

Die Rolle der organischen Matrix bei der symptomatischen Therapie von
Dentinerosionen in vitro

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Caroline Starck, geb. Blecher
Aus Lich

Gießen 2003

Aus dem Medizinischen Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
des Universitätsklinikums Gießen

Abteilung Zahnerhaltungskunde und Präventive Zahnheilkunde

Leiter: Prof. Dr. J. Klimek

Gutachter: Prof. Dr. J. Klimek

Gutachter: Prof. Dr. A. Schulz

Tag der Disputation: 11.05.2004

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, September 2003

INHALT

1	EINLEITUNG.....	2
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Erosionen.....	3
2.1.1	Definition, Pathogenese und Klinik	3
2.1.2	Epidemiologie und Ätiologie	5
2.1.3	Therapie.....	9
3	MATERIAL, METHODEN UND ERGEBNISSE DER VORVERSUCHE.....	13
3.1	Vorversuche	13
3.1.1	Mikroskopischer Nachweis der Kollagenschicht	13
3.1.2	Bestimmung der erforderlichen Enzymmenge zur Entfernung der Kollagenschicht	15
3.1.3	Mikroskopische Darstellung der Dentinproben aus einem pH-zyklischen Versuch über fünf Tage mit und ohne Kollagenase.....	17
3.2	Hauptversuch.....	20
3.2.1	Auswahl und Vorbereitung der Proben	20
3.2.2	Herstellung der Zahnschnitte.....	21
3.2.3	Versuchsgruppen und -Ablauf.....	21
3.2.4	Herstellung der Lösungen	23
3.2.5	Bestimmung des Mineralgehaltes.....	24
3.2.6	Herstellung der Mikroradiogramme	25
3.2.7	Filmentwicklung.....	25
3.2.8	Auswertung	26
3.2.9	Testmessungen zur Reproduzierbarkeit der Messungen	26
3.2.10	IR-Spektroskopie.....	27
3.2.11	Statistik.....	30
3.3	Materialien und Chemikalien	30
4	ERGEBNISSE	33
4.1.1	Allgemeines.....	33
4.1.2	Vergleich des Mineralverlustes der einzelnen Versuchsgruppen	33
4.1.3	IR-Spektren	35
5	DISKUSSION.....	41
5.1	Versuchsaufbau und -Durchführung	41
5.1.1	Versuchsaufbau	41
5.1.2	Messmethoden.....	43
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	47
5.2.1	Fluoridwirkung auf Schmelz	49
5.2.2	Fluoridwirkung auf Dentin	53
5.2.3	Remineralisation von Dentin.....	56
5.2.4	Enzymatischer Abbau der organischen Matrix.....	58
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	62
7	ABSTRACT	64
8	LITERATURVERZEICHNIS	66
	LEBENS LAUF	79
	DANKSAGUNG	80

1 EINLEITUNG

Während die Kariesprävalenz rückläufig ist, gewinnen vermehrt andere Destruktionen der Zahnhartsubstanz an Bedeutung. Ein zunehmend gesünderer Lebensstil mit verändertem Nahrungsmittelkonsum und gesteigertem Mundhygienebewusstsein fördert nichtkariesbedingte Verschleißerscheinungen der Zähne. Erosionen sind eine mögliche Form dieses Zahnhartsubstanzverlustes und werden noch heute oft übersehen oder rein restaurativ behandelt. Nichtkariesbedingte Zahnhartsubstanzverluste kommen jedoch zum Stillstand, wenn ausreichende kausale oder symptomatische Therapieformen gewählt werden. Bei säurebedingten Zahnhartsubstanzverlusten könnte dabei auch die lokale Fluoridapplikation eine Rolle spielen.

Im Rahmen der Kariesprophylaxe ist die Fluoridwirkung auf Zahnschmelz in einer Vielzahl von Studien gezeigt worden, bei Erosionen und speziell bei Erosionen im Dentin dagegen kaum experimentell nachgewiesen. In einer in vitro Studie zeigte sich, dass Dentinerosionen nach hochdosierter Fluoridapplikation zum Stillstand kommen können, während dieser Effekt bei Schmelz unter denselben in vitro Bedingungen nicht nachgewiesen werden konnte [Ganß et al., 2001 (b)]. Vermutlich war für diesen Effekt im Dentin die durch Säure an der Oberfläche exponierte organische Matrix verantwortlich.

Es sollte nun in einem weiteren in vitro Experiment festgestellt werden, ob der Erhalt der organischen Matrix des Dentins für eine effektive Therapie der Erosion mit Fluoriden von Bedeutung ist und ob der Verlust der organischen Deckschicht des Dentins den Erosionsprozess beschleunigt. In einer pH-zyklischen Versuchsreihe mit und ohne die enzymatische Entfernung der organischen Deckschicht wurde der erosive Mineralverlust von Dentinproben mit Hilfe mikroradiografischer Untersuchungen über einen Zeitraum von fünf Tagen beurteilt.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Erosionen

2.1.1 Definition, Pathogenese und Klinik

Erosionen sind säurebedingte Zahnhartsubstanzverluste, welche von der Karies abgegrenzt werden müssen. Obwohl das Resultat dieser beiden pathologischen Prozesse in der irreversiblen Destruktion des Zahnmaterials besteht, sind die Ursachen und Abläufe der jeweiligen Erkrankung voneinander zu unterscheiden. Während bei Karies Mikroorganismen der Plaque unter Substratzufuhr für die Produktion organischer Säuren verantwortlich sind, stammen die bei Erosionen einwirkenden Säuren nicht aus der Mundhöhle. Sie sind organischer oder anorganischer Natur und werden entweder von außen zugeführt oder sind endogenen Ursprungs [Meurman und ten Cate, 1996].

Erosionen werden als chronischer, oberflächlicher Zahnhartsubstanzverlust durch Säuren und/oder Komplexbildner ohne Mitwirken von Mikroorganismen definiert [Zipkin und Mc Clure, 1949].

Wenn der pH-Wert in der Mundhöhle unter den für Erosionen kritischen Wert von 4,5 sinkt [Stephan, 1966] und Säure auf die Zahnoberfläche einwirkt, kommt es zu einem zentripetalen Mineralverlust. Dabei werden im Schmelz zunächst die Schmelzprismen und später die interprismatischen Areale demineralisiert. Diesen Vorgang macht man sich schon seit 1955 [Buonocore, 1955] als Säure-Ätztechnik in der Füllungstherapie mit Kunststoffen zunutze. Bei aprismatischem Schmelz, welcher oberflächlich bei Milchzähnen und gelegentlich auch bei Zähnen der zweiten Dentition vorkommt, verläuft die Demineralisation ungleichmäßig. Der aprismatische Schmelz ist weniger säureanfällig und wird von der Oberfläche her unregelmäßig abgetragen, es resultiert jedoch auch hier ein irreversibler Substanzverlust [Meurman und Frank, 1991].

Die Mikrohärtigkeit der hypomineralisierten Oberfläche nimmt ab, sodass gegenüber dem normalen Schmelz eine erhöhte Abrasionsgefahr besteht [Davis und Winter,

1980; Sorvari et al., 1996]. Erosionen treten daher oft in Kombination mit Abrasionen, Attritionen oder bei pathologischer Okklusion mit keilförmigen Defekten auf. Dies erschwert die richtige Diagnose und verschleiert den kausalen Faktor [Imfeld, 1996]. Reine Erosionen sind selten, sie werden in der Regel schnell von anderen Formen des Zahnverschleißes überlagert [Smith und Knight, 1984].

Der Erosionsprozess im Dentin ist noch nicht systematisch erforscht [Meurman et al., 1991], jedoch weist die Untersuchung von Meurman et al. darauf hin, dass der Substanzverlust im Dentin wie auch im Schmelz strukturabhängig ist. Zuerst wird das peritubuläre Dentin demineralisiert, da die Säure durch die Dentinkanälchen penetriert, was schließlich zu einer Erweiterung der tubuli führt. Bei längerer Einwirkungszeit der Säure erscheint auch das intertubuläre Dentin rau und porös. Sobald vitales Dentin an der Oberfläche freiliegt, besteht die Gefahr der Hypersensitivität des Zahnes. Nach Eccles und Jenkins [1974] sind etwa die Hälfte aller Dentinerosionen schmerzhaft. Dies ist meist nach schneller Destruktion des Dentins der Fall, wenn keine Anreicherung von tertiärem Dentin als Barriere erfolgen konnte und die Dentinkanälchen mit ihrem organischen, zellulären Inhalt frei liegen. Weil der Erosionsprozess oft jedoch langsam abläuft, entwickeln viele der Betroffenen keine Hypersensitivität. Die Tubuli sind dann mit aus dem Speichel präzipitierten Kristalliten verschlossen und bilden gemeinsam mit der Anreicherung von tertiärem Reizdentin durch die Odontoblasten an der Innenseite des Pulpenkavums eine effektive Barriere gegen einströmende Noxen [Lambrechts und van Meerbeek, 1996]. Physiologischerweise tritt im Alter ein ähnliches Phänomen auf, welches man als „sklerosiertes Dentin“ bezeichnet [Nalbandian et al., 1960].

Klinisch stellt sich die Schmelzerosion mit einer seidenmatten Oberfläche im Gegensatz zu einer spiegelnd glänzenden unversehrten Oberfläche dar. Der Substanzverlust ist flächenhaft und verläuft in seichten Ausbuchtungen. Es lassen sich aktive von inaktiven Erosionen abgrenzen. Nach Mannerberg [1961] erkennt man aktive Erosionen an dünn auslaufenden Schmelzzonen an der Dentinegrenze. Weiterhin ist im rasterelektronenmikroskopischen Bild die Schmelzregion als

Honigwabenstruktur zu sehen. Inaktive Erosionen weisen im Gegensatz dazu wulstig abgegrenzte Schmelzränder und eine glänzende Oberfläche auf, die Honigwabenstruktur fehlt. Ist der Substanzverlust auf den Schmelz beschränkt, bezeichnet man diese Läsion mit Grad I. Geht die Läsion über die Schmelz-Dentin-Grenze hinaus, spricht man von Erosionen Grad II, während Erosionen, die zu mehr als einem Drittel aus exponiertem Dentin bestehen, mit dem Grad III bezeichnet werden [Eccles, 1979].

Einige Bereiche der Mundhöhle sind aufgrund ihrer Lage besonders anfällig für Erosionen. Dazu gehören speziell die Frontzähne des Oberkiefers [Lussi et al., 1992]. Die Lokalisation der Erosion an Okklusal-, Palatinal- oder Labialflächen der Zähne kann ein Hinweis auf die Säureherkunft sein. Erosionen an Palatinalflächen werden häufiger bei Personen mit chronischem Erbrechen gefunden, Erosionen an Labial- und Okklusalfächen dagegen bei einer ernährungsbedingten Säurezufuhr oder sauren Umweltbedingungen. Diese Hinweise können bei einer unklaren Anamnese von Bedeutung sein. Oft ergibt sich jedoch auch kein Zusammenhang zwischen Säureherkunft und Lokalisation der Erosion, weil die Art der Nahrungsaufnahme und das Schluckverhalten individuell stark variieren können [Järvinen et al., 1992]. Das Schluckverhalten des Betroffenen, aber auch seine orale Situation als solche mit spezieller Zahnstruktur, -morphologie und -stellung beeinflusst neben der Dauer und Intensität der Säureeinwirkung den Ablauf der Erosion. Daneben ist der Speichel durch seine Zusammensetzung und Sekretionsrate von größtem modifizierendem Einfluss auf die Pathogenese, indem er zur Verdünnung und Pufferung der Säuren im Mund beiträgt [Mannerberg 1963].

2.1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Die Prävalenz von Erosionen in der allgemeinen Bevölkerung ist nicht zu unterschätzen. In einer epidemiologischen Studie von Lussi [1991] wurde bei 29,9% der 26-30 -Jährigen und 42,6% der 46-50 -Jährigen mindestens eine schwere okklusale Läsion (Grad II) diagnostiziert, acht bzw. 13% der beiden Altersklassen waren von schweren fazialen Läsionen betroffen. Die Inzidenz von

Erosionen ist steigend [Lussi und Schaffner, 2000]. Eine weitere Studie von Ganß et al. [2001(a)] zeigte, dass Erosionen besonders bei Kindern im Milchgebiss zu finden waren. 70,6% der untersuchten Kinder wiesen mindestens eine frühe Läsion (Grad I) an Milchzähnen auf, 26,4% dagegen eine schwere Läsion (Grad II). Weiterhin können Risikogruppen benannt werden, in denen verstärkt Erosionen auftreten. Dazu gehören Patienten mit Essstörungen, gastroösophagealen Erkrankungen und Personen mit speziellen Ernährungsformen wie Laktovegetarier oder Rohköstler [Linkosalo und Markkanen, 1985; Järvinen und Meurman, 1988; Järvinen et al., 1991; Rytömaa et al., 1998; Ganß et al., 1999].

Hinsichtlich der Säureherkunft lassen sich exogene von endogenen Ursachen abgrenzen.

Zu den exogenen Ursachen zählen saure Lebensmittel, Medikamente, Umweltfaktoren und der Lebensstil allgemein, worauf nun kurz eingegangen werden soll. Säurehaltige Nahrungsmittel und Getränke wie Früchte, Zitrusfrüchte, Gemüse, Fruchtsäfte und Softdrinks sind die Hauptursache für Erosionen. Vielfach konnte ein Zusammenhang zwischen einzelnen Nahrungsmitteln und dem Auftreten von Erosionen festgestellt werden. Schon Miller [1907] beobachtete die Auswirkungen von Fruchtsäuren auf die Zähne, wobei es offenbar unabhängig von der Art der Säure zu Erosionen kam. Säuren wurden auch im Hinblick auf den erzeugten Mineralverlust von Zahnproben unter standardisierten Bedingungen getestet [Holloway et al., 1958; Larsen und Nyvad, 1999]. Dabei ergaben in vitro Untersuchungen, dass das erosive Potential einer Säure außer von ihrem pH-Wert stark von ihrer Pufferkapazität abhängt, der Fähigkeit, den pH-Wert der Mundhöhle durch Abpufferung neutralisierender Substanzen aus dem Speichel lange auf einem niedrigen Niveau zu halten. Das Maß hierfür ist der Gehalt an titrierbarer Säure, der bei Zitronensäure und Zitrusgetränken am höchsten war, gefolgt von reinem Orangensaft, Ananassaft, Johannisbeersaft, Apfelsaft und kohlenensäurehaltigen Erfrischungsgetränken. Am geringsten war die zur Neutralisation erforderliche Menge von NaOH bei einem Cola-Getränk, obwohl dessen pH-Wert am niedrigsten war [Grenby, 1990]. Für

die stark erosive Wirkung der Zitronensäure ist die komplexbildende Eigenschaft des Zitrats verantwortlich, welches mit Kalzium schwerlösliche Salze bildet und so den Mineralverlust fördert. Schließlich wird über eine ganze Reihe von epidemiologischen Studien berichtet, die den Erosionsbefund in statistischen Zusammenhang mit Ernährungsparametern bringen [Allan, 1967; Davis und Winter, 1980; Eccles und Jenkins, 1974; Järvinen et al., 1991; Lussi et al., 1992; Lussi und Schaffner, 2000].

Weiterhin kann die langfristige Einnahme saurer Medikamente zu erosiven Zahnschäden führen, wobei die Art der oralen Aufnahme sowie die Dauer der Säureexposition für die Ausprägung dieses Erscheinungsbildes von Bedeutung ist [Zero, 1996]. Zu diesen Substanzen zählen Acetylsalicylsäure, Ascorbinsäure, Eisenpräparate, Säureersatzmittel sowie selbst einige Mundhygieneprodukte, beispielsweise EDTA-haltige Mundspüllösungen [Hannig, 1993]. Da jedoch die meisten Medikamente nur über einen kurzen Zeitraum hinweg verabreicht werden, ist das Risiko Erosionen zu entwickeln als eher gering einzuschätzen.

Zu den exogenen erosiven Einflüssen gehören auch saure Umweltbedingungen, wie zum Beispiel die berufsbedingte Säureexposition von professionellen Wein-Testern [McIntyre, 1992], Laboranten, die mit dem Mund Säuren pipettieren [Levine, 1973] oder Fabrikarbeitern von Druckereien oder Batterieindustrien, die sauren Dämpfen, bzw. Aerosolen ausgesetzt sind [ten Bruggen Cate, 1968]. Obwohl diese Risiken in den westlichen Ländern durch konsequente Nutzung von Schutzkleidung wie Mundschutzen etc. weitgehend reduziert werden, könnten diese Faktoren in Entwicklungsländern noch eine bedeutendere Rolle spielen.

Das Risiko, Erosionen zu entwickeln, wird außerdem von Lebensweise und Verhalten direkt beeinflusst. So kann möglicherweise ein bewusst angestrebter „gesunder“ Lebensstil die Zahngesundheit beeinträchtigen, wenn eine große Menge an saurem Obst und Gemüse verzehrt wird. Bei Personen, die sich lactovegetarisch ernähren, konnte im Gegensatz zu einer Kontrollgruppe eine erhöhte Prävalenz von Erosionen festgestellt werden. Etwa doppelt so viele Personen der Laktovegetarier wiesen schwere Erosionen auf [Linkosalo und Markkanen, 1985; Ganß et al., 1999]. Weiterhin werden aufgrund exzessiver sportlicher Aktivitäten mehr und häufiger saure Getränke zugeführt, darüber

hinaus kann der durch körperliche Anstrengung bedingte Flüssigkeitsverlust zu Dehydration und Verringerung der Speichelsekretion führen [Zero, 1996]. Auch die durch körperliche Belastung provozierte Mundatmung, zum Beispiel bei Ausdauersportarten, könnte möglicherweise die Anfälligkeit der Zähne gegenüber Erosionen erhöhen. Eine Fallstudie von Moore und Wilson [2001] berichtete von einem Marathonläufer mit einem schweren Erosionsbefund. In anderen Fallstudien konnten schwerwiegende Erosionen mit ungewöhnlichem Ess-, Trink- oder Schluckverhalten in Verbindung gebracht werden. Dabei war eine aus verschiedenen Gründen verlängerte Einwirkungszeit der erosiven Substanz in der Mundhöhle die Ursache [High, 1977; Smith und Shaw, 1987]. Anzunehmen ist, dass die Art und Weise der Aufnahme der erosiven Substanz, die Schluckgewohnheiten sowie die Bewegungen der Lippen und Wangen und der verfügbare Speichel als modifizierende Faktoren das Erosionsrisiko beeinflussen. Aus einer klinischen Fallstudie von Thomas [1957] geht hervor, dass Personen mit gleicher Säureexposition unterschiedlich starke Erosionen entwickeln können. Dies weist ebenfalls auf modifizierende Faktoren hin, die entweder in biologischen Ursachen oder in bestimmten Verhaltensweisen begründet sind.

Erosionen werden außer durch exogene Säureeinwirkung auch von Säuren endogenen Ursprungs hervorgerufen. Magensäure oder saurer Mageninhalt führt bei Erbrechen, Regurgitationen, Reflux oder saurem Aufstoßen zu Demineralisationen der Zähne. Der pH-Wert von Magensäure liegt im Bereich von 1 bis 1,5 und damit weit unter dem kritischen Wert von 4,5. Die Ursache chronischen Erbrechens ist vielfältig. Essstörungen wie Anorexia nervosa und Bulimie sowie stressbedingtes Erbrechen sind psychosomatische Erkrankungen, die vorwiegend bei jüngeren Frauen im Alter von 20 bis 30 Jahren anzutreffen sind. Etwa 5% der Frauen in den westlichen Ländern sind von Bulimie betroffen [Cooper et al., 1987]. Klinisch feststellbare Erosionen der Zahnhartsubstanz werden bei regelmäßigem Erbrechen von mindestens einmal pro Woche nach ein bis zwei Jahren manifest [Scheutzel, 1992]. Häufig ist der Zahnarzt der erste, der aufgrund des klinischen Befundes diese Erkrankungen identifiziert.

Weitere Primärerkrankungen, die zu chronischem Erbrechen oder

gastroösophagealem Reflux führen, sind die chronische Gastritis, ein peptischer Ulcus oder Insuffizienzen der gastroösophagealen Sphinktermuskulatur. Ein Reflux ist außerdem bei hohem intraabdominellem Druck, beispielsweise unter einer Schwangerschaft oder nach exzessiver Nahrungsaufnahme ein häufiges Symptom. Erbrechen tritt als Nebenwirkung vieler Medikamente auf, die entweder direkt zentral das Brechzentrum erregen, oder indirekt eine Irritation der Magenschleimhaut bewirken [Scheutzel, 1996]. Eine Erosion fördern könnten auch solche Medikamente, welche die Speichelsekretionsrate vermindern, wie einige Antihypertensiva, trizyklische Antidepressiva und Neuroleptika [Sreenby und Schwarz, 1986].

2.1.3 Therapie

Eine Umfrage unter praktizierenden Zahnärzten zeigte, dass bezüglich der Therapie nichtkariesbedingter Läsionen Informationsbedarf bestand. Die von ihnen vorgeschlagenen Therapien zur Behandlung eines konkreten Falles variierte zwischen reiner Beobachtung, einer regelmäßigen Fluoridapplikation und einer vollständigen Restauration der Läsion [Lyttle et al. 1998]. Die Unsicherheit bestand hauptsächlich in der korrekten Diagnosestellung, ohne die eine adäquate Behandlung der einzelnen Läsion nicht möglich ist. Einige Maßnahmen sind unabhängig von der Ätiologie der Läsion anwendbar, wie beispielsweise die Applikation von Fluoridgels oder -lacken, die Verwendung von niedrig abrasiven Zahnpasten (RDA < 40), mittelharten oder weichen Zahnbürsten und die Empfehlung des Gebrauchs neutraler, speichelstimulierender Kaugummis. Individuell auf die Ursache und Ausprägung der Erkrankung abgestimmte Maßnahmen können jedoch effektiver in das Geschehen eingreifen. Zur Therapie von Erosionen stehen verschiedene Möglichkeiten zur Auswahl, unter welchen zwischen kausalen und symptomatischen Therapieformen unterschieden werden kann.

Die kausale Therapie erfordert eine genaue Diagnosestellung, die auf einer sorgfältigen klinischen Inspektion und gründlichen Anamneseerhebung beruht [Imfeld, 1996]. Das exakte Verständnis des pathologischen Vorgangs wird dann

die Wahl der Behandlungsmethode beeinflussen.

Sind für Erosionen hauptsächlich saure Nahrungsmittel und Getränke verantwortlich, kann entweder der Konsum dieser Substanzen abgestellt oder auf wenig erosive Getränke zurückgegriffen werden. Sowohl in vitro als auch in situ Studien haben gezeigt, dass allein der Zusatz von Kalzium das erosive Potential von Getränken erheblich reduzieren kann. So konnte nachgewiesen werden, dass ein Orangensaft mit einem Kalziumgehalt von etwa 43 mmol/l selbst nach einer Expositionszeit von einer Woche keine Demineralisation von Zahnproben erzeugte, während das gleiche Produkt ohne Kalzium einen Substanzverlust von über 1 mm verursachte [Larsen und Nyvad, 1999]. Der Zusatz von löslichen Kalziumphosphaten, Fluoriden und anderen Mineralsalzen zu Getränken wirkt der Demineralisation des Zahnes durch Sättigung der Lösung entgegen. Auch Hay et al. [1962] berichteten über eine Verringerung der Demineralisation von Zahnhartsubstanz durch Zugabe von 300 µg Phosphat und 600 µg Kalzium pro ml Zitronensäure. Ähnliche Ergebnisse wurden durch Zusatz von Brushit, Natriumhydrogenphosphat und Natriumkarbonat erzielt [Hartles und Wagg, 1962; Reussner et al., 1975]. Spencer und Ellis [1950] fanden in Rattenzähnen eine Verringerung der Erosionsrate von 60% nach Zugabe von 50 ppm Fluorid zu Grapefruitsaft. Statistisch signifikant verringerte sich die Erosionsrate auch in einer Studie von Rytömaa et al. [1988], die 40 ppm Fluorid zu sauren Getränken hinzusetzten. Eine weitere Untersuchung von Sorvari et al. [1988] zeigte eine Verringerung des Mineralverlustes bei Zusatz von 15 ppm Fluorid.

Da durch diese Additiva zwar nachgewiesene Erfolge erzielt werden können, aber der Geschmack der Getränke beeinträchtigt wird und auch die Fluoridaufnahme schlecht zu kontrollieren ist, sind solche Modifikationen für eine breite Anwendung problematisch. Zwar sind Getränke mit einem Zusatz von Kalziumionen in Deutschland zugelassen, jedoch existieren noch kaum Untersuchungen im Hinblick auf deren Erosionspotential [Grenby 1996].

Weiterhin können nach Konsum säurehaltiger Nahrungsmittel neutralisierende Substanzen zugeführt werden, wie etwa zuckerfreie Kaugummis, die den Speichelfluss anregen. Außer einer raschen Elimination der sauren Substanz aus der Mundhöhle durch sofortiges Ausspülen mit Wasser, kann auch die

Anwendung von fluoridhaltigen Mundspüllösungen ein Schutz sein. Milch oder Käse könnten ebenfalls vor Demineralisationen des Zahnes schützen [Gedalia et al., 1991; 1992], jedoch ist unklar, inwieweit dieser Effekt auf den hohen Gehalt an Kalziumionen oder auf eine Verdickung des Pellikels durch den Fettgehalt dieser Substanzen zurückzuführen ist. Diese Empfehlungen gelten neben einer kausalen psychologischen Therapie auch für Patienten mit Essstörungen und chronischem Erbrechen während ihrer Erkrankungsphase. Theoretisch wäre das Tragen einer Zahnschiene, die während des Erbrechens die Zähne abdeckt, von Vorteil, die Umsetzung dieser Methode jedoch kaum realisierbar. Saure Getränke sollten schnell getrunken werden anstatt langsam in kleinen Schlucken, auch sollte die Aufnahme möglichst durch einen Strohhalm erfolgen [Smith und Shaw, 1993]. Patienten, deren Erosionen auf einer bestimmten Medikation beruhen, sollten eingehend auf eine Umstellung der Präparate hingewiesen werden und beispielsweise erosive Brausetabletten durch Schlucktabletten austauschen.

Symptomatische Therapien lassen die Ursache einer Erosion erst einmal unbeeinflusst. Betrachtet man die erosive Läsion ausschließlich als lokales Erscheinungsbild, ist je nach Schweregrad des Substanzverlustes entweder ein Bonding als Oberflächenversiegler oder eine Restauration mit Composites, Glasionomerkementen oder Keramikveneers die Therapie der Wahl. Diese Methoden erreichen jedoch maximal einen lokalen Schutz vor weiterer Demineralisation der Zahnhartsubstanz. Bei unveränderten Bedingungen ist es nur eine Frage der Zeit, bis der Zerstörungsprozess weiter fortschreitet und an anderen Lokalisationen in Erscheinung tritt. Daher ist eine solche allein restaurative Therapie nicht ausreichend. Umfangreiche Restaurationen sind erst nach Stillstand des pathologischen Prozesses indiziert.

Ein wichtiger Ansatz der symptomatischen Therapie ist die lokale Applikation von Fluoriden. Verschiedene Studien zeigten, dass die Anwendung von Fluoriden nicht nur einen positiven Effekt in der Kariesprophylaxe erzielt, sondern dass auch der Erosionsprozess unter hochdosierter, lokaler Applikation von Fluoridpräparaten verringert werden kann, selbst wenn die erosiven Bedingungen weiter bestehen bleiben. So zeigte ein in vitro Versuch von Graubart et al. [1972],

dass die Einwirkung von verdünntem Grapefruitsaft über 24 Stunden eine Schmelzschicht von 22 µm erodierte. Dagegen verringerte sich diese Schicht auf 9,5 µm, wenn vorher eine vierminütige lokale Applikation von 2% Natriumfluorid auf den Zahn erfolgte. Eine weitere Studie belegte, dass die lokale Anwendung von 1,2% Natriumfluorid auf Schmelz über 48 Stunden vor anschließender Demineralisation in vitro durch ein Colagetränk schützen konnte [Sorvari et al., 1994]. Ein pH-zyklischer Versuch von Ganß et al. [2001 (b)] zeigte, dass nach fünf Tagen erosiver Demineralisation durch Zitronensäure der Mineralverlust von Schmelzproben unter Anwendung lokaler hochkonzentrierter Fluoride signifikant reduziert werden konnte. In Dentinproben war dieser Effekt noch ausgeprägter, der Mineralverlust stagnierte dort trotz anhaltender Säureeinwirkung ab dem zweiten Tag vollständig. Die Fluoridapplikation bestand dreimal täglich aus einer regelmäßigen Zahnpastenanwendung und einer fluoridierten Mundspüllösung sowie an zwei Tagen einer zusätzlichen Fluoridgelanwendung. Der unterschiedliche Effekt von Fluoriden auf Schmelz und Dentin lässt strukturelle Ursachen vermuten. Da Dentin zu 30 Vol% neben anorganischem Mineral aus organischen Bestandteilen besteht (hauptsächlich Kollagen), beeinflussen diese den Erosionsprozess im Dentin und sind möglicherweise für den verstärkten therapeutischen Effekt von Fluoriden verantwortlich. In folgendem in vitro Versuch sollte daher untersucht werden, ob der Erhalt der organischen Matrix des Dentins für eine effektive Therapie von Erosionen mit Fluoriden tatsächlich von Bedeutung ist.

3 MATERIAL, METHODEN UND ERGEBNISSE DER VORVERSUCHE

3.1 Vorversuche

In Vorversuchen wurde zunächst die nach Demineralisation von Dentinproben exponierte Matrix färberisch dargestellt. Anschließend wurde untersucht, ob diese organische Deckschicht mit Kollagenase hinreichend entfernt werden kann und welche Enzymmenge dafür erforderlich ist.

3.1.1 Mikroskopischer Nachweis der Kollagenschicht

Aus zwei extrahierten dritten Molaren wurden mit einer diamantierten Bandsäge (Mat. 1) unter ständiger Wasserkühlung Blockschnitte des koronalen Schmelzes und Dentins hergestellt. Diese wurden entweder für zehn Minuten, eine, zweieinhalb oder fünf Stunden in 0,05 M Zitronensäure pH 2,3 (Chem. 1) eingelegt. Dies erfolgte im Temperierbad bei 37°C unter Schütteln. Die für zehn Minuten, eine, zweieinhalb und fünf Stunden mit Zitronensäure demineralisierten Zahnproben ließen schon mit dem bloßen Auge eine Strukturveränderung der Oberfläche erkennen. Der Zahnschmelz zeigte sich hellweiß, matt und rauh, das Dentin dagegen gelblich und weich. Eine deutliche Stufe an der Schmelz-Dentin-Grenze, wobei die Dentinschicht im Vergleich zum Schmelz stärker hervortrat, zeigte, dass der Substanzverlust durch Zitronensäure im Schmelz ausgeprägter war als im Dentin. Allerdings war diese Stufe erst ab einer Ätzzeit von einer Stunde zu erkennen und nahm mit der Dauer der Ätzzeit zu. Die Dentinoberfläche der demineralisierten Proben war elastisch und mit einem spitzen Gegenstand eindrückbar. Auch ließ sich diese Schicht mit einem Skalpell schneiden und entfernen. Nach erosiver Demineralisation wurden die Zahnproben mit Aqua dest. abgespült und nach vorsichtiger Trocknung mit Zellstoffpapier zum Anfärben des Kollagens für fünf Minuten in eine Färbelösung nach van Giesson (Chem. 2) gelegt. Eine Probe wurde ohne vorherige Säurebehandlung angefärbt. Nach Abspülen der gefärbten Dentinproben mit Aqua dest. wurden diese in

lichthärtenden Kunststoff (Mat. 2) eingebettet und mit dem Lichtpolymerisationsgerät (Mat. 3) ausgehärtet. Danach wurden Schnitte von zirka 50 - 100 μm senkrecht zur Präparatschnittebene angefertigt und diese abschließend in einem Mikroschleifsystem (Mat. 4) mit gewässertem Schleifpapier der Körnung 1200 (Mat. 5) bearbeitet. Die Dünnschnitte wurden mit Entellan (Mat. 6) auf einem Objektträger fixiert und mit Glasplättchen blasenfrei eingedeckt. Im Durchlichtmikroskop mit Messfunktion (Mat. 7 und 8) konnten die Präparate bei Vergrößerungen um den Faktor eins, zweieinhalb, vier und zehn betrachtet und die Dicke der angefärbten Kollagenschicht vermessen werden.

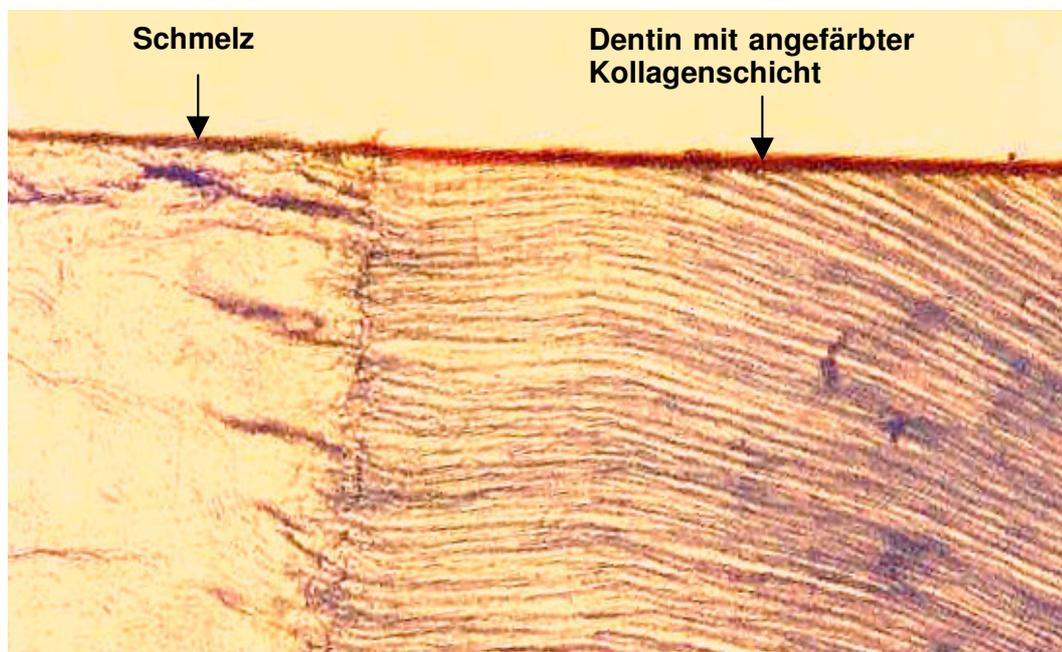


Abb 1 Dünnschliff einer Zahnprobe nach erosiver Demineralisation für eine Stunde mit 0,05 M Zitronensäure, die im Dentin exponierte Kollagenschicht ließ sich mit van-Giesson-Lösung rot anfärben

Das Anfärben der demineralisierten Zahnproben mit der Färbelösung für Kollagen nach van Giesson ergab in allen Fällen eine leuchtend rote Oberflächenschicht, die ausschließlich auf das Dentin begrenzt war. Der Schmelz ließ sich nicht anfärben. Nach erosiver Demineralisation von einer Stunde betrug die Dicke der Kollagenschicht etwa 10-16 μm (Abb. 1). Nach zweieinhalb Stunden etwa 21-37 μm und nach fünf Stunden 32-60 μm (Abb. 2).

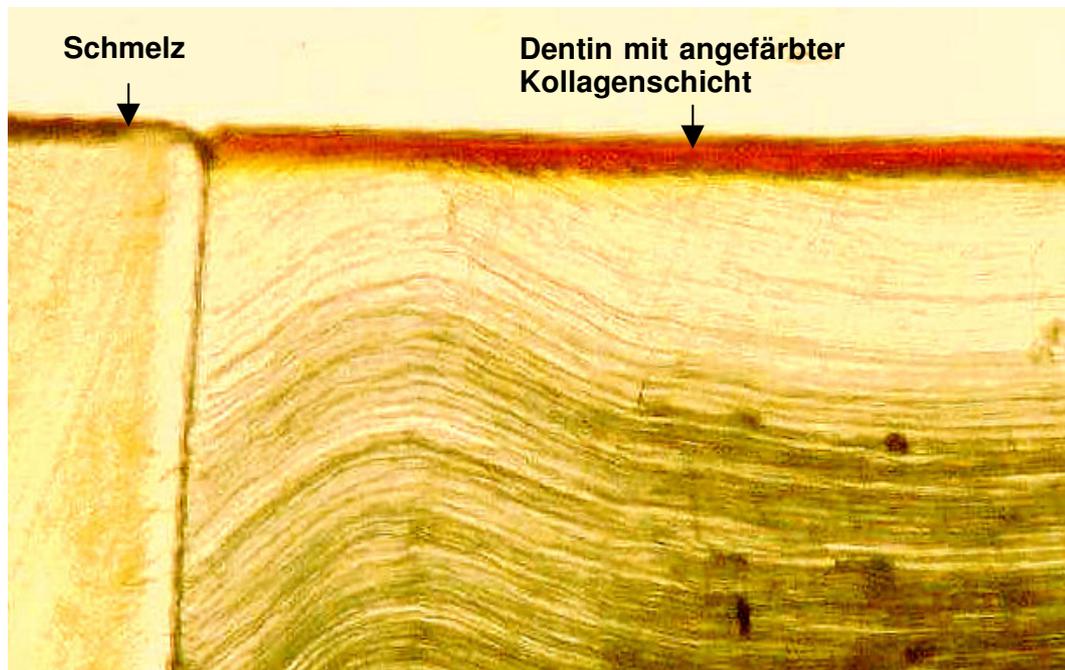


Abb 2 Dünnschliff einer Zahnprobe nach erosiver Demineralisation für fünf Stunden mit 0,05 M Zitronensäure, die im Dentin exponierte Kollagenschicht ließ sich mit van Giesson-Lösung rot anfärben

Dabei war auffällig, dass die Schichtdicke zervikal größer erschien als koronal. Lediglich die feine rote Schicht der für zehn Minuten demineralisierten Probe war nicht messbar, da sie aufgrund ihrer geringen Stärke aus dem Messbereich des Mikroskops herausfiel. Die nicht demineralisierte, geschliffene Kontrollprobe ließ sich nicht nachhaltig anfärben. Zunächst oberflächlich rot angefärbt, ließ sich die Farbe fast vollständig abspülen, der verbleibende rötliche Schimmer an der Dentinoberfläche war nicht messbar.

3.1.2 Bestimmung der erforderlichen Enzymmenge zur Entfernung der Kollagenschicht

Zur Exposition der organischen Schicht wurden vier Zahnproben für eine Stunde, zweieinhalb und fünf Stunden mit Zitronensäure demineralisiert und anschließend nach Abspülen mit Aqua dest. in jeweils 1 ml Remineralisationslösung [Gerrard und Winter, 1986] eingelegt. Dieser Lösung waren bei der für eine Stunde demineralisierten Probe 100 Units (1 Unit $\hat{=}$ 0,5325 μ g Kollagenase), den beiden

zweieinhalb Stunden erodierten Proben einmal 100 bzw. 400 Units, der fünf Stunden lang erodierten Probe 400 Units Kollagenase (Chem. 3) zugesetzt. Nach Inkubation für 19 bis 23 Stunden bei 25 °C unter leichtem Schütteln wurden die Proben abgespült, leicht getrocknet und zum Anfärben des Kollagens in die Färbelösung nach van Giesson gelegt. Anschließend erfolgte das Einbetten der gefärbten Proben in Kunststoff und nach Ablauf der Aushärtungsphase die Herstellung von Dünnschliffen zur mikroskopischen Betrachtung. Schon makroskopisch war weder an der für eine Stunde, zweieinhalb oder fünf Stunden demineralisierten und mit Kollagenase behandelten Proben ein Höhenunterschied zwischen Schmelz und Dentin zu erkennen. Die Dentinoberfläche war bei allen Proben auf das Niveau des Schmelzes abgetragen und erschien im Vergleich zum Schmelz uneben und hügelig. Die Oberfläche war hart, trocken und ließ sich weder eindrücken noch schneiden. Nach Anfärben der Proben mit van Giesson-Lösung war eine leichte Färbung der Versuchsfläche zu erkennen, welche aber bei fast allen Proben zu geringen Ausmaßes war, um mit dem Mikroskop gemessen werden zu können. Sowohl bei der für eine Stunde und zweieinhalb Stunden demineralisierten Probe mit dem Zusatz von jeweils 100 Units Kollagenase pro ml Remineralisationslösung (Abb. 3), als auch bei der mit 400 Units Kollagenase versetzten zweieinhalb Stunden lang demineralisierten Probe war keine angefärbte Schicht mehr messbar. Nur die für fünf Stunden demineralisierte Probe mit einem Zusatz von 400 Units Kollagenase pro ml wies noch eine messbare angefärbte Schichtdicke auf, die zirka 5 - 12 µm betrug. Dies zeigt, dass die Menge von 100 Units Kollagenase pro ml Remineralisationslösung zur vollständigen Entfernung einer durch eine Stunde oder zweieinhalb Stunden erosiver Demineralisation exponierten organischen Schicht der untersuchten Probengröße ausreicht. Damit war ein Zusatz von 400 Units Kollagenase pro ml nicht erforderlich. Bei für fünf Stunden demineralisiertem Dentin müsste entweder die Inkubationszeit verlängert oder die Menge an Kollagenase erhöht werden, um eine vollständige Entfernung der Kollagenschicht zu erzielen. Da für den geplanten Versuchsaufbau eine Demineralisationszeit von insgesamt einer Stunde pro Tag vorgesehen war, reicht die Menge von 100 Units pro ml Remineralisationslösung zur Entfernung des exponierten Kollagens aus.

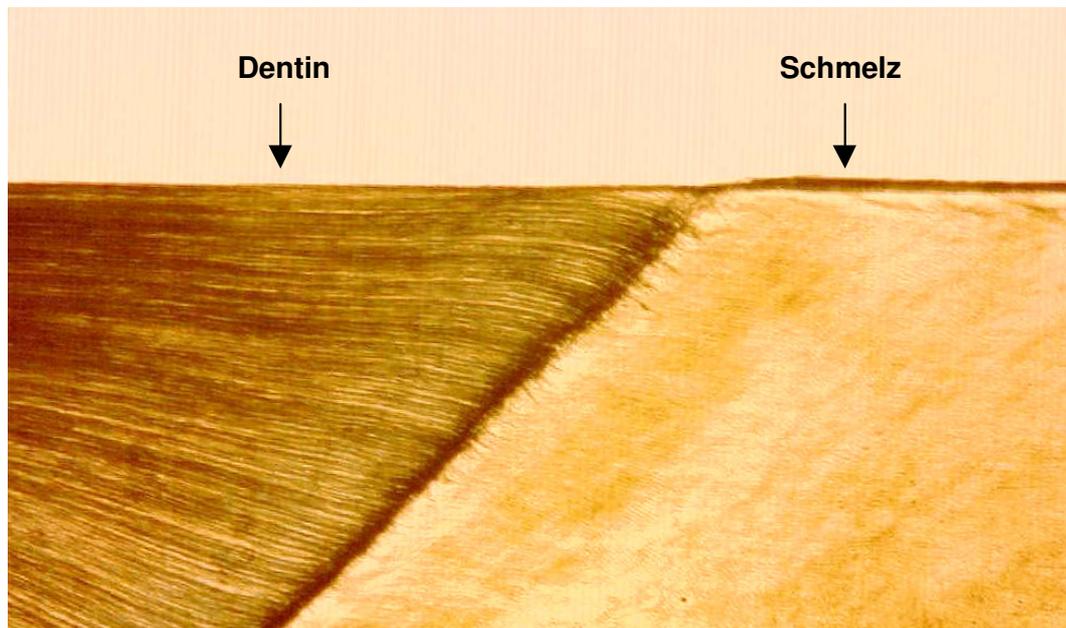


Abb 3 Dünnschliff einer Zahnprobe nach erosiver Demineralisation für zweieinhalb Stunden mit 0,05 M Zitronensäure und Inkubation mit Kollagenase (100 U pro ml) für 21,5 Stunden zur enzymatischen Entfernung der Kollagenschicht. Es ist keine gefärbte Schicht mehr nachweisbar.

3.1.3 Mikroskopische Darstellung der Dentinproben aus einem pH-zyklischen Versuch über fünf Tage mit und ohne Kollagenase

Um zu überprüfen, ob auch unter den für den Hauptversuch geplanten Bedingungen einer periodischen Demineralisation mit alternierenden Remineralisationszeiten die enzymatische Entfernung der exponierten organischen Matrix mit Kollagenase stattfindet, wurden einige Zahnproben einem pH-zyklischen Vorversuch unterzogen.

Dazu wurden vier kariesfreie, retinierte dritte Molaren ausgewählt und daraus Dentinblockschnitte hergestellt. Pro Zahn konnten zwei gleichgroße Dentinschnitte gewonnen werden. Jeweils eine der Proben wurde zusätzlich zur zyklischen Demineralisation mit Zitronensäure über fünf Tage mit Kollagenase behandelt (Gruppe A), die zweite Probe diente im gleichen pH-zyklischen Versuch, jedoch ohne Kollagenasezusatz, als Kontrollgruppe (Gruppe B). Bei

einem Probenpaar (Probe 4) wurde zusätzlich eine Hälfte des Dentins und des Schmelzes mit einem lichthärtenden Kleber (Mat. 9) abgedeckt, um die Versuchsfläche mit der Ausgangssituation vergleichen zu können. Täglich erfolgte bei beiden Gruppen über den Tag verteilt für 6 x 10 Minuten eine Demineralisation mit 0,05 M Zitronensäure (pH 2,3). Zwischendurch und über Nacht lagen die Proben in einer Remineralisationslösung [Gerrard und Winter, 1986]. Pro Probe wurde 1 ml dieser Lösung verwendet, dem in Gruppe A 100 Units Kollagenase zugesetzt waren. Die Zitronensäure wurde im Überschuss verwendet. Die Lösungen wurden täglich erneuert und dreimal pro Tag auf konstante Temperatur und mit einer ionenselektiven Elektrode (Mat. 10) auf gleichbleibenden pH-Wert überprüft. Die Kollagenaselösung wurde am ersten Versuchstag für den gesamten Versuchsablauf hergestellt, um zu prüfen, ob die Enzymaktivität über die gesamte Versuchswoche hindurch erhalten bleibt und bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt. Die Inkubation erfolgte bei 25°C unter leichtem Schütteln. Nach Abschluss der Versuchsreihe wurden die Präparate angefärbt, in Kunststoff eingebettet und ausgehärtet. Dann schloss sich die Herstellung von 50-100 µm dicken Schnitten zur Mikroskopie an. Auch im pH-zyklischen Versuchsablauf konnte bei der Gruppe ohne Kollagenase (Gruppe B) schon makroskopisch die Ausbildung einer organischen Deckschicht des Dentins beobachtet werden, die sich gegenüber dem Schmelzniveau ab dem zweiten Tag als positive Stufe abhob. In der mit Kollagenase behandelten Versuchsgruppe (Gruppe A) war diese Schicht nicht vorhanden, dort lag der Schmelz und Dentinbereich weitgehend auf einem Niveau. Insbesondere nach der längeren Inkubation mit Kollagenase über Nacht war eine Angleichung des Niveaus festzustellen. Die zur Hälfte mit Kleber abgedeckte Probe vier (Abb. 4) zeigte eine deutliche Stufe am Übergang der demineralisierten und mit Kollagenase behandelten Fläche zu dem geschützten Areal. Die Versuchsfläche war gleichmäßig abgetragen und verlief in seichten Ausbuchtungen. Die Tiefe der Läsion betrug etwa 176 - 201 µm, zervikal sogar etwa 300 µm. Bei keiner mit Kollagenase behandelten Probe konnte mit dem Messmikroskop eine angefärbte Kollagenschicht gemessen werden.

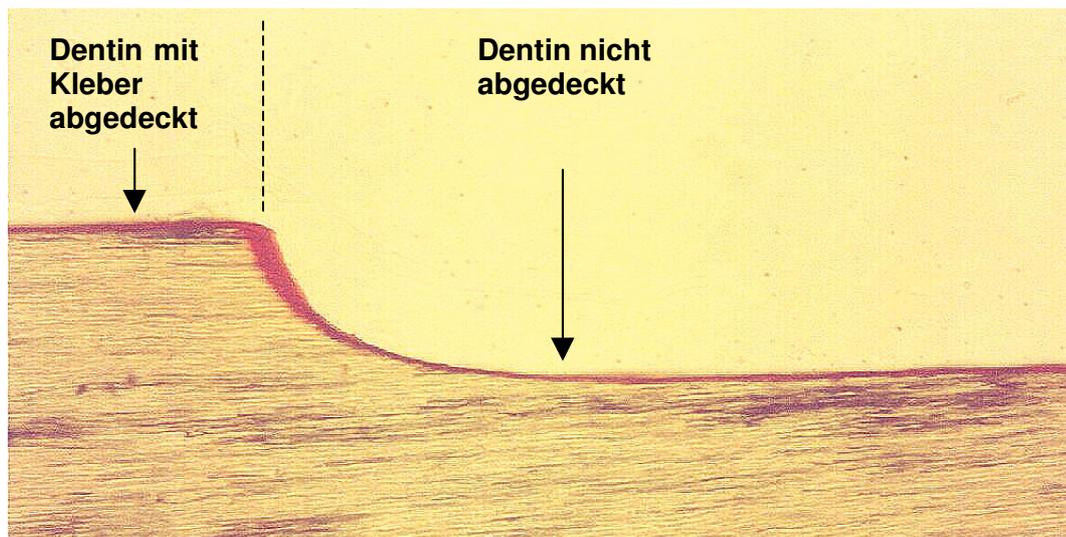


Abb 4 Enzymatisch abgetragene Kollagenschicht nach zyklischer Demineralisation des Dentins mit Zitronensäure (0,05 M) für fünf Tage über 6 x 10 min pro Tag, die Probe war zur Hälfte mit Kleber abgedeckt und unterlag dort keiner Demineralisation

Die nicht enzymatisch behandelten Proben zeigten eine unterschiedlich ausgeprägte Dicke der angefärbten Kollagenschicht, obwohl die Versuchsbedingungen gleich gewählt waren. Probe eins entwickelte eine exponierte organische Deckschicht von 49 - 54 μm Dicke, Probe zwei von 56 - 67 μm , Probe drei von 22 - 37 μm und Probe vier von 101- 104 μm Dicke.

Abb. 5 zeigt die zur Hälfte mit Kleber abgedeckte Probe, welche die gefärbte organische Schicht anschaulich darstellt.

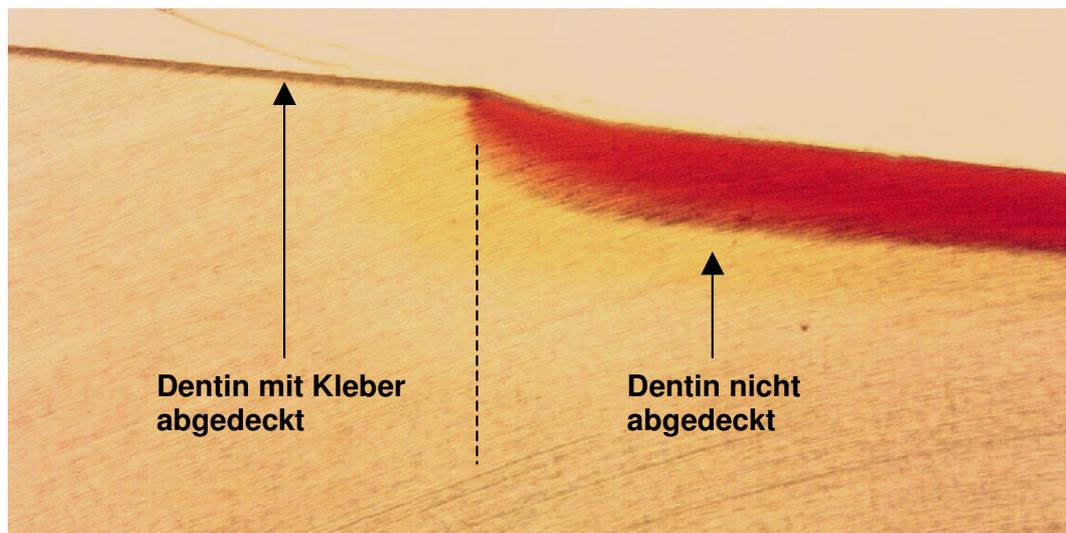


Abb 5 Anfärbte Kollagenschicht nach zyklischer Demineralisation des Dentins mit Zitronensäure (0,05 M) für fünf Tage über 6 x 10 min pro Tag, die Probe war zur Hälfte mit Kleber abgedeckt und unterlag dort keiner Demineralisation

3.2 Hauptversuch

Der Hauptversuch bestand aus einer 5-tägigen pH-zyklischen Demineralisation von Dentinproben mit regelmäßiger Fluoridapplikation und Inkubation einiger Proben mit Kollagenase in drei verschiedenen Versuchsgruppen.

3.2.1 Auswahl und Vorbereitung der Proben

Für die Herstellung der Proben wurden ausschließlich operativ entfernte, kariesfreie dritte Molaren verwendet, welche zum Zeitpunkt der Extraktion noch nicht mit der Mundhöhle in Kontakt gekommen, sondern vollständig mit Schleimhaut bedeckt waren. Um die Austrocknung der Zähne zu verhindern und eine Desinfektion zu erreichen, wurden sie direkt nach der chirurgischen Entfernung in eine wässrige gesättigte Thymollösung (Chem.4) eingelegt und dort bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Die den Zähnen grob anhaftenden Weichgewebsreste wurden mit einem Skalpell entfernt und die Fissuren mit einer Zahnbürste von abgelagertem, geronnenem Blut befreit.

3.2.2 Herstellung der Zahnschnitte

Von 25 ausgewählten Zähnen wurden die Zahnkronen gerade unterhalb der Schmelz-Zementgrenze von den Wurzeln abgetrennt. Dies erfolgte mit dem EXAKT-Trennschleifsystem, bei welchem die Zähne mit einem lichthärtenden Kleber (Mat. 9) an einer Plexiglasplatte fixiert wurden, die durch eine Vakuumpumpe an einem Metallschlitten haftete. Der Schlitten wird durch ein Gewicht von 50 Gramm an ein Diamantsägeblatt mit der Schnittgeschwindigkeit von 200 m/min herangeführt, welches den Zahn mit einem Materialverlust von zirka 200 μm durchschnitt. Die so erhaltenen Zahnkronen ließen sich ohne Verluste sauber von der Klebeschicht befreien und für weitere Schnitte an den Glattflächen erneut aufkleben. In einem Arbeitsgang ließ sich so der Schmelzmantel der oralen und bukkalen Seite der Zähne entfernen. Im nächsten Schneidevorgang erfolgte nach Abtrennung des mesialen oder distalen Schmelzmantels die Erzeugung der endgültigen Schnitte, die nun vollständig aus Dentin bestanden. Mit der Ringbandsäge ließen sich unter Wasserkühlung bereits 900 bis 1200 μm dicke Proben abtrennen, pro Zahn konnten dabei etwa drei bis fünf Proben gewonnen werden. Unter Verwendung von Sandpapier der Körnung 800 wurden die Proben abschließend in einem Mikroschleifsystem (Mat. 4) auf eine Stärke von 700 $\mu\text{m} \pm 20 \mu\text{m}$ reduziert, was mit einem Mikrometer (Mat. 11) überprüft werden konnte. Die fertigen Dentinschnitte verblieben bis zur weiteren Verwendung in 100%iger Luftfeuchtigkeit im Kühlschrank.

3.2.3 Versuchsgruppen und -Ablauf

Pro Zahn wurden drei Schnitte ausgewählt, die alle im Mittel 700 $\mu\text{m} \pm 20 \mu\text{m}$ Dicke betragen, und jeweils zu drei Versuchsgruppen mit jeweils 25 Proben zugeordnet. Gruppe 1 bildete die Kontrollgruppe (nur Erosion), Gruppe 2 die Fluoridgruppe ohne Kollagenase, Gruppe 3 die Fluoridgruppe mit Kollagenase. Alle Proben wurden unter sorgfältiger Kontrolle einer unversehrten Oberfläche mit einem Präzisionskleber (Mat. 13) auf spezielle Plexiglashalter für die Mikroradiografie (Mat. 14) aufgeklebt. Diese wurden unter Zuordnung zu Gruppe und Zahn beschriftet und bis zur endgültigen Versuchsdurchführung in 100%iger

Luftfeuchtigkeit aufbewahrt.

Um alle Proben möglichst standardisiert behandeln zu können, wurden sie flach nebeneinander auf ein speziell dafür angefertigtes Plastiksieb platziert, mit welchem sie gleichzeitig und gleichmäßig in die entsprechenden Behältnisse der verschiedenen Lösungen eingetaucht werden konnten (Abb. 8).



Abb 8 Plastikträger mit in Probenhalter für die Mikroradiografie eingeklebten Zahnproben. Mit dieser Vorrichtung war gewährleistet, dass alle Proben gleichmäßig den Versuchslösungen ausgesetzt waren

Dieses Sieb erleichterte auch das Herausnehmen der Proben und gewährleistete ein problemloses Abspülen unter fließendem Wasser. Es wurde darauf geachtet, dass alle Proben ausreichend von den jeweiligen Lösungen bedeckt und durch leichtes Schütteln gleichmäßig umspült wurden. Die Temperatur der Lösungen wurde konstant auf 25 °C gehalten.

Die Proben der Gruppe 1 wurden täglich für 6 x 10 Minuten der Demineralisationslösung (0,05 M Zitronensäure, pH 2,3) ausgesetzt, anschließend unter fließendem Leitungswasser eine Minute abgespült und mit einem Luftpüster vorsichtig getrocknet. Darauf folgte die Lagerung in der Remineralisationslösung. Die Proben der Gruppe 2 wurden zusätzlich zu den Maßnahmen der Gruppe 1

einer intensiven Fluoridierung ausgesetzt, welche nach jeder Demineralisation und einer direkt anschließenden fünfminütigen Lagerung in der Remineralisationslösung erfolgte. Nach der ersten, dritten und fünften erosiven Demineralisation wurden die Proben in die Fluoridspüllösung (Chem. 5) eingelegt, nach der zweiten, vierten und sechsten in die Zahnpastenlösung (Chem. 6). Jeweils am ersten und dritten Versuchstag wurde die letzte Zahnpastenanwendung durch eine Fluoridgellösung (Chem. 7) ersetzt. Die Dauer der jeweiligen Fluoridanwendung betrug fünf Minuten, die verbleibende Zeit über befanden sich die Proben in der Remineralisationslösung. Nach jedem Umlagern der Proben wurden diese unter fließendem Wasser für eine Minute abgespült und mit einem Luftpüster vorsichtig getrocknet. Auch hier erfolgte die Inkubation bei 25 °C unter leichtem Schütteln.

Der Gruppe 3 war zusätzlich zu den genannten Maßnahmen der Gruppe 1 und 2 in der Remineralisationslösung das Enzym Kollagenase (53,25 µg Kollagenase pro ml $\hat{=}$ 100 U pro ml) zugesetzt (Chem. 3). Alle Lösungen wurden auch in dieser Gruppe täglich erneuert.

Am Ende jedes Versuchstages wurde mittels mikroradiografischer Aufnahmen der Mineralgehalt der jeweiligen Probe bestimmt und in Beziehung zum Ausgangswert, der von jeder Probe vor Beginn der Versuchsreihe gemessen wurde, gebracht.

3.2.4 Herstellung der Lösungen

Die Remineralisationslösung wurde nach Vorgabe des Rezeptes von Gerrard und Winter [1986] hergestellt, wobei stets ein Liter angesetzt und bis zum Gebrauch in Lichtschutzflaschen aus Glas im Kühlschrank gelagert wurde. Der pH-Wert der Lösung betrug 6,5-6,7.

Die Kollagenaselösung wurde am ersten, dritten und fünften Tag hergestellt, die erforderliche Menge von 53,25 µg Kollagenase pro ml ($\hat{=}$ 100 U pro ml) wurde mit einer Analysenwaage (Mat. 12) abgewogen, in der Remineralisationslösung aufgelöst und bis zum Gebrauch verschlossen im Kühlschrank aufbewahrt.

Für die Herstellung der 0,05 M Zitronensäure wurden 10,51 g pulverisiertes

Zitronensäuremonohydrat in einem Liter destilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert der fertigen Lösung betrug 2,3 (Chem. 1).

Die Zahnpastenlösung bestand aus einem Gemisch an Zahnpaste (Chem. 6) mit einem Fluoridgehalt von 0,15% (Natriumfluorid) und Leitungswasser im Verhältnis 1:3. Die Zahnpaste ließ sich in kleinen Portionen nach und nach homogen auflösen, der pH-Wert der Lösung betrug 7,64. Als fluoridierte Mundspüllösung wurde ein unverdünntes Fertigpräparat (Chem. 5) mit einem Fluoridgehalt von 0,025% in Form von Olafur/Natriumfluorid verwendet. Der pH-Wert dieser Lösung betrug 3,55. Aus einem sauren Fluoridgegel mit einem Fluoridgehalt von 1,25% Natriumfluorid (Chem. 7) wurde eine Verdünnung mit Leitungswasser im Verhältnis 1:3 hergestellt, und unter Erwärmen in eine Suspension gebracht. Diese Lösung hatte einen pH-Wert von 4,73.

3.2.5 Bestimmung des Mineralgehaltes

Der Mineralgehalt der Dentinproben wurde mit der longitudinalen Mikroradiografie (LMR) bestimmt, einer von Josselin de Jong [1988] entwickelten und seither mehrfach ausführlich beschriebenen Methode. Die Mikroradiografie (Mikroradiograf, Mat. 15) ist eine nicht destruktive Methode zur Bestimmung des Mineralgehaltes von Zahnhartsubstanzen, die die Weiterverwendung der untersuchten Probe ermöglicht. Dadurch können Veränderungen des Mineralgehaltes während eines De- und Remineralisationsprozesses im Verlauf dargestellt und quantitativ erfasst werden. Ein Mikroradiogramm ist ein Röntgenstrahlenabsorptionsbild, das üblicherweise die untersuchte Probe zusammen mit einer Eichtrappe abbildet. Dabei befindet sich die Zahnprobe parallel zum Film. Die zur Kalibrierung verwendete Eichtrappe besteht aus zwei separaten Aluminiumtreppen, die um 90° verschoben übereinander angeordnet sind. Durch die Kombination beider Treppen erhält man insgesamt 100 Röntgenstrahlenabsorptionswerte, die mit Aluminiumschichtstärken zwischen 110 µm und 1100 µm korrespondieren [de Josselin de Jong et al., 1987; ten Bosch und Angmar-Mansson, 1991].

Die gemessenen Filmtransmissionswerte der Zahnprobe werden mit Hilfe einer

aus den entsprechenden Werten der Eichtreppe gebildeten polynomischen Funktion in Röntgenstrahlenabsorptionen umgewandelt und aus diesen gemäß der Formel von Ericsson [1965] die Konzentration des absorbierenden Materials errechnet. Da die LMR-Software auf die Berechnung von Schmelzmineral einer Probendicke von zirka 400 μm programmiert ist, wurden die Dentinproben für den vorliegenden Versuch in einer Stärke von zirka 700 μm angefertigt, um die absolute Menge an Mineral beizubehalten. Nach Schroeder [1992] beträgt der Mineralgehalt von Dentin nämlich nur 45 Vol% während dieser Anteil im Schmelz durchschnittlich 86 Vol% ausmacht.

3.2.6 Herstellung der Mikroradiogramme

Zur Fixierung der Dentinproben für den Versuchsablauf in einer definierten Position wurden diese mit einem Präzisionskleber (Mat. 13) in spezielle LMR-Probenhalter eingeklebt. Diese Halter wurden zur Aufnahme des Röntgenstrahlenabsorptionsbildes einer Probe mit der eingeklebten Probe in ein exakt passendes Geschiebe im Kameragehäuse eingesetzt, welches die Position des Halters zum Film und zur Aluminiumeichtreppe festlegt. Diese Position war reproduzierbar und für nachfolgende Messungen von Bedeutung. Die Zahnschnitte zeigten zum Film, zu welchem ein minimaler Abstand von zirka 0,3 mm, sowie ein maximaler Fokus/Objekt Abstand von zirka 340 mm gewährleistet war. Die Arbeitsspannung und die Stromstärke betragen 20 kV bzw. 50 mA. Es wurde ein hochauflösender Holografiefilm (Mat. 16) verwendet. Die Belichtungszeit pro Probe betrug zweieinhalb Minuten, was nach Angaben des Herstellers (Josselin de Jong) bei einer Probendicke von 400 μm Schmelz zu einer optimalen optischen Diskrimination des Röntgenbildes führt. Vor Einsetzen der Probenhalter in das Kameragehäuse wurden die Proben sorgfältig mit einem Luftpüster getrocknet, da schon geringe Feuchtigkeitsmengen die Qualität der Aufnahme herabsetzen.

3.2.7 Filmentwicklung

Der belichtete Holografiefilm wurde bei absoluter Dunkelheit in eine

Entwicklungsspule eingelegt und bei Zimmertemperatur fünf Minuten lang entwickelt (Chem. 8). Nach Wässerung mit Leitungswasser folgte eine fünfminütige Fixierung (Chem. 9), woraufhin sich nach erneuter Wässerung die Lagerung in Ethylalkohol (Chem. 10), ebenfalls für fünf Minuten, anschloss. Jeder Vorgang erfolgte unter ständiger Bewegung der Lösung. Abschließend wurde der entwickelte Film für 15 Minuten gewässert, bevor er kurz in ein Netzmittel getaucht wurde (Chem. 11). Schließlich wurde der Film für eine Stunde in einem Trockenschrank hängend getrocknet.

3.2.8 Auswertung

Die erhaltenen Mikroradiogramme wurden mit dem Inspektor Mikroradiografiesystem (Mat. 17) ausgewertet. Die Hardware dieses Systems bestand aus einem an ein Mikroskop angeschlossenen Mikrocomputer, dessen Software sowohl den beweglichen Objektisch als auch den die Lichtemission messenden Detektor steuerte. Bei der ersten Auswertung des Mineralgehaltes vor Beginn der Versuchsreihe wurde innerhalb jeder Probe ein Messfeld festgelegt, was nach manueller Einstellung zweier Referenzpunkte in den darauffolgenden Messungen automatisch wieder aufgefunden werden konnte. Dieses ein Quadratmillimeter große Areal wurde systematisch von einem Scanner abgefahren und dessen Schwärzung im Vergleich zu den gemessenen Scans der Aluminiumeichtreppe zur Berechnung des Mineralgehaltes der Probe herangezogen. Da bei jeder Folgemessung das gleiche Areal gemessen wurde, konnten die Werte mit dem Ausgangswert verglichen und durch Subtraktion von diesem als Änderung des Mineralgehaltes ermittelt werden.

3.2.9 Testmessungen zur Reproduzierbarkeit der Messungen

Um eventuelle Ungenauigkeiten der computergestützten Berechnung des Mineralgehaltes festzustellen, wurden direkt nacheinander zehn Messungen derselben mikroradiografischen Aufnahme angefertigt. In Tabelle 1 sind die jeweils berechneten Werte des Mineralgehaltes dieser Aufnahme in μm aufgeführt. Die Standardabweichung der gemessenen Werte vom Mittelwert

betrug 0,52 μm .

Tab 1: Mehrmals berechneter Mineralgehalt in μm derselben radiografischen Aufnahme einer Dentinprobe

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
310	310	311	310	309	310	310	310	312	310

Weiterhin wurde über den Versuchszeitraum hinweg zehnmal eine bestimmte unbehandelte Dentinprobe belichtet und ausgewertet, um etwaige Fehler im Bereich des Mikroradiografen oder der Belichtung des Filmes aufzudecken (Tabelle 2). Die Werte betragen im Mittel 365,6 μm , die Standardabweichung 9,4 μm .

Tab 2: Mineralgehalt in μm einer mehrmals auf verschiedenen Filmen projizierten Dentinprobe

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
365	348	355	363	365	364	381	374	373	368

3.2.10 IR-Spektroskopie

An einigen Proben jeder Versuchsgruppe wurden zur ergänzenden Strukturaufklärung der Oberflächen IR- Spektren aufgenommen. Zum Vergleich dienten Spektren von reinem Schmelz und von vollständig entmineralisiertem Dentin (organische Matrix).

Die IR-Spektroskopie ist eine einfache, schnelle und zuverlässige Methode, um eine Substanz chemisch zu identifizieren und ihrer Verbindungsklasse zuzuordnen. Es werden Schwingungsfrequenzen funktioneller Gruppen eines Moleküls als Absorptionsbanden dargestellt, die jeweils für eine spezielle Substanz charakteristisch sind. Die Schwingungsfrequenzen organischer Moleküle liegen im Bereich von 2,5 bis 16 μm . Häufig wird die Lage der Absorptionsbande im Diagramm in der reziproken Wellenlänge, der Wellenzahl

(in cm^{-1}), was der Anzahl Schwingungen pro Zentimeter entspricht, wiedergegeben. Der Meßbereich des IR-Spektrometers erstreckt sich daher von 4000 cm^{-1} bis etwa 625 cm^{-1} . Eine infrarote Lichtquelle im Spektrometer emittiert den gesamten Frequenzbereich der IR-Strahlung, Wellenlängen von $0,75 \mu\text{m}$ an aufwärts. Diese Strahlung trifft auf die zu messende Probe und regt die Gruppen der Substanz zu Schwingungen an. Jede Bindung innerhalb eines Moleküls besitzt eine charakteristische Schwingungsfrequenz, die von der jeweiligen Atommasse der Bindungspartner, aber auch von der Stärke der Bindung abhängt. Diesen Zusammenhang beschreibt das Hook'sche Gesetz.

Hook'sches Gesetz:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{F \cdot (m_1 + m_2)}{m_1 \cdot m_2}}$$

mit

- $\tilde{\nu}$ = Frequenz
- F = Kraftkonstante der Bindung
- m_1 = Masse des Atoms 1
- m_2 = Masse des Atoms 2

Daraus ergibt sich, dass die Wellenzahl des Absorbptionsbereiches um so höher wird, je größer die Bindungsstärke zwischen zwei Atomen ist. Dagegen resultiert eine kleinere Wellenzahl, wenn die Atommassen größer werden (Produkt der Massen im Nenner, Summe der Massen im Zähler).

Wenn eine Schwingungsfrequenz im Molekül nun in den Bereich der Wellenlänge der emittierten Strahlung fällt, wird Energie dieser Frequenz aus dem Licht absorbiert. Der resultierende Strahl wird im Vergleich zu einem Nullstrahl mit ungeschwächter Intensität gemessen und als Absorption gegenüber der Wellenzahl (s.o.) aufgezeichnet. Ein komplexes Molekül besitzt jedoch eine große Zahl von Schwingungsmöglichkeiten, an denen das gesamte Molekül beteiligt ist. Es treten somit eine Vielzahl an Schwingungen auf: Valenzschwingungen (asymmetrisch, symmetrisch) und Deformationsschwingungen (Pendel-, Spreiz-,

Kipp- und Torsionsschwingungen). In erster Näherung sind jedoch einige dieser Schwingungen auf bestimmte Bindungen oder funktionelle Gruppen beschränkt, während andere als Schwingungen des ganzen Moleküls aufgefasst werden müssen. So kann hauptsächlich der Vergleich zweier Spektren eindeutig die Identität bzw. Nichtidentität der betroffenen Probe mit der Referenzsubstanz liefern. Die in der Literatur angegebenen Bandenlagen sind katalogisiert (Sadler-Katalog) bzw. in digitalisierter Form in Datenbanken erfasst [Hesse et al., 1991; Williams und Fleming, 1991].

Zur Aufnahme der IR-Spektren wurde in der vorliegenden Arbeit ein Fourier-Transform-IR-Spektrometer mit Michelson Interferometer (Mat. 18) verwendet. Dieses ist zur Berechnung der aufgezeichneten Interferenzen zweier durch die Probe geleiteten Lichtbündel an einen Computer gekoppelt, der die Daten in die konventionelle Darstellung von Spektren mit der Absorption als Funktion der Wellenzahl umwandelt.

Die Messung erfolgte über eine „Golden Gate“-Einfachreflexions ATR-Einheit, die aus einem Probenhalter mit Diamantkristall 45° besteht (Mat. 19), der auf eine optische Grundeinheit im Spektrometer montiert wird. Die Grundeinheit ist aus einer Kombination von Spiegeln und Linsen aufgebaut. Eine Anpressvorrichtung gewährleistet einen reproduzierbaren Druckkontakt zwischen der Probe und dem Einfach-Reflexions-Kristall. Um Aussagen über Oberflächen von Substanzen treffen zu können ist es erforderlich, dass die Probe plan auf der Messfläche aufliegt. Bei der Untersuchung von Oberflächen müssen diese fein geschliffen sein, damit es überhaupt zu brauchbaren Messergebnissen und nicht zu unregelmäßigen Reflexionen kommt. Bei den Dentinproben hat es sich bewährt, die Messungen im feuchten Zustand durchzuführen, da dann die durch Wassereinlagerung gequollene Oberfläche gleichmäßiger an die Messfläche anzudrücken ist.

Es wurden Spektren der unbehandelten Dentinproben (sog. Baseline-Messungen) aufgezeichnet sowie nach Abschluss der Versuchsreihe Messungen an fünf zufällig ausgewählten Proben jeder Versuchsgruppe durchgeführt. Außerdem wurden Vergleichsspektren von vollständig entmineralisiertem Dentin (mit

EDTA-Lösung; Chem. 12) und reinem Schmelz angefertigt. Zusätzlich wurde zur Information über die Homogenität der Oberfläche der einzelnen Probe diese an mehreren Stellen gemessen und die erhaltenen Spektren miteinander verglichen. Außerdem erfolgte eine wiederholte Messung an derselben Stelle, um die Reproduzierbarkeit der Spektren festzustellen. Die Messung jeder einzelnen Probe dauerte ca. zweieinhalb Minuten. In dieser Zeit unterlagen die Proben keiner Austrocknung.

3.2.11 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS 10.0 für Windows 98. Zum Vergleich der Versuchsgruppen wurden aus den jeweils gemessenen Werten die arithmetischen Mittelwerte, Standardabweichungen, Mediane sowie Minima und Maxima errechnet. Die Daten wurden mit dem Kolmogoroff-Smirnoff-Test hinsichtlich einer Normalverteilung geprüft, welche hinreichend bestätigt werden konnte. Um zwischen den Gruppen an jedem Versuchstag Unterschiede nachzuweisen, wurde die einfache Varianzanalyse mit dem Anschlussstest nach Tukey durchgeführt, ebenso für Unterschiede zwischen den Versuchstagen innerhalb derselben Gruppe. Hierbei wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ als signifikant angesehen.

3.3 Materialien und Chemikalien

- Mat. 1: Exakt Trennschleifsystem
Exakt- Apparatebau, Otto Herrmann; Norderstedt, BRD
- Mat. 2: Einbettkunststoff Technovit 7200VLC
Kulzer-Exakt; Wehrheim, BRD
- Mat. 3: Exakt Lichtpolimerisationsgerät
Exakt - Apparatebau, Otto Herrmann; Norderstedt, BRD
- Mat. 4: Exakt Mikroschleifsystem
Exakt- Apparatebau, Otto Herrmann; Norderstedt, BRD
- Mat. 5: Schleifpapier FE 50, WS-Flex 18 A, Körnung P-1200; 800
Hermes, BRD

-
- Mat. 6: Entellan, Schnelleindeckmittel Art.-Nr.: 1.07961
Merck; Darmstadt, BRD
- Mat. 7: Makroskop M 420
Leika; Bensheim, BRD
- Mat. 8: Messuhr
Mitutoyo; Tokyo, Japan
- Mat. 9: Fixationskleber Technovit 7200 VLC
Kulzer-Exakt; Wehrheim, BRD
- Mat. 10: pH-Meter 761 Calimatic
Knick; Berlin, BRD
- Mat. 11: Mikrometer mit Digitalanzeige, 0-35 mm; 0,001 mm
Mitutoyo; Tokyo, Japan
- Mat. 12: Analysen-Feinwaage M 5 SA
Mettler; Zürich, Schweiz
- Mat. 13: Präzisionskleber Technovit 7210 VLC
Kulzer-Exakt; Wehrheim, BRD
- Mat. 14: LMR-Plexiglashalter
Inspektor Research Systems BV; Amsterdam, NL
- Mat. 15: Mikroradiograf, Röntgeneratore PW 1830/30
Philipps; Kassel, BRD
- Mat. 16: Kodak high speed holographic film SO- 253
Kodak AG; Stuttgart, BRD
- Mat. 17: Inspektor Mikroradiographiesystem
Inspektor Research Systems BV; Amsterdam, NL
- Mat. 18: IR-Spektrometer IFS 48
Bruker, Karlsruhe, BRD
- Mat. 19: Golden Gate-Einfachreflexions-ATR-Einheit
Art.-Nr.: 310500
L.O.T.-Oriol GmbH & CoKG; Darmstadt, BRD
- Chem. 1: Zitronensäure (Citronensäure-Monohydrat), Art. 242.1000
Merck; Darmstadt, BRD

-
- Chem. 2: van Giesson-Lösung, Pikrofuchsin
Chroma- Gesellschaft Schmid & Co;
Stuttgart- Untertürkheim, BRD
- Chem. 3: Kollagenase, Art.- Nr.: C- 0773
Sigma- Aldrich Chemie GmbH; St. Louis, USA
- Chem. 4: Thymol Pulver
Fluka Chemie AG Buchs, Schweiz
- Chem. 5: Meridol- Spüllösung, 250 ppm F⁻, pH = 3,55
GABA GmbH; Lörrach, BRD
- Chem. 6: Zahnpaste Colgate total, 1450 ppm F⁻, pH = 7,64
blend-a-med; Schwalbach, BRD
- Chem. 7: elmex gelee, 12500 ppm F⁻
GABA GmbH; Lörrach, BRD
- Chem. 8: Entwickler Kodak D-19
Kodak AG; Stuttgart, BRD
- Chem. 9: Express- Fixiersalz
Tetenal Photowork GmbH & Co; Norderstedt, BRD
- Chem. 10: Ethylalkohol 70%
Merck; Darmstadt, BRD
- Chem. 11: Agepon, Netzmittel für Fotomaterial
Agfa-Gevart AG Leverkusen, BRD
- Chem. 12: EDTA-Lösung , Titriplex III, 75%
Merck; Darmstadt, BRD

4 ERGEBNISSE

4.1.1 Allgemeines

Von den Proben konnten alle bis auf eine Probe der Gruppe 2 vom ersten und fünften Versuchstag ausgewertet werden. Bei diesen beiden lösten sich die Präparate vom Probenhalter ab und konnten nicht mehr mit in die Auswertung einbezogen werden.

4.1.2 Vergleich des Mineralverlustes der einzelnen Versuchsgruppen

In Tabelle 3 ist der Mineralverlust in den drei Versuchsgruppen dargestellt.

Tab 3 Mineralverlust (μm , arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung) an den fünf Versuchstagen in Gruppe 1 (Kontrollgruppe, nur Erosion, keine Fluoridierung, keine Kollagenase), Gruppe 2 (Erosion, Fluoridierung, keine Kollagenase), Gruppe 3 (Erosion, Fluoridierung, mit Kollagenase)

Gruppe	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
1 (Kontrollgruppe) n = 25	11,56 $\pm 6,64$	22,82 $\pm 10,96$	32,98 $\pm 12,85$	39,4 $\pm 11,87$	45,92 $\pm 14,28$
2 (Fluoridierung ohne Kollagenase) n = 23	12,65 $\pm 9,45$	20,94 $\pm 12,56$	20,19 $\pm 12,18$	22,58 $\pm 11,92$	12,22 $\pm 10,17$
3 (Fluoridierung mit Kollagenase) n = 25	19,67 $\pm 6,3$	34,41 $\pm 10,4$	45,48 $\pm 13,56$	60,52 $\pm 12,85$	73,32 $\pm 17,59$

In der Kontrollgruppe zeigte sich vom ersten zum zweiten und vom zweiten zum dritten Versuchstag ein Mineralverlust von etwa 11 μm (p jeweils $\leq 0,05$) und vom dritten zum vierten und vierten zum fünften Versuchstag von etwa 6 μm (p jeweils n.s.). Bei den Proben, die fluoridiert und der Kollagenase ausgesetzt worden waren, fand sich dagegen von Tag zu Tag ein annähernd gleichmäßiger Mineralverlust, der zwischen 13 und 15 μm lag (p immer $\leq 0,01$, außer Tag 2/ Tag 3 $p \leq 0,05$). Bei Proben, die fluoridiert, jedoch nicht der Kollagenase ausgesetzt waren, konnte zwar ein Mineralverlust beobachtet werden, der jedoch keine Signifikanz erreichte (Tag 1/ Tag 2 $p = 0,085$, ansonsten n.s.). Am letzten Versuchstag zeigte sich im Vergleich zum Tag zuvor ein signifikanter Mineralgewinn ($p \leq 0,01$).

Bereits am ersten Tag fand sich bei den fluoridierten Proben, die mit Kollagenase behandelt worden waren, ein signifikant größerer Mineralverlust als bei den nur fluoridierten Proben ($p \leq 0,01$) und den Kontrollproben ($p \leq 0,001$). Dieser Effekt war auch am zweiten Tag zu beobachten ($p \leq 0,001$) und ($p \leq 0,01$), während sich der Mineralverlust bei Kontrollproben und fluoridierten Proben an diesen beiden Tagen nicht signifikant unterschied. Am Tag 3, 4 und 5 waren die Unterschiede im Mineralgehalt zwischen allen Gruppen signifikant (p immer $\leq 0,01$). Am Ende des Versuchs war der Mineralverlust bei den fluoridierten Proben etwa 70% geringer als der der Kontrollproben, der der fluoridierten und mit Kollagenase behandelten Proben dagegen um etwa 60% größer als derjenige der Kontrollgruppe.

Abbildung 9 fasst die gemessenen Werte des Mineralverlustes tag- und gruppenspezifisch in Form von Boxplots zusammen. Während die Kästen (Boxes) denjenigen Bereich angeben, in welchen 50% der Werte zwischen dem 25. und dem 75. Perzentil fallen, erstrecken sich die Linien zum jeweils höchsten und niedrigsten Wert. Innerhalb der Kästen sind die jeweiligen Medianwerte in Form von Querbalken markiert. Man kann erkennen, dass einige Proben der Fluoridgruppe sowohl am dritten als auch am fünften Tag eine Mineralzunahme erfuhren, die sogar über den Ausgangswert hinaus ging.

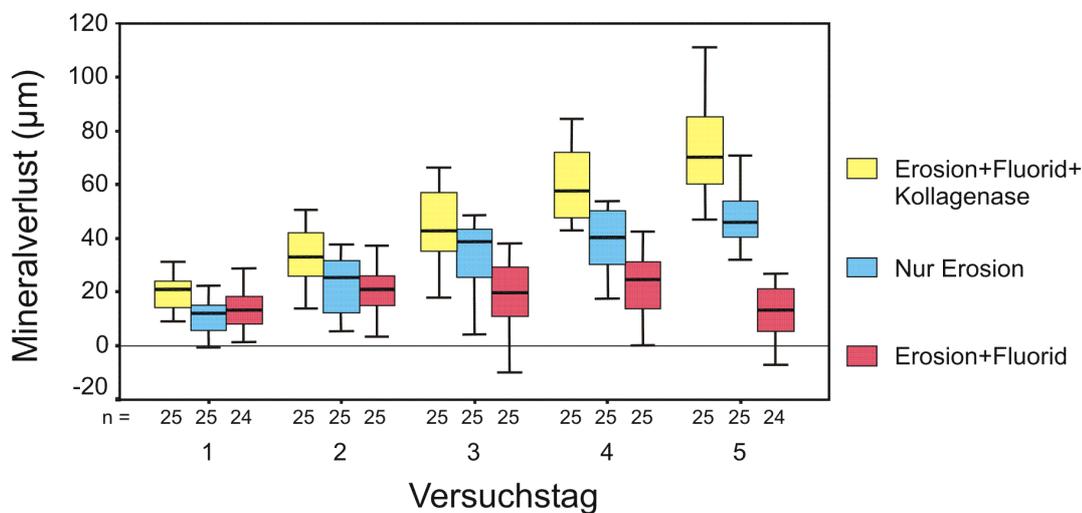


Abb 9 Mineralverlust (μm) in der Kontrollgruppe, nach Fluoridierung und Behandlung mit Kollagenase sowie nach alleiniger Fluoridierung an den fünf Versuchstagen

4.1.3 IR-Spektren

Abbildung 10 zeigt eine Transmissionskurve von Zahnschmelz, welche als Referenzkurve für Mineral auch im Dentin gelten kann. Im Schwingungsbereich von ca. 1000 Schwingungen pro cm fällt eine starke Bande mit hoher Absorption auf, die für Phosphatverbindungen charakteristisch ist [Williams und Fleming, 1991].

Abbildung 10 zeigt außerdem die Transmissionskurve von entmineralisiertem Dentin, mit typisch organischen Absorptionen. Die Phosphatbande fehlt hier völlig, dagegen sind deutliche Banden im Bereich von etwa 1200 bis 1600 cm^{-1} zu sehen. Die Bandenvielfalt in diesem Bereich wird bei Amiden gefunden [Williams und Fleming, 1991] und weist damit auf das Vorhandensein von Protein hin. Diese Banden können als charakteristisch für die organische Matrix des Dentins gelten und werden deshalb nachfolgend als Referenz zur Beurteilung weiterer Messungen herangezogen.

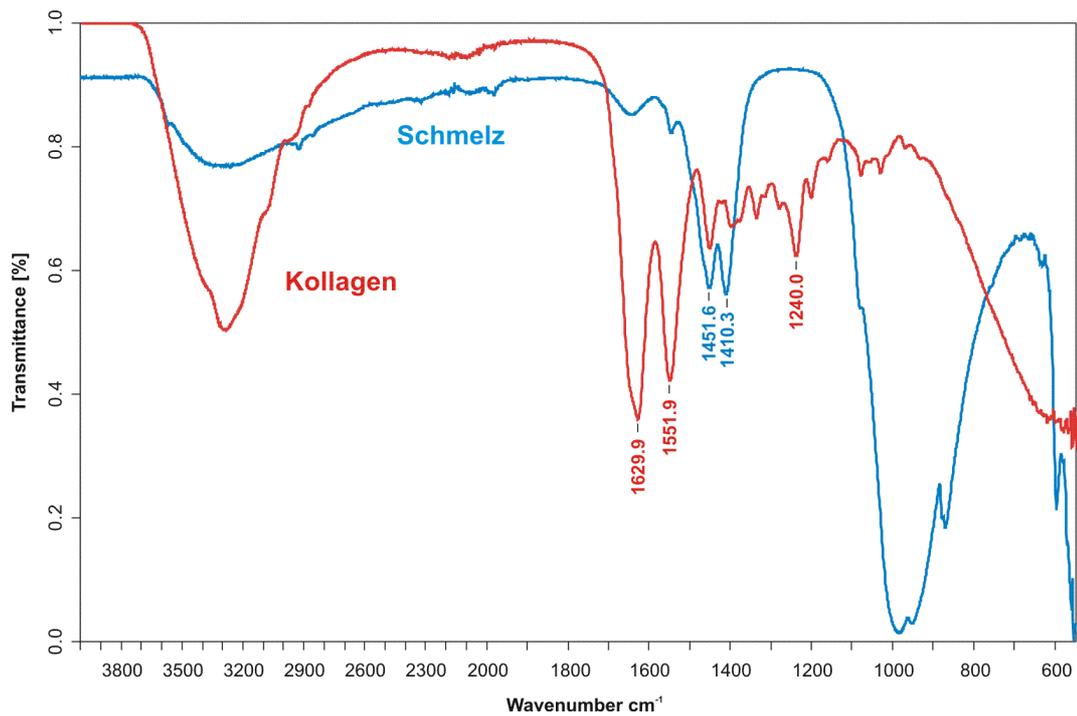


Abb 10 IR-Referenzspektren von Schmelz und Kollagen

Messungen von fünf zufällig ausgewählten Dentinproben vor dem Versuch, also sogenannte baseline-Messungen, zeigen deutliche Banden im Phosphatbereich, aber auch Absorptionen im Schwingungsbereich des Proteins (Abb. 11). Dabei wird bei wiederholter Messung derselben Dentinprobe eine gute Reproduzierbarkeit der Banden deutlich (Abb. 12).

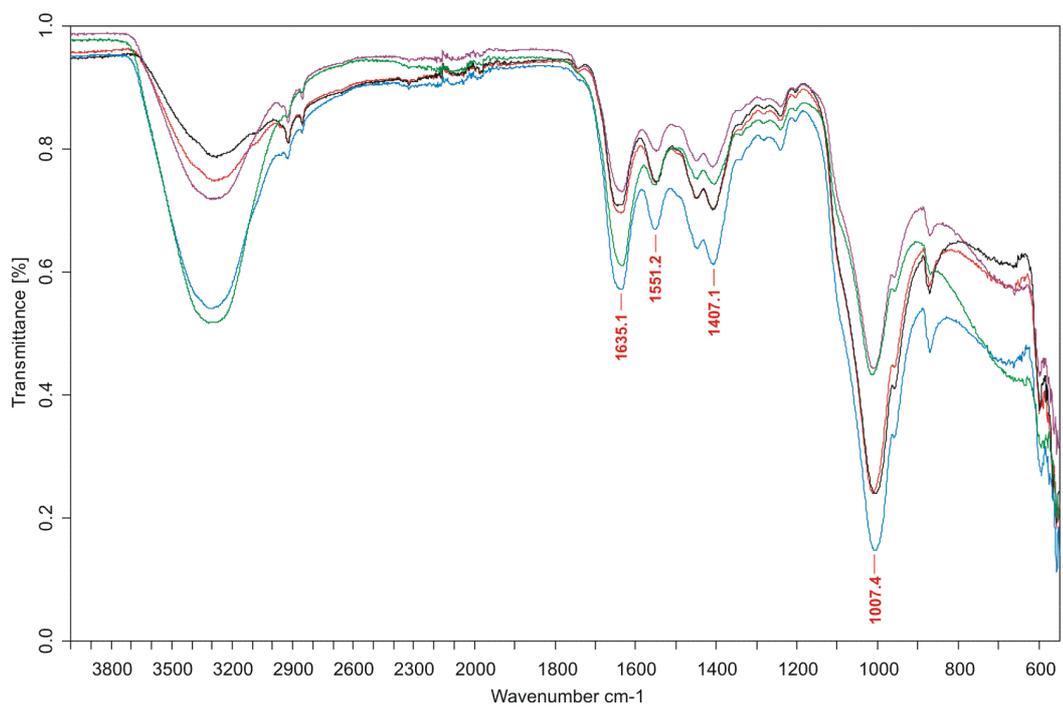


Abb 11 IR-Spektren der Baselines (fünf verschiedene Proben)

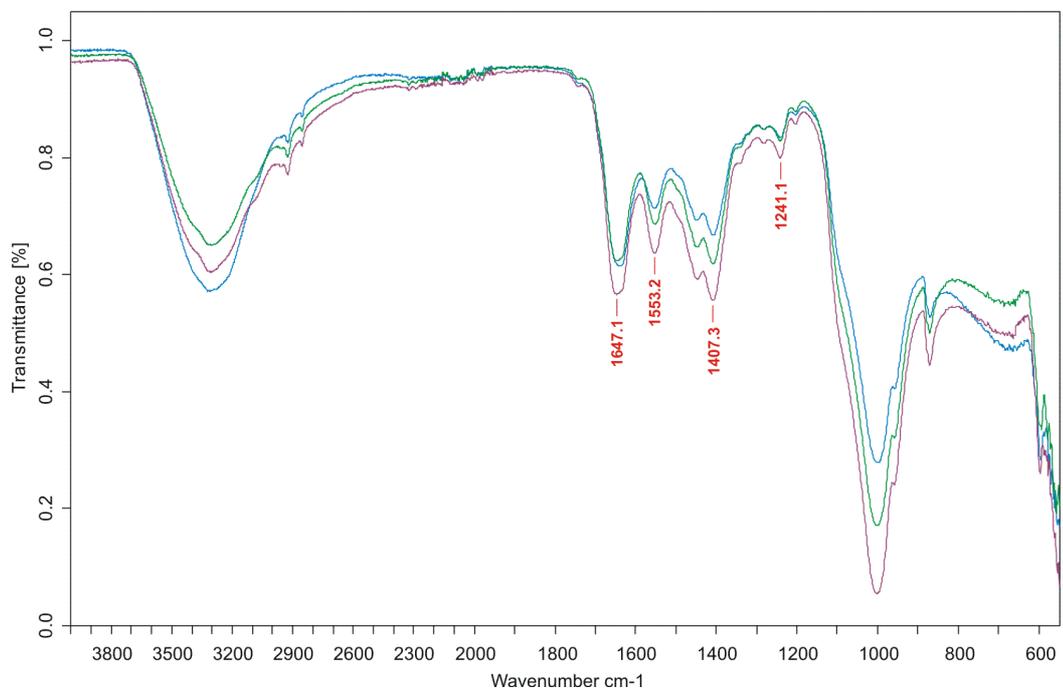


Abb 12 IR-Spektren zur Reproduzierbarkeit einer Probe

Nach Versuchsende wurden aus jeder Versuchsgruppe fünf Proben gemessen. Die Kurven der Gruppe 1 (Abb. 13) sowie der Gruppe 2 (Abb. 14) weisen die charakteristische Bandenanordnung der Referenzkurve der organischen Matrix des Dentins auf. Die Kurven der Gruppe 2 zeigen zusätzliche Banden im Mineralbereich. Dort sind auch unterschiedliche Bandenstärken, also unterschiedliche Konzentrationen der einzelnen Proben an Phosphat feststellbar. Diese Absorptionen waren in der Gruppe 1 nicht zu beobachten. Die Spektren der Proben innerhalb der jeweiligen Gruppe sind weitgehend identisch, was auf eine homogene Oberfläche der Proben hinweist.

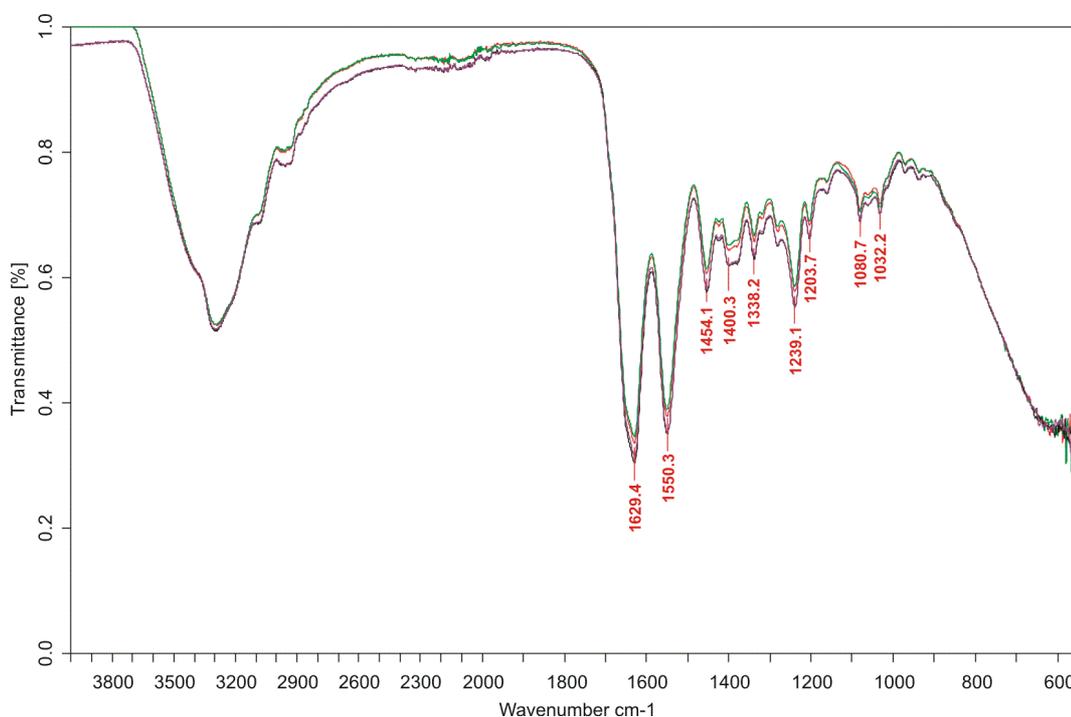


Abb 13 IR-Spektren von fünf zufällig ausgewählten Dentinproben der Gruppe 1 (Kontrollgruppe, nur Erosion) nach Versuchsende

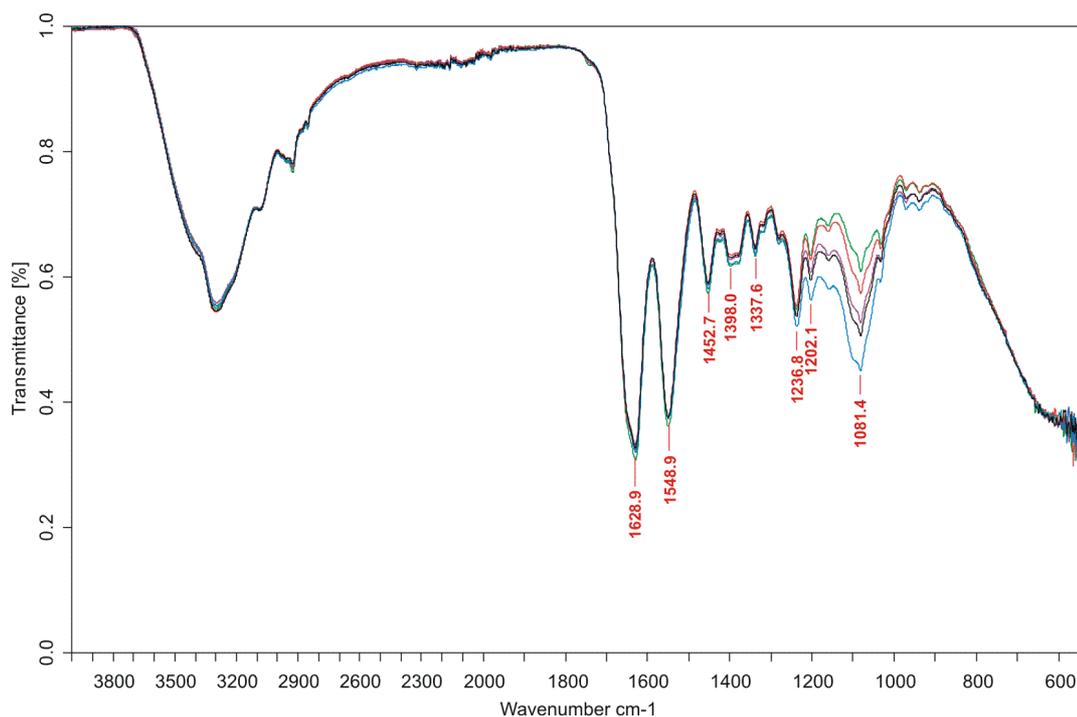


Abb 14 IR-Spektren von fünf zufällig ausgewählten Dentinproben der Gruppe 2 (Erosion und Fluoridierung) nach Versuchsende

Die Spektren der Gruppe 3 (Abb. 15) sind weniger eindeutig auszuwerten, da die Oberfläche der Proben stark uneben und somit für aussagekräftige Messungen mit dem Spektrometer problematisch ist. Trotzdem konnte festgestellt werden, dass an der Oberfläche sowohl organische als auch anorganische Substanzen vorlagen, der Mineralanteil aber vergleichsweise geringer war als in den Kurven der baselinemessungen. Die Banden im Wellenzahlbereich von 1000 - 1100 ähneln eher denjenigen der Gruppe 2, was auf eine durch Fluoridwirkung veränderte Mineralzusammensetzung an der Oberfläche der Proben schließen lässt (Abb. 15).

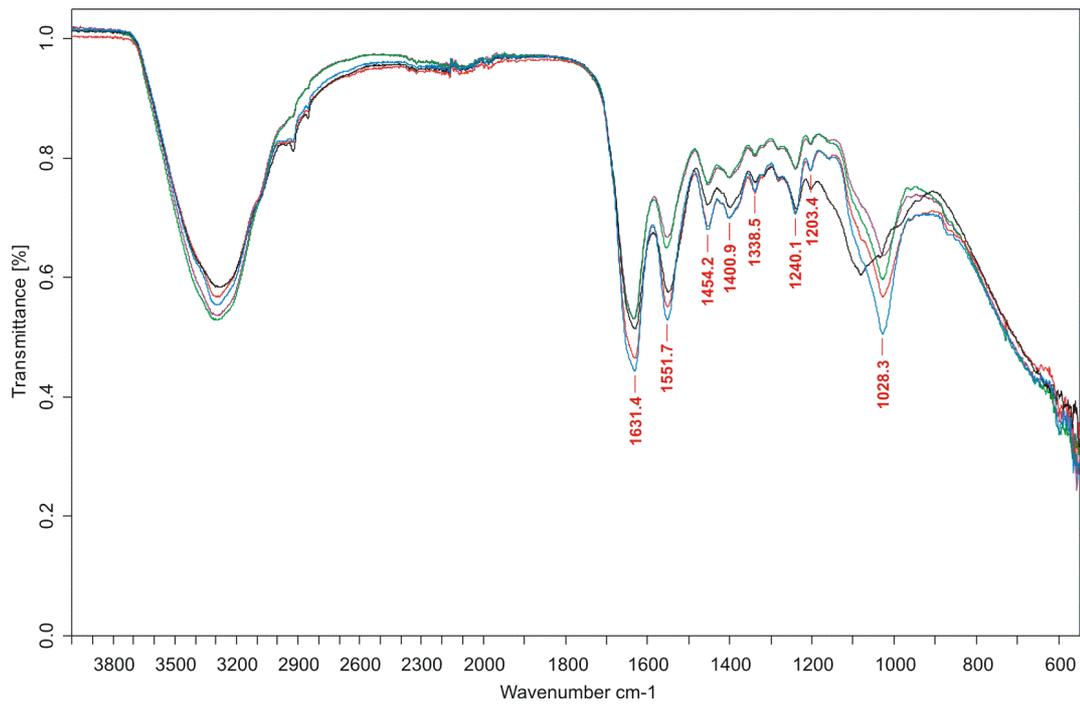


Abb 15 IR-Spektren von fünf zufällig ausgewählten Dentinproben der Gruppe 3 (Erosion, Fluoridierung und Kollagenase) nach Versuchsende

5 DISKUSSION

5.1 Versuchsaufbau und -Durchführung

5.1.1 Versuchsaufbau

Erosionen im Dentin können im Gegensatz zu Erosionen im Schmelz durch konzentrierte Fluoridapplikation nahezu vollständig gestoppt werden. Dies zeigten Ganß et al. [2001 b] in einem pH-zyklischen Versuch in vitro, in welchem der erosive Mineralverlust von Schmelz und Dentinproben gemessen wurde. Für diesen Effekt könnte die organische Matrix des Dentins verantwortlich sein. Die vorliegende Studie sollte nun den experimentellen Nachweis für die Wirksamkeit von Fluoriden mit und ohne Entfernung der durch Säure exponierten organischen Deckschicht des Dentins liefern.

Die Versuchsanordnung der Studie von Ganß et al. [2001 b] wurde weitgehend übernommen. Die erosive Demineralisation erfolgte in allen drei Gruppen mit Zitronensäure für 6 x 10 min pro Tag über einen Zeitraum von fünf Tagen. Die Proben der beiden Versuchsgruppen wurden zusätzlich intensiv mit Zahnpaste, Mundspüllösung und Fluoridgel fluoridiert und zwischendurch in einer Remineralisationslösung gelagert. Eine der Versuchsgruppen wurde außerdem mit Kollagenase zur enzymatischen Entfernung der organischen Deckschicht versetzt. Diese beiden Versuchsgruppen wurden einer Kontrollgruppe mit ausschließlicher Säureexposition gegenübergestellt. Die pH-zyklische Versuchsanordnung sollte annähernd die Mundbedingungen widerspiegeln, unter welchen ebenfalls mehrere kurze Phasen der Demineralisation auf Phasen neutralen pH-Wertes folgen. Trotzdem kann der Rückschluss auf tatsächliche Vorgänge in situ nicht gewährleistet sein. Es fehlen eine ganze Reihe von Faktoren wie chemische, mechanische, bakterielle und individuelle Einflüsse, die am Prozess des Substanzverlustes oder dessen Inhibition beteiligt sind. Daher soll unser Versuch ausschließlich als vereinfachter experimenteller Nachweis des Einflusses von Kollagen auf die Fluoridwirkung bei Erosion im Dentin verstanden werden. Die

im Versuch verwendete Konzentration an Kollagenase (100 U pro ml, 1 U $\hat{=}$ 0,5325 μ g Kollagenase) wurde im Vorversuch ermittelt und erwies sich als ausreichend, um das im Versuch durch erosive Demineralisation exponierte Dentinkollagen vollständig zu entfernen. Als Kriterium diente das Fehlen der organischen Deckschicht im histologischen Präparat, die sonst sichtbar mit van Giesson-Lösung angefärbt werden konnte. Zur Entfernung der organischen Deckschicht wurde das Enzym Kollagenase verwendet, da 90% der Matrix des Dentins aus Kollagen des Typs I bestehen und enzymatische Prozesse in der Mundhöhle nicht auszuschließen sind. So kann der Kollagenasespiegel, der in einem Spülschluck Leitungswasser gemessen wurde, bei parodontal Gesunden schon 200 Units pro ml betragen, bei parodontal Erkrankten wurden Werte bis zu 12000 Units pro ml gefunden [Gangbar et al., 1990]. Diese Angaben verdeutlichen den Stellenwert der enzymatischen Prozesse in der Mundhöhle, denen die organischen Substanzen des Zahnes ausgesetzt sind. Das verwendete Enzym Kollagenase spaltet komplexe Kollagenfasern spezifisch. Unspezifische Proteasen wie Trypsin und Pepsin, die auch im oralen Milieu enthalten sind, können ausschließlich bereits durch Säure denaturiertes Kollagen spalten. Deshalb könnten aber auch diese Enzyme an der Destruktion der organischen Deckschicht nach Säureexposition in vivo beteiligt sein.

Wird Dentin erosiv demineralisiert, bleibt oberflächlich eine vollständig demineralisierte organische Matrix zurück, der sich nach innen eine partiell demineralisierte Schicht anschließt. Sobald vollständig demineralisiertes Kollagen frei an der Oberfläche liegt, kann es durch enzymatische Prozesse gespalten und abgebaut werden. Partiiell demineralisiertes Kollagen lässt sich enzymatisch nicht oder nur kaum abbauen. Da das verwendete Enzym nach Herstellerangaben seine größte Aktivität im neutralen Bereich und bei Anwesenheit von Kalziumionen entfaltet, wurde es der Remineralisationslösung zugesetzt.

5.1.2 Messmethoden

5.1.2.1 Mikroradiografie

Die zur Bestimmung des Mineralgehaltes der Dentinproben verwendete Mikroradiografie ist eine weit verbreitete Methode, die ursprünglich in der Kariologie eingesetzt wurde. Diente dabei hauptsächlich die Transversale Mikroradiografie (TMR) zur Bestimmung von Art und Tiefe der Läsion, findet die Longitudinale Mikroradiografie (LMR) auch bei oberflächlichen Substanzverlusten wie Erosionen Anwendung. Der Vorteil der longitudinalen Mikroradiografie gegenüber anderer Bestimmungen des Mineralgehaltes liegt in der nicht destruirenden Analyse, die die Weiterverwendung der Proben im Laufe des Versuchs ermöglicht. Darüber hinaus können sowohl De- als auch Remineralisationsprozesse quantitativ erfasst werden. Die LMR als komplexes Messsystem beinhaltet jedoch auch Fehlerquellen, die sich aus der Fokusgröße des Röntgenapparates, dem Abstand des Fokus zur Filmebene, dem Auflösungsvermögen des verwendeten Filmes und der Spaltenbreite des Densitometers am Mikroskop ergeben [de Josselin de Jong und ten Bosch 1985]. Durch die Fokusgröße wird zusammen mit der Ausrichtung des Objektes zum Film die Projektionsschärfe bestimmt. Diese beträgt bei Verwendung der kleinstmöglichen Fokusgröße von 2 mm Durchmesser und einer fokusfernen Lage der Probe von 340 mm (Fokus-Objekt-Abstand) bzw. einer möglichst filmnahen Objektlage von 0,3 mm (Film-Objekt-Abstand) ca. 2 μm . Die Bildunschärfe, die durch das Auflösungsvermögen des Filmes bestimmt wird (z.B. Kodak SO 253), liegt bei 0,8 μm [de Josselin de Jong und ten Bosch, 1985]. Durch die Röntgenstrahlenstreuung am Objekt oder der Umgebung wird zusätzlich eine unkontrollierte Belichtung des Filmes bewirkt, die aber nach Attix und Roesch [1968] bei Zahnhartgewebe weniger als 1% des Massenschwächungskoeffizienten beträgt und daher vernachlässigt werden kann. Weiterhin treten Fehler während der mikrodensitometrischen Auswertung der Röntgenstrahlenabsorptionsbilder auf. Liegt die Längsseite des Densitometerschlitzes bei einer Breite von einem Mikrometer parallel zur Probenoberfläche, beträgt die Unschärfe 1 μm [de Josselin de Jong und ten Bosch, 1985]. Der Fehler bei der

Mineralgehaltsbestimmung einer Probe kann nach denselben Autoren demnach bei $\pm 4 \mu\text{m}$ liegen. Diese Fehlergrenze konnte bei wiederholten Testmessungen einer Probe von uns nicht bestätigt werden, die Werte derselben Proben lagen im Bereich von $348 - 381 \mu\text{m}$ mit einer Standardabweichung von $\pm 9,4 \mu\text{m}$. Dieser Fehler läßt sich eventuell auf die Verwendung von Dentinproben anstatt von Schmelz zurückführen. Das Mikroradiographiesystem ist durch die Eichterpe auf eine bestimmte Schichtdicke bzw. Dichte des zu untersuchenden Materials ausgerichtet, d.h. die Mikroradiogramme der Proben sollten Lichttransmissionswerte innerhalb der vorhandenen Werte der Eichterpe einnehmen. Nach Angaben von Josselin de Jong et al. [1987] ist eine optimale optische Diskrimination bei einer Schichtstärke von $400 \mu\text{m}$ Schmelz gegeben. Da diese Angaben aber für Dentin mit einer geringeren Mineraleichte als Schmelz nicht zutreffen, muss die Schichtdicke von Dentinproben auf ca. $700 \mu\text{m}$ erhöht werden, um zu der gleichen relativen Mineraleichte zu gelangen. Da diese Mikroradiografie-Geräte speziell für Schmelz mit einer Schichtdicke von $400 \mu\text{m}$ kalibriert sind, ist es denkbar, dass die größere Fehlerbreite durch eine weniger gute optische Diskrimination der dickeren Dentinproben aufgetreten ist. Trotzdem reichten diese Ergebnisse für eine Beurteilung des Mineralverlustes aus, da der gemessene Mineralgehalt unter den Versuchsbedingungen den Messfehler um ein Vielfaches überschritt.

5.1.2.2 IR-Spektroskopie

Die in unserem Versuch verwendete Reflexionsmethode sollte einen zusätzlichen Nachweis der chemischen Zusammensetzung der Oberflächenschicht der Dentinproben liefern. Referenzmessungen von vollständig demineralisiertem Dentin, geschliffenen, unbehandelten Dentinproben und Schmelz sollten zur Strukturaufklärung der aus dem Versuch resultierenden Dentinoberflächen dienen. Die typischen Banden im Spektrum für Peptide, Carbonate und Phosphatverbindungen konnten identifiziert und zugeordnet werden. So liegt nach Angabe der zugehörigen Literatur die typische Absorptionsbande von einem primären Amid (Amid I) bei ca. 1650 Schwingungen pro cm, von einem sekundären Amid (Amid II) bei ca. 1550 und einem tertiären Amid (Amid III) bei

ca. 1240 [Hesse et al., 1991]. Diese charakteristischen Banden können im Referenzspektrum des Kollagens (Abb. 10) exakt identifiziert werden. Daneben zeigen sich diverse Absorptionen im sogenannten „fingerprint“-Bereich, deren Zuordnungen im Einzelnen nicht möglich sind, die aber ganz spezifisch das Peptid Kollagen charakterisieren. Das Referenzspektrum von Schmelz zeigt eine ausgeprägte Bande im Bereich von 1000 Schwingungen pro cm, die den Phosphatverbindungen zugeschrieben wird. Außerdem erscheint eine Doppelbande im Bereich von 1410 und 1451, die für Carbonatverbindungen typisch ist. Die Messung der unbehandelten, geschliffenen Dentinproben (Abb. 11) zeigt Banden sowohl von Phosphatgruppen, Carbonatgruppen, aber auch Absorptionen im Amid I- Bereich. Schwächere Banden sind auch im Bereich des Amid II zu erkennen. Diese Befunde scheinen den „smear layer“ wiederzuspiegeln, der generell den geschliffenen Dentinproben aufgelagert ist und aus Mineral und ungeordnetem, aber nicht denaturiertem Kollagen besteht. Die Oberflächen der Proben aus der Gruppe 1 (reine Säurebehandlung, Abb. 13) wiesen ein exakt mit der Referenzmessung für reines Kollagen vergleichbares Spektrum auf. Außerdem zeigte sich eine außerordentlich gute interindividuelle Übereinstimmung zwischen den einzelnen Proben. Die Proben der Gruppen 2 und 3 wiesen im Bereich der Phosphatbanden eine weniger ausgeprägte Übereinstimmung der Spektren auf. Dies deutet möglicherweise auf eine individuell unterschiedlich ausgeprägte Fähigkeit zur Remineralisation hin. Bei der Gruppe 3 könnte aber auch die durch die Kollagenasebehandlung unebene Oberfläche der Proben für die Abweichung der Spektren verantwortlich sein. Um aussagekräftige, gut aufgelöste Spektren zu erhalten und Streustrahlung und somit Schwächung des Messergebnisses zu vermeiden, muß eine möglichst plane Oberfläche des Testkörpers gegeben sein, sowie ein möglichst gleichmäßiger Anpressdruck der Probe auf den Objektisch. Auch der Wassergehalt der Probe beeinflusst die Intensität einzelner Banden. Da hier Festkörper im Reflexionsverfahren untersucht, und nicht wie sonst in der IR-Spektroskopie üblich Testsubstanzpresslinge durchstrahlt wurden, ist eine exakt gleiche Handhabung der Proben nicht gewährleistet und damit nur eine qualitative Aussage zur Oberfläche des Prüfkörpers möglich. Genaue quantitative Aussagen

sind bei IR-Spektren nur nach spezifischen Eichkurven für die zu analysierende Verbindung statthaft. Bei IR-Oberflächenuntersuchungen jedoch, bei denen die Homogenität in der „reflektierenden Schicht“ unklar ist, ist eine prozentuale Angabe fraglich.

Genauere Aussagen über die chemische qualitative und quantitative Zusammensetzung verschiedener biologischer Materialien wurden anderenorts mit der Mikro-Raman-Spektroskopie gemacht. Die Raman-Spektroskopie basiert wie die IR-Spektroskopie ebenfalls auf lichtinduzierten Schwingungsanregungen von Molekülen. Die Lichtquelle der Raman-Spektroskopie ist jedoch ein Laser-Strahl. Das monochromatische Licht tritt durch die Probe hindurch, wobei ein geringer Teil in alle Raumrichtungen gestreut, spektral zerlegt und mit Hilfe eines photoelektrischen Detektors registriert wird. Mit der Raman-Spektroskopie können im Allgemeinen in symmetrischen Molekülen die symmetrischen Atomschwingungen dargestellt und identifiziert werden. Diese Schwingungen sind im IR-Spektrum inaktiv. Daher finden diese beiden Methoden ihren Anwendungsbereich bei unterschiedlichen Substanzen. Da die meisten organischen Substanzen sowohl symmetrische als auch asymmetrische Schwingungen aufweisen, können die Spektren der IR- und Raman-Spektroskopie ergänzende Bilder liefern. Zur Erzeugung einer IR-Absorption ist eine Änderung des Dipolmomentes einer Bindung während der Schwingung erforderlich. Für das Auftreten des Raman-Effektes jedoch muss sich die Polarisierbarkeit des Moleküls während der Schwingung ändern. Die Raman-Spektroskopie eignet sich besonders zur Charakterisierung unpolarer oder wenig polarer Bindungen, wie z.B. C-C-Dreifachbindungen, C-C-Doppelbindungen, N-N-Doppelbindungen, C-C-Bindungen, O-O und S-S-Bindungen sowie von Ringen. Die Gerüstschwingungen von C-C-Bindungen in Ringen sind im Raman-Spektrum meist wesentlich stärker als im IR-Spektrum. Dadurch lassen sich die Strukturen von Molekülgerüsten zuordnen. Umgekehrt sind die starken und charakteristischen IR-Banden polarer Gruppen wie C-O-Doppelbindungen und O-H-Bindungen im Raman-Spektrum nur schwach vertreten. Spencer et al. [2001] und Tsuda und Arends [1993] nutzten die Raman-Spektroskopie, um smear layer

und auch den CaF_2 -Gehalt von Apatit zu identifizieren. Durch diese Methode konnte selbst ein CaF_2 -Gehalt von 3 Gew.% im Apatit noch bestimmt werden. Von O'Shea et al. [1974] konnten in Apatit Konzentrationen an OH^- , F^- und Cl^- nachgewiesen werden. Als Vorteil der Mikro-Raman-Spektroskopie wird im Allgemeinen die Möglichkeit angesehen, Dentinproben im feuchten Zustand zu analysieren, ohne dass die Messergebnisse beeinträchtigt werden. Das Wasser hinterlässt im Raman-Spektrum kein ausgeprägtes Signal, wohingegen bei der IR-Spektroskopie durch Wasserbanden unerwünschte Überlagerungen der zu analysierenden Banden der Testsubstanz im Fingerprintbereich entstehen. Dieser Effekt war jedoch bei unseren Messungen zu vernachlässigen, es konnte keine Verfälschung der Banden durch wasserspezifische Indifferenzen festgestellt werden. Mixson et al. [1995] nutzten wie wir die Fourier-Transformations-IR-Spektroskopie, untersuchten aber unbehandeltes, pulverisiertes Dentinmaterial von inaktiven, erosiven Läsionen. Dabei stellten sie einen erhöhten Mineralgehalt in sklerotisch verändertem Dentin fest.

Die Methoden der IR- und Raman-Spektroskopie liefern allgemein eine ergänzende Strukturanalyse von organischen Substanzen. Die IR-Reflexionsmethode wie hier an geschliffenen und gut andrückbaren Oberflächen zeigt noch weitere wesentliche Vorteile gegenüber den „üblichen“ Probennahmen (Testsubstanzpresslinge) dieser Methode. Zum einen muss die Probe nicht isoliert und pulverisiert werden und bleibt so während der spektroskopischen Untersuchung völlig unversehrt. So kann man in einer Versuchsreihe fortlaufende Veränderungen an ein und derselben Oberfläche nacheinander dokumentieren. Zum anderen erübrigt sich die übliche Aufarbeitung der Proben, insbesondere die Schwierigkeit der Abgrenzung von Oberflächen, wenn ausschließlich diese isoliert und beurteilt werden sollen.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Dentin demineralisiert unter Säureeinwirkung in charakteristischer Weise. Die peritubulären Areale zeigen anfangs einen stärkeren Mineralverlust als das

intertubuläre Dentin, da sie stärker mineralisiert sind (86 Vol% gegenüber 45 Vol%, [Schröder, 1992]) und die Säure durch die Dentinkanälchen ins Innere des Dentins eindringt. Elektronenmikroskopisch erscheinen die intertubulären Areale einer initialen Dentinerosion daher prominenter als die peritubulären. Außerdem erweitert sich der Durchmesser der Tubuli sichtbar. Bei fortgeschrittenem Verlauf stellt sich eine vollständig demineralisierte Dentinoberfläche dar, die ca. ein Drittel der Tiefe der Läsion insgesamt ausmacht [Kinney et al., 1995]. Breschi et al. [2002] zeigten, dass nach Demineralisation von Dentin elektronenmikroskopisch drei Schichten unterschieden werden können. Dabei fand sich an der Oberfläche eine komplett eingefallene, zusammengeschrumpfte Schicht entmineralisierter Kollagenfibrillen, darunter eine teilweise demineralisierte Zone mit eher locker gefügten Kollagenfibrillen und großen Zwischenräumen über einer Schicht normalen Dentins. Nichtkollagene Bestandteile der organischen Matrix wie Phosphoproteine und Proteoglycane waren an kollagene Fasern gebunden als kleine globuläre Strukturen sichtbar. Die Ausbildung einer organischen Oberflächenschicht kann die Demineralisation der darunter liegenden partiell oder noch vollständig mineralisierten Dentinschicht verringern, lässt aber die Remineralisation unbeeinflusst [Klont und ten Cate, 1991; Kleter et al., 1994].

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass das Vorhandensein einer solchen aufgelagerten organischen Schicht tatsächlich für die Verlangsamung des Erosionsprozesses im Dentin verantwortlich ist. Diese Wirkung tritt offensichtlich erst nach einiger Zeit der Säureexposition auf, wenn die Schicht eine ausreichende Dicke angenommen hat. Dies zeigte sich in Gruppe 1 (Kontrollgruppe) ab dem vierten Versuchstag, nachdem die Dentinproben insgesamt vier Stunden lang der Säurebehandlung ausgesetzt waren. Der Mineralverlust betrug am vierten und fünften Versuchstag nur noch ca. 6 µm gegenüber den rund 11 µm der ersten drei Versuchstage.

Kommt noch täglich eine konzentrierte Fluoridapplikation hinzu (Gruppe 2), tritt dieser Effekt bereits nach zwei Tagen auf. Im weiteren Verlauf blieb der Mineralgehalt dieser Proben bei anhaltender Säureexposition etwa gleich, am

letzten Versuchstag konnte sogar eine Mineralzunahme beobachtet werden. Demzufolge ist die Applikation von konzentrierten Fluoriden auf Dentinerosionen als außerordentlich wirksam zu beschreiben.

In der Versuchsgruppe, in der die organische Oberflächenschicht durch Zusatz des Enzyms Kollagenase in der Remineralisationslösung zerstört wurde (Gruppe 3), stieg der Mineralverlust im Dentin trotz Fluoridierung stetig an. Rein makroskopisch war die von Kollagen befreite Oberfläche des demineralisierten Dentins gut an der etwas rauhen, harten und trockenen Struktur zu erkennen. Mit Hilfe der IR-Spektroskopie konnte die Oberfläche der mit Kollagenase behandelten Proben gut von der Versuchsgruppe mit organischer Deckschicht unterschieden werden (Abb. 15). Die Spektren ließen sich mit den Referenzspektren für unbehandelte Dentinproben vergleichen, was auf eine teilweise mineralisierte, organische Schicht ähnlich des smear-layers hindeutete.

Über die Fluoridwirkung auf Dentin gibt es bisher nicht viele Angaben. Der Hauptteil der Veröffentlichungen über die Wirkung von Fluorid stammt aus der Kariologie und beschäftigt sich zumeist mit Schmelz. In diesem Zusammenhang ist der Mechanismus der Fluoridwirkung sehr detailliert erforscht und beschrieben worden. Bevor wir uns der Fluoridwirkung auf Dentin zuwenden, sollen hier der Verständlichkeit halber die bekannten Wechselwirkungen mit Schmelz zusammengefasst werden.

5.2.1 Fluoridwirkung auf Schmelz

Fluoride beeinflussen das dynamische Lösungsgleichgewicht an der Zahnoberfläche, indem sie die Demineralisation des Schmelzes hemmen und dessen Remineralisation fördern. Demineralisation des Schmelzes findet statt, wenn durch sinkenden pH-Wert in der Mundhöhle oder Untersättigung des Speichels an Mineralionen das Löslichkeitsprodukt von Schmelz, der hauptsächlich aus Hydroxylapatit besteht, unterschritten wird. Kalzium, Phosphat und andere Schmelzbestandteile gehen in Lösung. Es resultiert ein partiell

angelöster Schmelz mit einem vergrößerten Porenvolumen von bis zu 25%, der eine weitere Penetration von verschiedenen Noxen begünstigt [Hellwig et al. 2002]. Steigt der pH-Wert in der Mundhöhle wieder an oder besteht eine Übersättigung des Speichels an Mineralionen, wird das Löslichkeitsprodukt von Hydroxylapatit überschritten und der Vorgang kehrt sich um. Mineralionen werden aus dem Speichel reabsorbiert und präzipitieren an der Kristalloberfläche. Nach lokaler Fluoridapplikation bildet sich initial Kalziumfluorid. Dieses Präzipitat dient bei nachfolgendem Absinken des pH-Wertes als Fluoridreservoir, welches freie Fluoridionen zur Bildung von Fluorapatit zur Verfügung stellt. Fluorapatit bzw. Fluorhydroxyapatit bildet sich im Gegensatz zu Hydroxylapatit thermodynamisch bevorzugt aus, da Fluorapatit schwerer löslich ist als Hydroxylapatit. Daher resultiert auch eine erhöhte Resistenz des remineralisierten Schmelzes gegenüber weiterer kariöser Attacken. Fluorapatit ist erst ab einem pH-Wert von 4,5 löslich, während Hydroxylapatit schon ab 5,5 in Lösung geht. Die Demineralisation im fluoridangereicherten Schmelz wird somit im pH- Bereich bis ca. 4,5 verhindert [Stephan, 1966]. Fluoride werden nicht nur in bestehende Kristallgitter eingebaut, sondern adsorbieren auch an der Kristalloberfläche, entweder fest gebunden an freie Bindungsstellen oder unspezifisch in der wässrigen Hülle der Kristallite.

Kariös bedingte Initialläsionen weisen eine charakteristische histologische Struktur auf. Während die Oberfläche intakt scheint, wobei auch dort ein Mineralverlust von ca. 10% zu messen ist, liegt der eigentliche Läsionskörper darunter. Durch Fluorideinlagerungen und Absorptionen in die oberflächlichen Schichten werden diese weniger anfällig für Demineralisationen als tiefergelegene Schichten. Die Säure kann jedoch in die Tiefe penetrieren und dort den weniger resistenten Schmelz auflösen. Initialläsionen können vollständig remineralisieren, wenn die Ursache der mikrobiellen Säureproduktion aufgehoben wird.

Im Gegensatz zu kariösen Initialläsionen sind bei Erosionen keine remineralisierbaren Strukturen mehr vorhanden, da hier der Schmelz durch die Stärke und Menge der Säure von der Oberfläche her schrittweise abgetragen wird. Es ist lediglich eine teilweise demineralisierte Oberfläche feststellbar.

Remineralisationslösungen können zwar die Mikrohärtigkeit dieser partiell demineralisierten Schicht erhöhen und den Mineralverlust im Verlauf insgesamt verringern [Attin et al., 1997 und 1999], jedoch zeigten Untersuchungen, dass es sich dabei hauptsächlich um eine Präzipitation verschiedener Kalziumphosphatverbindungen handelt. Elektronenoptisch wurde auf angeätzten Schmelzproben eine amorphe Schicht nachgewiesen, die der Oberfläche aufgelagert war [Mannerberg, 1960, 1961 und 1962; Lenz und Mühlemann, 1963]. Ein vollständiger Wiederaufbau von Schmelzkristallen im Sinne einer *restitutio ad integrum* konnte nicht beobachtet werden. Deshalb ist hier eine vermeintliche Remineralisation eher mit „Repräzipitation“ zu beschreiben.

Durch die Präzipitation von Kalziumphosphaten an der oberflächlichen Schmelzschicht resultiert auch eine erhöhte Abrasionsfestigkeit des demineralisierten Schmelzes, wie Untersuchungen von Attin [1997] und auch Eisenburger et al. [2001 a und b] belegen konnten. Während partiell demineralisierter Schmelz leicht durch Ultraschallvibrationen entfernt werden konnte, war nach sechsstündiger Exposition der Proben in einer Remineralisationslösung kein mechanischer Abrieb mehr feststellbar [Eisenburger et al., 2001 b]. Da präzipitiertes Kalziumphosphat *in vitro* allerdings keine hohe Stabilität aufweist, kann angenommen werden, dass die Ablagerungen nicht nur oberflächlich waren, sondern dass auch die partiell demineralisierte Schmelzoberfläche weitgehend mit Kristallen aufgefüllt wurde. Dies bestätigten auch Saxegaard und Rølla [1988].

Die Rolle von Fluoriden bei Erosionen erscheint unklar. Bei dem niedrigen pH-Wert erosiver Substanzen (meist unter pH 3) im Gegensatz zu dem nur schwach sauren Milieu, das bei kariösen Prozessen durch mikrobielle Säureproduktion erreicht wird, wird sowohl das Löslichkeitsprodukt von Hydroxylapatit als auch von Kalziumfluorid und Fluorapatit unterschritten. Dadurch muss es auch zur chemischen Auflösung dieser Kristalle kommen. Der schützende Einfluss von Fluoriden vor erosiven Demineralisationen sollte daher zu vernachlässigen sein. Trotzdem wird der konzentrierten Applikation von Fluoriden bei Erosionsprozessen ein Effekt zugeschrieben. Versuche *in situ* zeigten, dass

Schmelzerosionen unter Fluoridapplikation deutlich verringert werden konnten [Ganß et al., 2001 c]. Sorvari [1994] konnte nachweisen, dass die lokale, konzentrierte Fluoridapplikation im Vorfeld einer Erosion den Schmelz in der initialen Phase *in vitro* vor Demineralisationen schützte.

Weiterhin wurde nicht nur durch Messung der Mikrohärtigkeit und Abrasionsfestigkeit, sondern auch durch Bestimmung des Mineralverlustes von Zahnproben im Verlauf von Erosionsprozessen eine Schutzwirkung vor Demineralisationen durch Fluoride nachgewiesen. In einem pH-zyklischen Experiment [Ganß et al. 2001 b] von fünf Tagen zeigte sich, dass der erosive Mineralverlust von Schmelz unter Fluoridapplikation gegenüber einer Kontrollgruppe um 20 % verringert werden konnte. Dabei war ein signifikanter Unterschied zwischen niedrig konzentrierter (fluoridierte Zahnpaste) oder höher konzentrierter F⁻ Anwendung (kombinierte Anwendung von fluoridierter Zahnpaste, Gel und Spüllösung) messbar.

In der gleichen Studie von Ganß [2001 b] war interessanterweise der Effekt von Fluoriden im Dentin wesentlich ausgeprägter als im Schmelz. Dort wurde der Mineralverlust in der Gruppe der intensiven Fluoridierung schon ab dem zweiten Tag signifikant reduziert und konnte trotz weiterer Säureexposition (6 x 10 min pro Tag bei einem pH-Wert von 2,3) bis zum fünften Tag nahezu gestoppt werden. Diese starke Reduktion des Mineralverlustes konnte auch in vorliegendem Versuch nachgewiesen werden und muss im Zusammenhang mit dessen Struktur verstanden werden. Offensichtlich beeinflusst die organische Matrix den Erosionsprozess nachhaltig. Die strukturellen Unterschiede zwischen Schmelz- und Dentinerosionen sind in Abbildung 16 anschaulich dargestellt. Während es bei Schmelz zu einem zentripetalen totalen Substanzverlust kommt, bleibt bei Dentin bei ebenfalls zentripetaler Demineralisation die organische Matrix nahezu auf ursprünglichem Niveau erhalten.

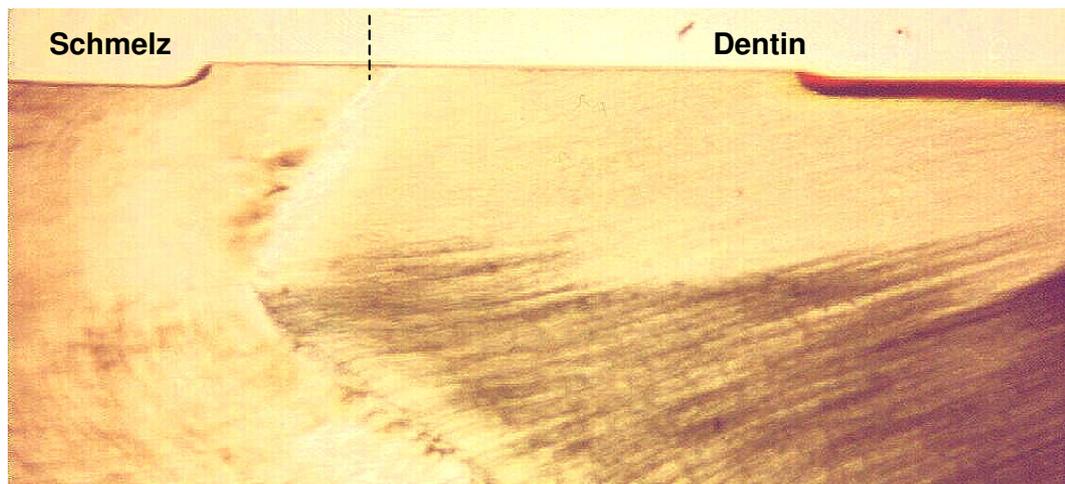


Abb 16 Übersicht einer Zahnprobe nach zyklischer Demineralisation mit Zitronensäure (0,05 M) für fünf Tage über 6 x 10 min pro Tag; im mittleren Feld war die Probe mit Kleber abgedeckt, links im Bild der erodierte Schmelz, rechts das angefärbte Kollagen im Bereich der Dentinerosion

5.2.2 Fluoridwirkung auf Dentin

Das Dentin ist in seiner chemischen Zusammensetzung dem Wurzelzement der Zähne und den Knochen allgemein sehr ähnlich, unterscheidet sich aber stark von Schmelz. Während die anorganischen Bestandteile zwar auch wie im Schmelz Kalziumphosphatkristalle vom Typ des Apatits sind (Kalzium und Phosphor im Gewichtsverhältnis von 1: 2,13), ist deren Größe jedoch wesentlich kleiner und dünner als die der Schmelzkristalle. Neben geringen Mengen an Karbonaten und Magnesium enthält Dentin eine Reihe von Spurenelementen wie Fluor, Blei und Zink. Der Magnesium- und Zinkgehalt im Dentin nimmt mit dem Alter zu. Während Schmelz nur zu 2 Vol% aus organischer Matrix besteht, nimmt diese im Dentin durchschnittlich 30 Vol% ein [Schroeder, 1992]. Das Dentin wird von Kanälchen durchzogen, die Zellfortsätze der Odontoblasten aus dem Pulpencavum beinhalten. Dadurch ist das Dentin als vitales Gewebe zu verstehen, dessen Vitalität sich in zahlreichen Anpassungsvorgängen äußert. Physiologisch bildet sich beispielsweise lebenslang Sekundärdentin nach, pathologisch bildet sich auf kariöse oder abrasive Einflüsse hin Reizdentin. Zusammen mit der vitalen Pulpa kann das Dentin als eine funktionelle Einheit betrachtet werden. Die Kanaldichte im koronalen Dentin nimmt von der Pulpa zur Schmelz-Dentin-

Grenze ab und beträgt zervikal ca. $50\text{-}34\ 000 / \text{mm}^2$ [Carrigan, 1984]. Auch das Lumen der Dentintubuli verkleinert sich im Laufe des Lebens, indem peritubuläres Dentin nachgebildet wird. Dieses besteht zu 90% aus anorganischem Material und enthält keine Kollagenfibrillen [Takuma und Eda, 1966], sondern nur saure und neutrale Mukopolysaccharide. Das intertubuläre Dentin ist weniger dicht mineralisiert als das peritubuläre Dentin. Es enthält zirka 50 Vol% organische Matrix, die zu 91 - 92 % aus Kollagenfasern des Typ I besteht. Die Kollagenfasern bilden ein Flechtwerk, das quer zur Verlaufsrichtung der Dentinkanälchen liegt und diese netzartig umgibt. Die organische Matrix besteht zu 8 - 9% aus nichtkollagener Grundsubstanz. Dazu gehören Phosphoproteine, Chondroitinsulfat, Muko- und Sialoproteine, Lipide, Zitrat und Laktat. Man nimmt an, dass diese nichtkollagenen Matrixbestandteile bei der Mineralisation des Dentins eine wichtige Rolle spielen.

Dentin ist aufgrund seiner Tubuli äußerst permeabel und porös und besitzt eine zirka zehn mal so große reaktive Oberfläche wie der Schmelz. Dies legt die Annahme nahe, dass Säuren oder andere Noxen schneller in das Gewebe eindringen und eventuell schädigen können. Bezüglich der Säureempfindlichkeit des Dentins stehen sich verschiedene Aussagen in der Literatur gegenüber. Während Hoppenbrouwers et al. [1986], Arends [1992] und auch ten Cate et al. [1995] postulieren, dass Dentin im schwach sauren Bereich (pH 5) stärker als Schmelz demineralisiert wird, zeigen die Ergebnisse von Ganß [2000] und auch Hall et al. [1999], daß dies nicht generell gilt. Ganß et al. [2000] verglichen die erosive Demineralisationsrate von polierten Schmelz- und Dentinproben mit Proben natürlicher Oberfläche nach dreistündiger Expositionszeit in 0,05 M Zitronensäure (pH 2,3). Dabei zeigte sich einerseits, dass polierte Proben stärker demineralisiert wurden als naturbelassene Oberflächen, andererseits aber auch ein höherer erosiver Mineralverlust bei poliertem Schmelz ($115,0 \pm 44,6 \mu\text{m}$) gegenüber poliertem Dentin ($99,8 \pm 12,3 \mu\text{m}$). Eine Erklärung der kontroversen Ergebnisse liefert möglicherweise die pH-zyklische Studie von Ganß et al. [2001 b], die den Mineralverlust von Schmelz und Dentinproben direkt miteinander verglichen. So übertraf der initiale erosive Mineralverlust im Dentin zunächst den des Schmelzes um mehr als das Doppelte: $32,6 \pm 15,8 \mu\text{m}$ wurden im Dentin, $13,6$

$\pm 6,3 \mu\text{m}$ im Schmelz herausgelöst. Am Ende der Versuchsreihe betrug der Mineralverlust des Dentins $136,7 \pm 16,4 \mu\text{m}$, der des Schmelzes jedoch $147,5 \pm 18,7 \mu\text{m}$.

Die vorliegende Studie liefert übereinstimmende Daten für Dentin. Gemäß der hohen Permeabilität für Säuren und der großen reaktiven Oberfläche im Dentin wurde nach täglicher erosiver Demineralisation zunächst mehr Mineral herausgelöst (ca $11 \mu\text{m}$), jedoch im Verlauf des Versuchs deutlich verringert (ca. $6 \mu\text{m}$). Dieser Effekt stellte sich schon ohne Zufuhr von Fluoriden ein (Gruppe 1), wird aber bei Applikation von konzentrierten Fluoriden deutlich verstärkt (Gruppe 2). Dentin könnte initial säureempfindlicher sein als Schmelz, langfristig jedoch weniger schnell demineralisierbar. Die Säureempfindlichkeit einer Substanz scheint somit von ihrem Gehalt an organischer Matrix abhängig zu sein.

Das Ergebnis der vorliegenden Studie zeigte, dass der Erhalt der organischen Deckschicht nach erosiver Demineralisation des Dentins von eminent großer Bedeutung für den weiteren Verlauf des Erosionsprozesses war. Dies verdeutlichen die Ergebnisse der fluoridierten Proben ohne Kollagenase (Gruppe 2), wo der Mineralverlust ab dem zweiten Versuchstag stagnierte. Die zugehörigen IR-Spektren wiesen die Charakteristika der organischen Matrix (Protein-Banden im Bereich von 1200 bis 1600 Schwingungen pro cm), aber auch geringe Abweichungen im Mineralbereich (1000 bis 1100 Schwingungen pro cm) verglichen mit den Spektren der Kontrollgruppe (Gruppe 1), auf. Dort waren Absorptionen messbar, die bei den einzelnen Proben sowohl geringfügig im Schwingungsbereich als auch in der Intensität variierten (Abb. 14). Dies könnte auf individuelle Eigenschaften, Fluorid- und Mineralionen einzulagern, hinweisen. Bei den Proben der Fluoridgruppe mit zugesetztem Enzym Kollagenase (Gruppe 3) konnte ein kontinuierlicher Mineralverlust festgestellt werden, der den der Kontrollgruppe noch weit überragte. H^+ Ionen konnten offensichtlich ohne organische Deckschicht als Diffusionshindernis leicht durch das poröse Dentin eindringen und einen weiteren Mineralverlust begünstigen. Die Oberflächen der mit Kollagenase behandelten Proben zeigten im IR-Spektrum schwache Banden im Proteinbereich. Eine komplett demineralisierte Dentinschicht konnte aber durch starke Absorptionen im Mineralbereich

ausgeschlossen werden. Die Spektren repräsentieren daher eine Oberfläche mit partiell mineralisiertem Kollagen (Abb. 15). Gleichzeitig zeigen die Spektren, dass dieses noch teilweise mineralisierte Kollagen enzymatisch nicht vollständig entfernt werden konnte. Der Vergleich beider Fluoridgruppen macht deutlich, dass die organische Deckschicht, die sich nach erosiver Demineralisation von Dentin ausbildet, als biologische Schutzschicht verstanden werden kann. Sie dient einerseits als Diffusionsbarriere, andererseits als remineralisierbare Struktur. Klont und ten Cate [1991] zeigten, dass eine Remineralisation im Dentin ausschließlich an verbliebenen Kristalliten stattfindet und nicht losgelöst davon. Der in der vorliegenden Studie nach dem letzten Versuchstag beobachtete Mineralgewinn in der Fluoridgruppe ohne Kollagenase fordert allerdings zu weiterer Diskussion heraus, da die Oberflächenschicht ja zum größten Teil aus organischem Material bestand.

5.2.3 Remineralisation von Dentin

Aus der Forschung über die Dentinogenese, also die ursprüngliche, erstmalige Mineralisation von Dentin während der Zahnentwicklung weiß man, dass nicht die hohe lokale Konzentration von Kalzium- und Phosphationen allein zu einer Mineralisation des rein organischen Kollagens führt, sondern dass andere, nichtkollagene Bestandteile der organischen Matrix speziell als Kristallisationskeime dienen. Es gibt Hinweise darauf, dass Phosphoproteine, Sialoproteine und Proteoglycane an der Induktion und Regulation von Kristallwachstum, -größe und -form beteiligt sind [Linde, 1989]. Dies bestätigen sowohl Studien *in vitro* als auch *in vivo* [Lussi et al., 1988; Linde et al., 1989; Lussi und Linde, 1993]. Diese Makromoleküle, die eng mit den Kollagenfibrillen verknüpft sind, dienen als polyanionische Liganden, die eine hohe Affinität zu Kalzium, aber auch allgemein zu divalenten Kationen haben und so die Präzipitation und das Wachstum von Kalziumphosphatkristallen fördern. Das Kollagengeflecht wird als passives Stützgerüst verstanden, das ausschließlich als Basis und Leitstruktur für das Kristallwachstum dient [Linde, 1984]. Die Induktion der Mineralisation speziell durch Phosphoproteine, welche mehr als

50% der nichtkollagenen Proteine der organischen Matrix des Dentins ausmachen, wird im Krankheitsbild der *Dentinogenesis imperfecta* deutlich, bei dem die Menge an Phosphoproteinen reduziert ist oder sogar völlig fehlt, sodass die Mineralisation unzureichend und mangelhaft ist [Ritchie et al., 1998]. Phosphoproteine wirken jedoch nur induzierend auf die Mineralisation, wenn sie fest an die Kollagenmatrix gebunden sind. Befinden sich diese Makromoleküle frei in Lösung, wie es nach Säureexposition von Dentin der Fall sein kann, hemmen sie dessen Remineralisation. Sie entziehen der Lösung Kalziumionen und fallen als Komplexe aus, ohne direkt an der Dentinmatrix zu präzipitieren. Damit verhindern sie die Mineralisation der eigentlichen Zahnschubstanz. Clarkson [1991] zeigte, dass das Entfernen der löslichen, nichtkollagenen Proteine aus der Lösung die Remineralisation von demineralisiertem Dentin wieder fördert. Ähnliche Ergebnisse erzielten Inaba et al. [1996], die eine erhöhte Remineralisationsrate von bis zu 27% *in vitro* nach zweiminütiger Behandlung von demineralisierten Dentinproben mit 10%igem NaOCl nachwiesen. NaOCl gilt als unspezifisches proteolytisches Agens, das organisches Material entfernen kann. Der Hauptteil der Phosphoproteine des Dentins besteht aus leicht löslichen Makromolekülen, die bei Demineralisation mit anorganischen Säuren oder organischen Säuren in Kombination mit einer konzentrierten Salzlösung aus dem Verbund der Kollagenmatrix herausgelöst werden können. Diese Moleküle sind in intermolekularen Zwischenräumen des Kollagens mechanisch festgehalten [Mc Curdy et al., 1990]. Daneben existieren jedoch auch schwerer lösliche Phosphoproteine, die kovalent an Kollagen gebunden sind und sich selbst nicht durch 1 M NaCl [Lussi und Linde, 1993] oder andere Agentien wie Guanidinchlorid lösen lassen [Linde et al., 1980; Clarkson et al., 1991]. Wenn Phosphoproteine also räumlich fest an das Kollagen gebunden vorliegen, entweder kovalent gebunden oder mechanisch gefangen, induzieren sie die Bildung von Apatitkristallen direkt an den Kollagenfibrillen. In niedriger Konzentration wirken sie als Initiatoren, in höherer Konzentration kontrollieren sie die Größe und Ausrichtung der wachsenden Kristalle [Linde et al., 1989; Hunter et al., 1996].

Wenn Fluoride auf demineralisiertes Dentin einwirken, wurde mehrfach eine Akkumulation von Fluoriden nachgewiesen, die mit einer Hyperremineralisation im Vergleich zum natürlichen Dentin einherging. Arends et al. [1989] berichteten über einen Mineralgehalt von bis zu 70 Vol% an oberflächlichen Schichten anstelle des ursprünglichen Mineralgehaltes von 48 Vol% im Rinderdentin. Im menschlichen Dentin konnte ebenfalls eine Hyperremineralisation gezeigt werden [Arends et al., 1990], die jedoch etwas geringer war als die im Rinderdentin. Rinderdentin weist eine größere Porosität und damit eine höhere Penetrationsfähigkeit auf als das menschliche Dentin. Die Dentinmineralisation hängt demnach von der Diffusionsmöglichkeit von F^- in das Gewebe ab. Fluoridreiches Mineral lagert sich an den die Tubuli auskleidenden peritubulären Apatitkristallen an, deren Säureresistenz dadurch erhöht wird. Dies fördert eine weitere Remineralisation [Iijma et al., 1993]. Im Gegensatz zum Schmelz sind nach Erosionen im Dentin auch noch organische Strukturen erhalten, die eventuell durch Induktion möglicherweise verbliebener anionischer Makromoleküle die Remineralisation fördern. Weiterhin kann sich Mineral in die intermolekularen Zwischenräume einlagern, die durch Lücken von Wasserstoffbrückenbindungen entstehen. Dentin-Kollagen, das ausschließlich aus Kollagen des Typs I besteht [Linde, 1984], unterscheidet sich von Typ I-Kollagen anderen Gewebes in seinem Gehalt an Hydroxylysin. Diese in den Peptidketten gehäuft vorkommende Aminosäure führt zu einer verstärkten Quervernetzung der Kollagenmoleküle. Das Kollagennetzwerk des Dentins ist daher besonders stabil und praktisch nicht dehnbar. Aus diesem Grund ist die Menge an Mineral, das in das Gewebe aufgenommen werden kann, limitiert. Hyperremineralisiertes Dentin dürfte somit nur in einer veränderten Kollagennetzstruktur, wie es durch Säureeinwirkung der Fall ist, zu finden sein. An den Kollagenfibrillen verbliebenes Mineral kann diese vor proteolytischer Degradation schützen. Erst eine vollständig demineralisierte organische Matrix kann enzymatisch abgebaut werden [Klont und ten Cate, 1989].

5.2.4 Enzymatischer Abbau der organischen Matrix

Enzyme spalten Moleküle an ganz speziellen Bindungsstellen. Sind diese aus

sterischen Gründen oder durch Anlagerung anderer Moleküle für das Enzym nicht erreichbar, kann kein Abbau erfolgen. Sogar voll entmineralisiertes Dentin-Kollagen kann nicht von unspezifischen Proteasen wie Trypsin oder Pepsin gespalten werden. Die möglichen Spaltungsstellen des Kollagens sind für diese Enzyme räumlich nicht erreichbar. Nach Denaturierung des Kollagens durch Säure liegt dieses jedoch in veränderter Struktur vor und ist nun durch Trypsin spaltbar. Spezifische Proteasen wie die in unserem Versuch verwendete bakterielle Kollagenase spalten das Kollagen auch in seiner nicht denaturierten Form, wenn es ausreichend demineralisiert, d.h. von Mineralkristallen befreit ist. Mineralisiertes Kollagen ist vor enzymatischem Abbau gut geschützt. Die Spaltungsstellen sind verdeckt und für angreifende Enzyme unerreichbar. Selbst nur noch partiell mineralisiertes Dentin kann vor enzymatischem Abbau noch geschützt sein. Rasterelektronenmikroskopische Studien zeigten, dass selbst nach Demineralisation von Dentinproben noch intakte, nicht denaturierte Kollagenfibrillen an der Oberfläche vorhanden waren [Johannsen und Parks, 1961, Sarnat und Massler, 1965]. Hier bestanden die Säureeinwirkungen jedoch in schwach sauren pH-Werten, wie sie bei der Karies auftreten. Bei erosiven Demineralisationen hingegen kann angenommen werden, dass das entmineralisierte Kollagen an der Oberfläche in denaturierter Form vorliegt und somit auch von unspezifischen Proteasen wie Trypsin, Pepsin, etc. gespalten wird. Scott und Leaver [1974] fanden heraus, dass die Spaltung denaturierten Kollagens mit Trypsin stark temperaturabhängig ist und sich die Menge des bei 20°C abgebauten Kollagens von 1 - 2% auf 12 - 25% bei 37°C erhöht. Dies steigert das Risiko eines enzymatischen Abbaus der organischen Deckschicht in der Mundhöhle beträchtlich.

Für die Präsenz spezifischer Kollagenasen in der Mundhöhle wurden bereits einige Nachweise erbracht. Neben bakteriellen Kollagenasen, z.B. aus schwarz pigmentierten Bacteroides-Arten und Capnocytophaga [Mayrand und Grenier, 1985], gibt es auch Gewebekollagenasen, die hochspezifische Spaltungen vornehmen können. Weiterhin liegen Enzyme in aktiver oder passiver Form vor. Eine inaktive Form der Kollagenase wurde in demineralisiertem Dentin gefunden,

die von Odontoblasten sezerniert, aber erst durch kariöse Veränderungen im Dentin aktiviert wird [Dayan et al., 1983]. Welche Faktoren zu einer Aktivierung des Enzyms auch unter erosiven Bedingungen führen, ist noch nicht geklärt. Des Weiteren fand man in der Gingiva eine latente Form der Kollagenase, die durch Serin-Proteasen im Gewebe aktiviert wird [Uitto et al., 1984]. Auch Plasmazellen produzieren endogene Kollagenasen, beispielsweise polymorphkernige Granulozyten [Uitto und Raeste, 1978; Uitto et al., 1990 und Overall et al., 1991], und Makrophagen [Wahl et al., 1974]. Sorsa et al. [1989] berichteten über Kollagenasen aus neutrophilen Granulozyten, die natives, tripelhelikales Kollagen des Typs I, II und III an einer spezifischen Bindungsstelle spalten können, sodass ein $\frac{3}{4}$ Fragment (alpha-A-Peptid) und ein $\frac{1}{4}$ Fragment (alpha-B-Peptid) des Moleküls entsteht. Diese Spaltprodukte sind wiederum unter bestimmten Bedingungen für unspezifische Proteasen weiter spaltbar. Serin-Proteasen, Gelatinasen und Elastasen können diese Fragmente bei Körpertemperatur weiter abbauen [Sakai und Gross, 1967]. Bei niedrigen Temperaturen behalten die Fragmente ihre Tripel-Helix-Struktur und sind dann für Serin-Proteasen unzugänglich [Turto et al., 1977]. Eine Menge an unspezifischen Proteasen wird von Bakterien der Mundhöhle sezerniert, die an kariösen Prozessen beteiligt sind [Edwardsson, 1974; Hoshino, 1985]. Daneben finden sich weitere Proteasen in subgingivaler Plaque [Bretz und Loesche, 1987] und im Speichel [Söder, 1972; Chauncey, 1961].

Diese Erkenntnisse weisen auf die vielseitigen Möglichkeiten in der Mundhöhle hin, die dazu beitragen können, die demineralisierte organische Matrix zu zerstören. Trotzdem gibt es auch Faktoren in der Mundhöhle, die wiederum auf die Kollagenase inhibitorisch wirken, welche von den Speicheldrüsen [Drouin, 1988] oder auch durch subgingivale Bakterien [Grenier, 1991] sezerniert werden. Van Strijp et al. [1997] fanden heraus, dass Laktobazillen und Aktinomyzeten eine hohe Affinität zu Kollagen des Typs I haben, konnten aber keine proteolytische Aktivität dieser Bakterien nachweisen. Dagegen zeigte Wang et al., [1999], dass *Actinobazillus actinomycetem comitans* eine Serin-Protease sezerniert, die Kollagen des Typs I sehr gut zu spalten vermochte.

Festzuhalten ist, dass an den Kollagenfibrillen verbliebenes Mineral das Kollagen

vor enzymatischem Abbau schützen kann, ebenso das Kollagen ganz eng gebundenes Mineral vor saurer Hydrolyse. Bei einem Versuch von Selvig [1968] waren selbst bei starker Demineralisation noch einzelne Kristalle an Kollagenfibrillen zu finden. Der Hauptteil des abgelagerten Minerals befand sich in und auf den Kollagenfibrillen, ein kleinerer Teil zwischen den Fibrillen. Es wurde festgestellt, dass die zuletzt abgelagerten Mineralkristalle zwischen den Fibrillen auch als erste wieder herausgelöst werden konnten. Liegen Spaltstellen des Kollagens von Mineral entblößt frei da, besteht die Gefahr, dass Kollagen abgebaut wird und gleichzeitig auch das Restmineral mit verloren geht.

Unser Versuch kann nur theoretische Aussagen über den Erosionsprozess mit und ohne Erhalt der organischen Matrix machen, die nicht direkt auf den tatsächlichen Vorgang in der Mundhöhle übertragen werden dürfen. Es bleibt zu klären, ob sich eine solche organische Deckschicht unter Mundbedingungen überhaupt ausbilden kann und wie stabil sie ist. Es fehlen Informationen über den Einfluss mechanischer Art durch Abrieb sowie die genauen Wechselwirkungen mit oralen Mikroorganismen.

Die Ergebnisse dieser Studie haben gezeigt, dass der erosionshemmende Effekt von Fluoriden im Dentin wesentlich von der organischen Deckschicht abhängt. Daher muss dem Erhalt der organischen Matrix im Hinblick auf eine erfolgreiche symptomatische Therapie mit Fluoriden größte Bedeutung zugemessen werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser in vitro Studie war es, den Einfluss der organischen Matrix des Dentins auf den Erosionsprozess zu untersuchen und deren Bedeutung für die Effektivität von Fluoriden zu bestimmen.

Von 25 menschlichen Weisheitszähnen wurden je drei 700 µm dicke longitudinale Dentinschnitte hergestellt. Die erosive Demineralisation erfolgte sechsmal täglich für zehn Minuten mit 0,05 molarer Zitronensäure (pH 2,3), dazwischen wurden die Proben in einer Remineralisationslösung mit oder ohne Kollagenase aufbewahrt. Die Fluoridierung erfolgte alternierend für sechsmal fünf Minuten täglich mit einer Fluoridzahnpaste, einer fluoridhaltigen Mundspüllösung und mit einem Fluoridgelee. Die Versuchsdauer betrug fünf Tage, der Mineralgehalt wurde zu Beginn des Versuchs und nach jedem Versuchstag mit der longitudinalen Mikroradiografie bestimmt und als Differenz zum Ausgangswert in µm ausgedrückt. Die Versuchsgruppen waren folgende: Gruppe 1: Erosion, keine Fluoridierung, keine Kollagenase (Kontrollgruppe); Gruppe 2: Erosion, Fluoridierung, keine Kollagenase; Gruppe 3: Erosion, Fluoridierung, Kollagenase. Zur strukturellen Analyse der Oberflächen der Dentinproben wurden am Versuchsende IR-Spektren aufgenommen und mit Hilfe von Referenzspektren ausgewertet. Sie zeigten, dass die durch Säure exponierte Deckschicht der Dentinproben aus Kollagen bestand. Nach Fluoridapplikation konnten Änderungen der Banden im Mineralbereich festgestellt werden. Die mit Kollagenase behandelten Proben zeigten sowohl charakteristische Banden von Mineral als auch von Kollagen. Am Ende des Versuchs betrug der Mineralverlust in der Kontrollgruppe $45,9 \pm 14,3$ µm, in der Gruppe 3 dagegen $73,3 \pm 17,6$ µm ($p \leq 0,001$). In Gruppe 2 fand sich nach zwei Versuchstagen ein Mineralverlust von $21,0 \pm 12,6$ µm, der an den folgenden Tagen stagnierte. Am letzten Tag konnte sogar ein Mineralgewinn beobachtet werden.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass Fluoride höchst erfolgreich die Erosion

im Dentin stoppen können, wenn die durch Säure exponierte organische Deckschicht erhalten ist. Es wurde gezeigt, dass nach Entfernung dieser organischen Matrix mit Kollagenase trotz hoch konzentrierter Fluoridapplikation ein deutlicher Mineralverlust auftritt, der nahezu linear ansteigt. Dieses Ergebnis stellt einerseits die Bedeutung konzentrierter Fluoridapplikation in der Therapie von Erosionen im Dentin heraus, macht aber andererseits auch deutlich, dass der Erhalt der organischen Bestandteile des Dentins Voraussetzung für die Effektivität der Fluoride ist.

Weitere Untersuchungen über die Existenz und Stabilität der organischen Deckschicht in situ sind nötig, um die Therapie der Erosionen im Dentin zu optimieren. Sogar eine Remineralisation der Dentinerosionen bei anhaltender Säureexposition könnte möglich sein.

7 ABSTRACT

The aim of this in vitro study has been to examine the influence of the organic matrix of dentine on the process of erosion and to determine its relevance for the effectiveness of fluorides.

Three 700 μm thick longitudinal dentine cuts of 25 human wisdom teeth each were produced. The erosive demineralisation was undertaken six times daily for ten minutes with 0,05 molar citric acid (pH 2,3); in between the samples were stored in a remineralisation solution with or without collagenase. Fluoridation occurred six times for five minutes alternating between a fluoride toothpaste, a fluoridated mouth rinse, and a fluoride gel. The experiment lasted for five days. The mineral content was determined at the beginning of the experiment and after each day by longitudinal microradiography, and the difference to the base value was expressed in μm . The experimental groups were: group 1: erosion, no fluoridation, no collagenase (control group); group 2: erosion, fluoridation, no collagenase; group 3: erosion, fluoridation, collagenase.

For the structural analysis of the dentine samples' surface, at the end of the experiment IR spectrum analyses were taken and analysed by way of reference spectra. They showed that the surface layer of the dentine samples exposed by the acid consisted of collagen. After the application of fluoride, changes of the bands in the mineral area could be detected. The samples treated with collagenase showed characteristic bands of mineral, as well as collagen. At the end of the experiment, the loss of mineral in the control group amounted to $45,9 \pm 14,3\mu\text{m}$, in group 3, however, $73,3 \pm 17,6 \mu\text{m}$ ($p \leq 0,001$). In group 2, after two days, a loss of mineral of $21,0 \pm 12,6 \mu\text{m}$ occurred, which stagnated during the following days. On the last day, an increase in mineral could even be observed.

These results clearly show that fluorides are highly successful in stopping the erosion in the dentine when the organic surface layer, exposed by acid, is preserved. It has been shown that after the removal of the organic matrix by the enzyme collagenase, a significant loss of mineral occurs, which increases almost in a linear fashion, in spite of a highly concentrated fluoride application. On the one hand, this result clearly establishes the relevance of concentrated fluoride

application in the therapy of erosions in the dentine, on the other hand, it shows that the preservation of the organic components of the dentine is a prerequisite for the effectiveness of the fluorides. Further experiments on the existence and stability of the organic surface layer in situ are necessary in order to treat dentine erosions successfully. Even with a prolonged exposure to acid, a remineralisation of dentine erosions could be possible.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Allan, DN.

Enamel erosion with lemon juice

Br Dent J 1967; 122: 300-302

Arends, J; Christoffersen, J; Jongebloed, WL.

Remineralization of bovine dentine in vitro: The influence of the F content in solution on mineral distribution

Caries Res 1989; 23: 309-314

Arends, J; Ruben, J; Christoffersen, J; Jongebloed, WL; Zuidgeest, TMG.

Remineralization of human dentine in vitro

Caries Res 1990; 24: 432-435

Arends, J; Christoffersen, J; Buskers, JAKM; Ruben, J.

Effects of Fluoride and Methanhydroxydiphosphate on enamel and on dentine demineralization

Caries Res 1992; 26:409-417

Attin, T; Hilgers, RD; Hellwig, E.

Beeinflussung des erosionsbedingten Oberflächenshärteverlustes von Zahnschmelz durch Fluorid.

Dtsch Zahnärztl Z 1997; 52:241-245

Attin, T; Deifuss, H; Hellwig, E.

Influence of acidified fluoride gel on abrasion resistance of eroded enamel

Caries Res 1999; 33: 135-139

Attix, FN; Roesch, WC.

Basis concepts of dosimetry

Acad Press London, 1968

Breschi, L; Gobbi, P; Mazzotti, G; Falconi, M; Ellis, TH; Stangel, I.

High resolution SEM evaluation of dentin etched with maleic citric acid

Dent Mat 2002; 18: 26-35

Bretz, WA, Loesche, WJ.

Characteristics of trypsin-like activity in subgingival plaque samples

J Dent Res 1987; 66: 1668-1672

-
- Buonocore, MG.
A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces
J Dent Res 1955; 46: 37-45
- Carrigan, PJ; Morse, DR; Furst, ML; Sinai, IH.
A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location
J Endodont 1984; 10: 359-363
- Chauncey, HH.
Salivary enzymes
J Am Dent Assoc 1961; 63: 361-369
- Clarkson, BH; Feagin, FF; Mc Curdy, SP; Sheets, JH; Speirs, R.
Effects of phosphoprotein moieties on the remineralization of human root caries
Caries Res 1991; 25:166-173
- Cooper, PJ, Charmock, J; Taylor, MJ.
The prevalence of bulimia nervosa
Br J Psychiatry 1987; 151: 684-686
- Davis, WB; Winter, PJ.
The effect of abrasion on enamel and dentine after exposure to dietary acid
Br Dent J 1980; 148: 116-119
- Dayan, D; Binderman, I; Mechanic, GL.
A preliminary study of activation of collagenase in carious human dentine matrix
Archs Oral Biol, 1983; 28: 185-187
- Drouin, L; Overall, CM; Sodek, J.
Identification of matrix metalloproteinase inhibitor (TIMP) in human parotid and submandibular saliva: Partial purification and characterization
J Periodontal Res 1988; 23: 370-377
- Eccles, JD; Jenkins, WG.
Dental erosion and diet
J Dent 1974; 2: 153-156
- Eccles, JD.
Dental erosion of nonindustrial origin. A clinical survey and classification
J Prosthet Dent 1979; 42: 649-653
- Edwardsson, S.
Bacteriological studies on deep areas of carious dentine
Odontol Revy 1974; 25: 1-14

-
- Eisenburger, M; Addy, M; Hughes, JA; Shellis, RP.
Effect of time on the remineralisation of enamel by synthetic saliva after citric acid erosion
Caries Res 2001a; 35: 211-215
- Eisenburger, M; Hughes, J; West, NX; Shellis RP; Addy, M.
The use of ultrasonication to study remineralisation of eroded enamel
Caries Res 2001b; 35: 66-61
- Ericsson, SE.
Quantitative microradiography of cementum and abraded dentine
Acta Radiologica 1965; Suppl. 246: 1-137
- Gangbar, S; Overall, CM; Mc Culloch, CAG; Sodek, J.
Identification of polymorphonuclear leukocyte collagenase and gelatinase activities in mouthrinse samples: Correlations with periodontal disease activity in adult and juvenile periodontitis
J Periodont Res 1990; 25: 257-267
- Ganß, C; Schlechtriemen, M; Klimek, J.
Dental erosion in subjects living on a raw food diet
Caries Res 1999; 33: 74-80
- Ganß, C; Klimek, J; Schwarz, N.
A comparative profilometric in vitro study of the susceptibility of polished and natural human enamel and dentine surfaces to erosive demineralization
Arch Oral Biol 2000; 45: 897-902
- Ganß, C; Klimek, J; Giese, K.
Dental erosion in children and adolescents- a cross sectional and longitudinal investigation using study models
Community Dent Oral Epidemiol 2001(a); 29: 264-271
- Ganß, C; Klimek, J; Schäffer, U; Spall, T.
Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in vitro
Caries Res 2001(b); 35: 325-330
- Ganß, C; Brune, V; Klimek, J.
Effektivität zweier Fluoridierungsmaßnahmen auf den erosiv bedingten Mineralverlust im Schmelz in situ
Quintessenz-Verlags-GmbH, Berlin 2001: Kielbassa, A; Hellwig, E:
Autoreferateband, Wissenschaftliches Programm der 15. Jahrestagung der DGZ, Köln 2001(c)

-
- Gedalia, I; Dakuar, A; Shapira, L; Lewinenstein, I; Goultschin, J; Rahamin, E.
Enamel softening with Coca Cola and rehardening with milk or saliva
Am J Dent 1991; 4: 120-122
- Gedalia, I; Davidov, I; Lewinenstein, I; Shapira, L.
Effect of hard cheese exposure, with and without fluoride prerinse, on the rehardening of softened human enamel
Caries Res 1992; 26: 290-292
- Gerrard, WA; Winter, PJ.
Evaluation of toothpaste by their ability to assist rehardening of enamel in vitro
Caries Res 1986; 20: 209-216
- Graubart, J; Gedalia, I; Pisanti, S.
Effects of fluoride pretreatment in vitro on human teeth exposed to citrus juice
J Dent Res 1972; 51:1677
- Grenby, TH.
In vitro Experimente über die Auswirkungen von Erfrischungsgetränken auf die Zahnhartsubstanz
Oralprophylaxe 1990; 12: 103-113
- Grenby, TH.
Lessening dental erosive potential by product modification
Eur J Oral Sci 1996; 104: 221-228
- Grenier, D.
Production of trypsin and chymotrypsin inhibitors by oral bacterial isolates
J Periodontal Res 1991; 26: 381-387
- Hall, AF; Buchanan, CA.
The effect of saliva on enamel and dentine erosion
J Dent 1999; 27: 333-339
- Hannig, M; Albers, HK.
Die erosive Wirkung von Acetylsalicylsäure an Zahnschmelz und Dentin in vitro
Dtsch Zahnärztl Z 1993; 48: 298-302
- Hartles, RL; Wagg, BJ.
Erosive effect of drinking fluids on the molar teeth of the rat
Arch Oral Biol 1962, 7: 307-315
- Hay, D; Pinsent, BRW; Schram, CJ; Wagg, BJ.
The protective effect of calcium and phosphate ions against acid erosion of dental enamel and dentine
Br Dent J 1962; 112: 283-287

Hellwig, HE; Klimek, J; Attin, T.
Einführung in die Zahnerhaltung
Urban und Schwarzenberg, 2002

Hesse, M; Meier, H; Zeeh, B.
Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie
Thieme, Stuttgart 1991

High, AS.
An unusual pattern of dental erosion. A case report
Br Dent J 1977; 143: 403-404

Holloway, PJ; Mellanby, M; Stewart, RJC
Fruit drinks and tooth erosion
Brit Dent J 1958; 104: 305-309

Hoppenbrouwers, PMM; Driessens, FCM; Borggreven, JMPM.
The vulnerability of unexposed human dental roots to demineralization
J Dent Res 1986; 65: 955-958

Hoshino, E.
Predominant obligate anaerobes in human carious dentin
J Dent Res 1985; 64: 1195-1198

Hunter, G; Hauschka, P; Poole, A; Rosenberg, L; Goldberg, H.
Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue
proteins
Biochem J 1996; 317: 5964

Iijma, Y; Ruben, JL; Zuidgeest, TGM; Arends, J.
Fluoride and mineral content in hyperremineralized coronal bovine dentin in vitro
after an acid challenge
Caries Res 1993; 27: 106-110

Imfeld, T.
Dental erosion. Definition, classification and links
Eur J Oral Sci 1996; 104: 151-155

Inaba, D; Ruben, J; Takagi, O; Arends, J.
Effect of sodium hypochloride treatment on remineralization of human root
dentine in vitro
Caries Res 1996; 30: 218-224

Järvinen, V; Meurman, JH.
Dental erosion and upper gastrointestinal disorders
Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1988; 65:298-303

-
- Järvinen, V; Rytömaa, I; Heinonen, OP.
Risk factors in dental erosion
J Dent Res 1991; 70: 942-947
- Järvinen, V; Rytömaa, I; Meurman, JH.
Location of dental erosion in a referred population
Caries Res 1992; 26: 391-396
- Johansen, E; Parks, HF.
Electron-microscopic observations on soft carious human dentin
J Dent Res 1961; 40: 235-248
- Josselin de Jong, E; ten Bosch, JJ.
Error analysis of the microradiographic determination of mineral content in mineralized tissue slices
Phys Med Biol 1985; 30: 1067-1075
- Josselin de Jong, E; van der Linden, AHIM; ten Bosch, JJ.
Longitudinal microradiography: a new nondestructive quantitative method to follow mineral changes in mineralized tissue slices
Phys Med Biol 1987; 32: 1209-1220
- Josselin de Jong, E; van der Linden, AHIM; Borsboom, PCF; ten Bosch, JJ.
Determination of mineral changes in human dental enamel by longitudinal microradiography and scanning optical monitoring and their correlation with chemical analysis
Caries Res 1988; 22:153-159
- Kinney, JH; Balooch, M; Haupt, DLJ; Marshall, SJ; Marshall GW Jr.
Mineral Distribution and dimensional changes in human dentin during demineralisation
J Dent Res 1995; 74: 1179-1184
- Kleter, GA; Damen, JJM; Everts, V; Niehof, J; ten Cate, JM.
The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentine in vitro
J Dent Res 1994; 73: 1523-1529
- Klont, B; ten Cate, JM.
Accessibility of dentine collagen for enzyme degradation during in vitro lesion formation
Caries Res 1989; 23: 125-126
- Klont, B; ten Cate, JM.
Remineralization of bovine incisor root lesions in vitro. The role of the collagenous matrix
Caries Res 1991; 25: 39-45

-
- Lambrechts, P; van Meerbeek, B.
Restaurative therapy for erosive lesions
Eur J Oral Sci 1996; 104: 229-240
- Larsen, MJ; Nyvad, B.
Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH,
buffering effect and contents of calcium phosphate
Caries Res 1999; 33: 81-87
- Levine, RS.
Fruit juice erosion- an increasing danger
J Dent 1973; 2: 85-88
- Lenz, H; Mühlemann, HR.
Repair of etched enamel exposed to the oral environment
Helv Odontol Acta 1963; 7: 47-49
- Linde, A; Bhowan, M; Butler, WT.
Noncollagenous proteins of dentin
J Biol Chem 1980; 255: 5931-5942
- Linde, A.
Noncollagenous proteins and proteoglycans in dentinogenesis; in Linde, A
(Hrsg): Dentin and Dentinogenesis, Band 2. Boca Raton, CRC Press 1984;55-92
- Linde, A.
Dentine matrix proteins: Composition and possible functions in calcification
Anat Rec 1989; 224: 154-166
- Linde, A; Lussi, A; Crenshaw, MA.
Mineral induction by immobilized polyanionic proteins
Calcif Tissue Int 1989; 44: 286-295
- Linkosalo, E; Markkanen, H.
Dental erosion in relation to lactovegetarian diet
Scand J Dent Res 1985; 93: 436-441
- Lussi, A; Crenshaw, MA; Linde, A.
Induction and inhibition of hydroxyapatite formation by rat dentin phosphoprotein
in vitro
Arch Oral Biol 1988; 33: 685-691
- Lissi, A; Schaffner, M; Hotz, P; Suter, P.
Dental erosion in a population of swiss adults
Community Dent Oral Epidemiol 1991; 19: 286-290

-
- Lussi, A; Schaffner, M; Hotz, P; Suter, P.
Erosion der Zahnhartsubstanz. Epidemiologie, klinisches Erscheinungsbild,
Risikofaktoren und Verhaltensregeln
Schweiz Monatsschr Zahnmed 1992; 102: 321-329
- Lussi, A; Linde, A.
Mineral induction in vivo by dentine proteins
Caries Res 1993; 27: 241-248
- Lussi, A; Schaffner, M.
Progression of and risk factors for dental erosion and wedge shaped defects over
a 6-year period
Caries Res 2000; 34: 182-187
- Lyttle, HA; Sidhu, N; Smyth, B.
A study of classification and treatment of noncarious cervical lesions by general
practitioners
J Prosthet Dent 1998; 79: 342-346
- Mannerberg, F.
Appearance of tooth surfaces as observed in shadowed replicas, in various age
groups, in long-term studies, after tooth brushing, in case of erosion and after
exposure to citrus fruit juice
Odont Revy 1960; 11: 166-169
- Mannerberg, F.
Changes in the enamel surface in cases of erosion. A replica study
Arch Oral Biol 1961; 4: 59-62
- Mannerberg, F.
Effect of lemon juice on different types of tooth surface: A replica study in vivo
Acta Odontol Scand 1962; 20: 153-164
- Mannerberg, F.
Saliva factors in case of erosion
Odontol Revy 1963; 15: 156-166
- Mayrand, D; Grenier, D.
Detection of collagenase activity in oral bacteria
Can J Microbiol 1985; 31: 134-138
- Mc Curdy, SP; Clarkson, BH; Speirs, RL; Feagin, FF.
Phosphoprotein extraction from the dentine/ cementum complex of human tooth
roots.
Arch Oral Biol 1990; 35: 347-357

- Mc Intyre, JM.
Erosion
Aust Prosth J 1992; 6: 17-25
- Meurman, JH; Drysdale, T; Frank, RM.
Experimental erosion of dentin
Scand J Dent Res 1991; 99: 457-462
- Meurman, JH; Frank, RM.
Progression and surface ultrastructure of in vitro erosive lesions in human and bovine enamel
Caries Res 1991; 25: 81-87
- Meurman, JH; ten Cate, JM.
Pathogenesis and modifying factors of dental erosion
Eur J Oral Sci 1996, 104: 199-206
- Miller, WD.
Experiments and observations on the wasting of tooth tissue, variously designed as erosion, abrasion, chemical abrasion, denudation, etc.
Dent Cosm 1907; 49: 1-23
- Mixson, JM; Spencer; P; Moore, DL; Chappell, RP; Adams, S.
Surface morphology and chemical characterization of abrasion/ erosion lesions
Am J Dent 1995; 8: 5-9
- Moore D; Wilson, MA.
Dental erosion: a case study of a marathon runner
Dent Update 2001; 28: 25-28
- Nalbandian, J; Gonzales, F; Sognaes, RF.
Sclerotic age changes in root dentine of human teeth as observed by optical, electron and x-ray microscopy
J Dent Res 1960; 39: 598
- O'Shea, DC; Bartlett; ML; Young; RA.
Compositional analysis of apatites with laser Raman spectroscopy: (OH, F, Cl) apatites
Arch Oral Biol 1974; 19: 995-1006
- Overall, CM; Sodek, J; Mc Culloch CAG; Birek, P.
Evidence for polymorphonucleolar leukocyte collagenase and 92-kilodalton gelatinase in gingival crevicular fluid
Infect Immun 1991; 59: 4687-4692

-
- Reussner, GH; Cocodrilli, G Jr; Thiessen, R Jr.
Effects of phosphates in acid-containing beverages on tooth erosion
J Dent Res 1975; 54: 365-37
- Ritchie, HH; Ritchie, DG; Wang, LH.
Six decades of dentinogenesis research. Historical and prospective views on phosphoryn and dentin sialoprotein
Eur J Oral Sci 1998; 106: 211-220
- Rytömaa, I; Meurman, JH; Koskinen, J; Laakso, T; Gharazi, L; Turunen, R.
In vitro erosion of bovine enamel caused by acidic drinks and other foodstuff
Scand J Dent Res 1988; 96: 324-333
- Rytömaa, I; Järvinen, V; Kanerva, R; Heinonen, OP.
Bulimia and tooth erosion
Acta Odontol Scand 1998; 56: 36-40
- Sakai, T; Gross, J.
Some properties of the products of reaction of tadpole collagenase with collagen
Biochemistry 1967; 6: 518-528
- Sarnat, H; Massler, M.
Microstructure of active and arrested dentinal caries
J Dent Res 1965; 44:1389-1401
- Saxegaard, E; Rölla, G.
Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro
Scand J Dent Res 1988; 96: 523-535
- Scheutzel, P.
Zahnmedizinische Befunde bei psychogenen Eßstörungen
Dtsch Zahnärztl Z 1992; 47: 119-123
- Scheutzel, P.
Etiology of dental erosion- intrinsic factors
Eur J Oral Sci 1996; 104: 178-190
- Schroeder, HE.
Orale Strukturbiologie
Thieme, Stuttgart 1992
- Scott, PG, Leaver, AG.
The degradation of human dentine collagen by trypsin
Connect Tissue Res 1974; 2: 299-307

- Selvig, KA.
Ultrastructural changes in human dentine exposed to a week acid
Arch Oral Biol 1968; 13: 719-734
- Smith, BGN; Knight, JK.
A comparison of patterns of tooth wear with etiological factors
Br Dent J 1984; 157: 16-19
- Smith, AJ; Shaw, L.
Baby fruit juices and tooth erosion
Br Dent J 1987; 162: 65-67
- Smith, AJ; Shaw, L.
Comparison of rates of clearance of glucose from various oral sites following drinking with a glass feeder cup and straw
Med Sci Res 1993; 21: 617-619
- Söder, PÖ.
Proteolytic activity in the oral cavity: proteolytic enzymes from human saliva and dental plaque material
J Dent Res 1972; 51: 389-393
- Sorsa, T; Suomalainen, K; Konttinen, YT; Saari, HAT; Lindy, S; Uitto, VJ
Identification of protease(s) capable of further degrading native ¾- collagen and ¼- collagen fragments generated by collagenase from native type I collagen in human neutrophils
Proc Finn Dent Soc 1989; 85: 3-11
- Sorvari, R; Kiviranta, I; Luoma, H.
Erosive effect of a sport drink mixture with and without addition of fluoride and magnesium on the molar teeth of rats
Scand J Dent Res 1988; 96: 226-231
- Sorvari, R; Meurman, JH; Alakuijala, P; Frank, RM.
Effect of fluoride varnish and solution on enamel erosion in vitro
Caries Res 1994; 28: 227-232
- Sorvari, R; Peltari, A; Meurman, JH.
Surface ultrastructure of rat molar teeth after experimentally induced erosion and attrition
Caries Res 1996; 30: 163-168
- Spencer, AJ; Ellis, LN.
The effect of fluoride and grapefruit juice on the etching of teeth
J Nutr 1950; 43: 107-115

- Spencer, P Wang, Y; Walker, MR; Swafford, JR.
Molecular structure of acid -etched dentin smear layers in situ study
J Dent Res 2001; 80: 1802-1807
- Sreenby, LM; Schwarz, SS.
A reference guide to drugs and dry mouth
Gerodontol 1986; 5: 75-99
- Stephan, RM.
Effects of different types of human foods on dental health in experimental animals
J Dent Res 1966; 45: 1551-1561
- Takuma, S; Eda, S.
Structure and development of the peritubular matrix in dentine
J Dent Res 1966; 45: 683
- Ten Bosch, Angmar-Mansson, B.
A review of quantitative methods for studies of mineral content of intraoral incipient carious lesions
J Dent Res 1991; 70: 2-14
- Ten Bruggen Cate, HJ.
Dental erosion in industry
Br J Ind Med 1968; 25: 249-266
- Ten Cate JM; Buijs, MJ; Damen JJM.
PH-cycling of enamel and dentin lesions in the presence of low concentrations of fluoride
Eur J Oral Sci 1995; 103: 362-367
- Thomas, AK.
Further observations on the influence of citrus fruit juices on human teeth
NYS Dent J 1957, 23: 424-430
- Tsuda, H; Arends, J.
Detection and quantification of calcium fluoride using micro-raman-spectroscopy
Caries Res 1993; 27: 249-257
- Turto, H; Lindy, S; Uitto, VJ; Wegelius, O; Uitto, J.
Human leukocyte collagenase: characterization of enzyme kinetics by a new method
Anal Biochem 1977; 83: 557-569

-
- Uitto, VJ, Raeste, AM.
Activation of latent collagenase of human leukocytes and gingival fluid bacterial plaque
J Dent Res 1978; 57: 844-851
- Uitto, VJ; Elliot, I; Robinson, PJ.
Activation of human gingival collagenase
J Oral Pathol 1984; 13: 412-418
- Uitto, VJ; Suomalainen, K; Sorsa, T.
Salivary collagenase: Origin, characteristics and relationship to periodontal health
J Periodontal Res 1990; 25: 135-142
- Van Strijp, AJP; Klont, B; ten Cate, JM.
Solubilization of dentin matrix collagen in situ
J Dent Res 1992; 71: 1498-1502
- Van Strijp, AJP; van Steenberg, TJM, ten Cate, JM.
Bacterial colonization of mineralized and completely demineralized dentine in situ
Caries Res 1997; 31: 349-355
- Wahl, LM; Wahl, SM; Mergenhagen, SE; Martin, GR.
Collagenase production by endotoxin-activated macrophages
Proc Natl Acad Sci USA 1974; 71: 3598-3601
- Wang, PL; Shirasu, S; Shinohara, M; Daito, M; Fujii, T; Kowashi, Y; Ohura, K.
Purification and characterization of a trypsin-like protease from the culture supernatant of *Actinobacillus actinomycetem comitans* Y4
Eur J Oral Sci 1999; 107: 147-153
- Williams, DH; Fleming, I.
Strukturaufklärung in der organischen Chemie
Thieme, Stuttgart 1991
- Zero,DT.
Etiology of dental erosion- extrinsic factors
Eur J Oral Sci 1996; 104: 162-177
- Zipkin, J; McClure, J.
Salivary citrate and dental erosion
J Dent Res 1949; 28: 613-626

LEBENS LAUF

1977	geboren in Lich, Eltern. Dr. Jürgen Blecher und Gertrud Blecher
1983 – 1987	Grundschule in Linden
1987 – 1989	Förderstufe der Ludwig-Uhland-Schule Gießen
1989 – 1996	Gymnasium der Justus-Liebig-Schule Gießen
1996 – 2002	Studium der Zahnheilkunde an der Philipps-Universität Marburg
10/2002 – 09/2003	zahnärztliche Assistentenstelle in der Praxis Dr. M. Sättler in Gr.-Buseck
seit 11/2003	zahnärztliche Assistentenstelle in der Praxis Dr. J. Liedl in Kehl

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. Klimek für die Überlassung des Themas sowie Frau Dr. C. Ganß für die exzellente Betreuung dieser Arbeit. Weiterhin danke ich Frau Birgit Meier für Ihre Unterstützung im medizinisch-technischen Labor der Zahnklinik und Herrn Prof. Dr. Reissenauer und Frau Gertrud Stammeler aus dem chemischen Institut für die freundliche Bereitstellung des Spektrometers.