röntgenstrahlengenerators (PW 1730/10, Fa. Philips, Eindhoven, Niederlande) montiert (Abb. 7).

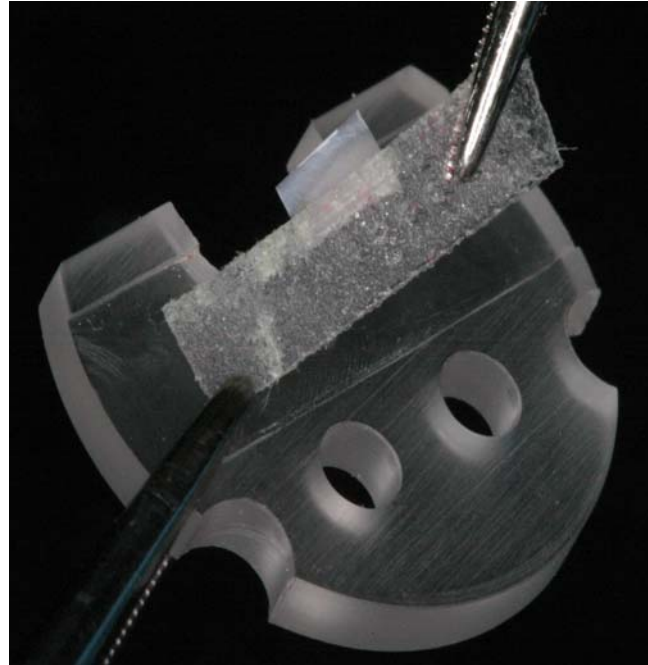


Abb. 6: TMR-Probenhalter mit Dünnschliff.

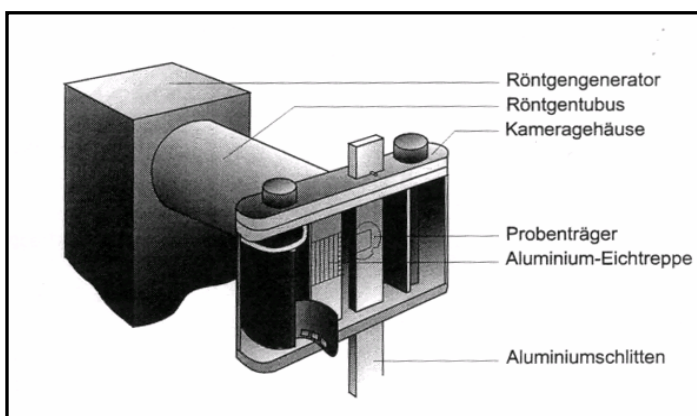


Abb. 7: Röntgentubus mit Kameragehäuse

Die mikroradiografische Untersuchung der Schmelzproben erfolgte bei einer Röhrenspannung von 20 kV und einem Röhrenstrom von 40 mA und einer Belichtungszeit von 20 Sekunden. Für die Dentinproben war eine Röhrenspannung von 20 kV, ein Röhrenstrom von 20 mA und eine Belichtungszeit 12 Sekunden erforderlich. In Vorversuchen waren diese Einstellungsparameter evaluiert worden. Zur Erstellung der Mikroradiogramme diente 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. Diese Filmrolle mit dem unbelichteten Film wurde dann in das

Die mikroradiografische Untersuchung der Schmelzproben erfolgte bei einer Röhrenspannung von 20 kV und einem Röhrenstrom von 40 mA und einer Belichtungszeit von 20 Sekunden. Für die Dentinproben war eine

Kameragehäuse eingelegt; die Kamera wurde daraufhin geschlossen. Der Probenhalter mit der darin befindlichen Probe wurde zunächst mittels Druckluft vorsichtig getrocknet. Um die Dentindünnschliffe vor Austrocknung zu schützen und um so eine Schrumpfung des Dentins zu verhindern, wurden diese Proben vor dem Einlegen in den Probenträgerhalter mit Ethylenglycol (Ethylenglycol 99+%, Fa. Sigma, Steinheim, Deutschland) benetzt. Anschließend wurde dieser in den Probenträgerhalter des AL-Schlittens eingelegt und das Kameragehäuse bis zum Anschlag eingeschoben. Die Probenoberfläche war somit zum Film parallel ausgerichtet.

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

4.6 Mikroradiografische Auswertung

Nach der Entwicklung wurden die mikroradiografischen Einzelaufnahmen ausgeschnitten und auf einen Objektträger (Fa. diaplus) geklebt und mit einem Durchlichtmikroskop (Durchlichtmikroskop 60318, Fa. 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).

4.7 Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Läsionen

Nach Abschluss der mikroradiografischen Auswertung wurden die bisher nicht verwendeten Probenhälften parallel zur Schnittfläche poliert und durch Lagerung in Natriumhypochloritlösung (1 %) von der Schmierschicht befreit. Die Proben wurden mit einem leitfähigen Kleber (Silver Print; GC, Tokio, Japan) auf entsprechende Probenhalter fixiert (Fa. Plano) und nach Trocknung im Wärmeschrank mit Gold besputtert (Sputtergerät SCD 040, Fa. Balzers, Liechtenstein; Dicke der Goldschicht: ca. 20 nm). Die Darstellung der entstandenen

Läsionstiefen der Proben erfolgte mit einem Rasterelektronenmikroskop (Cam Scan Maxim 2040, Fa. Electron Optics LTD). Die Beschleunigungsspannung des Primärelektronenstrahls betrug jeweils 20 kV. Die mikromorphologischen Untersuchungen im Bereich der Demineralisation erfolgten bei 100-1000-facher Vergrößerung.

4.8 Statistische Auswertung

Die im Rahmen der mikroradiografischen Untersuchung bei den demineralisierten Schmelz- bzw. Dentinbereichen und die den unterschiedlichen Lösungen ausgesetzten Bereichen ermittelten Mineralverluste und Läsionstiefen wurden der Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen. Die Einzelvergleiche zwischen den 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 Rang-Summen-Test nach WILCOXON. Das Signifikanzniveau wurde mit 5 % festgelegt.