

4. Material und Methode

4.1 Herstellung und Demineralisation der Schmelzproben

Für die Untersuchung wurden 60 permanente Frontzähne von schlachtfrischen Rindern verwendet. Die Zähne wurden nach Extraktion und vorsichtiger Säuberung in 0,9 % Kochsalzlösung (NaCl-Lösung 0,9 %, DeltaSelect, Pfullingen, Deutschland) und bei 37 °C (CRT Brutschrank Incubat, Melag, Berlin, Deutschland) gelagert. Zunächst wurden die Wurzeln abgetrennt. Bei der weiteren Verarbeitung erfolgte die Präparation von jeweils vier Schmelzproben ($3 \times 4 \times 3 \text{ mm}^3$) aus den Labialflächen der Zahnkronen. Der Trennvorgang erfolgte unter ständiger Wasserkühlung mittels einer diamantierten Bandsäge (Bandsäge Exakt 300 cl, Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) (Abb. 2). Mit Hilfe von selbst hergestellten Silikonformen (SUPERIUM Dubliersilikon, Weber Dental, Stuttgart, Deutschland) wurden mehrere Proben zu Blöcken in kaltpolymerisierendem Kunstharz (Technovit 4071, Kulzer; Wehrheim, Deutschland) eingebettet. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Oberflächen mit einer Poliermaschine (Poliermaschine Phoenix Alpha, Buehler, Düsseldorf, Deutschland) mit Schleifpapier aufsteigender Körnung (Schleifpapier: Körnung 800, 1200, 2400, 4000; Exakt, Norderstedt,

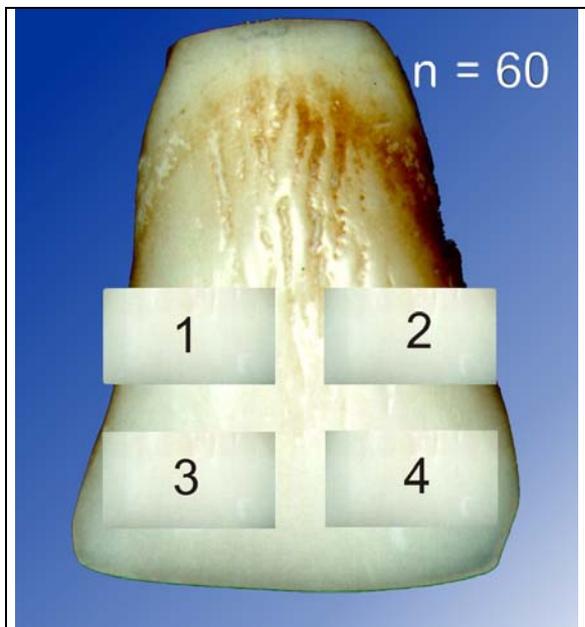


Abb. 2: Vier aus der labialen Zahnfläche herauspräparierte Schmelzproben.

Deutschland) unter geringem Substanzabtrag standardisiert und zur etablierten Oberfläche parallelisiert. Die Umdrehungszahl der Poliermaschine war auf 300 U/min eingestellt. Abschließend wurde ein Drittel der Proben mit säurefestem Nagellack (Betrix, Frankfurt/Main, Deutschland) abgedeckt, um später als Kontrollwert für gesunden Zahnschmelz zu dienen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben in 0,9%iger Kochsalzlösung bei 37 °C gelagert. Die in Kunststoffblöcke eingebetteten Schmelzproben wurden für 14 Tage bei 37 °C (Wärmeschrank BR 6000, Heraeus, Hanau, Deutschland) in einer Demineralisationslösung (5 l) nach Buskes demineralisiert (Tab. 4).

Tab. 4: Zusammensetzung der Demineralisationslösung für Schmelz nach Buskes (Buskes et al. 1985)

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

Zur Aufbewahrung der Proben diente eine flache, dicht verschlossene Kunststoffwanne. Die Abdeckung sollte das Lösen von CO_2 aus der Umgebungsluft behindern, so dass der pH-Wert möglichst konstant gehalten werden konnte. Mit Hilfe eines pH-Meters wurde täglich der pH-Wert (5,0) kontrolliert (pH-Meter CG 819, Firma Schott, Hofheim, Deutschland) und im Falle einer Abweichung durch Zugabe von Milchsäure bzw. Kaliumhydroxid korrigiert. Hierdurch konnte während der gesamten Demineralisationszeit ein konstanter pH-Wert von 5,0 eingehalten werden. Zwei Wochen nach

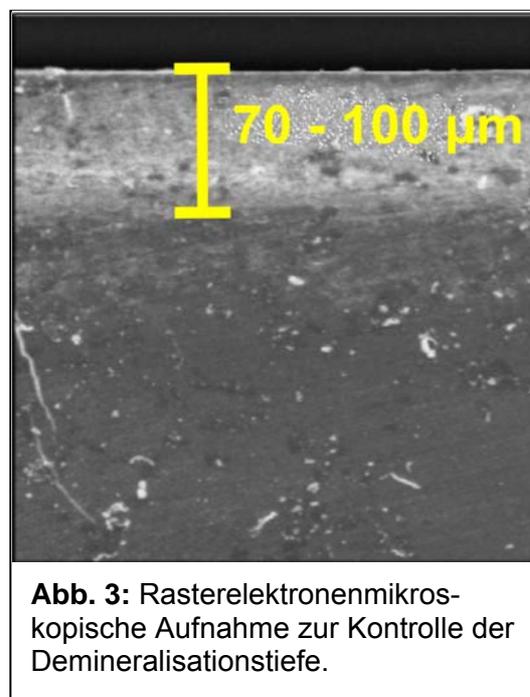


Abb. 3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme zur Kontrolle der Demineralisationstiefe.

Beginn der Demineralisation wurde anhand von vier Schmelzproben rasterelektronenmikroskopisch (Rasterelektronenmikroskop Cam Scan Maxim 2040, Electron Optics LTD, Waterbeach, England) die Demineralisationstiefe kontrolliert (Abb. 3). Die Untersuchung erfolgte, nachdem die Proben mit Gold besputtert wurden (Sputtergerät SCD 040, Balzers, Liechtenstein), unter Vakuum. Die Demineralisationsperiode war nach dem Erreichen einer Läsionstiefe von 70 – 100 μm abgeschlossen. Nach beendeter Demineralisation wurde ein weiteres Drittel jeder Probenoberfläche mit Nagellack abgedeckt, um den Demineralisationsbereich vor dem Effekt der Lösungen zu schützen und um einen Referenzbereich für die mikroradiografische Auswertung zu

erhalten. Die Proben lagerten bis zur weiteren Verarbeitung erneut in Kochsalzlösung (Abb. 4).

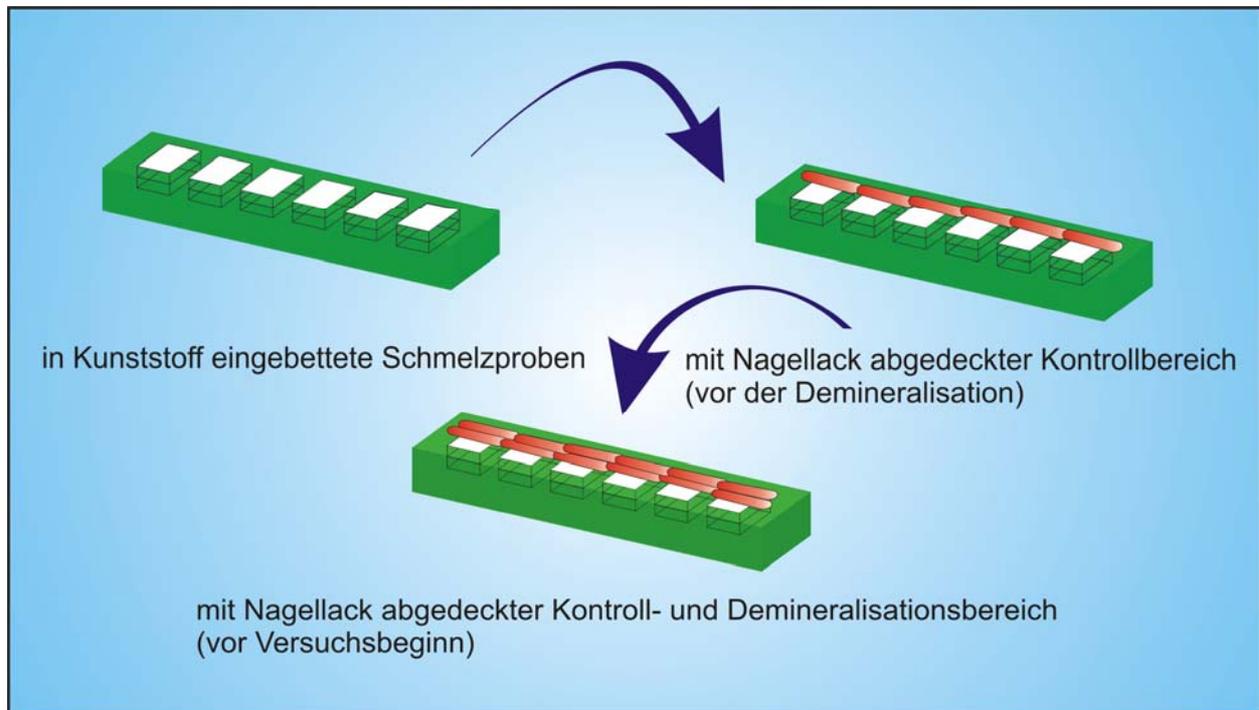


Abb. 4: Schematische Darstellung der Probenblöcke.

4.2 Herstellung der einzelnen Lösungen und Durchführung der Versuche

Anschließend wurden die Schmelzproben in 24 Gruppen mit jeweils zehn Proben aufgeteilt. In den einzelnen Ansätzen der potentiellen Speichellersatzmittel sowie der kommerziellen Mundpflegeprodukte (Tab. 5) lagerten die Proben 14 Tage bei 37 °C (CRT Brutschrank Incubat). Zweimal täglich (jeweils nach 12 h) wurden die selbst hergestellten Lösungen erneuert. Der pH-Wert der einzelnen Ansätze (Gruppen 5 - 24) wurde vor Versuchsbeginn gemessen und auf den gewünschten Wert von 5,5 bzw. 6,5 eingestellt. Während des Versuchs wurde der pH-Wert alle 12 h kontrolliert (pH-Meter CG 840, Fa. Schott, Hofheim, Deutschland) und im Falle einer pH-Wert-Abweichung korrigiert. Fiel der pH-Wert leicht ab, wurde dieser mit Kalilauge und bei einem Anstieg mit Milchsäure korrigiert. Allerdings wurde eine Schwankungsbreite von 1 % toleriert. Um die Lösungen aus 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. Mit Hilfe der Software nach Shellis wurden die Sättigungen für Oktakalziumphosphat, Hydroxylapatit und Fluorapatit berechnet (Shellis 1988).

Tab. 5: Zusammensetzungen und Konzentrationen der verschiedenen Lösungen.

Gruppe	CaCl ₂ (mg/l)	KH ₂ PO ₄ (mg/l)	NaF (mg/l)	pH	Basislösung
1	bioXtra [®]			6,55	
2	Aldiamed [®] Mundgel			n.m.	
3	Aldiamed [®] Mundspüllösung			8,5	
4	Paroex [®]			5,63	
5	--	--	--	6,5	
6	--	--	--	5,5	
7	--	--	4,2	6,5	
8	--	--	4,2	5,5	
9	55,5	--	4,2	6,5	
10	55,5	--	4,2	5,5	
11	55,5	111	4,2	6,5	
12	55,5	111	4,2	5,5	
13	55,5	444	4,2	6,5	
14	55,5	444	4,2	5,5	
15	111	222	4,2	6,5	
16	111	222	4,2	5,5	
17	111	888	4,2	6,5	
18	111	888	4,2	5,5	
19	222	444	4,2	6,5	
20	222	444	4,2	5,5	
21	222	1776	4,2	6,5	
22	222	1776	4,2	5,5	
23	3552	7104	4,2	6,5	
24	3552	7104	4,2	5,5	

Erläuterung: bioXtra[®], BioX Healthcare, Udimore, Großbritannien

Aldiamed[®] Mundgel Biomedica Pharma-Produkte GmbH Rodgau, Deutschland

Aldiamed[®] Mundspüllösung Biomedica Pharma-Produkte GmbH Rodgau, Deutschland

Paroex[®], John O. Butler, Kriftel, Deutschland

Carboxymethylcellulose, Sigma, Steinheim, Deutschland

Kaliumchlorid 99,5-100 %, Merck, Darmstadt, Deutschland

Magnesiumchlorid > 98 % wasserfrei, Merck, Hohenbrunn, Deutschland

Natriumchlorid min. 99,5 %, Merck, Darmstadt, Deutschland

Methyl-4-hydroxybenzoat min. 99 %, Merck, Darmstadt, Deutschland

Propyl-4-hydroxybenzoat min. 99 %, Merck, Darmstadt, Deutschland

Kalziumchlorid ≥ 90,0 % wasserfrei gepulvert, Merck, Darmstadt, Deutschland

Kaliumdihydrogenphosphat min. 98 %, Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumfluorid min. 99,0 % reinst, Omikron GmbH, Neckarwestheim, Deutschland

n.m., aufgrund der gelförmigen Konsistenz mit dem verwendeten pH-Meter (pH-Meter CG 840, Schott, Hofheim, Deutschland) nicht messbar

4.3 Messung der Kalziumkonzentration

Mittels eines speziellen Ionenmeters (Orion Auto chemistry System 960, Fisher Scientific, Ulm, Deutschland) können unterschiedliche Elektrolytkonzentrationen in einer Lösung ermittelt werden. Bei der Messung der Kalziumkonzentration wurde eine Kalziumelektrode (Typ 9700 BN, Fisher Scientific) und eine 4 M Kaliumchloridlösung (Kaliumchlorid, Merck) verwendet. Die Instrumente wurden mit einer 0,1 M Kalziumdichloridlösung (Kalziumdichlorid-2-hydrat, Merck) standardisiert. Die Lösungen, deren Kalziumkonzentration bestimmt wurde, enthielten lediglich 2 g/l Carboxymethylcellulose (Carboxymethylcellulose, Sigma) und Kalziumdichlorid in unterschiedlichen Mengen (55,5; 111; 222; 444; 888; 1776; 3552; 7104 bzw. 14208 mg/l). Parallel zu den Messungen der CMC-haltigen Lösungen wurde die Kalziumkonzentration von wässrigen Lösungen bestimmt, die bei gleichen Kalziumdichloridkonzentrationen keine Carboxymethylcellulose enthielten.

4.4 Viskositätsmessung

Die Messungen der Viskosität erfolgten mit Hilfe eines Ubbelohde Viskosimeters (Schott, Mainz, Deutschland) bei 37 °C unter Verwendung einer standardisierten Meßmethode (kinematische Viskosität). Zunächst wurden die zu untersuchenden Lösungen bei 3000 Upm fünf Minuten homogenisiert (Ultrazentrifuge L 70; Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland) und anschließend wurde eine definierte Menge in eine dreischenkige Ubbelohde Kapillare gefüllt und die Viskosität (mm^2/s) bestimmt.

4.5 Vorbereitung der Proben für die Mikroradiografie

Nach Beendigung der In-vitro-Exposition wurden die Proben senkrecht zur demineralisierten Oberfläche zersägt (Bandsäge Exakt 300cl, Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) und die Schnittflächen mit Schleifpapier aufsteigender Körnung poliert (Schleifpapier: Körnung 1200, 2400, 4000; Exakt, Norderstedt, Deutschland). Die Proben wurden mittels eines Sekundenklebers (Sekundenkleber, Renfert, Hilzingen, Deutschland) mit der polierten Fläche auf Objektträger aus Plexiglas (diaplust; Oststeinbeck, Deutschland) geklebt. Unter ständiger Wasserkühlung wurden anschließend mit einem diamantierten Sägeblatt (200 μm) (Bandsäge Exakt 300cl,

Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) planparallele Schnitte hergestellt 300 μm Dicke. Die Vorschubkraft des Probestisches betrug hierbei 0,5 N; die Schnittgeschwindigkeit der Säge war auf 200 m/min eingestellt. Die Parallelisierung und Glättung erfolgte in Anlehnung an eine Studie (Kielbassa und Shohadai 1999) mit gewässertem Schleifpapier (Körnung 1200-4000) in einer Mikroschleifapparatur (Exakt Mikroschleifsystem, Exakt Apparatebau). Die definitive Schliffdicke der Proben betrug 90-100 μm (Abb. 5). Die Kontrolle erfolgte mit einem digitalen Mikrometer bei einer Genauigkeit von 0,001 mm (Digimatic Bügelmessschraube, Mitutoyo, Kawasaki, Japan)

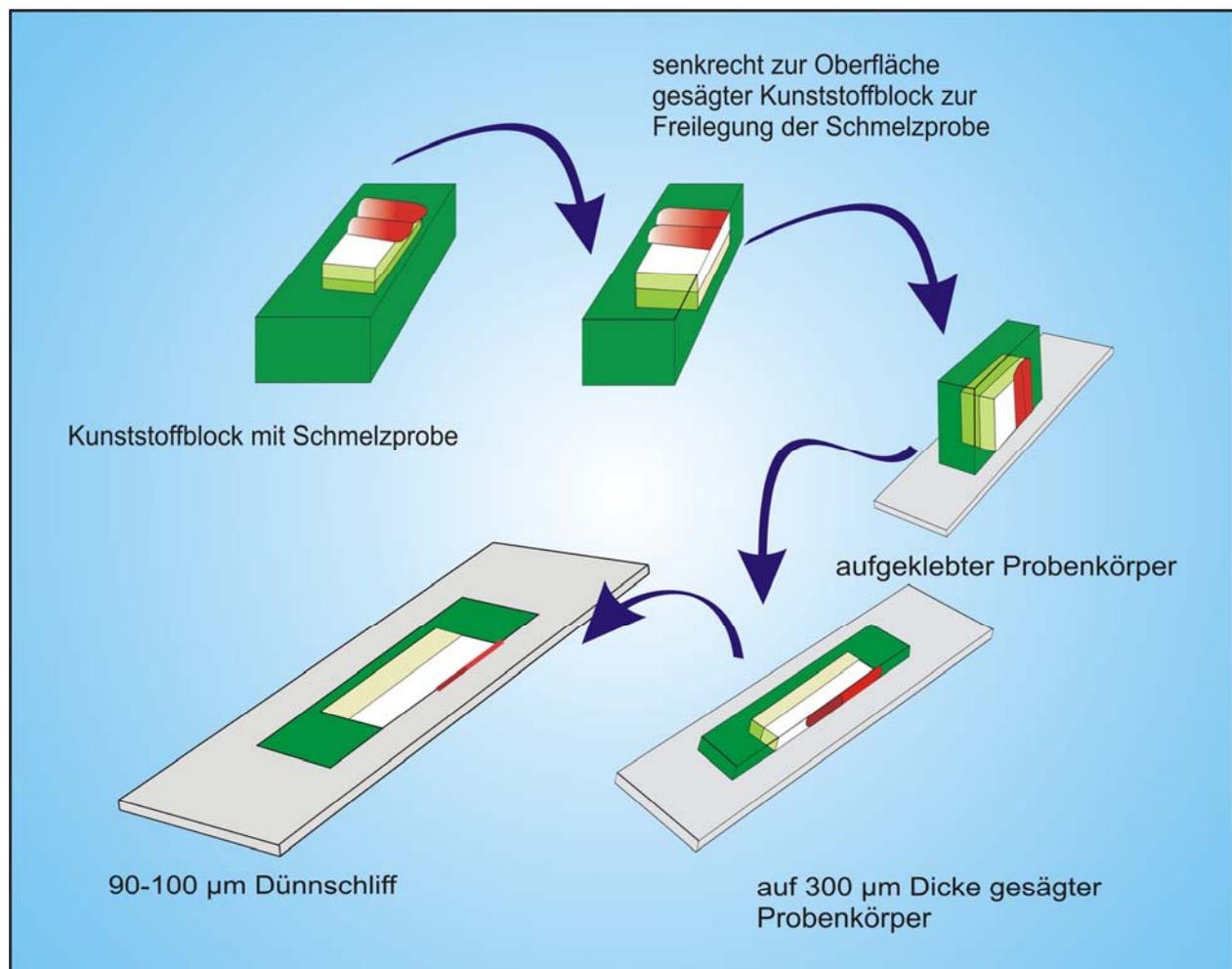


Abb. 5: Schematische Darstellung der Dünnschliffpräparation für die mikroradiografische Auswertung (TMR).

4.6 Transversale Mikroradiografie

Die transversale Mikroradiografie kann zerstörungsfrei den Mineralverlust (mineral loss) einer Probe (ausgedrückt in $\text{Vol.}\% \times \mu\text{m}$) und die Läsionstiefen (in μm) bestimmen.

Somit wird nicht nur der oberflächliche Mineralverlust, sondern auch eine etwaige Läsionstiefe erfasst.

Die zu untersuchenden Proben wiesen drei unterschiedliche Bereiche auf: Den mit Nagellack geschützten Kontrollbereich (gesund), die von Nagellack bedeckte demineralisierte Oberfläche und die der Lösung ausgesetzte demineralisierte Oberfläche. Der Kontrollbereich erleichterte dabei die Identifikation der demineralisierten bzw. den Lösungen ausgesetzten Bereiche während der mikroradiografischen Auswertung. Die drei mikroradiografisch dargestellten Bereiche wurden hinsichtlich des Mineralverlustes und der Läsionstiefe ausgewertet.

Die Aufnahmen wurden in einem speziellen Kameragehäuse vorgenommen, das mit der Objektivseite an den Röntgentubus des Röntgengenerators gekoppelt war. In dem Kameragehäuse war auf Filmhöhe eine Aluminiumeichtreppe für transversale Mikroradiogramme montiert (Abb. 6), rechts daneben befand sich ein Aluminiumschlitten zur Aufnahme des TMR-Probenhalters (TMR-Probenhalter; Plano, Wetzlar, Deutschland).

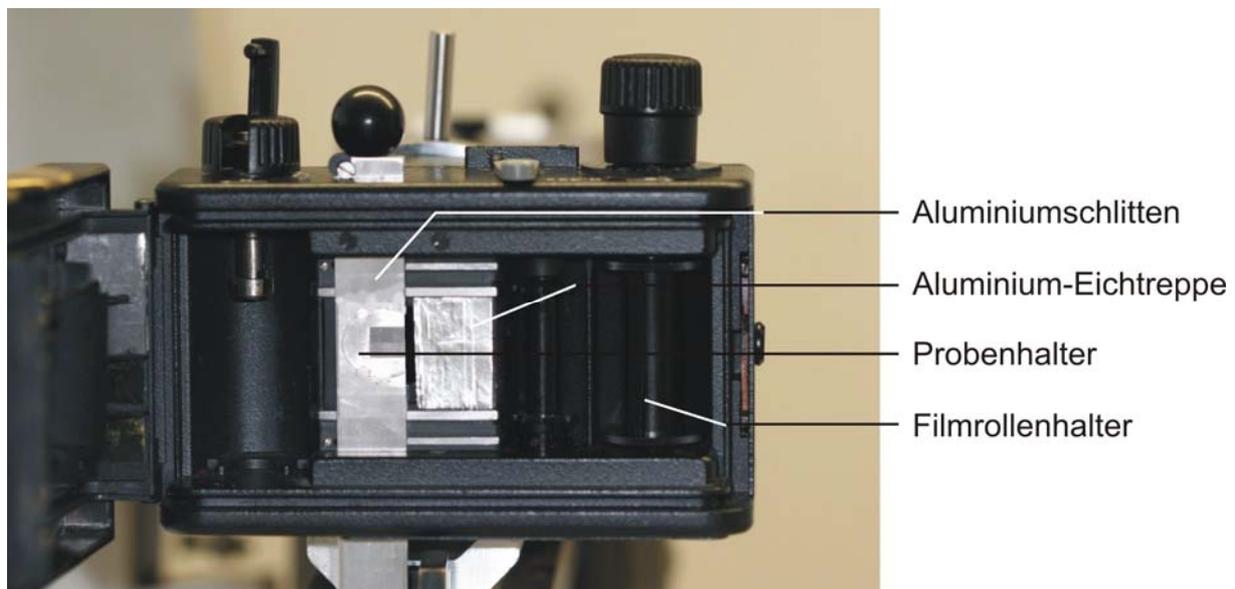


Abb. 6: Aufbau innerhalb der Kamera.

Der Aluminiumschlitten wurde bei geschlossenem Kameragehäuse herausgezogen und der Probenhalter mit einer fixierten Probe konnte daraufhin eingelegt bzw. gewechselt werden.

Die Aluminiumeichtreppe (step wedge) besteht aus unterschiedlich dicken Aluminiumfolien mit einer jeweils definierten Schichtstärke. Auf dem Röntgenfilm

werden die Folien als Abfolge verschiedener Grauwerte dargestellt. Der „step wedge“ hat den gleichen Strahlenabschwächungskoeffizienten wie Hydroxylapatit, sodass jedem Grauwert im Mikroradiogramm ein definierter Mineralgehalt zugeordnet werden kann. Der Probenhalter fixierte die Probe während der mikroradiografischen Aufnahme in einer exakten Position zur Aluminiumeichtreppe. Die Probe auf dem TMR-Probenhalter wurde zusammen mit der 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 (Abb. 7).

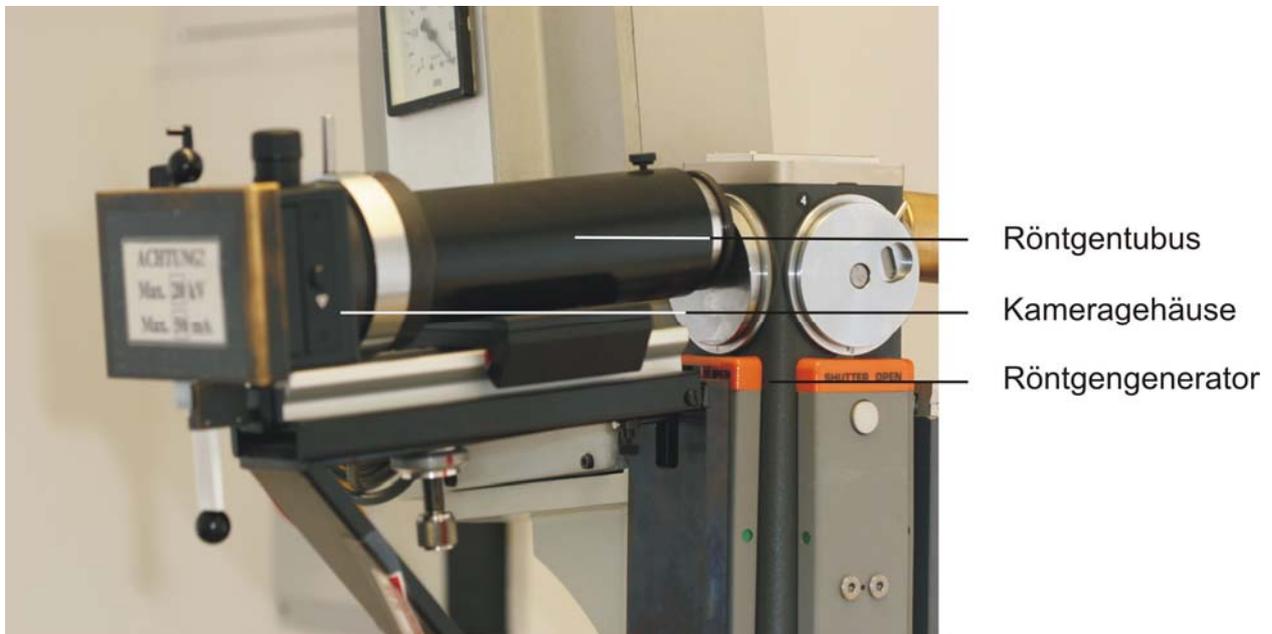


Abb. 7: Kamera für die Mikroradiografie.

4.7 Herstellen der Mikroradiogramme

Aus den vorbereiteten Dünnschliffen wurden die Schmelzproben mittels eines Skalpells aus den Kunstharzresten herausgeschnitten und mit einem Tesa-Filmstreifen auf dem Probenhalter (TMR-Probenhalter; Plano, Wetzlar, Deutschland) fixiert (Abb. 8). Anschließend wurde jeweils ein Probenhalter mit einer Schmelzprobe in den Aluminiumschlitten eingelegt und bis zum Anschlag in das Kameragehäuse zurückgeschoben. Damit war die Probenoberfläche parallel zum Film ausgerichtet. Die

mikroradiografische Untersuchung der Schmelzproben erfolgte mit einer Röhrenspannung von 20 kV und einem Röhrenstrom von 40 mA bei 20 Sekunden Belichtungszeit (Röntgenstrahlengenerator PW 1730/10, Philips, Eindhoven, Niederlande). 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. Die Filmrolle und der unbelichtete Film wurden in das Kameragehäuse eingelegt und die Kamera anschließend geschlossen. Nach jeder Aufnahme wurde der Film bei geschlossenem Kameragehäuse weitergedreht bevor eine erneute Bestrahlung folgte. Die jeweiligen Proben wurden nach dem Röntgen wieder in Kochsalzlösung aufbewahrt, um ein Austrocknen zu vermeiden.

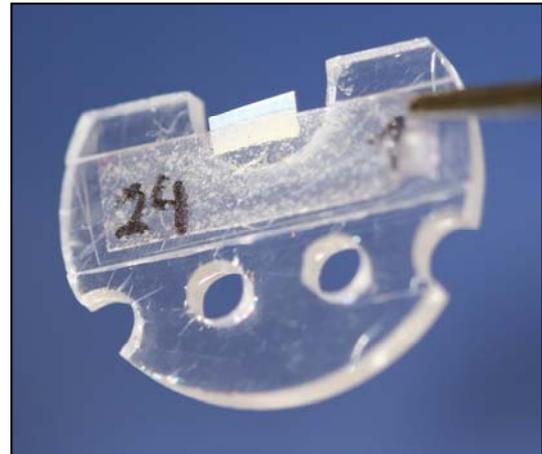


Abb. 8: Fixieren einer Schmelzprobe auf dem Probenhalter.

4.8 Mikroradiografische Auswertung

Nach Entwicklung der mikroradiografischen Filme wurden diese mit einem Durchlichtmikroskop (Durchlichtmikroskop 60318, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und einer daran angeschlossenen Videokamera (CCD-Videokamera Modul XC 77CE, Sony, Japan) untersucht. Die Ermittlung der Läsionstiefe und des Mineralverlustes erfolgten mit dem Programm Transversal Micro Radiography (TMR für Windows, Version 2.0.27.2, Inspektor Research System BV, Amsterdam, Niederlande) für den jeweiligen Bereich der Schmelzprobe. Vor jeder einzelnen Auswertung erfolgte eine Kalibrierung mit dem auf dem Film abgebildeten „step wedge“. Die im Rahmen der Untersuchung ermittelten Werte für den Mineralverlust und die Läsionstiefe des nicht demineralisierten Schmelzbereiches (gesunde Kontrolle), wurden von den ermittelten Läsionstiefen bzw. Mineralverlusten der demineralisierten sowie den Lösungen ausgesetzten Schmelzbereichen der jeweiligen Probe abgezogen.

4.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS (Version 11.5 für Windows; SPSS GmbH, München, Deutschland). Die im Rahmen der mikroradiografischen Untersuchung anhand der demineralisierten Schmelzbereiche sowie den unterschiedlichen Lösungen ausgesetzten Bereiche ermittelten Mineralverluste und Läsionstiefen wurden der Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen. Die Einzelvergleiche zwischen den Gruppen erfolgten nach BONFERRONI (post hoc test). 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. Die Ergebnisse des t-Testes wurden einer multiplen Testung mit dem Faktor 24 unterzogen. Für die Faktoren 'Kalzium', 'Phosphat', 'Fluorid' und 'pH' wurde das Allgemeine Lineare Modell (ALM) angewandt. Das Signifikanzniveau wurde mit 5 % festgelegt.