

Die Degradation der organischen Dentinmatrix durch Pepsin  
unter erosiven Bedingungen in vitro

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Martin Jens Merz  
aus Bad Soden-Salmünster

Gießen 2010

Aus dem Medizinischen Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
Poliklinik für Zahnerhaltungskunde und Präventive Zahnheilkunde  
Leitung: Prof. Dr. Joachim Klimek  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Caroline Ganß

Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Lotzmann

Tag der Disputation: 14.06.2011

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, 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 Angaben 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.

Martin Jens Merz

# Inhaltsverzeichnis:

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht</b> .....	<b>3</b>
2.1 Struktur und Eigenschaften von erodiertem Dentin.....	3
2.2 Epidemiologie.....	6
2.3 Ätiologie.....	10
2.3.1 Exogene Erosionen.....	10
2.3.2 Endogene Erosionen.....	11
2.4 Therapie.....	13
2.5 Fragestellung.....	16
<b>3. Material, Methoden und Ergebnisse der Vorversuche</b> .....	<b>18</b>
3.1 Herstellung der Proben.....	18
3.2 Herstellung der Lösungen.....	19
3.3 Messmethoden.....	20
3.3.1 <i>Bestimmung des Mineralverlustes mit der longitudinalen Mikroradiographie (LMR)</i> .....	20
3.3.1.1 Filmentwicklung.....	21
3.3.1.2 Auswertung.....	22
3.3.2 <i>Bestimmung des Kollagenverlustes mit der Hydroxyprolinanalyse</i> .....	23
3.3.2.1 Prinzip der Nachweisreaktion.....	23
3.3.2.2 Durchführung der Hydroxyprolinanalyse.....	24
3.3.3 <i>Rasterelektronenmikroskopie</i> .....	26
3.4 Vorversuche.....	26
3.4.1 <i>Erster Vorversuch</i> .....	27
3.4.2 <i>Zweiter Vorversuch</i> .....	28
3.4.3 <i>Dritter Vorversuch</i> .....	29
3.5 Durchführung des Hauptversuchs.....	31
3.6 Statistik.....	33
3.7 Materialien.....	35
3.8 Chemikalien.....	36

<b>4. Ergebnisse</b>	<b>37</b>
4.1 Allgemeines	37
4.2 Vergleich des Mineralverlustes in der Kontrollgruppe mit dem Mineralverlust in der P-HCl-8-Gruppe	38
4.3 Vergleich des Mineralverlustes der einzelnen Pepsingruppen untereinander	39
4.4 Ergebnisse der Hydroxyprolinanalyse	40
4.5 Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung (REM)	41
<b>5. Diskussion</b>	<b>43</b>
5.1 Wahl des Versuchsaufbaus	43
5.2 Wahl der Messverfahren	44
5.2.1 Messung der Mineralverluste	44
5.2.2 Messung des Kollagenverlustes	47
5.3 Probenmaterial	48
5.4 Diskussion der Ergebnisse	49
5.4.1 Hydroxyprolinanalyse	49
5.4.2 Mineralverlust	53
5.5 Ausblick	56
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>57</b>
<b>7. Summary</b>	<b>59</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>61</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>73</b>
<b>Danksagung</b>	<b>74</b>

## 1. Einleitung

Patienten mit Essstörungen in Kombination mit Erbrechen (Bulimie) zeigen häufig säurebedingte Zahnhartsubstanzverluste [Rytomaa et al., 1998]. Diese beschränken sich oft nicht nur auf den Schmelz, sondern erreichen bei mehr als der Hälfte der Bulimiepatienten auch das Dentin [Öhrn et al., 1999].

Durch Kontakt der Magensäure mit dem Zahnschmelz, der zu 95 Gewichtsprozent aus Apatitverbindungen besteht, kommt es zu einem schnellen und ausgeprägten Mineralverlust. Zumindest bei Schmelzläsionen kann für die schnelle Progression sicherlich das hohe erosive Potential der Salzsäure des Mageninhaltes verantwortlich gemacht werden. Der Schmelz kann bei regelmäßigem Kontakt mit dem sauren Mageninhalt im Sinne eines Oberflächenphänomens Schicht für Schicht abgetragen werden, bis das Dentin exponiert wird.

Das Dentin besteht im Vergleich zum Schmelz nur zu 70 Gewichtsprozent aus anorganischen Bestandteilen. 20 Gewichtsprozent des Dentins bestehen aus organischen Verbindungen, hauptsächlich aus Kollagen [Schröder,2000]. Das Herauslösen der mineralischen Anteile durch Säuren bei Erosionsprozessen führt im Dentin zu einer Exposition der organischen Kollagenmatrix. Diese Kollagenmatrix kann allein durch Säuren nicht hydrolysiert oder degradiert werden [Boonstra et al., 1990]. Daher bleiben die organischen Anteile auf der Oberfläche erhalten, während die Demineralisation in tieferen Schichten weiter voranschreitet. Im weiteren Verlauf verhindert die zunehmende Dicke der organischen Deckschicht die Diffusion von Ionen in tiefere Schichten. Erosionen schreiten umso langsamer voran, je dicker die entmineralisierte organische Matrix auf der Oberfläche wird [Ganss et al., 2004b]. Dadurch wird aus dem oberflächenkontrollierten Geschehen im Schmelz, im Dentin ein diffusionskontrollierter Prozess.

Eine demineralisierte Dentinmatrix ist gegenüber biochemischen Einflüssen, wie zum Beispiel proteolytischen Enzymen, nicht mehr geschützt [Klont und ten Cate,1991]. Es konnte gezeigt werden, dass die mineralfreien organischen Strukturen des Dentins durch bakterielle Kollagenase in vitro vollständig entfernt werden [Ganss et al., 2004b]. Nach der Entfernung der Kollagenmatrix entfällt ihre Funktion als Diffusionsbarriere und Dentinerosionen schreiten deutlich schneller

voran [Ganss et al., 2004b]. Für die Progression von Erosionen im Dentin spielt die organische Kollagenmatrix also eine wichtige Rolle.

Diese histologischen und chemischen Unterschiede zwischen Schmelz und Dentin lassen vermuten, dass bei Dentinerosionen, die durch den Kontakt mit Mageninhalt verursacht werden, nicht allein das Erosionspotential der Salzsäure für den Substanzverlust verantwortlich sein kann. Der Mageninhalt enthält proteolytische Enzyme, wie zum Beispiel Pepsin. Es konnte gezeigt werden, dass bei 45% der Patienten mit einer chronischen Refluxerkrankung Pepsin während der Beschwerdephasen in der Mundhöhle nachgewiesen werden kann [Kim et al., 2008]. Es wäre durchaus vorstellbar, dass bei Patienten mit Bulimie während des Erbrechens ebenfalls Pepsin in die Mundhöhle gelangt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Dauerexposition von einer vollständig demineralisierten organischen Dentinmatrix in Pepsin zu einer Degradation des Kollagens führt. Diese Versuchsbedingungen waren jedoch wenig klinisch. Ob eine Degradation in vitro auch unter Bedingungen möglich ist, die sich mehr an klinische Bedingungen anlehnen, ist noch nicht gezeigt worden.

In der vorliegenden in vitro Studie sollte daher untersucht werden, ob Pepsin unter klinisch relevanten Versuchsbedingungen, mit einer zyklischen De- und Remineralisation, die erodierte Dentinmatrix nennenswert degradieren kann und ob diese Degradation einen Einfluss auf die Progression von Dentinerosionen hat.

## 2. Literaturübersicht

Das Wort Erosion leitet sich aus dem lateinischen Wort „erodere“ ab, was so viel wie „abnagen“ bedeutet. Im zahnmedizinischen Sinne gebraucht, beschreibt der Begriff den pathologischen, irreversiblen, oberflächlichen Verlust von Zahnhartsubstanzen durch Säuren und/oder Komplexbildner ohne die Einwirkung von Mikroorganismen [Zipkin und McClure,1949]. Der kritische pH-Wert für Erosionen liegt im Schmelz zwischen 4 und 4,5. Unterhalb dieses Wertes ist mit Verlusten von Zahnhartsubstanzen zu rechnen [Barbour et al., 2003].

### 2.1. Struktur und Eigenschaften von erodiertem Dentin

Bei der makroskopischen Betrachtung erscheinen gesunde Zähne glänzend, glatt und weisen keine Unregelmäßigkeiten auf der Oberfläche auf. Bei einer erosiv bedingten Frühläsion des Schmelzes verliert der Zahn zunächst seinen natürlichen Glanz [Eccles,1979;Grando et al., 1996]. Besteht die Noxe weiterhin treten dellenförmige Vertiefungen der Glattflächen nahe des Gingivalsaumes auf. Diese können je nach Ursache sowohl palatinal als auch vestibulär auftreten [Järvinen et al., 1992], wobei zervikal zumeist eine intakte Schmelzlamelle bestehen bleibt [Lussi und Schaffner,2000]. Das Höcker-Fissurenrelief verliert im weiteren Verlauf von Erosionen immer mehr an Höhe, sodass die Zähne wie abgeschmolzen aussehen können. Die flächenhafte Ausdehnung der Defekte ist in der Regel größer als die zentripetale Ausdehnung. Bei Spätläsionen ist das Dentin bereits mitbeteiligt [Eccles,1979].

Der Schweregrad der Läsionen kann mit Hilfe verschiedener Indizes beschrieben werden. Eine häufig verwendete Nomenklatur ist die von Lussi [Lussi,1996], welche zwischen Erosionen an Glattflächen und Erosionen an Okklusalfächen unterscheidet.

Nach diesem Index werden Erosionen an Glattflächen in vier Schweregrade eingeteilt. Grad 0 entspricht keinen erkennbaren Erosionen, der Verlust von oberflächlichen Strukturen ist jedoch möglich. Grad I beschreibt Erosionen, die auf den Schmelz beschränkt sind. Zervikal der Läsionen finden sich intakte Schmelzbereiche. Bei Läsionen mit Grad II ist bereits Dentin exponiert. Allerdings

nimmt die freigelegte Dentinoberfläche hierbei weniger als die Hälfte der Gesamtoberfläche der Läsion ein. Bei Grad III besteht mehr als die Hälfte der Läsionsfläche aus Dentin.

Bei dem Index für Okklusalflächen ist Grad 0 identisch mit dem Index für Glatflächen. Grad I definiert leichte Erosionen. Diese stellen sich durch gerundete Höcker, seidenglänzenden Schmelz und Füllungsrän­der, die höher sind als der benachbarte Schmelz, dar. Das Dentin ist bei Grad I noch nicht betroffen. Grad II beschreibt ausgeprägte Erosionen und die Exponierung von Dentin [Lussi,1996].

Erosionen entstehen auf sauberen, plaquefreien Oberflächen. Eine Säure kann so direkt auf die Zahnhartsubstanzen einwirken und die mineralischen Apatitverbindungen auflösen.

Bei den Schmelzerosionen handelt es sich dabei um ein reines Oberflächenphänomen [Larsen,1991]. Im Schmelz werden zunächst die Prismenzentren und erst im weiteren Verlauf die interprismatische Substanz herausgelöst. Hierdurch entsteht eine mikroskopische Struktur der Schmelzoberfläche, die dem Ätzmuster bei der Schmelzkonditionierung für die adhäsive Füllungstherapie gleicht [Buonocore,1955]. Die Demineralisation von aprismatischen Schmelzbereichen, wie sie bei Milchzähnen und im zervikalen Bereich bleibender Zähne zu finden sind, ist durch schlechteres Lösungsverhalten geringer und unregelmäßiger als in prismatischen Schmelzbereichen. Im aprismatischen Schmelz können demnach erodierte Bereiche neben vollkommen unversehrten Bereichen liegen [Meurman und Frank,1991].

Bei längerfristiger Einwirkung einer Säure kommt es zu einem vollständigen Verlust der Kristallite, so dass es im Schmelz zu einem langsamen, zentripetalen Substanzverlust mit Verminderung der Oberflächenhärte kommt [Attin et al., 1997].

Im Dentin werden die stärker mineralisierten peritubulären Anteile zuerst erodiert. Hierdurch werden die Dentintubuli im Durchmesser vergrößert. Diese Erweiterung kann bei rascher Progression der Erosionen zu einer Hypersensibilität der betroffenen Zähne führen. Die Beschwerden können jedoch ausbleiben, wenn der Erosionsprozess sehr langsam verläuft. Wenn die Säureexposition des Dentins sehr lange besteht, wird auch das intertubuläre Dentin herausgelöst und es kommt zu einer Freilegung der organischen Anteile [Prati et al., 2003].

Die organische Matrix des Dentins besteht zu 91-92% aus Kollagen. Dabei stellt Kollagen Typ I mit etwa 90% den Hauptteil der Dentinmatrix. In wesentlich geringeren Konzentrationen (etwa 3%) wird auch Kollagen Typ V im Dentin gefunden [Butler, 1998]. Die restlichen organischen Bestandteile (etwa 8%) werden durch nicht kollagene Anteile gebildet [Jones und Leaver, 1974].

Die Kollagenmatrix ist im mineralisierten Dentin gegen chemische und biochemische Einflüsse geschützt. Das Kollagen der Dentinmatrix kann im Gegensatz zu anderen Proteinen nicht alleine durch Säuren herausgelöst oder degradiert werden [Boonstra et al., 1990; Dung et al., 1994; Ganss et al., 2004b]. Die organische Matrix bleibt, zumindest in vitro, bei rein säurebedingten Erosionen auf der Oberfläche erhalten. Bei einem In-vitro-Experiment wurden bovine Dentinproben in Essigsäure mit einem pH-Wert von 4,5 bzw. 5,0 für eine Woche demineralisiert. Obwohl 50% der nicht kollagenen Proteine nach einer Woche aus den Proben gelöst waren, konnte kein Kollagenverlust der Matrix nachgewiesen werden [Boonstra et al., 1990]. In einem anderen Experiment wurden humane Dentinproben nach der Einwirkung von Zitronensäure untersucht. Hierzu wurden zunächst Längsschnitte der Proben angefertigt. Die Schnitte wurden mit der van-Giesson-Färbung, einer kollagenspezifischen Färbemethode, angefärbt. Bei der anschließenden Untersuchung der Präparate unter dem Lichtmikroskop konnte die organische Deckschicht eindeutig und durchgängig auf der Probenoberfläche identifiziert werden [Ganss et al., 2004b].

Die Entstehung dieser organischen Deckschicht hat einen großen Einfluss auf die Progression von Erosionen im Dentin [Hara et al., 2005]. Die Progression von Dentinerosionen ist umso geringer, je dicker die exponierte organische Matrix wird [Ganss et al., 2004b]. Die Matrix stellt eine Art Diffusionsbarriere für  $H^+$ -Ionen in tiefer liegende, mineralisierte Dentinareale dar und verhindert so die weitere Auflösung der Kristallite. Aus einem rein oberflächenkontrolliertem Prozess, wie er im Schmelz auftritt, wird im Dentin durch die Kollagenmatrix ein komplexer, diffusionskontrollierter Prozess.

Durch die Demineralisation des Dentins wird das exponierte Kollagen allerdings mechanischen, chemischen und vor allem biochemischen Prozessen zugänglich [Dung et al., 1994]. In zwei Studien konnte gezeigt werden, dass ein für Kollagen spezifisches Enzym (bakterielle Kollagenase von *Clostridium Hystolyticum*) eine durch Zitronensäure demineralisierte Dentinmatrix vollständig degradieren kann

[Ganss et al., 2004b; Kleter et al., 1994]. In beiden Studien konnte ebenfalls gezeigt werden, dass nach Entfernung der organischen Strukturen säurebedingte Zahnhartsubstanzverluste wesentlich schneller voranschreiten. Die höhere Progredienz wird auf die fehlende Wirkung der Matrix als Diffusionsbarriere zurückgeführt.

Auch das Pepsin als unspezifisches Enzym für Kollagen Typ I ist *in vitro* in der Lage, die vollständig demineralisierten organischen Anteile, zumindest nach sehr langer Einwirkdauer (72 Stunden), zu degradieren [Carmichael et al., 1977]. Andere Autoren beschreiben die Degradierung von nicht helikalem Kollagen im Dentin durch Pepsin auch bei kürzerer Einwirkdauer, aber höherer Temperatur [Tonami und Ericson, 2005a].

Die Potenz von Pepsin zur Spaltung von Kollagen Typ I unter zyklischen De- und Remineralisationsbedingungen in nativem Dentin ist bisher nicht untersucht worden. Ob die Degradation der organischen Matrix durch Pepsin überhaupt einen Einfluss auf die Progression erosiv bedingter Mineralverluste im Dentin hat, ist bislang ebenfalls nicht untersucht worden.

## **2.2. Epidemiologie**

In den letzten Jahren wurden nur wenige Studien zur Prävalenz von Erosionen veröffentlicht. Entweder beschränkten sich diese Veröffentlichungen auf einen Personenkreis beruflich, ernährungsbedingter oder durch Grunderkrankungen gefährdeter Personen oder es sind Fallberichte. Hinzu kommt, dass verschiedene Bewertungsindizes keinen genauen Vergleich der Daten zulassen.

Reine Formen von Erosionen liegen selten vor. Das klinische Bild der Erosionen wird meist durch eine Kombination von chemischen und mechanischen Substanzverlusten, wie Attrition und Abrasion, verursacht [Imfeld, 1996; Nunn, 1996]. Epidemiologische Studien zu Erosionen sollten daher immer mit Vorsicht betrachtet werden.

Der Vergleich der Prävalenzzahlen verschiedener Länder untereinander zeigt deutliche Unterschiede. Es liegen Studien zur Prävalenz von Erosionen aus Deutschland, der Schweiz und Großbritannien vor. Im Folgenden werden nur Daten aus den genannten drei Ländern vorgestellt und verglichen.

In einer Studie zur Prävalenz von Erosionen bei deutschen Kindergartenkindern konnte gezeigt werden, dass 32% der Kinder von Erosionen der Milchzähne betroffen waren. Etwa 13% wiesen sogar eine Erosion mit Dentinbeteiligung an mindestens einem Zahn auf. Die Prävalenz nahm mit zunehmendem Alter der Kinder zu [Wiegand et al., 2006]. Nach einer weiteren deutschen Studie sind bereits 70% der Zehnjährigen an mindestens einem Milchzahn von einer geringgradigen Läsion (Grad I) betroffen. 26% der untersuchten Patienten wiesen mindestens einen Zahn mit einer schweren Läsion (Grad II) auf [Ganss et al., 2001a]. Die Untersuchung an den bleibenden Zähnen Jugendlicher in der gleichen Studie zeigte geringere Prävalenzzahlen als im Milchgebiss. Nur etwa 12% der Untersuchten im Alter zwischen 12 und 17 wiesen eine geringgradige und 0,2% eine schwere Läsion der bleibenden Zähne auf [Ganss et al., 2001a]. In Großbritannien sind die Prävalenzzahlen in dieser Altersgruppe deutlich höher. Etwa 60% der britischen Schulkinder im Alter von 12 bis 14 Jahren zeigten Erosionen der bleibenden Schneidezähne oder der Sechsjahrmolaren [Dugmore und Rock, 2003].

Ähnliche Unterschiede in der Prävalenz von Erosionen zwischen den einzelnen Ländern lassen sich auch bei Erwachsenen und Senioren finden.

Bei der Untersuchung von 1260 deutschen Erwachsenen wiesen etwa 11% Erosionen auf. Hierbei entfielen ca. 6% auf reine Schmelzerosionen und ca. 4% auf Erosionen mit Dentinbeteiligung. Unter 2520 untersuchten Senioren der gleichen Studie sind nur 8% von Erosionen betroffen. Die Gesamtprävalenz verteilt sich bei den Senioren auf 4% für Schmelzerosionen und auf 4% für Erosionen mit Dentinbeteiligung [Schiffner et al., 2002].

Nach einer Schweizer Studie [Lussi et al., 1991] ist ein deutlich höherer Prozentsatz der Bevölkerung von Erosionen betroffen. Für diese Studie wurden die Teilnehmer in zwei Altersgruppen eingeordnet: eine Gruppe mit 26- bis 30-Jährigen und eine mit 46- bis 50-Jährigen. Bei 30% der 26- bis 30-Jährigen und 43% der 46- bis 50-Jährigen wurde mindestens eine okklusale Läsion Grad II diagnostiziert. Vestibuläre Defekte konnten bei beiden Altersklassen in einer Häufigkeit von 8% bis 13% festgestellt werden. Um die Progression der Erosionen zu untersuchen, wurden 55 Teilnehmer derselben Studie nach sechs Jahren erneut untersucht. Allgemein war eine Zunahme der erosiven Substanzverluste

zwischen den einzelnen Untersuchungen zu bemerken. Die Progression war in der Gruppe der 46- bis 50-Jährigen deutlicher als in der Gruppe der 26- bis 30-Jährigen [Lussi und Schaffner,2000]. Für eine andere Schweizer Studie wurden 417 Rekruten der Schweizer Armee im Alter zwischen 19 und 25 Jahren untersucht. Bei den Rekruten waren erosive Defekte auf den Okklusalfächen gehäuft festzustellen. 82% wiesen Erosionen der Kauflächen ohne Beteiligung des Dentins und 30% Erosionen mit Dentinbeteiligung auf. An den bukkalen Flächen der Zähne konnten bei 14% Erosionen ohne und bei 0,5% Erosionen mit Einbeziehung des Dentins beobachtet werden [Jaeggi et al., 1999].

Für eine Studie zur Prävalenz von Erosionen in England wurden 1007 Teilnehmer untersucht. Von den 1007 untersuchten Personen wiesen nur 9 Gebissverhältnisse ganz ohne Erosionen auf. Allerdings werden vom Autor nur 5,1% der gesamten Erosionen dieser Studie als pathologisch eingestuft [Smith und Robb,1996].

In bestimmten Bevölkerungsgruppen ist die Prävalenz von Erosionen besonders hoch. Hierfür ist die ungewöhnlich häufige Exposition der Zähne gegenüber endogenen oder exogenen Säuren verantwortlich. Zu den Patienten mit erhöhtem Risiko gehören im Bezug auf endogen verursachte Erosionen Personen, bei welchen Magensäure in regelmäßigen Abständen in die Mundhöhle gelangt. Dies kommt bei Patienten mit pathologischem Essverhalten, wie Bulimia nervosa und unter Umständen auch Anorexia nervosa, aber auch Patienten mit chronischen Magen-Darm-Erkrankungen wie dem gastro-ösophagealen Reflux vor [Hurst,1977;Järvinen et al., 1988;Rytömaa et al., 1998;Schroeder et al., 1995].

Die Substanzverluste von Schmelz und Dentin sind bei diesen Patienten meist sehr ausgeprägt [Järvinen et al., 1988;Pace et al., 2008;Rytömaa et al., 1998]. In einer Untersuchung zu Ausmaß und Häufigkeit von Erosionen bei Bulimikern wiesen 69% der untersuchten Zähne erosive Defekte auf. Die Ausdehnung und die Tiefe der Defekte waren zudem ausgeprägter als in der Kontrollgruppe [Robb et al., 1995]. Nur bei 7% der untersuchten Zähne einer Kontrollgruppe einer anderen Studie waren erosive Defekte zu finden [Jones und Cleaton-Jones,1989]. Nach einer weiteren Studie sind 44% der an Bulimia nervosa erkrankten Patienten von Erosionen betroffen. Die Ausprägung der Zahnhartsubstanzverluste ist dabei jedoch nicht immer abhängig von der Frequenz des Erbrechens und der Dauer des Bestehens einer Essstörung [Robb et al., 1995]. Allerdings sinkt die Zahl von

beschwerdefreien Patienten im Bezug auf die orale Gesundheit von 42% auf 27%, wenn die Krankheit länger als vier Jahre besteht [Spigset,1991].

In einer Studie, welche die Prävalenz von Erosionen bei an Anorexia nervosa erkrankten Patienten untersuchte, waren bei 20% der Patienten Erosionen zu finden [Scheutzel,1996].

In einer weiteren Studie, bei der nicht zwischen den verschiedenen Formen von Essstörungen unterschieden wurde, sind bei 45 von 81 untersuchten Patienten (56%) Dentinerosionen diagnostiziert worden [Öhrn et al., 1999].

Patienten, die an chronischem Reflux leiden, weisen ebenfalls vermehrt Erosionen auf. Obwohl der Reflux selbst ohne Symptome bleiben kann, finden sich häufiger Erosionen als in einer gesunden Kontrollgruppe [Bartlett et al., 1997;Moazzez et al., 2005]. So zeigen 24% [Meurman et al., 1994] bis 47% [Munoz et al., 2003] der an Reflux erkrankten Personen erosive Zahnhartsubstanzverluste. In der Kontrollgruppe der Studie von Munoz hingegen wurden nur in 12% der Fälle Erosionen diagnostiziert. Die Zahnhartsubstanzverluste unterschieden sich im Vergleich zu den Kontrollgruppen nicht nur in der Prävalenz, sondern auch in der Schwere und Lokalisation der Läsionen [Munoz et al., 2003]. Auch eine Untersuchung von 37 alkoholabhängigen Patienten zeigte im Vergleich mit einer Kontrollgruppe eine höhere Prävalenz für Erosionen. Dies wird auf eine vermehrte Assoziation zwischen Alkoholabhängigkeit und chronischem Reflux oder Erbrechen zurückgeführt [Robb und Smith,1990].

Rohköstler und Vegetarier und Personen, welche beruflich Säuren ausgesetzt sind, stellen Risikogruppen für exogen bedingte Erosionen dar [Ganss et al., 1999;Järvinen et al., 1991;Lussi und Jaeggi,2008].

Im Rahmen einer Studie [Ganss et al., 1999] wurden Erosionen der Zahnhartsubstanzen bei Vegetariern signifikant häufiger festgestellt als in der Kontrollgruppe. 37% der Untersuchten wiesen mindestens einen Zahn mit einer leichten Erosion auf und 60% der Patienten mindestens einen Zahn mit einer schweren Erosion. Nach einer britischen Studie hingegen, bei der das Auftreten von Erosionen bei vegetarisch lebenden Schulkindern untersucht wurde, konnte keine erhöhte Zahl von erkrankten Zähnen im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden [Al-Dlaigan et al., 2001].

## **2.3. Ätiologie**

Erosionen können durch Säuren oder Chelatoren mit einem pH-Wert unterhalb von 4,5 hervorgerufen werden, wenn es sich um eine im Bezug auf Zahnmineralien untersättigte Lösung handelt. Es ist also nicht alleine der pH-Wert entscheidend für das erosive Potential einer Noxe. Vielmehr beeinflussen verschiedene Aspekte der Lösungszusammensetzung den Erosionsprozess. Dazu gehört die Fähigkeit der Lösung, als Chelator zu wirken, der Gehalt einer Lösung an titrierbarer Säure, die Disozitierbarkeit der Säure, die Temperatur der Lösung und der Gehalt an anorganischen Bestandteilen wie Fluorid, Phosphat und Kalzium [Barbour et al., 2003;Barbour et al., 2005;Graehn,1991;Lussi et al., 1993]. Bei den Säuren, die Erosionen in der Mundhöhle verursachen, wird zwischen exogener und endogener Herkunft unterschieden.

### **2.3.1. Exogene Erosionen**

Als exogene Säuren werden solche bezeichnet, die von außen der Mundhöhle zugeführt werden. Dazu zählen Säuren in Lebensmitteln und Getränken, Vitaminzubereitungen und Medikamenten, sowie Säuren die durch berufsbedingten Kontakt in die Mundhöhle gelangen [tenCate und Imfeld,1996;Zero,1996].

Hauptursache exogen bedingter Erosionen ist der Konsum von stark säurehaltigen Nahrungsmitteln. Zu der Gruppe saurer Lebensmittel gehören Getränke wie Fruchtsäfte, Fruchtttees, Erfrischungs- und Sportlergetränke sowie verschiedene Obst- und Essigprodukte [Järvinen et al., 1991;Zero,1996].

Das erosive Potential von Erfrischungsgetränken wurde in vielen Studien untersucht und nachgewiesen [Attin et al., 2005;Grando et al., 1996;Rytömaa et al., 1988]. Zusätzlich zu den Erosionen kommt es durch Konsum von potentiell erosiven Getränken zu einer Erweichung des Zahnschmelzes. Im Laborversuch konnte eine durch saure Getränke reduzierte Mikrohärtigkeit sowohl bei Milch- als auch bei bleibenden Zähnen festgestellt werden [Lussi et al., 2000].

Kohlensäurehaltige Mineralwässer besitzen kaum erosives Potential. Sie weisen im Vergleich zu Orangensaft ein um das Hundertfache niedrigeres erosives Potential auf. Unter anderem wird die komplexe mineralische Zusammensetzung der meisten Mineralwässer für diesen Effekt verantwortlich gemacht. Zudem befinden sich die meisten Mineralwässer während des Konsums durch schnelles Entweichen der Kohlensäure nicht mehr im kritischen pH-Wert-Bereich [Parry,2001].

Saure, kalziumhaltige Nahrungsmittel sind ebenfalls nicht erosiv. Durch den hohen Gehalt an Kalzium entsteht kein Konzentrationsgefälle zwischen Zahnhartgewebe und dem Nahrungsmittel. Die Mineralien der Zahnhartsubstanzen gehen daher nicht in Lösung. Zu den sauren kalziumgesättigten Nahrungsmitteln zählen Fruchtjoghurts [Cagler et al., 2006] und saure Säfte und Erfrischungsgetränke, denen Kalzium zugesetzt wurde [Attin et al., 2005].

### **2.3.2. Endogene Erosionen**

Die einzige endogene Säurequelle ist die Magensäure, die im Wesentlichen aus Salzsäure und Enzymen, vor allem zur Eiweißverdauung, besteht. Salzsäure säuert den Speisebrei an, aktiviert die proteolytischen Enzyme und tötet Mikroorganismen ab [Golenhofen,2000]. Der pH-Wert der Magensäure liegt mit einem pH-Wert zwischen 1 und 3 weit unterhalb des kritischen Bereichs für erosiv bedingte Mineralverluste. Außerdem besitzt die Salzsäure ein hohes erosives Potential. So konnte in vitro gezeigt werden, dass Salzsäure im Vergleich zu einer höher konzentrierten Zitronensäure einen signifikant größeren Substanzverlust im Dentin hervorruft [White et al., 2001].

Die Magensäure kann zum einen bei gastrointestinalen Erkrankungen wie dem gastroösophagealen Reflux oder Dünndarmulzera [Sonnenberg,1999], zum anderen bei Essstörungen wie Bulimia nervosa und Anorexia nervosa in die Mundhöhle gelangen [Robb et al., 1995].

Bei der Refluxkrankheit wird die Magensäure chronisch in den Ösophagus und die Mundhöhle gepresst. Die Magensäure kommt so in Kontakt mit den Zähnen. Der gastroösophageale Reflux kann verschiedene Ursachen haben. Im Allgemeinen

bestehen sie in einer nicht regelgerechten Struktur des Magens oder in Motilitätsstörungen der Ringmuskulatur der Kardia [Armstrong,2005].

Für eine Studie zur Prävalenz des gastro-ösophagealen Reflux wurden 1128 Patienten endoskopisch untersucht. 22% der Untersuchten dieser Studie waren von der Refluxkrankheit betroffen [Voutilainen,2000]. 4-6% der Bevölkerung leiden sogar an täglichem Reflux. Frauen sind eher von milden und Männer eher von schweren Formen der Refluxkrankheit betroffen [Sonnenberg,1999]. Insgesamt ist die Prävalenz der gastroösophagealen Refluxkrankheit ansteigend [El-Serag,2004]. Auch durch wiederholten Missbrauch von Alkoholika kann der ösophageale Rückfluss in Kombination mit regelmäßigem Erbrechen auftreten. [Robb und Smith,1990]. Ob Erosionen der Zähne als Symptom einer Refluxerkrankung auftreten, hängt vom Schweregrad der Erkrankung ab. Erosionen können bei milderer Formen auch komplett ausbleiben [Meurman et al., 1994].

Neben den genannten organischen Erkrankungen können auch psychische Krankheiten, im Speziellen Essstörungen, dazu führen, dass Magensäure regelmäßig aus dem Magen in die Mundhöhle gelangt. Es sind verschiedene Formen von Essstörungen bekannt. Hierbei kann unter anderem zwischen der Anorexie, der Bulimie und atypischen Essstörungen unterschieden werden. Die einzelnen Erkrankungen haben oft gemeinsame Symptome und können von einer Form in eine andere übergehen [Fairburn und Harrison,2003;Nilsson et al., 2007]. Die Ursachen einer Essstörung sind in den soziokulturellen Lebensumständen der betroffenen Patienten zu finden [Nilsson et al., 2007].

Die Anorexie (Anorexia nervosa) geht mit einem durch den Patienten selbst stark reglementierten Essverhalten einher. Von den betroffenen Patienten werden meist Diäten mit hohem Obst und Gemüseanteil eingehalten. Diese Diäten erhöhen das Risiko für Zahnhartsubstanzverluste durch exogene Säuren [Milosevic et al., 1997]. Bei der Bulimia nervosa treten im Unterschied zur Anorexia nervosa unter anderem Essattacken mit anschließendem, selbstinduziertem Erbrechen auf. Hierdurch entsteht ein erhöhtes Risiko für endogene Erosionen. Das Ausmaß der erosiven Substanzverluste wird nicht durch Frequenz und Dauer des Erbrechens bestimmt. Vielmehr scheinen individuelle Faktoren der Patienten großen Einfluss auf die Entwicklung der Erosionen zu nehmen [Robb et al., 1995].

Eine klare Trennung der Anorexie und der Bulimie ist oft nicht möglich. Liegt eine Mischform der beiden Krankheitsbilder vor, so spricht man von einer anorektischen Bulimie oder bulimischen Anorexie [Oehler und Krause,2002]. Bei einer solchen Mischform ist das Erosionsrisiko sowohl durch exogene als auch durch endogene Säurequellen erhöht.

Eine Sonderform der Essstörungen ist die Rumination. Sie beschreibt das wiederholte Aufstoßen und Kauen von saurem Mageninhalt. Der Vorgang des Wiederkäuens wird nach den Mahlzeiten von dem Patienten mehrfach wiederholt. Durch das wiederholte Kauen des sauren Mageninhaltes ist das Risiko für Erosionen ebenfalls erhöht [Scheutzel,1996].

In westlichen Ländern ist die Prävalenz der Essstörungen sehr hoch. Im Wesentlichen erkranken junge Frauen. Nach einer Untersuchung sind ca. 9% der norwegischen Frauen mindestens einmal während ihres Lebens von einer Essstörung betroffen. Von den insgesamt 9% entfielen 1,6% auf Bulimia nervosa und 0,4% auf Anorexia nervosa [Gotestam,1995]. Die Zahl der an einer Essstörung erkrankten Männer liegt weit unter der von Frauen. Etwa 0,4% der jungen Männer im Alter zwischen 14 und 15 leiden an einer gestörten Nahrungsaufnahme [Kjelsas,2004]. Die Prävalenz der Essstörungen steigt seit den fünfziger Jahren latent an. Nach neueren Untersuchungen zeigen bereits 20% der Schüler und Schülerinnen der dritten und vierten Klasse ein auffälliges Essverhalten [Berger et al., 2005].

## **2.4. Therapie**

Das Ziel der Therapie von Erosionen ist, die Progression säurebedingter Zahnhartsubstanzverluste zu verhindern. Eine Therapie sollte nur dann durchgeführt werden, wenn Zahnhartsubstanzverluste eindeutig diagnostiziert und als pathologisch eingestuft wurden. Die Therapie von Erosionen ist primär kausal orientiert. Der erosive Substanzverlust kommt mit der Beseitigung der schädigenden Noxe zum Stillstand.

Zunächst sollte vor Therapiebeginn eine eindeutige Abgrenzung von säurebedingten zu nicht säurebedingten Zahnhartsubstanzdefekten erfolgen. Sind Erosionen eindeutig diagnostiziert worden, sollte zwischen aktiven und inaktiven

Läsionen unterschieden werden. Liegen inaktive Läsionen vor, ist außer einer regelmäßigen Kontrolle keine Therapie notwendig. Auflagerungen oder Verfärbungen im Bereich des Defektes sind ein typisches Zeichen für inaktive Läsionen [Lussi et al., 1992].

Die Progredienz des Substanzverlustes sollte bei der Entscheidung, ob therapiert werden sollte oder nicht, ebenfalls berücksichtigt werden. Die Entwicklung der Erosionen kann mit Hilfe von Studienmodellen über einen bestimmten Zeitraum beobachtet werden. Veränderungen der Defekte können so registriert werden. Die Beobachtung von Studienmodellen ist jedoch relativ ungenau. Es sind speziellere Messmethoden für die Messung von Mineralverlusten vorhanden. Für die klinische Routinearbeit sind diese allerdings zumeist ungeeignet [Schlueter et al., 2005].

Sind die Zahnhartsubstanzverluste als pathologisch und progredient eingestuft worden, gilt es, die Ursachen für die Erosionen herauszufinden. Durch eine genaue Anamnese sollte zunächst abgeklärt werden, ob die Erosionen exogener oder endogener Natur sind. In der Anamnese sollte der Patient nach Allgemeinerkrankungen, Essstörungen, der Einnahme von Medikamenten, besonderen Diäten und nach besonderen Lebensumständen gefragt werden. Wird vom Patienten das Vorliegen einer Essstörung oder einer Allgemeinerkrankung angegeben, sollte in jedem Fall die Zusammenarbeit mit entsprechenden Fachärzten angestrebt werden [Burkhart,2005;Christensen,2002].

Erosionen exogenen Ursprungs können oft relativ schnell anhand eines Ernährungsprotokolls diagnostiziert werden. In diesem Protokoll sollten alle Nahrungsmittel und Informationen über Frequenz und Menge der Nahrungsaufnahme des Patienten aufgeführt werden. Das Ernährungsprotokoll sollte über einen Zeitraum von fünf bis sieben Tagen geführt werden und ein Wochenende mit einschließen. So können zumeist alle erosiven oder potentiell erosiven Nahrungsmittel vom Behandler registriert werden. Im Anschluss kann der Behandler den Patienten über die erosiven Nahrungsmittel aufklären und eventuell Alternativen zur bisherigen Ernährung anbieten. Saure Nahrungsmittel und Getränke sollten nicht übermäßig genossen werden und im günstigsten Fall zusammen mit Milchprodukten konsumiert werden [Lussi et al., 2004].

Bei Erosionen durch endogene Säuren ist es nicht immer sofort möglich, die kausalen Ursachen der Zahnhartsubstanzverluste abzustellen. In dieser Situation

ist eine symptomatische Therapie angezeigt. Das Ziel der symptomatischen Therapie ist es, die am Zahn stattfindenden Demineralisationsprozesse zu reduzieren. Es konnte sowohl in vitro als auch in situ ein schützender Effekt von Fluoriden gegenüber Erosionen nachgewiesen werden. In einer In-vitro-Studie konnte der erosive Mineralverlust durch die tägliche Fluoridierung mit Zahnpasta, fluoridhaltiger Mundspüllösung sowie zweimal wöchentlich mit einem fluoridhaltigen Gel (Intensivfluoridierung) signifikant verringert werden [Ganss et al., 2001b]. Der schützende Effekt der Fluoride war im Dentin ausgeprägter als im Schmelz [Ganss et al., 2001b]. Im Schmelz konnte eine Reduktion des Substanzverlustes um etwa 21% und im Dentin sogar um etwa 66% erreicht werden. Die Effektivität der Intensivfluoridierung in situ übersteigt im Schmelz sogar die Effektivität in vitro. Im Dentin konnte in situ eine Reduktion der erosiven Substanzverluste um etwa 59% und im Schmelz um etwa 87% nachgewiesen werden [Ganss et al., 2004a].

Die Effektivität von herkömmlichen Fluoriden, wie Natrium- oder Aminfluorid, wird der Bildung von kalziumfluorid-ähnlichen Präzipitaten auf der Zahnoberfläche zugeschrieben. Nur saure Fluoridpräparate sind in der Lage, diese Präzipitate zu bilden. Die Dicke der aufgelagerten Niederschläge steigt mit abnehmenden pH-Wert, zunehmendem Fluoridgehalt und verlängerter Einwirkdauer des Präparates [Saxegaard und Rølla, 1988]. Doch ist diese kalziumfluorid-ähnliche Deckschicht relativ leicht säurelöslich, sodass diese herkömmlichen Fluoride regelmäßig in hohen Konzentrationen und mit langer Einwirkdauer appliziert werden müssen. Das ist sehr zeit- und kostenintensiv. Neuere Studien haben gezeigt, dass andere Fluoridverbindungen, die polyvalente Metallkationen enthalten, andere, sehr säureresistente Präzipitate auf der Zahnoberfläche bilden [Hooper et al., 2007; Hove et al., 2007; Schlueter et al., 2007]. In diesem Zusammenhang haben sich saure, zinnhaltige Fluoridlösungen als besonders effektiv erwiesen, da diese auch unter sehr erosiven Bedingungen und nach kurzer Applikationsdauer sowohl in vitro als auch in situ einen säurebedingten Zahnhartsubstanzverlust wirksam reduzieren können [Schlueter et al., 2009]. Trotz des niedrigen pH-Werts sind fluoridhaltige Mundhygienemittel aber nicht erosiv [Lussi und Jaeggi, 2001].

Wie bereits beschrieben resultiert aus dem Einwirken einer Säure auf die Zahnhartsubstanzen ein oberflächlicher Mineralverlust mit einer Verminderung der

Oberflächenhärte. Durch die Reduzierung der Oberflächenhärte wird die Zahnschmelze anfälliger für mechanisch bedingte Substanzverluste, wie sie im Rahmen von Mundhygienemaßnahmen auftreten. Allgemein wird empfohlen, das Zähneputzen nach der Exposition mit einer endogenen oder exogenen Säure um eine halbe bis zwei Stunden zu verschieben. In verschiedenen Studien wurde jedoch gezeigt, dass dieses Vorgehen eine zusätzliche Abrasion durch das Zähneputzen nur geringfügig reduzieren kann [Attin et al., 2001; Jaeggi und Lussi, 1999]. Ein Verschieben des Zahnputzzeitpunktes ist zudem oftmals nur schwer in den Alltag zu integrieren. Es hat sich aber gezeigt, dass durch die Anwendung fluoridhaltiger Präparate neben einem rein säurebedingten Zahnhartsubstanzverlust ebenfalls ein zusätzlicher abrasiv bedingter Substanzverlust wirksam reduziert werden lässt [Ganss et al., 2007a; Lussi und Hellwig, 2006]. Die regelmäßige Anwendung von fluoridhaltigen Präparaten, wie etwa eine Mundspüllösung, erscheinen daher sinnvoller, um Abrasionen zu vermeiden, als den Zeitpunkt des Zähneputzens nach einer Säureattacke zu verschieben.

## **2.5. Fragestellung**

Es ist bekannt, dass Patienten mit Essstörungen in Kombination mit Erbrechen oder Refluxerkrankungen oft unter ganz erheblich ausgeprägten, sehr schnell voranschreitenden Zahnhartsubstanzverlusten leiden [Öhrn et al., 1999; Rytomaa et al., 1998; Spigset, 1991]. Die schnelle Progredienz lässt sich bei Schmelzerosionen im Gegensatz zu Dentinerosionen allein durch das hohe erosive Potential der Magensäure erklären.

Im Dentin kommt es, wie bereits beschrieben, im Verlauf von Erosionen zu einer Exponierung der organischen Strukturen [Ganss et al., 2004b]. Die organische Matrix ist zunächst nicht säurelöslich [Boonstra et al., 1990] und wirkt als Diffusionsbarriere für einwirkende Säuren. Die Entfernung der Matrix mit für Kollagen spezifischen proteolytischen Enzymen führt zu einer schnelleren Progression von Dentinerosionen [Ganss et al., 2004b].

Auch die Magensäure enthält proteolytische Enzyme. Der wichtigste Vertreter ist hier das Pepsin [Golenhofen, 2000]. Bei chronischen Refluxerkrankungen gelangt

dieses Enzym regelmäßig in die Mundhöhle [Kim et al., 2008]. Dies könnte bei häufigem Erbrechen ebenfalls der Fall sein. Das Pepsin käme so bei Patienten, bei denen eine Essstörung mit regelmäßigem Erbrechen assoziiert ist, mit der organischen Matrix des Dentins in Kontakt.

Pepsin weist eine allgemeine proteolytische Aktivität auf. Es ist kein spezifisches Enzym für Kollagen [Golenhofen,2000]. Prinzipiell kann Kollagen aus verschiedenen Geweben, wie Sehnen und Bandscheiben, durch Pepsin aufgelöst werden [Osebold und Pedrini,1976;Tsuzaki et al., 1993]. Auch im Dentin konnte eine vollständig demineralisierte organische Matrix durch Pepsin degradiert werden [Tonami und Ericson,2005a].

Es ist jedoch noch nicht untersucht worden, ob auch eine organische Matrix, die unter simulierten klinischen Bedingungen (zyklische De- und Remineralisierung) in vitro exponiert worden ist, durch Pepsin abgebaut werden kann. Es könnte durchaus sein, dass eine Degradation der Matrix durch Pepsin unter erosiven Bedingungen einen erhöhten Mineralverlust im Dentin verursacht.

Ziel der vorliegenden Studie war es daher zu untersuchen, ob Pepsin in vitro im zyklisch de- und remineralisierten Dentin die organische Matrix degradieren kann. Außerdem sollte untersucht werden, ob eine derartige Degradation einen Einfluss auf die Progredienz von Dentinerosionen im Vergleich zu einer nicht mit Enzymen behandelten Kontrollgruppe hat.

### **3. Material, Methoden und Ergebnisse der Vorversuche**

#### **3.1. Herstellung der Proben**

Für die Durchführung des Versuchs wurden Dentinproben mit einer Dicke von 750 µm und einer Oberfläche von 10,6 mm<sup>2</sup> aus kariesfreien dritten Molaren gewonnen. Zum Zeitpunkt der chirurgischen Entfernung waren die verwendeten Zähne noch nicht in die Mundhöhle durchgebrochen. Die Zähne wurden gereinigt und bis zur Herstellung der Proben in einer gesättigten Thymollösung (Chem. 1) aufbewahrt.

Zur Probenherstellung wurde zunächst die Krone vom Wurzelanteil mit einer Diamantbandsäge (Mat. 1) getrennt. Im nächsten Schritt wurden aus den Zahnkronen Serienschnitte hergestellt. Die Schnitte bestanden nur aus koronalem Dentin und dem okklusalen Schmelzmantel. Pro Zahn wurden vier bis sechs Schnitte hergestellt.

Anschließend wurden die Proben mit einem Mikroschleifsystem (Mat. 2) und mit Schleifpapier (Körnung P800/P1200; Mat. 3) geschliffen und poliert. Zunächst wurde eine Seite der Proben plan geschliffen. Anschließend wurden die Schnitte planparallel auf eine Dicke von 750±20 µm reduziert. Die Dicke der Proben wurde mit einer Mikrometerschraube (Mat. 4) überprüft. Im letzten Schritt wurden aus den Dentinschnitten mit einem Trepanbohrer (Mat. 5) mit einem definierten Außendurchmesser von 5 mm die endgültigen Proben ausgestanzt. Die so hergestellten Proben besaßen alle eine Versuchsoberfläche von 10,6 mm<sup>2</sup>. Alle Proben wurden vor dem Versuch unter dem Mikroskop (Mat. 6) mit 10facher Vergrößerung auf eventuell verbliebene Kunststoffreste, Schmelzreste und Defekte untersucht.

Die Proben wurden mit einem lichthärtenden Kunststoff (Mat. 7) auf Trägern für die mikroradiographische Untersuchung (LMR-Träger) befestigt (Mat. 8) und nummeriert. Der Kunststoff wurde so an die Proben angeschwemmt, dass alle Flächen bis auf die Versuchsoberflächen bedeckt wurden.

Die Versuchsoberfläche wurde unter dem Mikroskop erneut auf Verunreinigungen durch den Kunststoff untersucht. Insgesamt wurden 150 Proben hergestellt und bis zur Durchführung der Testreihen in einer feuchten Kammer im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.2. Herstellung der Lösungen

Im Folgenden wird die Herstellung der für den Versuch benötigten Lösungen beschrieben. Die pH-Werte aller Lösungen wurden mit einer ionenselektiven pH-Elektrode überprüft (Mat. 9). Zur Einwaage der einzelnen Chemikalien diente eine Feinanalysewaage (Mat. 10).

#### 1. Remineralisationslösung [Gerrard und Winter, 1986]

Für die Remineralisationslösung wurden 0,4 g Orthophosphorsäure (Chem. 2) in 40 ml destilliertem Wasser gelöst. Weiterhin wurden 1,5 g Kaliumchlorid (Chem. 3), 1 g Natriumhydrogenkarbonat (Chem. 4) und 0,22 g Kalziumchlorid (Chem. 5) in je 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Diese Lösungen wurden vermischt und mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt.

#### 2. HCl-Lösung

Für die Salzsäurelösung wurden 0,5 g Natriumchlorid (Chem. 6) in 99,5 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 20%iger Salzsäure (Chem. 7) auf einen pH-Wert von 1,6 eingestellt.

#### 3. Pepsin-HCl-Lösung [Okada et al., 1992]

Für die Pepsinlösung wurden zunächst eine Stammlösung hergestellt. Dazu wurden 75 mg Pepsin (Chem. 8) in 10 ml der Salzsäurelösung gelöst (Konzentration 7,5 mg/ml), die bis zur weiteren Verwendung Portionsweise eingefroren wurde. Für die Verbrauchslösung wurden je 1 ml mit 9 ml der Salzsäurelösung verdünnt, sodass eine Endkonzentration von 750 µg/ml entstand.

#### 4. Zitrat-Azetat-Puffer

Zur Herstellung des Zitrat-Azetat-Puffers wurden 50 g Zitronensäure (Chem. 9) mit 12 ml Eisessig (Chem. 10), 120 g Natriumacetat (Chem. 11), sowie 34 g Natriumhydroxid (Chem. 12) vermischt und mit destilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Es resultierte ein Puffer mit einem pH-Wert von 6.

## 5. Dimethylaminobenzaldehydlösung

Zehn Gramm des p-Dimethylaminobenzaldehyd (Chem. 13) wurden in 50 ml Methylcellosolve (Chem. 14) gelöst und bis zur weiteren Verwendung in lichtundurchlässigen Flaschen unter dem Abzug aufbewahrt.

## 6. Chloramin-T-Reagens

Das Chloramin-T-Reagens wurde vor jeder Analyse frisch angesetzt. Dazu wurden 1,41 g Chloramin T (Chem. 15) in 20 ml destilliertem Wasser gelöst. Zu dieser Lösung wurden 30 ml Methylcellosolve (Chem. 14) und 50 ml Zitrat/Acetat-Puffer (pH 6) hinzugegeben.

### 3.3. Messmethoden

#### 3.3.1. Bestimmung des Mineralverlustes mit der longitudinalen Mikroradiographie (LMR)

Die Bestimmung des Mineralgehaltes der Dentinproben erfolgte mit der longitudinalen Mikroradiographie (LMR). Das Prinzip der Messung beruht auf der Anfertigung von Röntgenbildern von Zahnproben auf einem Spezialfilm. Die Bestimmung des Mineralgehaltes der Proben erfolgt durch Auswertung der Filmschwärzung durch ein Densitometer.

Das Mikroradiographiegerät besteht aus einem Röntgenerators mit einer vertikalen Röhrenanordnung (Cu-Röntgenröhre) und einer Fotokamera ohne Objektiv. In dem Kameragehäuse befindet sich im Strahlengang eine Aluminiumkalibriertreppe, die für die spätere Auswertung der Filme notwendig ist. Neben der Kalibriertreppe befindet sich während der Aufnahme die Probe. Auf jeder angefertigten Röntgenaufnahme sind so die Abbildungen der Proben und die der Aluminiumkalibriertreppe zu sehen.

Die reproduzierbare Positionierung der Probe erfolgt mit einem Präzisionsgeschiebe. In diesen Probenhalter können die LMR-Träger in eine entsprechende Aussparung fugenlos eingesetzt werden. Dieses Geschiebe erlaubt neben der präzisen Positionierung der Probe ein Einbringen der LMR-

Träger ohne Lichteinfall, sodass mehrere Proben auf einen Film projiziert werden können.

Für die Aufnahmen wurde ein hochauflösender Holographiefilm (Mat. 11) verwendet, der bei absoluter Dunkelheit in die Kamera eingelegt wurde. Durch den Gesamtaufbau war der Abstand zwischen Film und Probe minimal, sodass eine maximale Projektionsschärfe erzielt werden konnte.

Für die Aufnahmen wurde eine Spannung von 20 kV und eine Stromstärke von 50 mA verwendet. Die Dauer der Filmbelichtung betrug 2,5 Minuten pro Probe. Dies führt bei Aufnahmen von 400 µm dicken Schmelzproben zu einer optimalen optischen Diskrimination der Bilder [de Josselin de Jong et al., 1987]. In der vorliegenden Studie wurden allerdings Dentinproben verwendet. Das Dentin besitzt einen geringeren Mineralgehalt als der Schmelz. Daher wurden 750 µm dicke Dentinschnitte verwendet um diesen Unterschied auszugleichen und um einen mit Schmelz vergleichbaren Gesamtmineralgehalt je Probe zu Beginn des Versuches zu erhalten.

Vor dem Einsetzen der Präparate in das Kameragehäuse wurden die Proben vorsichtig getrocknet, um Qualitätsverluste der Aufnahmen durch verbliebene Flüssigkeitsreste zu vermeiden.

Vor Beginn des Versuchs wurde der Mineralgehalt jeder Probe einzeln bestimmt (Baselineaufnahmen). Anhand dessen konnte zu jedem Untersuchungszeitpunkt ein Mineralverlust oder -gewinn aus der Differenz der Aufnahmen errechnet werden.

### **3.3.1.1. Filmentwicklung**

Die Entwicklung der Filme erfolgte standardisiert nach Herstellerangaben. Dazu wurde der belichtete Film in einer Dunkelkammer aus der Filmhülse entfernt, auf eine Spule aufgewickelt und in eine lichtdichte Box eingebracht. In dieser Lichtschutzbox befand sich die Entwicklungsflüssigkeit (Mat. 12).

Der Film wurde unter ständiger Bewegung bei 21°C für 5 Minuten im Entwicklungsbad belassen und anschließend für 5 Minuten gewässert. Nach der Wässerung wurde die Filmemulsion für 5 Minuten fixiert (Mat. 13), erneut für 5 Minuten gewässert und mit Ethanol (Chem. 16) gereinigt. Nach der Entwicklung

wurde der Film abermals sorgfältig unter fließendem Wasser für 20 Minuten gespült, mit einem Netzmittel (Mat. 14) behandelt und für 30 Minuten getrocknet.

### 3.3.1.2. Auswertung

Der entwickelte Film wurde mit einem Inspektor-Mikroradiographiesystem ausgewertet (Mat. 15). Dieses besteht aus einem Mikroskop mit angeschlossenen Densitometer und einem Computer zur Verarbeitung der gemessenen Werte der einzelnen Proben.

Durch zweidimensionales Scannen der Negative wird densitometrisch die Schwärzung des Filmes bestimmt. Bei allen Aufnahmen werden durch zwei Bohrungen im Probenhalter zwei eindeutige Referenzpunkte auf das Negativ projiziert. Anhand dieser Referenzpunkte wird auf der Ausgangsaufnahme (Baseline) der Bereich der Probe definiert, der ausgewertet werden soll. Durch Speicherung der Referenz- und Messpunkte kann bei allen späteren Messungen der gleiche Bereich einer Probe ausgewertet werden. Zunächst wird das definierte Areal im Bereich der Versuchsfläche, anschließend die Projektion der Kalibriertreppe gescannt. Beim Scannen wird der festgelegte Messbereich vom Computer in ein aus Punkten bestehendes Raster eingeteilt. Alle Punkte dieses Rasters werden einzeln durch einen Vergleich mit der Kalibriertreppe auf ihren Schwärzungsgrad, also ihre optische Dichte geprüft. Die Kalibriertreppe besteht aus 100 Einzelarealen unterschiedlicher Dichte bzw. Schwärzung. Jedem Einzelareal ist ein Mineralgehalt zugeordnet [de Josselin de Jong et al., 1987]. Durch diesen Vergleich kann nun der Mineralgehalt, bezogen auf reines Hydroxylapatit, bestimmt werden. Der so bestimmte Mineralgehalt wird vom System in eine Schichtdicke, gemessen in Mikrometer, umgerechnet. Bei allen Folgemessungen kann durch Subtraktion der gemessenen Werte von den Ausgangswerten ein Mineralverlust oder -gewinn bestimmt werden.

Im vorliegenden Versuch wurde die Größe des untersuchten Bereichs auf 1 mm<sup>2</sup> festgelegt. Da Dentinproben untersucht wurden, die einen Mineralgehalt von nur etwa 50 Volumenprozent besitzen, war eine Umrechnung der Werte für die Probendicke von Mikrometer Hydroxylapatit auf Mikrometer Dentin notwendig. Der Umrechnungsfaktor war 2.

### 3.3.2. Bestimmung des Kollagenverlustes mit der Hydroxyprolinanalyse

#### 3.3.2.1 Prinzip der Nachweisreaktion

Die organische Matrix des menschlichen Dentins besteht zu 91-92% aus Kollagen. Den weitaus größten Anteil stellt das Kollagen Typ I. In der Aminosäuresequenz von Kollagen Typ I ist die Aminosäure Hydroxyprolin im Gegensatz zu anderen Proteinen relativ häufig zu finden. Der färberische Nachweis von Hydroxyprolin gilt deshalb als spezifischer Nachweis für Kollagen Typ I [Stegemann und Stalder,1967].

Durch eine saure Hydrolyse ist es möglich, die Struktur von Kollagen in seine einzelnen Aminosäuren zu zerlegen. Über eine spezielle Färbereaktion und eine anschließende photometrische Extinktionsmessung lässt sich die Hydroxyprolinkonzentration in der Lösung quantitativ bestimmen.

Über die Konzentration kann anschließend die abgebaute Kollagenmenge errechnet werden [Stegemann und Stalder,1967;Woessner,1961].

Die Färbereaktion erfolgt in mehreren Stufen. Zunächst müssen die in der Probenlösung vorhandenen Peptidbindungen des Kollagens hydrolytisch gespalten werden. Für die Färbereaktion wird Hydroxyprolin zunächst zu einem Pyrolderivat oxidiert. Das Pyrolderivat reagiert mit einem weiteren Agens (p-Dimethylaminobenzaldehyd) zu einem roten Chromophor (Abb.1) [Woessner,1961]. Der Farbstoff wird anschließend in einer Extinktionsmessung quantitativ bestimmt.

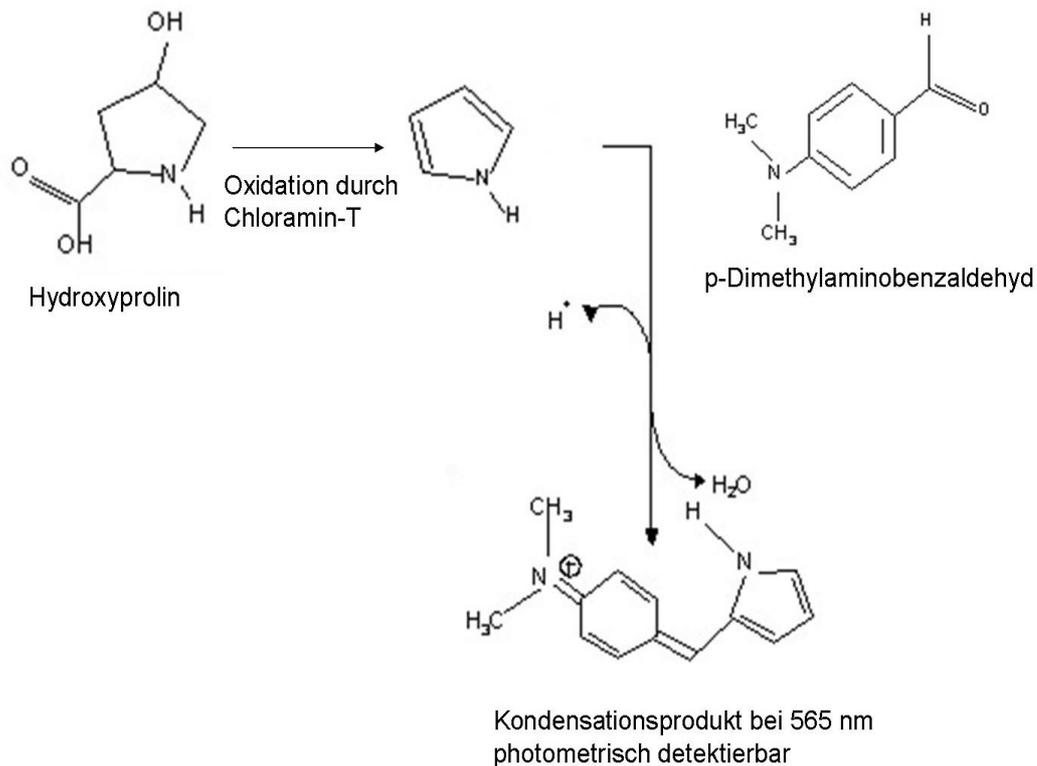


Abb.1: Schematische Darstellung der chemischen Reaktion, die zur Entstehung des Kondensationsproduktes führt, das zum photometrischen Nachweis von Hydroxyprolin dient.

### 3.3.2.2 Durchführung der Hydroxyprolinanalyse

Für die saure Hydrolyse wurden zu 1 ml der zu untersuchenden Lösung 0,5 ml einer 6 molaren Salzsäurelösung zugegeben. Anschließend erfolgte die Hydrolyse bei 105°C in luftdicht verschließbaren Szintillationsgefäßen über eine Dauer von 24 Stunden. Nach dem Abkühlen wurden 0,1 ml des Hydrolysats mit 0,4 ml des Zitrat-Azetat-Puffers auf einen pH-Wert von 5,5 angehoben.

Nun wurden 0,5 ml Chloramin-T Reagenz zugesetzt. Der Ansatz wurde, nachdem er geschüttelt wurde, bei 22°C für 20 Minuten ruhen gelassen. Nach Zugabe von Chloramin-T wurde Hydroxyprolin über Pyrolinecarboxylsäure und Pyrrol-2-Carbonsäure zu einem Pyrrolderivat oxidiert.

Im nächsten Schritt wurden 0,5 ml einer 6,2 molaren Perchlorsäure (Chem. 17) zugegeben. Die Probe wurde erneut geschüttelt und für 12 Minuten bei 22°C ruhen gelassen. Die Zugabe von Perchlorsäure beendet die Oxidation durch

Chloramin-T. Als letztes Agens wurden 0,5 ml p-Dimethylaminobenzaldehyd hinzugegeben und bei 60°C für 20 Minuten inkubiert. Nach diesem Schritt ergab sich die von Hydroxyprolin konzentrationsabhängige Rotfärbung der Lösung.

Der entstandene Chromophor ist nur für den Zeitraum von einer Stunde stabil. Die Messung des Hydroxyprolingehaltes musste daher innerhalb einer Stunde nach Zugabe des letzten Reagenz erfolgen. Das für das Färbeverfahren notwendige Inkubieren der Proben bei verschiedenen Temperaturen wurde in einem exakt heizbaren Wärmeofen durchgeführt. Die Temperatur der Lösungen wurde vor jeder Färbung überprüft.

Für die Bestimmung der Hydroxyprolinkonzentration wurden 1 ml der Lösungen mit einer Pipette in Messküvetten für photometrische Messungen (Mat. 16) gefüllt. Die Messung der Extinktionswerte erfolgte halbautomatisch mit einem Photometer (Mat. 17) bei einer Wellenlänge von 565 nm.\*

Vor der Extinktionsmessung wurde das Photometer kalibriert. Dazu wurde eine Kalibriergerade angefertigt und im System gespeichert. Die Berechnung der Hydroxyprolinkonzentrationen erfolgte automatisch durch die Messeinheit durch Vergleich mit der Kalibriergeraden. Für die Anfertigung der Kalibriergeraden wurde aus reinem Hydroxyprolin (Chem. 18) eine Verdünnungsreihe hergestellt und nach dem beschriebenen Schema angefärbt. Bei den Hauptversuchen dienten folgende Verdünnungen als Referenzkonzentrationen: 0 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml, 2000 ng/ml, 3000 ng/ml. Die Steigungen der Kalibriergeraden wurden vom Computer durch Extrapolieren der Extinktionswerte errechnet und in ng/ml angegeben.

Jeder Messzyklus umfasste die Bestimmung der Hydroxyprolinkonzentration in einem Standard, in einer Mischung aller Reagenzien ohne Hydroxyprolin (Leerwert) und in den Proben des Versuchs in Dreifachmessung.

---

\* An dieser Stelle gilt ein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Ulrich Müller und Frau Winter aus dem Institut für Humangenetik für die freundliche Bereitstellung und Unterstützung bei der Benutzung des Photometers.

### 3.3.3. Rasterelektronenmikroskopie

Für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung wurden zusätzlich Proben hergestellt. Dazu wurden 2 Proben mit der HCl-Lösung, sowie 2 Proben mit der Pepsin-HCl-Lösung über eine Gesamtdauer von 150 Minuten behandelt. Für die Aufnahmen wurden die Proben in der Mitte gebrochen. Die geteilten Proben wurden kritisch punktgetrocknet (Mat. 18), so auf Probenteller für rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen aufgeklebt, dass die Bruchfläche senkrecht betrachtet werden konnte, und anschließend mit Gold bedampft. Anschließend wurden die Bruchpräparate mit einem Elektronenmikroskop, ausgestattet mit einer LaB6-Elektrode, betrachtet (Mat. 19). Die Beschleunigungsspannung betrug 5kV. Die Bilder wurden mit Hilfe eines Sekundärelektronendetektors (SE-Detektor) aufgenommen. Zur Verbesserung des Signals und des topographischen Kontrastes wurde das Detektorgitter mit einer Spannung von +300 V betrieben. Die Einstellungen des Rasterelektronenmikroskopes (REM), einschließlich Neigungswinkel, Punktgröße, Scan-Modus usw., waren für beide Versuchsgruppen gleich. Die REM-Aufnahmen wurden mit einer 500-, 2000- und 8000-fachen Originalvergrößerung angefertigt.

### 3.4. Vorversuche

Im ersten Vorversuch sollte zunächst festgestellt werden, ob und in welcher Menge Kollagen durch die Pepsin-HCl-Lösung aus den Dentinproben gelöst und durch photometrische Hydroxyprolinanalyse quantitativ nachgewiesen werden kann. In einem zweiten Vorversuch wurde der zeitliche Rahmen für den geplanten Demineralisationszyklus festgelegt. Weiterhin sollte festgestellt werden, ob sich der Mineralverlust von Proben nach einer Behandlung mit der HCl-Lösung vom Mineralverlust nach Behandlung der Proben mit Pepsin-HCl-Lösung unterscheidet. Zusätzlich sollte in den Vorversuchen die Größenordnung des Kollagenverlustes bestimmt werden, um die Verdünnungsreihe für die Kalibriergerade der photometrischen Messungen dem entsprechenden Messbereich anzupassen. Zu dieser Frage existiert weder Literatur, noch sind experimentelle Erfahrungen vorhanden. Daher waren mehrere Vorversuche notwendig.

### 3.4.1. Erster Vorversuch

Im ersten Vorversuch sollte untersucht werden, ob eine Pepsinkonzentration von 750 µg/ml zu einem photometrisch nachweisbaren Abbau von Kollagen aus der Dentinmatrix führt.

Es wurden drei Proben (Probe 1-3) untersucht. Um die Kollagenmatrix des Dentins in ausreichendem Maße zu exponieren, wurden die Proben mit einer 0,05 molaren Zitronensäure mit einem pH-Wert von 2,3 für 5 Stunden bei 37°C Grad im Schüttelbad (Mat. 21) demineralisiert.

Die Proben wurden nach der Demineralisation jeweils in ein separates Versuchsgefäß mit jeweils 1 ml Pepsin-HCl-Lösung gegeben. In dieser Lösung wurden die Proben unter leichtem Schütteln bei 37°C im Temperierbad für eine Stunde inkubiert. Zur Quantifizierung der durch das Pepsin abgebauten Menge an Kollagen wurde eine Hydroxyprolinanalyse durchgeführt. Als Negativkontrolle diente eine Probe, die für drei Stunden in der HCl-Lösung ohne Pepsin mit einem pH-Wert von 1,6 bei 37°C und leichtem Schütteln inkubiert wurde.

Nach der Behandlung der Proben mit Zitronensäure war optisch eine leicht gelbliche Verfärbung der Versuchsoberfläche zu erkennen. Die Oberfläche des Dentins war bei Sondierung mit einer zahnärztlichen Sonde leicht eindrückbar. Zwischen dem Kunststoffmantel und der Probe hatte sich eine sichtbare Stufe gebildet. In allen Hydrolysaten der mit der Pepsin-HCl-Lösung behandelten Proben konnte Hydroxyprolin nachgewiesen werden (Abb. 2). Nach der Behandlung mit der HCl-Lösung ohne Pepsin hingegen konnte in dem Hydrolysat kein Hydroxyprolin nachgewiesen werden.

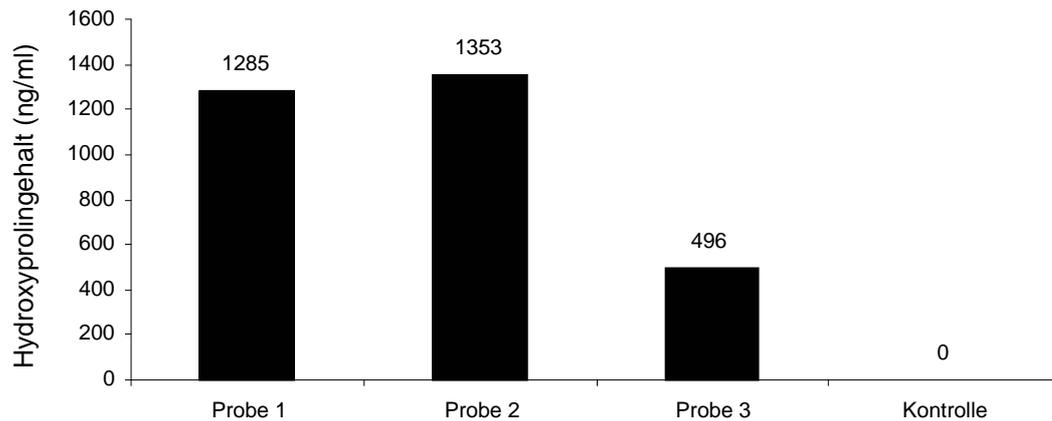


Abb.2: Hydroxyprolinegehalt der Probenhydrolysate des ersten Vorversuchs

### 3.4.2. Zweiter Vorversuch

In einem zweiten Vorversuch wurde der zeitliche Rahmen ermittelt, der notwendig ist, um einen für das Messverfahren ausreichenden Mineralverlust im Dentin durch zyklische Demineralisation mit der HCl-Lösung (pH 1,6) zu provozieren. Es wurden 10 Proben untersucht. Die Darstellung des Mineralgehaltes erfolgte mit der longitudinalen Mikroradiographie.

Die Proben wurden jeweils täglich für  $6 \times 10$  Minuten in der HCl-Lösung erodiert. Zwischen den Demineralisationszyklen wurden die Proben für eine Stunde in einer Remineralisationslösung aufbewahrt. Bei jedem Wechsel der Proben in die nächste Lösung wurden die Dentinschnitte mit Wasser gespült.

Ein gleichzeitiges Umsetzen der Proben in die jeweilige Lösung konnte durch Fixierung auf einem Plastiksieb erreicht werden. Das Auswechseln der Lösungen erfolgte täglich. Alle Proben waren während des Versuchs gleichmäßig von den Lösungen bedeckt. Die Inkubation in allen Lösungen erfolgte bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und unter leichtem Schütteln in einem Wasserbad.

Bereits nach 60 Minuten Inkubationszeit in der HCl-Lösung konnte eine Stufe zwischen Befestigungskunststoff und der Dentinprobe festgestellt werden. Die Oberflächen der Proben waren eindrückbar und gelblich verfärbt. Diese Beobachtung ähnelte den Beobachtungen aus dem ersten Vorversuch. Eine Verstärkung dieses Phänomens konnte in den darauf folgenden Versuchszyklen

beobachtet werden. Eine mikroradiographische Untersuchung erfolgte nach 120 Minuten sowie nach 150 Minuten Inkubationszeit in der Salzsäure.

Die Auswertung der LMR-Aufnahmen nach 120 Minuten ergab im Mittel einen Mineralverlust von  $51,0 \pm 18,0 \mu\text{m}$ , nach 150 Minuten Expositionszeit einen Mittelwert von insgesamt  $45,0 \pm 33,1 \mu\text{m}$  (Abb. 3). Dieser Vorversuch zeigte, dass eine Behandlung der Proben über einen Zeitraum von insgesamt 150 Minuten mit der HCl-Lösung ausreichend ist, um die Probe messbar zu erodieren. Weil bei der Gruppe, die im Hauptversuch mit Pepsin-HCl-Lösung erodiert werden sollte, ein höherer Substanzverlust erwartet wurde, wurde die Erosionszeit für den Hauptversuch auf 5 Minuten pro Demineralisationszyklus reduziert.

### 3.4.3. Dritter Vorversuch

In dem dritten Vorversuch sollte festgestellt werden, in welcher Konzentration Kollagen unter den durch die ersten beiden Vorversuche festgelegten Bedingungen durch Pepsin-HCl-Lösung aus der organischen Matrix herausgelöst werden kann. Weiterhin sollte untersucht werden, ob durch die Degradation der organischen Matrix der Mineralverlust im Dentin im Vergleich zur Behandlung mit HCl-Lösung ohne Pepsin schneller voranschreitet.

Der Mineralverlust nach der Behandlung mit der Pepsin-HCl-Lösung wurde am Ende des dritten Vorversuchs mit den Werten für den Mineralverlust der Salzsäuregruppe aus dem zweiten Vorversuch verglichen. Während des Experimentes wurde entsprechend dem zweiten Vorversuch eine zyklische De- und Remineralisation über einen Zeitraum von 150 Minuten durchgeführt. Dies entspricht einer Demineralisation von  $6 \times 5$  Minuten pro Tag über 5 Versuchstage. Die Proben der Pepsin-HCl-Gruppe wurden einzeln in luftdicht verschließbare, säure- und hitzebeständige Szintillationsgefäße gegeben (Mat. 20). Jede der Proben wurde jeweils bei  $37^\circ\text{C}$  unter leichtem Schütteln in 1ml Pepsin-HCl-Lösung inkubiert. Die Lösungen wurden an jedem der 5 Versuchstage erneuert und bis zur endgültigen Auswertung in den Einzelgefäßen bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

Zwischen den einzelnen Behandlungen mit Pepsin-HCl-Lösung wurden die Proben mit Wasser abgespült und bis zum nächsten Zyklus in einer Remineralisationslösung [Gerrard und Winter, 1986] ebenfalls bei  $37^\circ\text{C}$  unter

leichtem Schütteln aufbewahrt. Bei allen durchgeführten Maßnahmen wurde darauf geachtet, dass alle Proben gleichmäßig von den jeweiligen Lösungen umspült und bedeckt waren.

Bereits nach dem ersten Tag konnte eine Gelbverfärbung der Versuchsoberflächen, verbunden mit einer Erhöhung der Oberflächenelastizität, festgestellt werden. Die Proben wurden im Verlauf des Experimentes nach 120 Minuten (4 Versuchstage) und nach 150 Minuten (5 Versuchstage) mikroradiographisch ausgewertet. Die Hydroxyprolinanalyse wurde an den Pepsin-HCl-Lösungen des ersten und des fünften Tages durchgeführt.

Die Auswertung der LMR-Aufnahmen der mit Pepsin-HCl-Lösung behandelten Proben zeigte einen mittleren Mineralverlust von  $43,0 \pm 24,9 \mu\text{m}$  nach 120 Minuten und  $91,0 \pm 15,3 \mu\text{m}$  nach 150 Minuten.

Vergleicht man die Werte für den Substanzverlust des zweiten und des dritten Vorversuchs miteinander, zeigte sich ein größerer Mineralverlust bei den mit der Pepsin-HCl-Lösung behandelten Proben (Abb. 3).

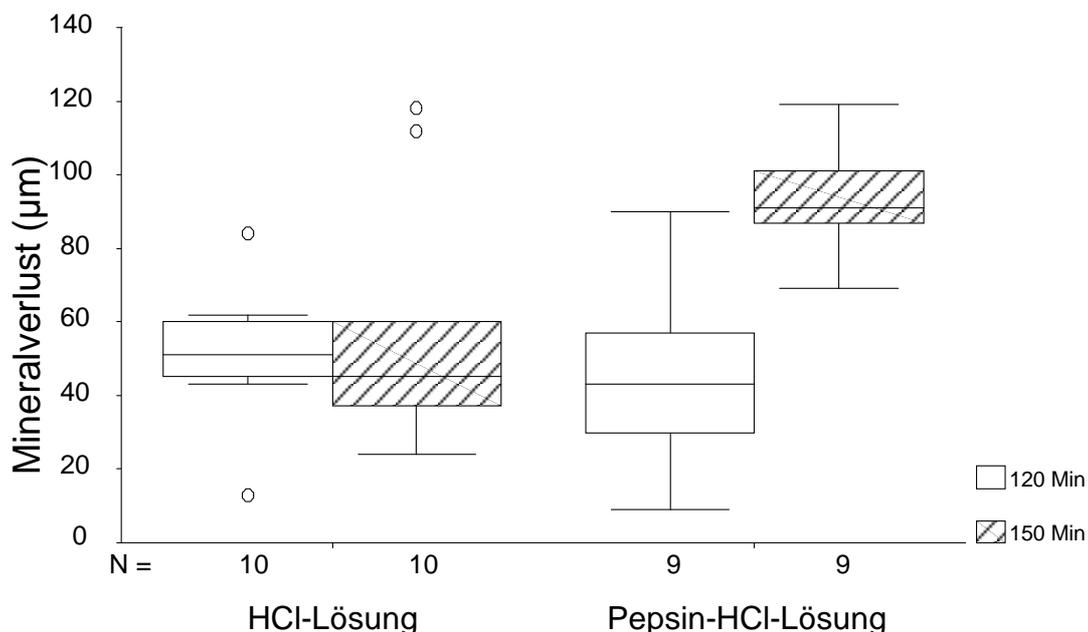


Abb. 3: Mikroradiographisch bestimmter Mineralverlust der Dentinproben der mit der HCl-Lösung und mit der Pepsin-HCl-Lösung behandelten Proben. Ohne Pepsinwirkung war keine Progression der Erosion von 120 Min auf 150 Min zu beobachten. Unter Pepsineinfluss steigerte sich der Mineralverlust von der ersten mikroradiographischen Untersuchung bis zur zweiten erheblich.

Bei der photometrischen Auswertung der Hydrolysate konnte eine für das Messverfahren ausreichende Menge Hydroxyprolin nachgewiesen werden. Die Hydroxyprolinanalyse der Pepsin-HCl-Lösung vom ersten Versuchstag ergab einen Gehalt von  $967 \pm 598$  ng. In der Lösung vom fünften Tag konnte eine Konzentration von  $965 \pm 117$  ng festgestellt werden. Anhand der gemessenen Hydroxyprolinkonzentrationen wurde die Kalibriergerade dem Messbereich angepasst.

### 3.5. Durchführung des Hauptversuchs

Zur Durchführung der Hauptversuche wurden insgesamt 100 Proben auf drei Versuchsgruppen und eine Kontrollgruppe verteilt ( $n = 25$  pro Gruppe).

Die Behandlung der Gruppen erfolgte in drei aufeinander folgenden Versuchsdurchgängen. In dem ersten Durchgang wurden die Proben in 1ml Pepsin-HCl-Lösung (P-HCl-1-Gruppe) behandelt. Gleichzeitig wurden die Proben der Kontrollgruppe behandelt. In dem zweiten Durchgang wurden die Proben mit 4ml Pepsin-HCl-Lösung (P-HCl-4-Gruppe) und in dem dritten mit 8ml Pepsin-HCl-Lösung (P-HCl-8-Gruppe) zyklisch erodiert.

In der P-HCl-1-Gruppe war der Substanzverlust insgesamt geringer als in der Kontrollgruppe. Die Werte für den gemessenen Mineralverlust widersprachen somit den gewonnenen Erkenntnissen aus den Vorversuchen. Daher wurde anschließend ein weiterer Durchgang mit 4ml Pepsin-HCl-Lösung (P-HCl-4) pro Probe in Einzelgefäßen durchgeführt, um lokale Sättigungsphänomene der Pepsin-HCl-Lösung auszuschließen. Weil der Mineralverlust der P-HCl-4-Gruppe ebenfalls geringer als in der Kontrollgruppe war, wurde ein dritter Durchgang durchgeführt (P-HCl-8). In den Gruppen P-HCl-1 und P-HCl-4 wurden die Proben in Einzelgefäßen behandelt, die mit dem jeweiligen Volumen befüllt waren, in der P-HCl-8- und in der Kontrollgruppe wurden die Proben in Sammelgefäßen erodiert, die mit einer Gesamtmenge von 200 ml gefüllt waren. Das entsprach einer Menge von 8 ml pro Probe.

Die Proben aller Gruppen wurden zyklisch de- und remineralisiert. Hierzu wurden die Proben für  $6 \times 5$  Minuten täglich in den entsprechenden Lösungsvolumina mit

der HCl- bzw. mit Pepsin-HCl-Lösung demineralisiert. Zwischen den einzelnen Demineralisationszyklen wurden die Proben aller Gruppen für eine Stunde in einer Remineralisationslösung [Gerrard und Winter,1986] aufbewahrt. Bei dem Wechsel der Proben von der Versuchslösung in die Remineralisationslösung und umgekehrt wurden die Proben mit Wasser für jeweils 1 Minute gespült. Die Inkubation der Proben in den entsprechenden Lösungen erfolgte bei 37°C und leichtem Schütteln. Der Austausch der einzelnen Lösungen erfolgte täglich. Die Hydroxyprolinanalysen wurden an den Hydrolysaten der P-HCl-4-Gruppe vorgenommen. Bis zur Analyse wurden die Hydrolysate am Ende eines jeden Versuchstages bei -20°C eingefroren.

An jedem Versuchstag wurde mit der LMR der Mineralgehalt aller Proben bestimmt. Der genaue Versuchsablauf ist in folgendem Schema dargestellt (Abb. 4):

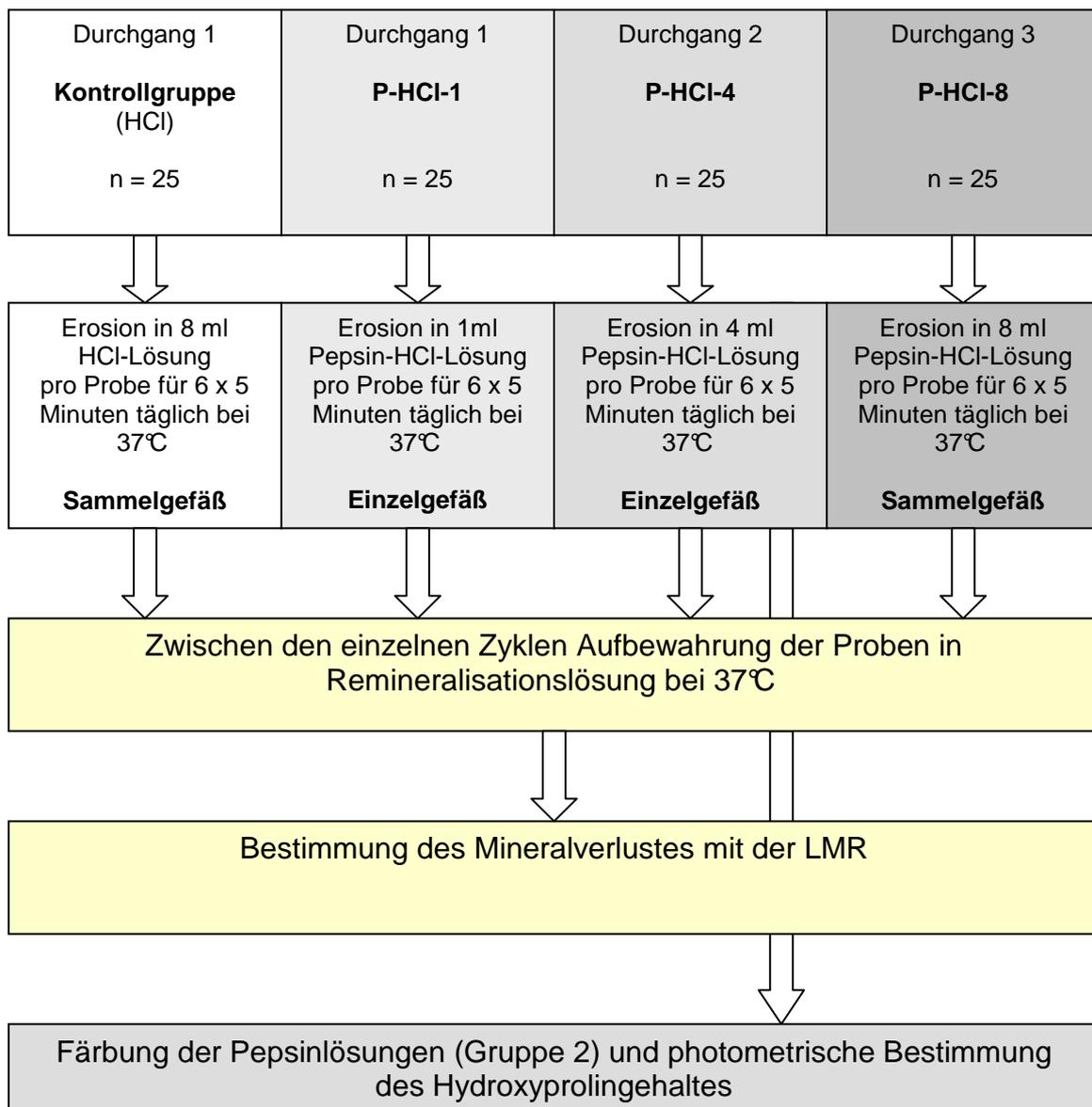


Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs des Hauptversuchs

### 3.6. Statistik

Die Daten wurden mit SPSS, Version 10.0 für Windows statistisch ausgewertet. Alle Daten wurden im Hinblick auf eine Abweichung von der Gaußschen Verteilung getestet (Kolmogorov-Smirnov-Test; n.s.)..

Es wurden t-Tests für gepaarte Stichproben innerhalb der Gruppen und t-Tests für unabhängige Stichproben für den Vergleich zwischen den Gruppen durchgeführt. Das Signifikanzniveau für die mikroradiographische Auswertung wurde für alle

Gruppen aufgrund der Problematik des multiplen Testens auf  $p \leq 0,01$  festgelegt. Das Signifikanzniveau für die Hydroxyprolinanalyse wurde auf  $p \leq 0,05$  festgelegt. Die Ergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben, die Ergebnisse der mikroradiographischen Untersuchung in  $\mu\text{m}$ , die der Hydroxyprolinanalyse in  $\text{ng/ml}$ . Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Box and Whisker-Plots (Abb. 5).

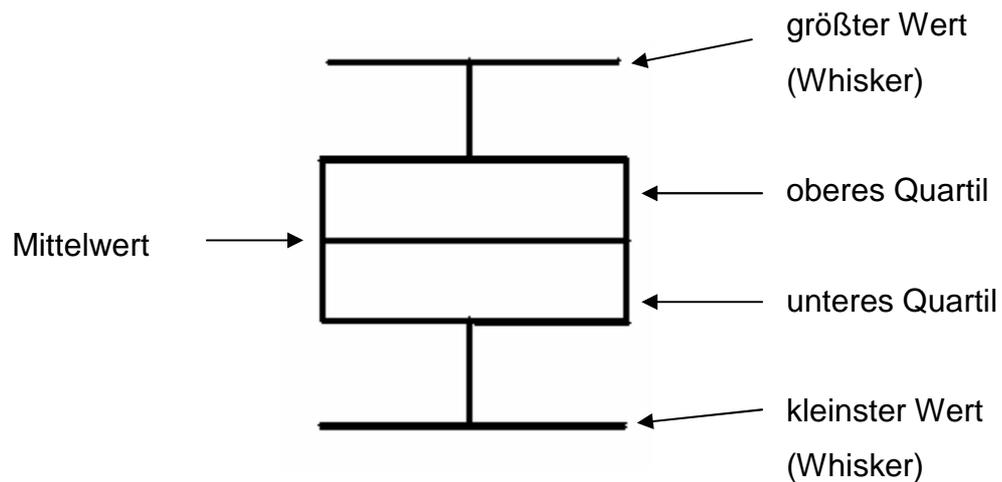


Abb.5: Schematische Darstellung eines Box and Whisker Plots

### 3.7. Materialien

- Mat. 1 : Exakt Trennschleifsystem, Exakt-Apparatebau, Otto Hermann, Norderstedt, Deutschland
- Mat. 2 : Exakt-Mikroschleifsystem, Exakt-Apparatebau, Otto Hermann, Norderstedt, Deutschland
- Mat. 3 : Schleifpapier FE 50, WS-Flex 18 A, Körnung P-800, Hermes, Deutschland
- Mat. 4 : Mikrometerschraube mit Digitalanzeige, 0-35 mm; 0,001, Mitutoyo, Tokyo, Japan
- Mat. 5: Drill Diamond Core, 5mm Außendurchmesser; 1/8"Shank, Rio Grande, USA
- Mat. 6: SMZ-1 Zoom Stereomikroskop, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
- Mat. 7 : Einbettkunststoff Technovit 7200 VLC, Kulzer-Exakt, Wehrheim, Deutschland
- Mat. 8: Probenträger, TGA Weber GmbH, Linden, Deutschland
- Mat. 9: pH-Meter 761 Calimatic, Knick, Berlin, Deutschland
- Mat. 10: Analysen-Feinwaage M 5 SA, Mettler, Zürich, Schweiz
- Mat. 11: Kodak high speed holographic film SO-253, Kodak AG, Stuttgart, Deutschland
- Mat. 12: D-19-Entwickler, Kodak AG, Stuttgart, Deutschland
- Mat. 13: Fixierbad, Tetenal, Norderstedt, Deutschland
- Mat. 14: Netzmittel Agepon, AGFA, Köln, Deutschland
- Mat. 15: Inspektor Mikroradiographiesystem, Inspektor Research Systems BV, Amsterdam, Niederlande
- Mat. 16: Makro-Küvetten, Nr.: 271111, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, Deutschland
- Mat. 17: Visible UV Spectrophotometer „Ultrospec 3000“, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, Großbritannien
- Mat. 18: Kritischer Punkt Trockner CPD 030, Baltec, Witten, Deutschland
- Mat. 19: REM- Type XL20, Philips Electron Optics, Eindhoven, Niederlande
- Mat. 20: Szintillationsgefäße 20 ml, Art.- Nr. 5810100, MAGV Laborbedarf, Rabenau, Deutschland

Mat. 21: Schüttelbad-1083, GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH,  
Hannover, Deutschland

### 3.8. Chemikalien:

- Chem. 1: Thymol-Pulver, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- Chem. 2: Orthophosphorsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Chem. 3: Kaliumchlorid reinst, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Chem. 4: Natriumhydrogencarbonat per analysi, Riedel-De Haën AG,  
Hannover Deutschland
- Chem. 5: Kalziumchlorid gepulvert rein, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Chem. 6: Natriumchlorid p.a., Merck, Darmstadt, Deutschland
- Chem. 7: Salzsäure 6 mol/l, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Chem. 8: Pepsin from porcine gastric mucosa P6887, 3200 U/mg protein  
kristallin, Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
- Chem. 9: Zitronensäure (Zitronensäure-Monohydrat), Merck, Darmstadt  
Deutschland
- Chem.10: Essigsäure (Eisessig) 100%, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Chem.11: Natriumacetat - wasserfrei reinst, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Chem.12: Natriumhydroxid – granuliert, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Chem.13: p-Diaminobenzaldehyd, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Chem.14: Ethylenglycolmonomethylether (Methycellulose), Merck, Darmstadt,  
Deutschland
- Chem.15: Chloramin-T-Trihydrat, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Chem.16: Ethanol 70 %, Otto Fischer GmbH & Co., Saarbrücken, Deutschland
- Chem.17: Perchlorsäure (6,2 mol/l), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Chem.18: Hydroxyprolin, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Allgemeines**

In der Kontrollgruppe konnten fast alle mikroradiographischen Aufnahmen ausgewertet werden. Lediglich die Aufnahmen der Proben 7 und 14 des dritten Tages, die Probe 17, 18 und 20 des vierten Tages waren nicht auswertbar. Die genannten Proben waren während der Anfertigung der Mikroradiogramme nicht mehr in der eindeutigen Referenzposition zur Aluminiumkalibriertreppe positioniert. In der P-HCl-8-Gruppe lösten sich die Proben 20 und am vierten Tag die Proben 10 und 13 während des Versuchs von den Probenträgern.

Makroskopische Betrachtungen der Probenoberflächen aus der Kontrollgruppe ließen bereits nach dem ersten Versuchstag eine Veränderung des Dentins erkennen. Die Probenoberflächen erschienen aufgeraut und matt. Im weiteren Verlauf des Versuchs hat sich dieser optische Eindruck verstärkt. Am zweiten Tag hatte sich zwischen Befestigungskunststoff und den Proben bereits eine sichtbare und tastbare Stufe gebildet. Bis zum Ende des Experiments hatte sich auf den Oberflächen ein weicher Belag gebildet. Bei genauerer Beobachtung unter dem Mikroskop zeigte sich dieser Belag eindrückbar. Unter Belastung trat eingelagerte Flüssigkeit aus den Probenoberflächen aus.

Die makroskopische Untersuchung der Probenoberflächen, der mit Pepsin-HCl-Lösung behandelten Gruppen ergab ebenfalls eine Stufenbildung zwischen Kunststoff und Probe. Die Oberfläche stellte sich jedoch eher wachsartig dar. Bei Belastung der Oberfläche unter dem Mikroskop trat keine Flüssigkeit aus.

#### 4.2. Vergleich des Mineralverlustes in der Kontrollgruppe mit dem Mineralverlust in der P-HCl-8-Gruppe

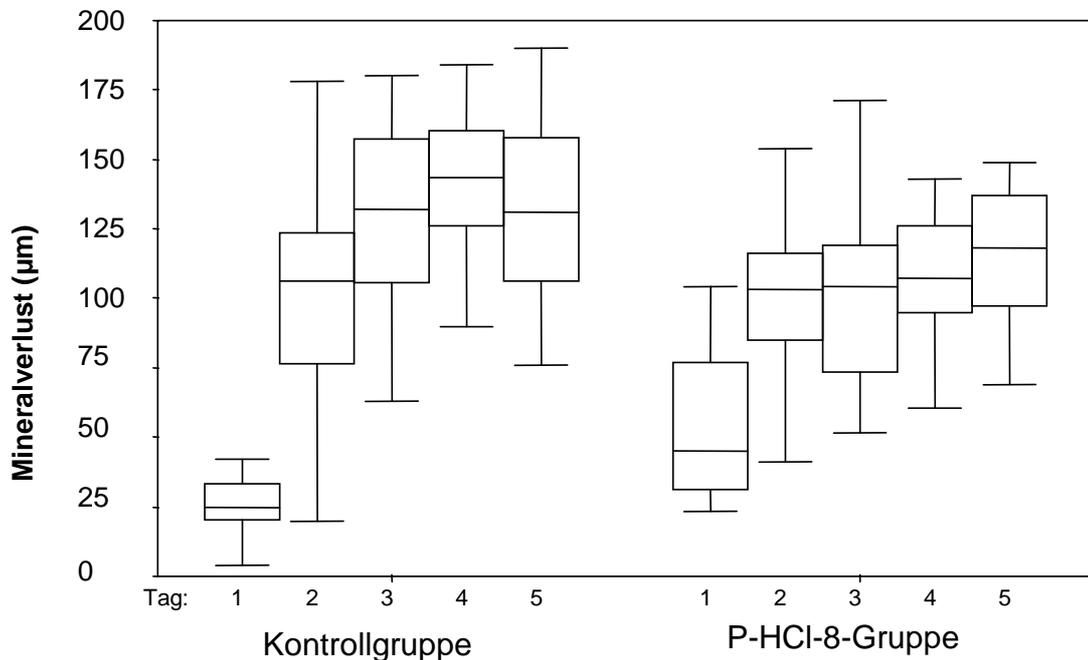


Abb. 6: Kumulativer Mineralverlust ( $\mu\text{m}$ ) in der Kontrollgruppe ( $6 \times 5$  Minuten pro Versuchstag in HCl-Lösung erodiert) und in der P-HCl-8-Gruppe ( $6 \times 5$  Minuten pro Tag in Sammelgefäßen (200ml) mit 8 ml Pepsin-HCl-Lösung pro Probe erodiert)

Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der P-HCl-8-Gruppe wurde ein Überschuss an den entsprechenden Erosionsmedien angeboten. Daher wurden diese beiden Gruppen miteinander verglichen.

Innerhalb der ersten zwei Versuchstage stieg der Mineralverlust in beiden Gruppen an. An den folgenden Versuchstagen stagnierte der Mineralverlust in beiden Gruppen. Der Substanzverlust pro Tag wurde im Verlauf des Experiments immer geringer. Die entsprechenden Mittelwerte und Standardabweichungen können Tabelle 1 entnommen werden.

In der P-HCl-8-Gruppe lag der Mittelwert des Mineralverlustes nach dem ersten Tag über dem der Kontrollgruppe. Mit einer mittleren Differenz von  $25,1 \mu\text{m}$  zwischen den beiden Gruppen war der Unterschied am ersten Tag höchst signifikant. Ab dem zweiten Tag war zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied mehr festzustellen.

Tab. 1: Kumulativer Mineralverlust (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $\mu\text{m}$ ) am Ende eines jeden Versuchstages in der Kontrollgruppe (6  $\times$  5 Minuten pro Versuchstag in Salzsäure erodiert) und in der P-HCl-8-Gruppe (6  $\times$  5 Minuten pro Tag in 8 ml HCl/Pepsinlösung pro Probe erodiert). Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb eines Tages sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet ( $p \leq 0,01$ ).

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
Kontrollgruppe	27,9 $\pm$ 24,7 <sup>a</sup>	100,0 $\pm$ 35,6 <sup>a</sup>	129,2 $\pm$ 35,9 <sup>a</sup>	143,0 $\pm$ 31,1 <sup>a</sup>	133,0 $\pm$ 35,3 <sup>a</sup>
P-HCl-8-Gruppe	53,1 $\pm$ 45,0 <sup>b</sup>	105,0 $\pm$ 42,5 <sup>a</sup>	108,6 $\pm$ 50,8 <sup>a</sup>	113,9 $\pm$ 44,5 <sup>a</sup>	128,7 $\pm$ 66,0 <sup>a</sup>

#### 4.3. Vergleich des Mineralverlustes der einzelnen Pepsingruppen untereinander

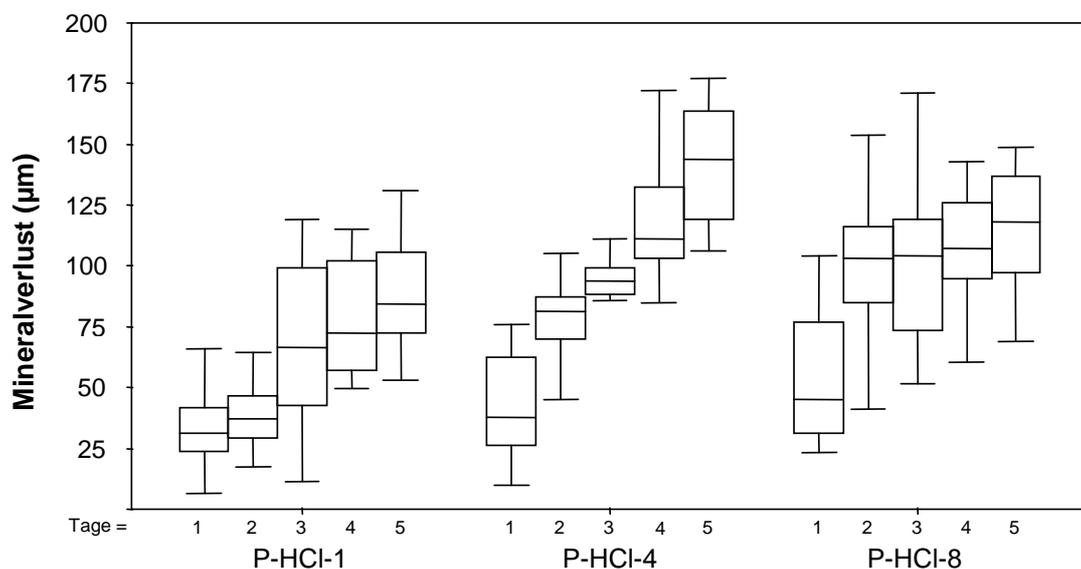


Abb. 7: Kumulativer Mineralverlust ( $\mu\text{m}$ ) in den P-HCl-1-, P-HCl-4- und der P-HCl-8-Gruppen (jeweils 6  $\times$  5 Minuten pro Tag in 1 ml, 4 ml, 8 ml Pepsin-HCl-Lösung pro Probe erodiert)

Zwischen der P-HCl-1-Gruppe und der P-HCl-4-Gruppe war der Unterschied im Mineralverlust an den Tagen 2, 4 und 5 statistisch signifikant.

Im Vergleich zwischen der P-HCl-1-Gruppe und der P-HCl-8-Gruppe bestand an allen Versuchstagen eine signifikante Differenz im Mineralverlust. Die

Unterschiede der Mineralverluste zwischen der P-HCl-4-Gruppe und der P-HCl-8-Gruppe waren an keinem der Versuchstage statistisch signifikant (Tab. 2).

Tab. 2: Kumulative Mineralverluste (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $\mu\text{m}$ ) am Ende eines jeden Versuchstages in der P-HCl-1-, P-HCl-4- und P-HCl-8-Gruppe (jeweils  $6 \times 5$  Minuten pro Tag in 1 ml, 4 ml und 8 ml Pepsin-HCl-Lösung erodiert). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an einem Versuchstag sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet ( $p \leq 0,01$ ).

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
P-HCl-1-Gruppe	33,4 $\pm$ 17,1 <sup>a</sup>	43,2 $\pm$ 19,7 <sup>a</sup>	69,8 $\pm$ 31,5 <sup>a</sup>	78,5 $\pm$ 22,5 <sup>a</sup>	87,9 $\pm$ 21,7 <sup>a</sup>
P-HCl-4-Gruppe	42,4 $\pm$ 19,5 <sup>a,b</sup>	78,4 $\pm$ 16,9 <sup>b</sup>	94,8 $\pm$ 16,8 <sup>a,b</sup>	117,1 $\pm$ 21,5 <sup>b</sup>	142,4 $\pm$ 22,5 <sup>b</sup>
P-HCl-8-Gruppe	53,1 $\pm$ 25,1 <sup>b</sup>	105 $\pm$ 42,5 <sup>b</sup>	108,6 $\pm$ 50,8 <sup>b</sup>	113,9 $\pm$ 44,5 <sup>b</sup>	128,7 $\pm$ 66 <sup>b</sup>

#### 4.4. Ergebnisse der Hydroxyprolinanalyse

Die Analyse wurde an den Probenlösungen der P-HCl-4-Gruppe durchgeführt. An allen Versuchstagen konnte Hydroxyprolin nachgewiesen werden.

Nach dem ersten Versuchstag betrug der mittlere in den Hydrolysaten gemessene Gehalt an Hydroxyprolin  $2036 \pm 868$  ng. Vom ersten auf den zweiten Tag konnte ein leichtes Ansteigen der Hydroxyprolinkonzentration festgestellt werden. Die mittlere Differenz von 187 ng war allerdings nicht signifikant. Im weiteren Verlauf des Experimentes nahmen die Werte für die Hydroxyprolinkonzentrationen von Tag zu Tag ab (Tag 3:  $1715 \pm 1599$  ng; Tag 4:  $1104 \pm 664$  ng; Tag 5:  $990 \pm 1064$  ng). Ein Vergleich der Werte des ersten und des letzten Tages war mit einer Differenz von 1005 ng signifikant ( $p \leq 0,05$ ). Ein Vergleich der Konzentrationswerte zu den Werten des jeweiligen Vortages war an keinem Tag signifikant.

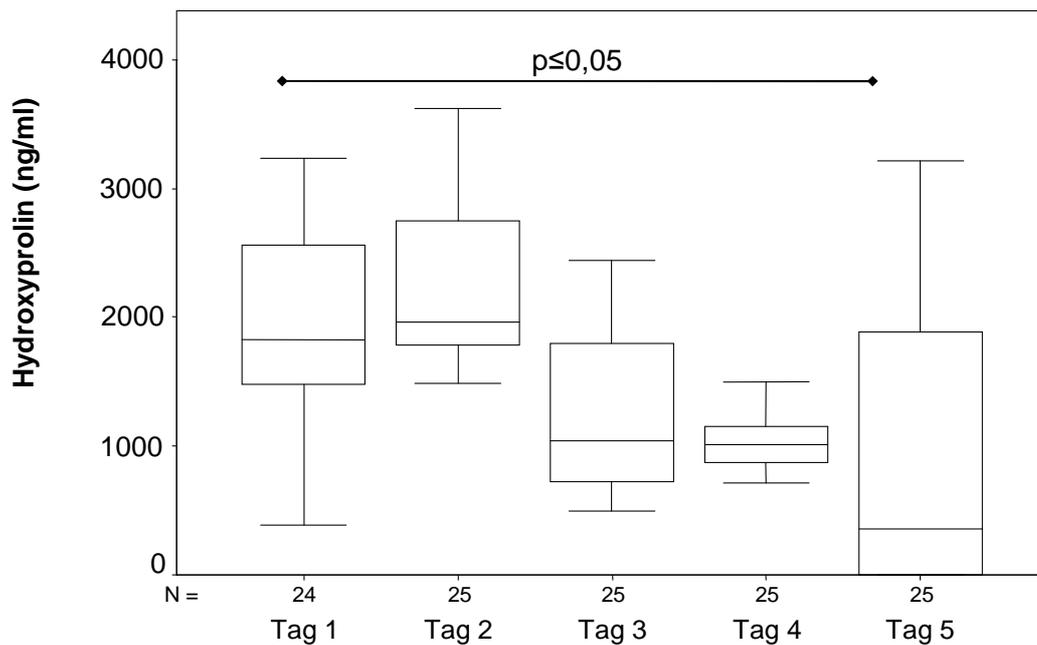


Abb. 8: Hydroxyprolingehalt (ng/ml) in den Hydrolysaten der P-HCl-4-Gruppe (6 × 5 Minuten pro Tag in 4 ml Pepsin-HCl-Lösung erodiert)

#### 4.5. Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung (REM)

Bei der Untersuchung der Proben aus der Kontrollgruppe konnten die typischen Schichten und Strukturen demineralisierten Dentins dargestellt werden (Abb. 9). Im Transversalschnitt zeigten sich drei verschiedene Schichten. Der Übergang dieser Schichten war fließend. Die oberste Schicht war vollständig demineralisiertes Dentin mit den typischen Strukturen einer demineralisierten organischen Dentinmatrix (a), gefolgt von teilweise demineralisiertem Dentin (b). Darunter befand sich vollkommen mineralisiertem, normal strukturiertes Dentin (c). Die untersuchten Präparate der mit Pepsin-HCl-Lösung behandelten Proben wiesen eine andere Schichtung und Struktur auf (Abb. 10). Im Transversalschnitt konnten nur zwei Schichten dargestellt werden. Die beiden Schichten waren deutlich und scharf voneinander abgegrenzt. Die obere Schicht bestand aus vollkommen demineralisiertem Dentin, jedoch mit deutlichen strukturellen Unterschieden im Vergleich zu den nur mit HCl-Lösung behandelten Proben (a). Die organische Matrix erschien deutlich dichter und homogener. Die Schicht teilweise demineralisierten Dentins fehlte, sodass sich direkt an das vollständig

demineralisierte Dentin das normal strukturierte, vollständig mineralisierte Dentin anschloss (b). Die entsprechenden Aufnahmen 9 und 10 sind im Kapitel 5.4.1 abgebildet.

## 5. Diskussion

Das Auftreten von teilweise schweren Dentinerosionen bei Patienten mit gastroösophagealem Reflux oder gestörtem Essverhalten ist in der Literatur häufig beschrieben worden [Aine et al., 1993; Rytömaa et al., 1998; Scheutzel, 1992; Schroeder et al., 1995; Taylor et al., 1992]. Inwieweit das Enzym Pepsin der Magensäure durch Degradation der organischen Matrix des Dentins mit für diese ausgeprägten Erosionen verantwortlich ist, ist bisher nicht untersucht worden.

Es ist bekannt, dass eine intakte organische Dentinmatrix Erosionsprozesse durch reine Säureattacken verlangsamen kann. In welcher Weise das Pepsin die organische Matrix unter zyklischen De- und Remineralisationsbedingungen degradieren kann und welchen Einfluss diese Degradation auf die Ausprägung und Progression von Dentinerosionen hat, wurde in der vorliegenden Studie erstmalig untersucht.

### 5.1. Wahl des Versuchsaufbaus

Der in dieser Studie verwendete Versuchsaufbau zur zyklischen De- und Remineralisation von Dentin unter Pepsineinfluss sollte möglichst der In-vivo-Situation bei Patienten mit Bulimia Nervosa nahe kommen. Daher wurden die Zusammensetzungen und Konzentrationen der Lösungen, die Temperatur, die Enzymkonzentration und die Dauer und Frequenz der Demineralisationszeiträume dieser Situation möglichst angenähert.

Die Versuchslösungen sollten in ihrer Zusammensetzung mit den physiologischen Werten beim Menschen vergleichbar sein. Die verwendete Salzsäurelösung entsprach daher in ihrer Konzentration und im pH-Wert etwa der Magensäure nach einer Mahlzeit [Newton et al., 2004]. Für alle drei Hauptversuche wurde eine Pepsinkonzentration von 750 µg/ml verwendet. Dies entspricht der durchschnittlichen Pepsinkonzentration im Magen eines gesunden Menschen [Newton et al., 2004].

Pepsin kann bis zu einem pH-Wert von 6,5 proteolytisch aktiv sein [Johnston et al., 2007]. Die Wirksamkeit des Pepsins in der Mundhöhle ist also mindestens

ebenso lange gegeben wie das Mundhöhlenmilieu sich im sauren pH-Wertbereich befindet. Die Neutralisation des Speichels dauert nach einem Säureangriff etwa 3 Minuten, kann jedoch auch bis zu 10 Minuten in Anspruch nehmen [Meurman et al., 1987]. In der vorliegenden Studie wurde somit mit einer Inkubation der Proben von 5 Minuten in den Versuchslösungen pro Zyklus von einem durchschnittlichen Wert ausgegangen.

Der gesamte Versuch wurde bei Körpertemperatur (37 °C) durchgeführt, um eine optimale Aktivität der Enzyme zu gewährleisten.

Die Inkubation der Proben in den einzelnen Lösungen erfolgte 6-mal täglich. Dieses deckt sich mit Erfahrungen aus der Bulimiesprechstunde der Poliklinik für Zahnerhaltungskunde und Präventiven Zahnheilkunde des Zentrums für ZMK der Justus-Liebig-Universität Gießen. Patienten gaben an, bis zu sechs Mal pro Tag zu erbrechen. Außerdem wurden in vorhergehenden Studien ähnliche Versuchsprotokolle verwendet, sodass ein Vergleich mit diesen Studien möglich ist [Ganss et al., 2001b; Ganss et al., 2004b].

## **5.2. Wahl der Messverfahren**

### **5.2.1. Messung der Mineralverluste**

Zur Erfassung von Mineralverlusten der Zahnhartsubstanzen stehen zahlreiche Messverfahren zur Verfügung [Mehl et al., 1997; Schlueter et al., 2005; Sorvari und Kiviranta, 1988; West et al., 1998; Zero et al., 1990; Zhang et al., 2000]. Die aus der Kariesforschung bekannten Messmethoden sind für die Erosionsforschung aufgrund der morphologischen Unterschiede der beiden Läsionen oft ungeeignet. Bei der Auswahl des Verfahrens waren verschiedene Kriterien zu beachten. Der Mineralverlust der Proben sollte in der Studie über mehrere Versuchstage verfolgt werden. Daher durfte die quantitative Erfassung des Mineralverlustes nicht destruktiv erfolgen. Das angewandte Messverfahren sollte auch ausreichend empfindlich für das Ausmaß der Mineralverluste sein.

Die quantitative Erfassung von Mineralverlusten der Zahnhartsubstanzen kann prinzipiell mit chemischen oder physikalischen Nachweismethoden erfolgen.

Bei den chemischen Methoden werden Kalzium- und Phosphationen nachgewiesen. Mit der Absorbtionsspektroskopie kann zum Beispiel der Gehalt an Kalzium und Phosphat vor und nach einer erosiven Demineralisation quantifiziert werden [Grenby et al., 2005].

Die Absorbtionsspektroskopie war für den Nachweis der Mineralverluste dieser Studie ungeeignet, da das Vorhandensein von Pepsin und Kollagenabbauprodukten in den zu untersuchenden Hydrolysaten durchaus einen Einfluss auf die Ergebnisse bei Verwendung dieser Nachweismethode hätte nehmen können.

Zum physikalischen Nachweis von Mineralverlusten stehen die Profilometrie, die Elektronmikroskopie und die Mikroradiographie neben anderen Messverfahren zur Verfügung.

Bei der Profilometrie wird die Oberfläche mit einem optischen oder mechanischen Tastsystem abgetastet. Bei diesem Prozess wird die räumlichen Abweichungen des Tastsystems aufgezeichnet und daraus der Mineralverlust ermittelt [Ganss et al., 2009]. Mit diesem Verfahren ist eine Verlaufskontrolle von Erosionen auch möglich. In dieser Studie sollte der Einfluss des Abbaus der Kollagenmatrix auf einen säurebedingten Mineralverlust untersucht werden. Eine Darstellung des Mineralverlustes durch die Profilometrie ist jedoch nur nach der Entfernung der freigelegten organischen Strukturen möglich, sodass eine Verlaufskontrolle mit der Profilometrie in diesem Fall nicht möglich gewesen wäre. [Ganss et al., 2007b; Ganss et al., 2009] Außerdem werden bei dieser Messmethode nur teilweise demineralisierte Dentinareale nicht erfasst. Die Messung des Mineralverlustes mit der Profilometrie war also für diese Studie nicht geeignet.

Bei der Elektronenmikroskopie handelt es sich um ein destruktives Verfahren. Für eine Quantifikation der Dicke der organischen Matrix bzw. des Mineralverlustes müssen Bruchpräparate hergestellt werden. Die Proben hätten nach der Aufbereitung für einen weiteren Versuchszyklus nicht mehr zur Verfügung stehen können. Lediglich nach Abschluss der Versuchsreihe wurden elektronenmikroskopische Bilder zur näheren Abklärung der histologischen Strukturen der Proben angefertigt.

Bei den mikroradiographischen Messmethoden können zwei Verfahren unterschieden werden: zum einen die transversale Mikroradiographie und zum anderen die longitudinale Mikroradiographie.

Bei der transversalen Mikroradiographie werden die Zahnproben in transversaler Richtung mit Röntgenstrahlen durchdrungen und die oberflächlichen Substanzverluste auf einen Film projiziert. Zu diesem Zweck müssen Dünnschliffe der Präparate angefertigt werden. Die Proben können also bei der transversalen Mikroradiographie nicht zerstörungsfrei untersucht werden [Pretty et al., 2004].

Für die Bestimmung des Mineralverlustes wurde die longitudinale Mikroradiographie ausgewählt. Bei diesem Verfahren werden Röntgenbilder von Dentinproben in einem longitudinalen Strahlengang angefertigt. Die Messmethode bot folgende Vorteile:

Die Proben ließen sich zerstörungsfrei untersuchen und konnten so an mehreren aufeinander folgenden Tagen untersucht werden. Die Proben mussten mit keinerlei chemischen Zusätzen behandelt werden, um für das Verfahren vorbereitet zu werden. Zudem ist die longitudinale Mikroradiographie ein etabliertes Verfahren zur Bestimmung erosiver Zahnhartsubstanzverluste [Ganss et al., 2001b; Ganss et al., 2004c].

Fehlerquellen bei der Messung ergeben sich aus der Fokusgröße des Röntgenapparates, dem Fokus-Film-Abstand, dem Auflösungsvermögen des Films und der Spaltbreite des Densitometers des Mikroskops zur Messung der Filmschwärzung [de Josselin de Jong und ten Bosch, 1985].

Die Projektionsschärfe hängt von Fokusgröße und der Ausrichtung des Probenkörpers im Strahlengang ab. Die Bildunschärfe ist von der Beschaffenheit des verwendeten Filmes im Bezug auf sein Auflösungsvermögen abhängig [de Josselin de Jong und ten Bosch, 1985].

Die Abweichung bei Mehrfachmessungen einer Schmelzprobe von 400 µm liegt bei  $\pm 4$  µm [de Josselin de Jong und ten Bosch, 1985]. Die Aluminiumkalibriertreppe innerhalb des Systems ist auf 400 µm dicke Schmelzproben und die damit verbundene Dichte ausgerichtet [de Josselin de Jong et al., 1987]. Da in diesem Falle Dentinproben zur Untersuchung herangezogen wurden, wurde die Schichtdicke der Dentinproben aufgrund des prozentual geringeren Mineralgehaltes auf 750 µm erhöht. Hieraus resultierte bei der vorliegenden Studie eine größere Fehlerbreite im Bereich von  $\pm 6,6$  µm. In anderen Arbeiten wurden

Standardabweichungen von  $\pm 9,4 \mu\text{m}$  bei reinen Dentinproben gefunden [Ganss et al., 2004b]. Die höhere Fehlerbreite ist wahrscheinlich auf die weniger gute optische Diskrimination der dickeren Dentinproben zurückzuführen. Aus der Filmentwicklung resultierte eine Fehlerbreite im Bereich von  $\pm 6,6 \mu\text{m}$ , welche wahrscheinlich auf leichte Unterschiede der Filmemulsionen und der Entwicklungsmedien zurückzuführen ist. Neuere Studien haben gezeigt, dass Messwerte ab einer Größenordnung von etwa  $40 \mu\text{m}$  sicher und reproduzierbar dargestellt werden können. Zumindest ab Versuchstag 2 lagen alle Messwerte oberhalb dieser Nachweisgrenze [Ganss et al., 2009].

### **5.2.2. Messung des Kollagenverlustes**

Neben dem Mineralverlust sollte die Potenz des Pepsins zur Lyse der erodierten organischen Matrix in nativem Dentin untersucht werden. Das durch Pepsin abgebaute Kollagen sollte hierfür quantifiziert werden.

Zum Nachweis von Kollagen stehen mehrere Verfahren, wie zum Beispiel immunhistochemische oder histologische Färbungen zur Verfügung. Diese sind allerdings nicht für quantitative Analysen geeignet. Mit der Hydroxyprolinanalyse stand ein etabliertes, quantitatives Verfahren zur Kollagenbestimmung zur Verfügung [Stegemann und Stalder, 1967].

Bei der Hydroxyprolinanalyse handelt es sich um eine spezifische Nachweismethode für Kollagen, da Hydroxyprolin eine für Kollagen spezifische Aminosäure darstellt. Über die quantitative Bestimmung dieser Aminosäure kann der Gesamtgehalt des Kollagens einer Lösung berechnet werden [Stegemann und Stalder, 1967]. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass die Analysen direkt an den Versuchslösungen durchgeführt werden können, in denen die Dentinproben erodiert wurden.

Die bei dieser Studie nachgewiesenen Konzentrationen an Hydroxyprolin bewegen sich im Bereich von Nanogramm beziehungsweise im einstelligen Mikrogrammbereich. Die Hydroxyprolinanalyse ist jedoch genügend empfindlich, um Konzentrationen dieser Größenordnung nachzuweisen. Die geringen Konzentrationen erfordern allerdings ein besonders sorgfältiges Vorgehen bei der

Analyse. Eventuellen Verunreinigungen der Lösungen, der Küvetten oder des Spektrometers wurde durch sorgsame Handhabung vorgebeugt.

Die größte Schwierigkeit bei der Durchführung der Färbereaktion und der Messung ergibt sich aus der zeitlichen Instabilität des durch die Färbereaktion gebildeten Chromophors. Zudem sind die einzelnen Agenzien sehr empfindlich gegenüber pH-Wertschwankungen.

Der durch die Färbung gebildete Chromophor ist nur für eine Stunde stabil. Die Bestimmung der Hydroxyprolinkonzentrationen musste also innerhalb einer Stunde nach dem letzten Schritt zur Färbung der Hydrolysate durchgeführt werden [Woessner,1961]. Mehrfachmessungen derselben Lösung zeigten, dass innerhalb einer Stunde keine größeren Schwankungen der Messwerte durch den Zerfall des Chromophors entstehen. Um jedoch trotzdem die Instabilität des Farbstoffes als Fehlerquelle bei der Messung auszuschließen, wurden alle Kalibrier- und Probenlösungen im gleichen zeitlichen Abstand zur Färbung photometrisch ausgewertet.

Die Färbung ist, wie bereits beschrieben, sehr empfindlich gegenüber pH-Wertschwankungen und dem Mischungsverhältnis der einzelnen Agenzien. Um eine erfolgreiche Färbung zu gewährleisten, wurde das Protokoll für den Färbeprozess streng befolgt. Alle Schritte wurden unter genauer pH- Wertkontrolle durchgeführt [Stegemann und Stalder,1967;Woessner,1961].

### **5.3. Probenmaterial**

Die Dentinproben für die Versuche wurden aus retinierten, dritten Molaren gewonnen, um Unterschiede im Mineral- und Kollagengehalt der Proben durch Karies, post eruptive Schmelzreifung oder die Bildung von Sekundär- und Tertiärdentin zu minimieren. Ergebnisse aus einer Untersuchung von Erosionen an koronalem Dentin entsprechen eher der Situation in vivo, da Erosionen zumeist im Bereich der Zahnkronen auftreten. Aus jedem Zahn wurden mehrere Dentinproben für die geplanten Untersuchungen hergestellt und anschließend auf die einzelnen Versuchsgruppen verteilt.

Für die mikroradiographische Untersuchung mussten die Zähne zu Schliffpräparaten aufbereitet werden. Hierfür wurden die einzelnen Dentinscheiben durch paralleles Abschleifen der Oberfläche auf eine definierte Dicke präpariert. Wie aus anderen Untersuchungen bekannt ist, bildet sich durch diese Art der Probenherstellung ein Smear Layer unterschiedlicher Dicke auf der Dentinoberfläche. Die Dicke des Smear Layers ist dabei abhängig von der Körnung des Schleifpapiers [Prati et al., 2003]. Durch eine Behandlung mit Säuren oder Chelatoren lässt sich der Smear Layer wieder von der Dentinoberfläche entfernen. Die erforderliche Dauer für die Entfernung dieses Layers ist relativ kurz. Mit einer 6%igen Zitronensäure kann der Smear Layer bereits nach 15 Sekunden nahezu vollständig von einer Dentinoberfläche entfernt werden [Pashley et al., 1987]. Die in der vorliegenden Studie verwendete Salzsäure war sehr konzentriert, sodass davon ausgegangen werden kann, dass der Smear Layer relativ schnell von den Probenoberflächen entfernt wurde. Eine direkte Beeinflussung des Demineralisationsprozesses durch den Smear Layer war also nicht zu erwarten.

## **5.4. Diskussion der Ergebnisse**

### **5.4.1 Hydroxyprolinanalyse**

In allen Pepsingruppen konnte Kollagen nachgewiesen werden. Dies beweist zunächst die prinzipielle Aktivität des Enzyms an der Kollagenmatrix nativer Dentinproben.

Das Kollagen mineralisierten Dentins ist gegen biochemische Einflüsse geschützt, sodass ohne eine gleichzeitige Säurebehandlung das Kollagen durch das Pepsin nicht degradiert werden kann. Erst durch die gleichzeitige Behandlung mit einer Säure wird die exponierte Matrix für Enzyme angreifbar [Johanson und Parks, 1962]. Durch die Säure allein allerdings wird die organische Matrix nicht abgebaut [Carriho et al., 2009].

In einem sauren Milieu ist Pepsin in der Lage, Polypeptidketten in wasserlösliche Einzelpeptide zu zerlegen [Tang et al., 1973]. Pepsin hydrolysiert Peptidbindungen hinter hydrophoben, aromatischen Resten wie Phe-Trp, Phe-Tyr, Phe-Phe, bei einem pH-Wert (pH-Optimum) zwischen 1,5 und 2,0. Das Enzym selbst wird im

sauren Milieu autokatalytisch vom inaktiven in den aktiven Zustand überführt. Nach der Aktivierung spaltet das Enzym Polypeptidketten vom N-terminalen Ende her. Die Aktivierung von Pepsin ist im sauren pH-Wertbereich nicht reversibel [Fruton,2002]. Die Verwendung von Lösungen mit einem pH-Wert von 1,6 in dieser Studie scheint also die prinzipielle, dauerhafte Aktivität der Pepsinmoleküle zu gewährleisten.

Andere Autoren haben in ihren Studien bereits die Potenz des Pepsins zur Degradation der isolierten Dentinmatrix nachgewiesen [Carmichael et al., 1977;Kleter et al., 1997;Tonami und Ericson,2005b].

In einem Experiment wurde festgestellt, dass das im Dentin und im Knochen enthaltene Kollagen im Vergleich zum Kollagen der Haut durch Pepsin nicht äquivalent auflösbar ist. Die Inkubation von bovinem Dentin in einer Pepsinlösung für 72 Stunden bei 4°C löste nur 5,6% des enthaltenen Kollagens, während das Kollagen aus Proben der Haut zu 100% hydrolysiert war. Die einzelnen Ketten der Dentinmatrix waren nach der Behandlung mit Pepsin noch intakt und über Brücken miteinander verbunden [Carmichael et al., 1977]. Warum das Kollagen des Dentins nur teilweise abgebaut wurde, wird in der genannten Studie nicht geklärt.

Auch in der vorliegenden Studie wurde das Kollagen des erodierten Dentins nicht vollständig abgebaut. Auf den rasterelektronischen Aufnahmen der mit Pepsin behandelten Proben (Abb. 9) war die organische Deckschicht auch nach Ende des Versuchs noch deutlich als breite Schicht sichtbar. Im Vergleich zu anderen Studien, in denen ebenfalls die proteolytische Wirkung von Pepsin auf eine demineralisierte Dentinmatrix untersucht wurde, wurde in der vorliegenden Studie eine größere Pepsinkonzentration verwendet (2400 U/ml im Vergleich zu 1536 U/ml [Kleter et al., 1997] und 1090 U/ml [Carmichael et al., 1977]). Entgegen der Erwartung wurden die organischen Strukturen in den anderen genannten Studien, trotz der geringeren Enzymmenge, deutlich stärker degradiert als in der vorliegenden Studie. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass nach einer künstlich erzeugten Demineralisation von nativem Dentin Restmineral im Bereich der organischen Matrix verbleiben kann. Das verbliebene Restmineral kann verstärkend auf die helikale Struktur des Kollagens einwirken. Dadurch wird die

Degradation durch das Pepsin erschwert [Ahmed et al., 2008]. Ob die Enzymkonzentration eventuell für eine suffiziente Degradation der organischen Dentinmatrix zu gering war, muss in Folgestudien mit höherer Enzymkonzentration geklärt werden.

Zusätzlich zum insgesamt verhältnismäßig geringen Kollagenverlust nahm der Gehalt an nachweisbarem Kollagen in den Hydrolysaten von Tag zu Tag ab. Eine Begründung hierfür könnte in strukturellen Veränderungen der organischen Matrix durch Pepsin zu finden sein. Um die Struktur der organischen Matrix nach der Pepsinbehandlung darzustellen, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Bruchpräparaten einzelner Proben angefertigt (Abb. 9 u. Abb. 10).

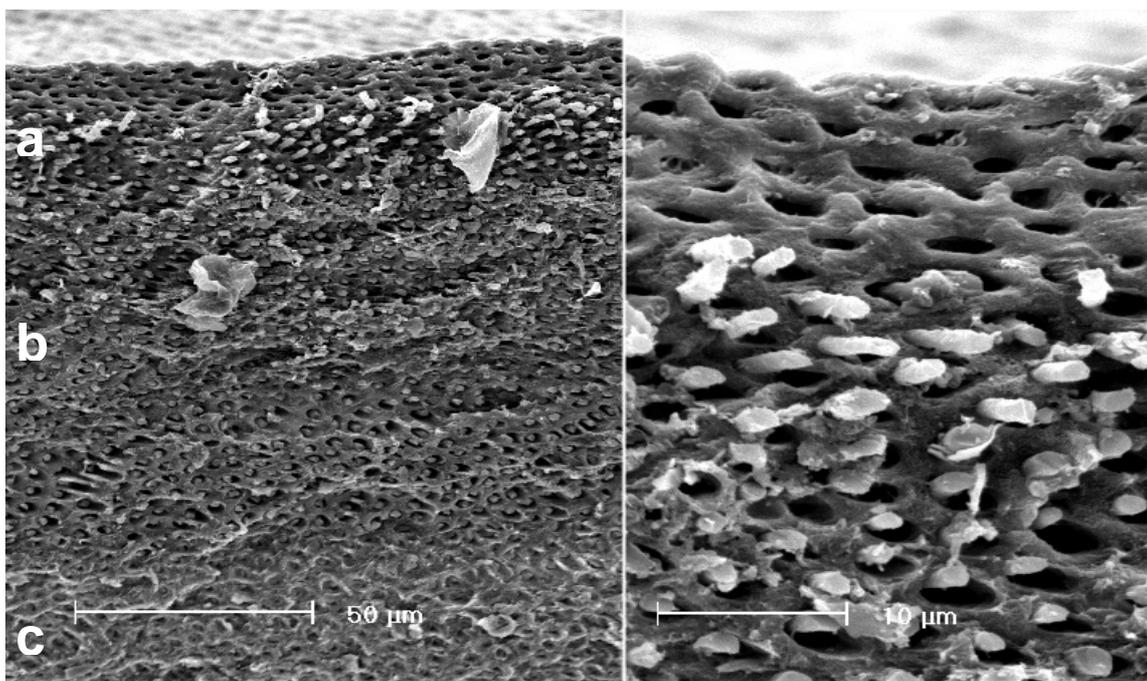


Abb. 9: Transversalschnitt einer mit Salzsäure demineralisierten Probe aus der Kontrollgruppe. Im oberen Anteil ist die demineralisierte organische Matrix zu erkennen (a), gefolgt teilweise demineralisiertem Dentin (b) und gesundem Dentin (c). Die demineralisierte Matrix erscheint strukturiert (Originalvergrößerung links 500fach, rechts 2000fach).

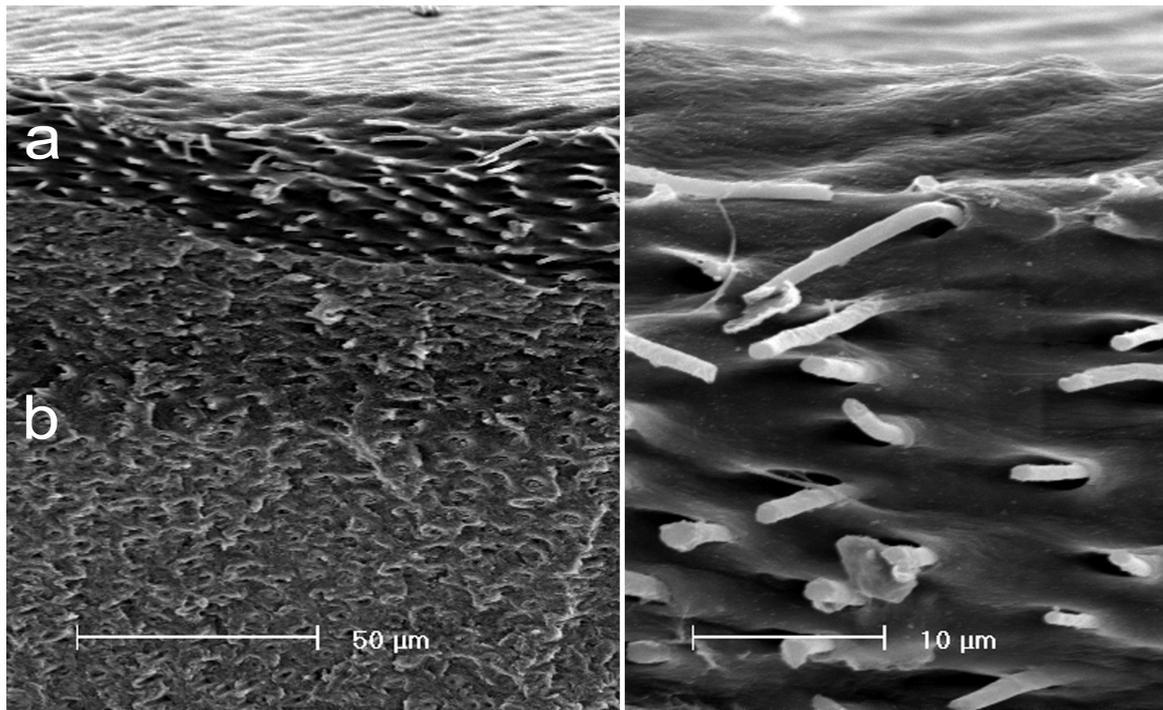


Abb. 10: Transversalschnitt einer mit Pepsin behandelten Probe. Im oberen Anteil ist die demineralisierte organische Matrix zu erkennen (a), gefolgt von gesundem Dentin (b). Teilweise demineralisiertes Dentin konnte nicht dargestellt werden. Das demineralisierte Dentin erscheint dicht und homogen, lediglich unterbrochen von herausragenden Odontoblastenfortsätzen (Originalvergrößerung: links 500fach, rechts 2000fach).

Bei diesen Aufnahmen ist eine strukturell modifizierte organische Deckschicht auf den mit Pepsin behandelten Proben zu erkennen (Abb. 10). Diese Modifikation der Matrix ist bei der Kontrollgruppe nicht vorhanden (Abb. 9). Die Veränderungen der Dentinmatrix sind dabei nicht nur oberflächlich, sondern betreffen die organische Matrix in der gesamten Schichtstärke.

Eine Ursache dafür könnte ein partieller Abbau des Kollagens mit der Entstehung von Kollagenbruchstücken und deren Repräzipitation sein. Die Entstehung von Kollagenbruchstücken durch partiellen Abbau der Kollagenfasern durch Pepsin wurde durch Tonami beschrieben [Tonami und Ericson,2005b]. Bei der Gelatineherstellung werden solche Kollagenbruchstücke repolymerisiert. Dabei vollzieht sich die Faltung der Moleküle nicht mehr strukturiert, sondern rein zufällig, und es entsteht eine amorphe Kollagenstruktur [Babel,1996]. Aufgrund der sehr dichten, amorphen Struktur der Matrix nach Pepsinbehandlung kann ein ähnlicher Prozess im Bereich der organischen Matrix der Proben beim vorliegenden Versuchsaufbau vermutet werden.

### 5.4.2. Mineralverlust

Alle Versuchsgruppen wiesen für den Mineralverlust einen nicht linearen Verlauf auf. Diese Ergebnisse entsprechen anderen Studien zur Untersuchung von Erosionen [Ganss et al., 2001b;Ganss et al., 2004b].

Sowohl in den Pepsin-HCl-Gruppen als auch in der Kontrollgruppe zeigte sich eine abnehmende Progression der Erosionen mit zunehmender Dauer der Studie. Die Entwicklung des Mineralverlustes über den Versuchszeitraum in der Kontrollgruppe decken sich mit anderen Studien zur Progression von Erosionen ohne Entfernung der organischen Matrix [Ganss et al., 2001b;Ganss et al., 2004b]. Die Größenordnung des Mineralverlustes nach dem fünften Tag liegt in der vorliegenden Studie bei  $133,0 \pm 35,3 \mu\text{m}$ . Dies entspricht in etwa den Werten aus anderen Studien ( $147,5 \pm 18,7 \mu\text{m}$  nach dem fünften Tag) mit zyklischem Versuchsaufbau [Ganss et al., 2001b]. Das Phänomen des abnehmenden Mineralverlustes wird in diesen Studien auf die Bildung einer immer dicker werdenden Kollagendeckschicht als Diffusionsbarriere durch die Erosionsprozesse zurückgeführt.

Signifikante Unterschiede im Mineralverlust waren nur in der Initialphase des Experimentes zu beobachten. Der Mineralverlust nahm am ersten Tag mit ansteigendem Enzymangebot zu. In der P-HCl-1-Gruppe lagen die Werte für den Mineralverlust an allen Versuchstagen unter denen der P-HCl-4-Gruppe und der P-HCl-8-Gruppe. Am Ende des Versuchs lag der Mineralverlust der Kontrollgruppe über dem aller Pepsin-HCl-Gruppen.

Nach enzymatischer Entfernung der organischen Deckschicht verläuft der Mineralverlust eher linear [Ganss et al., 2004b;Kleiter et al., 1994]. Daher wurde in der Pepsin-HCl-Gruppe vor dem Beginn der Studie, wie in den genannten Arbeiten, ein insgesamt höherer Substanzverlust in den Pepsin-HCl-Gruppen durch die enzymatische Degradation der Matrix erwartet. Ein höherer Mineralverlust in der Pepsin-HCl-Gruppen war jedoch nur am ersten und zweiten Tag zu verzeichnen. Am Ende der Studie lag der Mineralverlust der mit Pepsin behandelten Proben sogar unter dem der Kontrollgruppe. In den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte nachgewiesen werden, dass die organische Matrix nach Abschluss der Versuchsreihe noch in beträchtlicher Menge auf der Oberfläche der Pepsinproben vorhanden war.

Der insgesamt geringere Mineralverlust in den Pepsin-HCl-Gruppen im Vergleich zu der Kontrollgruppe könnte sich eventuell durch die modifizierte Dentinmatrix der Pepsin-HCl-Gruppen erklären lassen. Die insgesamt dichter erscheinende Matrix der pepsinbehandelten Proben hat wahrscheinlich die Diffusion von nicht nur den Pepsinmolekülen, sondern auch der  $H^+$ -Ionen in tiefere Schichten suffizienter verhindert als die unbehandelte Matrix der Kontrollgruppe.

Die Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse in der Initialphase des Experimentes könnten in Sättigungsphänomenen der Versuchslösungen oder im unterschiedlichen Enzymangebot in den einzelnen Gruppen begründet sein.

Um eine Sättigung der Lösungen in Bezug auf Hydroxylapatit zu verhindern, wurde vor Versuchsbeginn das Löslichkeitsprodukt für alle Volumina unter Berücksichtigung der speziellen ionischen Zusammensetzung von Dentin ausgerechnet. Hierfür steht ein spezielles Computerprogramm zur Verfügung [Shellis,1988].\*\* Nach diesen Berechnungen war eine Sättigung nicht zu erwarten. Der Unterschied im Mineralverlust der einzelnen Gruppen in der Initialphase lässt sich also wahrscheinlich nicht mit einer Sättigung der Lösungen in Bezug auf Hydroxylapatit erklären. Lokale Sättigungsphänomene an der Probenoberfläche konnten jedoch durch diese Berechnung nicht ausgeschlossen werden. Um die lokalen Sättigungsphänomene zu eliminieren, wurden die Proben während der Erzeugung der erosiven Demineralisation unter ständigem Schütteln inkubiert. So konnte während des Versuchs von einer latenten Umspülung der Proben mit ungesättigten Lösungsanteilen ausgegangen werden. In der P-HCl-1-Gruppe waren die verwendeten Volumina wahrscheinlich zu gering, um eine ausreichende Zirkulation der Versuchslösung zu gewährleisten. Der insgesamt geringste Mineralverlust der P-HCl-1-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen könnte also zum Teil auf lokale Sättigungsphänomene während des Versuchs zurückgeführt werden.

Der Unterschied im Mineralverlust in der Initialphase aller Versuchsreihen könnte, neben lokalen Sättigungsphänomenen, ebenso auf dem unterschiedlich hohen Angebot von Enzymen pro Probe beruhen.

---

\*\* An dieser Stelle gilt besonderer Dank Herrn Prof. Dr. A. Lussi (Klinik für Zahnerhaltung, Präventiv- und Kinderzahnmedizin Bern) für die Berechnung der Löslichkeitsprodukte.

Entsprechend der allgemeinen Enzymkinetik steigert sich der Substratumsatz pro Zeit proportional zur Enzymkonzentration [Kreuzig,2001;Löffler et al., 2006]. Auch wenn die Enzymkonzentration in allen Lösungen identisch war, so war die absolute Enzymmenge gemessen an der Probenoberfläche in der P-HCl-8-Gruppe höher als in der P-HCl-4- und der P-HCl-1-Gruppe. Das könnte einen höheren Kollagenabbau mit steigenden Flüssigkeitsvolumen pro Probe zur Folge haben. Der höhere Kollagenumsatz könnte in der Initialphase dazu geführt haben, dass mehr Kollagen von den Probenoberflächen der Gruppen mit hoher Pepsinkonzentration entfernt wurde. Dies hätte am Anfang zu einer von der Enzymkonzentration abhängigen Reduktion der Matrixdicke geführt. Die Funktion der Matrix als Diffusionsbarriere für die  $H^+$ -Ionen in der Pepsin-Salzsäure-Lösung wäre also mit zunehmendem Enzymangebot reduziert worden, sodass die erosiv bedingten Mineralverluste am ersten Versuchstag schneller hätten voranschreiten können.

Der Unterschied in der Progression des Mineralverlustes zwischen den verschiedenen Pepsin-HCl-Gruppen hat sich im weiteren Verlauf des Experimentes wahrscheinlich durch die Entwicklung der beschriebenen Oberflächenmodifikation der Matrix aufgehoben.

## 5.5. Ausblick

Mit der vorliegenden Studie konnte das erste Mal gezeigt werden, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen eine demineralisierte organische Dentinmatrix durch Pepsin nur unvollständig abgebaut wird. Die Degradation durch das Pepsin schreitet langsamer voran als die Demineralisationsprozesse, sodass das Pepsin keinen Einfluss auf die Progression eines säurebedingten Mineralverlustes hat.

Die Situation *in vivo* ist insgesamt wesentlich komplexer als es der Versuchsaufbau der vorliegenden Studie simulieren kann. Es ist sehr wahrscheinlich, dass unter Mundbedingungen derartig dicke organische Schichten nicht entstehen.

Im Magen-Darm-Trakt und in der Mundhöhle kommen verschiedene andere proteolytische Enzyme außer Pepsin vor. So ist zum Beispiel Trypsin als unspezifische Protease durchaus in der Lage, Kollagen zu spalten [Scott und Leaver, 1974]. Bei verschiedenen Erkrankungen, bei denen Mageninhalt in die Mundhöhle gelangt, kann Trypsin ebenfalls mit dorthin gelangen [Marshall et al., 2001] und Einfluss auf die Struktur und den Abbau der organischen Matrix nehmen.

Im Speichel von gesunden Personen lassen sich weiterhin verschiedene für Kollagen spezifische Enzyme, sogenannte Matrix-Metalloproteinasen, nachweisen [Davis, 1991; Mäkelä et al., 1994; van Strijp et al., 2003]. Diese Enzyme werden auch von inflammatorische Zellen wie Granulozyten, Leukozyten und Monozyten sezerniert [Sorsa et al., 1989b; Sorsa et al., 1989a]. Es ist bekannt, dass diese Enzyme an dem Abbau von parodontalem Kollagen im Rahmen von Parodontalerkrankungen beteiligt sind [Hannas et al., 2007; Tjäderhane et al., 1998a]. Ebenso spielen sie eine Rolle bei der Zerstörung des Kollagens während der Progression einer Dentinkaries [Tjäderhane et al., 1998b]. Es wäre daher durchaus denkbar, dass diese und andere Kollagenasen ebenfalls Einfluss auf die erodierte Dentinmatrix nehmen können. Ob das *in vivo* tatsächlich der Fall ist, ist bisher nicht untersucht. Diese Frage sollte in Folgestudien geklärt werden.

## 6. Zusammenfassung

Bei Patienten, bei denen durch einen chronischen Reflux oder durch eine Essstörung in Kombination mit regelmäßigem Erbrechen häufig Magensäure in die Mundhöhle gelangt, können zum Teil sehr ausgeprägte erosive Zahnhartsubstanzverluste festgestellt werden. Im Schmelz, der zum größten Teil aus mineralischen Anteilen besteht, kann hierfür die Erosivität der Salzsäure des Magens verantwortlich gemacht werden. Im Dentin allerdings sind Erosionsvorgänge durch den deutlich höheren organischen Anteil wesentlich komplexer. Verschiedene Autoren haben die Wirkung einer durch Säure exponierten Dentinmatrix als Diffusionsbarriere für Säuren beschrieben. Dentinerosionen schreiten nach enzymatischer Degradation dieser Barriere wesentlich schneller voran.

In den genannten Patientengruppen gelangt neben der Magensäure auch Pepsin, ein Enzym, das Kollagen in zahlreichen Geweben degradieren kann, in die Mundhöhle. Es ist durchaus denkbar, dass das Pepsin der Magensäure in der Lage ist, die Dentinmatrix zu degradieren und so Dentinerosion zu beschleunigen. Dies könnte eine Erklärung für die teilweise schweren Erosionen im Dentin bei Patienten mit Erosionen endogener Herkunft sein. Ziel dieser In-vitro-Studie war es deshalb, den Einfluss von Pepsin auf die organische Dentinmatrix und die daraus resultierende Progression von Dentinerosionen zu untersuchen.

Aus noch nicht in die Mundhöhle durchgebrochenen Weisheitszähnen wurden insgesamt 100 longitudinale Zahnschnitte mit einer Dicke von 750 µm hergestellt. Alle Proben entstammten dem koronalen Dentin. Die Proben wurden in eine Kontrollgruppe (Demineralisation in 8 ml HCl-Lösung pro Probe; pH 1,6) und drei Pepsin-HCl-Gruppen (1 ml (P-HCl-1), 4 ml (P-HCl-4) und 8 ml (P-HCl-8) Pepsin-HCl-Lösung pro Probe; pH 1,6; 750 µg/ml Pepsin) verteilt. Jede Gruppe enthielt 25 Proben. Die Proben wurden zyklisch de- und remineralisiert. Die Demineralisation der Proben aller Gruppen erfolgte 6-mal täglich für 5 Minuten in der entsprechenden Versuchslösung mit der entsprechenden Menge. Die Proben wurden zwischen den einzelnen Zyklen für mindestens eine Stunde in einer Remineralisationslösung gelagert. Der Mineralverlust der Proben wurde nach jedem Versuchstag mit der longitudinalen Mikroradiographie bestimmt. In den Pepsinlösungen der P-HCl-4-Gruppe wurde der Kollagengehalt mit der

Hydroxyprolinanalyse täglich gemessen. Zusätzlich wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Bruchpräparaten von Proben angefertigt, die mit der Pepsin-HCl-Lösung beziehungsweise mit der HCl-Lösung behandelt worden sind.

Am Ende des letzten Versuchstages konnte kein signifikanter Unterschied im Mineralverlust zwischen den Gruppen festgestellt werden (Kontrollgruppe:  $133,0 \pm 35,3 \mu\text{m}$ , P-HCl-1-Gruppe:  $87,9 \pm 21,7 \mu\text{m}$ , P-HCl-4-Gruppe:  $142,0 \pm 22,5 \mu\text{m}$ , P-HCl-8-Gruppe:  $128,7 \pm 66,0 \mu\text{m}$ ; alle Vergleiche n.s.). Lediglich in der Initialphase der Studie war eine schnellere Progression in den Pepsin-HCl-Gruppen zu verzeichnen, die mit ansteigendem Lösungsvolumen zunahm. Der Mineralverlust nach dem ersten Tag betrug in der Kontrollgruppe  $27,9 \pm 24,7 \mu\text{m}$ , in der P-HCl-1-Gruppe  $33,4 \pm 17,1 \mu\text{m}$  (n.s. im Vergleich zur Kontrollgruppe), in der P-HCl-4-Gruppe  $42,2 \pm 19,5 \mu\text{m}$  (n.s. im Vergleich zur P-HCl-1-Gruppe und zur Kontrollgruppe) und in der P-HCl-8-Gruppe  $53,1 \pm 25,1 \mu\text{m}$ , ( $p \leq 0,01$  im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur P-HCl-1-Gruppe, n.s. im Vergleich zur P-HCl-4-Gruppe). Die Konzentrationen von Hydroxyprolin nahmen von Tag zu Tag ab, jedoch war der Unterschied zwischen den Hydroxyprolinkonzentrationen des ersten und des letzten Versuchstages statistisch signifikant (Reduzierung von Tag 1 zu Tag 5 um  $1005 \pm 1280 \text{ ng}$ ,  $p \leq 0,05$ ).

Rasterelektronenmikroskopisch konnte eine strukturelle Veränderung der Dentinmatrix der mit der Pepsin-HCl-Lösung behandelten Proben im Vergleich zu den mit der HCl-Lösung behandelten Proben festgestellt werden. Die organischen Anteile der mit der Pepsin-HCl-Lösung behandelten Proben waren nur teilweise entfernt worden und waren noch in beträchtlicher Menge auf den Oberflächen vorhanden. Sie erschienen aber insgesamt dichter und weniger strukturiert als bei den Proben der mit der HCl-Lösung behandelten Proben.

Die Ergebnisse der Hydroxyprolinanalyse zeigen, dass Kollagen zwar abgebaut wird, doch zeigen die mikroradiographischen Untersuchungen, dass die Progression von Dentinerosionen unter den genannten Bedingungen in vitro durch Pepsin nicht signifikant beschleunigt wird. Eine mögliche Erklärung dafür ist die unvollständige Degradation der Matrix durch Pepsin.

## 7. Summary

Patients suffering from chronic reflux or eating disorders associated with regular vomiting, frequently have gastric acid present in the oral cavity. These patients often show erosive loss of dental hard tissues. In enamel, which is mainly composed of mineral, the low pH and the resulting high erosivity of the hydrochloric acid contained in the gastric juice is held responsible for causing erosion. In dentine, however, the processes of erosion are more complex, due to the higher content of organic material. The organic dentine matrix is exposed by the impact of acids, persists on the tooth surface and can act, as described by various authors, as a diffusion barrier for acids. After the enzymatic degradation of this barrier, dentine erosion progresses much more quickly.

In the patient groups mentioned above together with the gastric acid proteolytic enzymes like pepsin, an enzyme able to degrade collagen in numerous tissues, can reach the oral cavity. It is quite conceivable that the pepsin in the gastric juice is able to degrade the dentine matrix and, thereby, accelerate dentine erosion. This might be an explanation for the sometimes severe dentine erosion in patients with erosion of endogenous origin. The aim of this in vitro study was, therefore, to investigate the effect of pepsin on the organic dentine matrix and on the progression of dentine erosion.

A total of 100 longitudinal tooth sections with a thickness of 750  $\mu\text{m}$  were prepared from the coronal dentine of human third molars which had not yet reached the oral cavity. The specimens were divided into four groups: a control group (demineralisation in 8ml HCl solution per specimen, pH 1.6) and three pepsin-HCl groups (1ml (P-HCl-1), 4ml (P-HCl-4) and 8ml (P-HCl-8) of pepsin-HCl solution (pH 1.6, 750  $\mu\text{g}$  of pepsin per ml HCl) per specimen). Each group contained 25 specimens. The specimens were cyclically de- and re-mineralised. Demineralisation of the specimens of all groups was done 6 times per day for 5 minutes each, in the respective test solution with the appropriate quantity. Between cycles, the specimens were kept for at least one hour in a remineralisation solution. The mineral loss of the specimens was determined after each experimental day by longitudinal microradiography (LMR). In the pepsin solutions of the P-HCl-4 group, content of collagen degradation products was measured daily with hydroxyproline analysis. Additionally scanning electron

microscopic (SEM) pictures were made of cross sections of specimens, treated either with the pepsin-HCl solution or with the HCl solution.

At the end of the last experimental day, no significant differences in mineral loss were found between the groups (Control group:  $133.0 \pm 35.3 \mu\text{m}$ , P-HCl-1 group:  $87.9 \pm 21.7 \mu\text{m}$ , P-HCl-4-group:  $142.0 \pm 22.5 \mu\text{m}$ , P-HCl-8 group:  $128.7 \pm 66.0 \mu\text{m}$ ; all comparisons n.s.). Only in the initial phase of the study a faster progression was noted in the pepsin-HCl groups, which increased with an increasing volume of solution. Mineral loss after the first day was  $27.9 \pm 24.7 \mu\text{m}$  in the control group, in  $33.4 \pm 17.1 \mu\text{m}$  the P-HCl 1 group (n.s. compared to control group),  $42.2 \pm 19.5 \mu\text{m}$  in the P-HCl-4 group (n.s. compared to P-HCl 1 or to control group). In the P-HCl 8 group,  $53.1 \pm 25.1 \mu\text{m}$  ( $p \leq 0.01$  compared to control group or to p-HCl-1 group, n.s. compared to P-HCl 4 group). The concentration of hydroxyproline decreased from day to day. However, only the difference between the hydroxyproline concentration on the first and last day of the experiment was significant (reduction from day 1 to day 5 by  $1005 \pm 1280 \text{ ng}$ ,  $p \leq 0.05$ ).

The SEM-pictures showed a structural change within the dentine matrix in the specimens treated with the pepsin-HCl solution in comparison with those specimens treated with the HCl solution. The organic fraction was removed only partially by the treatment with the pepsin-HCl solution and was still present in considerable quantities on the surfaces. These structures were denser and less structured than in the specimens which had been treated with the HCl solution.

The results of the hydroxyproline analysis show that collagen was indeed degraded by the enzyme. However, the results of the LMR-analysis showed that the progression of dentin erosion was not accelerated by pepsin treatment under the in vitro conditions used in the present study. The incomplete degradation of the matrix by pepsin could be an explanation for the lack of an increase of mineral loss.

## 8. Literaturverzeichnis

Ahmed, A; García-Godoy, F; Kunzelmann, KH.  
Self-limiting caries therapy with proteolytic agents  
Am J Dent 2008; 21: 303-312

Aine, L; Baer, M; Mäki, M.  
Dental erosions caused by gastroesophageal reflux disease in children  
J Dent Child 1993; 60: 210-214

Al-Dlaigan, YH; Shaw, L; Smith, A.  
Dental erosion in a group of British 14-year-old school children. Part II: Influence of dietary intake.  
Br Dent J 2001; 190: 258-261

Armstrong, D.  
Gastroesophageal reflux disease.  
Curr Opin Pharmacol 2005; 5: 589-595

Attin, T; Knofel, S; Buchalla, W; Tütüncü, R.  
In situ evaluation of different remineralization periods to decrease brushing abrasion of demineralized enamel  
Caries Res 2001; 35: 216-222

Attin, T; Koidl, U; Buchalla, W; Schaller, HG; Kielbassa, AM; Hellwig, E.  
Correlation of microhardness and wear in differently eroded bovine dental enamel  
Arch Oral Biol 1997; 42: 243-250

Attin, T; Weiss, K; Becker, K; Buchalla, W; Wiegand, A.  
Impact of modified acidic soft drinks on enamel erosion  
Oral Diseases 2005; 11: 7-12

Babel, W.  
Gelatine - ein vielseitiges Biopolymer  
Chemie in unserer Zeit 1996; 30: 86-95

Barbour, ME; Parker, DM; Allen, GC; Jandt, KD.  
Human enamel dissolution in citric acid as a function of pH in the range  $2.30 \leq \text{pH} \leq 6.30$  - a nanoindentation study  
Eur J Oral Sci 2003; 111: 258-262

Barbour, ME; Parker, DM; Allen, GC; Jandt, KD.  
Human enamel erosion in constant composition citric acid solutions as a function of degree of saturation with respect to hydroxyapatite  
J Oral Rehabil 2005; 32: 16-21

Bartlett, DW; Evans, DF; Anggiansah, A; Smith, BG.  
A study of the association between gastro-oesophageal reflux and palatal dental erosion.  
Br Dent J 1997; 22: 182-207

- Berger, U; Schilke, C; Strauss, B.  
Gewichtssorgen und Diätverhalten bei Kindern in der 3. und 4. Klasse  
Psychother Psychosom Med Psychol 2005; 55: 331-338
- Boonstra, W; ten Bosch, JJ; Arends, J.  
Protein and mineral release during in vitro demineralization of bovine dentine  
J Biol Buccale 1990; 18: 43-48
- Buonocore, M.  
A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces  
J Dent Res 1955; 46: 37-45
- Burkhart, N.  
Communicating effectively with patients suspected of having bulimia nervosa.  
J Am Dent Assoc 2005; 136: 1130-1137
- Butler, WT.  
Dentin matrix proteins  
Eur J Oral Sci 1998; 106: 204-210
- Cagler, E; Lussi, A; Kargul, B; Ugur, K.  
Fruit yogurt: any erosive potential regarding teeth?  
Quintessence Int 2006; 37: 647-651
- Carmichael, DJ; Dodd, CM; Veis, A.  
The solubilization of bone and dentin collagens by pepsin. Effect of cross-linkages and non-collagen components.  
Biochim Biophys Acta 1977; 491: 177-192
- Carriho, M; Tay, F; Donnelly, A; Agee, K; Tjäderhane, L; Mazzoni, A; Breschi, L; Foulger, S; Pashley, DH.  
Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen  
J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2009; 90: 373-380
- Christensen, GJ.  
Oral care for patients with bulimia  
J Am Dent Assoc 2002; 133: 1689-1691
- Davis, G.  
Identification of an abundant latent 94-kDa gelatin-degrading metalloprotease in human saliva which is activated by acid exposure: implications for a role in digestion of collagenous proteins  
Arch Biochem Biophys 1991; 286: 551-554
- de Josselin de Jong, E; ten Bosch, JJ; Noordmans, J.  
Optimised microcomputer-guided quantitative microradiography on dental mineralised tissue slices.  
Phys Med Biol 1987; 32: 887-899

- de Josselin de Jong, E; ten Bosch, J.  
Error analysis of the microradiographic determination of mineral content in mineralised tissue slices.  
Phys Med Biol 1985; 30: 1067-1075
- Dugmore, CR; Rock, WP.  
The progression of tooth erosion in a cohort of adolescents of mixed ethnicity  
Int J Paediatr Dent 2003; 13: 295-303
- Dung, SZ; Li, Y; Dunipace, AJ; Stookey, GK.  
Degradation of insoluble bovine collagen and human dentine collagen pretreated in vitro with lactic acid, pH 4.0 and 5.5  
Arch Oral Biol 1994; 39: 901-905
- Eccles, JD.  
Dental erosion of nonindustrial origin. A clinical survey and classification  
J Prosthet Dent 1979; 42: 649-653
- El-Serag, A.  
Time trends of gastroesophageal reflux disease: a systematic review.  
Clin Gastroenterol Hepatol 2004; 5: 17-26
- Fairburn, CG; Harrison, PJ.  
Eating disorders  
Lancet 2003; 361: 407-416
- Fruton, J.  
A history of pepsin and related enzymes.  
Q Rev Biol 2002; 77: 127-147
- Ganss, C; Klimek, J; Brune, V; Schürmann, A.  
Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in situ  
Caries Res 2004a; 38: 561-566
- 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 2001a; 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 2001b; 35: 325-330
- Ganss, C; Klimek, J; Starck, C.  
Quantitative analysis of the impact of the organic matrix on the fluoride effect on erosion progression in human dentine using longitudinal microradiography  
Arch Oral Biol 2004b; 49: 931-935

- Ganss, C; Lussi, A; Scharmann, I; Weigelt, T; Hardt, M; Klimek, J; Schlueter, N.  
Comparison of calcium analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosion in dentine  
Caries Res 2009; 43: 422-429
- Ganss, C; Schlechtriemen, M; Klimek, J.  
Dental erosions in subjects living on a raw food diet  
Caries Res 1999; 33: 74-80
- Ganss, C; Schlueter, N; Friedrich, D; Klimek, J.  
Efficacy of waiting periods and topical fluoride treatment on toothbrush abrasion of eroded enamel in situ  
Caries Res 2007a; 41: 146-151
- Ganss, C; Schlueter, N; Mueller, U; Klimek, J.  
Effect of TiF<sub>4</sub> on erosion progression in enamel in vitro (Abstr.)  
Caries Res 2004c; 38: 392
- Ganss, C; Schlueter, N; von Hinckeldey, J; Klimek, J.  
Effects of toothbrushing on eroded dentine.  
Eur J Oral Sci 2007b; 115: 390-396
- Gerrard, WA; Winter, PJ.  
Evaluation of toothpastes by their ability to assist rehardening of enamel in vitro  
Caries Res 1986; 20: 209-216
- Golenhofen, K.  
Physiologie heute  
Urban und Fischer Verlag , 2000
- Gotestam, K.  
General population-based epidemiological study of eating disorders in Norway  
Int J Eat Disord 1995; 18: 119-26
- Graehn, G.  
[Acid erosions of tooth surface. 1. Influence of saliva, medicaments, fruit acids and mechanical stress]  
Saureerosion der Zahnhartsubstanzen. 1. Mitteilung: Einfluss von Speichel, Medikamenten, Nahrungssauern und mechanischen Belastungen  
Dtsch Stomatol 1991; 41: 494-499
- Grando, LJ; Tames, DR; Cardoso, AC; Gabilan, NH.  
In vitro study of enamel erosion caused by soft drinks and lemon juice in deciduous teeth analysed by stereomicroscopy and scanning electron microscopy  
Caries Res 1996; 30: 373-378
- Grenby, TH; Mistry, M; Desai, T.  
Potential dental effects of infants' fruit drinks studied in vitro.  
Br J Nutr 2005; 64: 273-283
- Hannas, A; Pereira, J; Granjeiro, J; Tjäderhane, L.  
The role of matrix metalloproteinases in the oral environment.  
Acta Odontol Scand 2007; 65: 1-13

Hara, AT; Ando, M; Cury, JA; Serra, MC; Gonzales-Cabezas, C; Zero, DT.  
Influence of the Organic Matrix on Root Dentine Erosion by Citric Acid  
Caries Res 2005; 39: 138

Hooper, S; Newcombe, R; Faller, R; Eversole, S; Addy, M; West, N.  
The protective effects of toothpaste against erosion by orange juice: studies in situ  
and in vitro  
J Dent 2007; 36: 476-481

Hove, L; Young, A; Tveit, AB.  
An in vitro study on the effect of TiF<sub>4</sub> treatment against erosion by hydrochloric  
acid on pellicle-covered enamel  
Caries Res 2007; 41: 80-84

Hurst, P.  
Teeth, vomiting and diet: a study of the dental characteristics of seventeen  
anorexia nervosa patients.  
Postgrad Med J 1977; 53: 298-305

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

Jaeggi, T; Schaffner, M; Bürgin, W; Lussi, A.  
Erosionen und keilförmige Defekte bei Rekruten der Schweizer Armee  
Schweiz Monatsschr Zahnmed 1999; 109: 1171-1178

Jaeggi, T; Lussi, A.  
Toothbrush abrasion of erosively altered enamel after intraoral exposure to saliva:  
An in situ study  
Caries Res 1999; 33: 455-461

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

Järvinen, V; Rytömaa, I; Meurman, JH.  
Location of dental erosion in a referred population  
Caries Res 1992; 26: 391-396

Järvinen, VK; Rytömaa, I; Heinonen, OP.  
Risk factors in dental erosion  
J Dent Res 1991; 70: 942-947

Johanson, E; Parks, H.  
Electron-microscopic observations on sound human dentine.  
Arch Oral Bio 1962; 185-193

Johnston, N; Dettmar, P; Bishwokarma, B; Lively, M; Koufman, J.  
Activity/stability of human pepsin: implications for reflux attributed laryngeal  
disease.  
Laryngoscope 2007; 117: 1036-1039

- Jones, I; Leaver, A.  
Studies on the minor components of the organic matrix of human dentine.  
Arch Oral Biol 1974; 19: 371-380.  
Arch Oral Biol 1974; 19: 380
- Jones, RR; Cleaton-Jones, P.  
Depth and area of dental erosions, and dental caries, in bulimic women  
J Dent Res 1989; 68: 1275-1278
- Kim, H; Lee, K; Yeo, M; Kim, D; Cho, S.  
Pepsin detection in the sputum/saliva for the diagnosis of gastroesophageal reflux disease in patients with clinically suspected atypical gastroesophageal reflux disease symptoms.  
Digestion 2008; 77: 201-206
- Kjelsas, E.  
Prevalence of eating disorders in female and male adolescents (14-15 years).  
Eat Behav 2004; 5: 13-25
- Kleter, GA; Damen, JJ; Buijs, MJ; ten Cate, JM.  
The Maillard reaction in demineralized dentin in vitro  
Eur J Oral Sci 1997; 105: 278-284
- Kleter, GA; Damen, JJ; Everts, V; Niehof, J; ten Cate, JM.  
The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin in vitro  
J Dent Res 1994; 73: 1523-1529
- Klont, B; ten Cate, JM.  
Remineralisation of bovine incisor root lesions in vitro: the role of the collagenous matrix  
Caries Res 1991; 25: 39-45
- Kreuzig, T.  
Kurzlehrbuch Biochemie  
Urban & Fischer Verlag , 2001
- Larsen, MJ.  
On the chemical and physical nature of erosions and caries lesions in dental enamel  
Caries Res 1991; 25: 323-329
- Löffler, G; Petrides, PE; Heinrich, PC.  
Biochemie und Pathobiochemie  
Springer, Berlin , 2006
- Lussi, A.  
Dental erosion clinical diagnosis and case history taking  
Eur J Oral Sci 1996; 104: 191-198
- Lussi, A; Hellwig, E.  
Risk assessment and preventive measures  
Monogr Oral Sci 2006; 10: 190-199

- Lussi, A; Jaeggi, T.  
Das erosive Potenzial verschiedener Zahnpflegeprodukte im Vergleich zu Nahrungsmitteln und Getränken  
Schweiz Monatsschr Zahnmed 2001; 111: 274-281
- Lussi, A; Jaeggi, T.  
Erosion--diagnosis and risk factors.  
Clin Oral Invest 2008; 12: 5-13
- Lussi, A; Jaeggi, T; Zero, D.  
The role of diet in the aetiology of dental erosion  
Caries Res 2004; 38 (suppl 1): 34-44
- Lussi, A; Jaggi, T; Schärer, S.  
The influence of different factors on in vitro enamel erosion  
Caries Res 1993; 27: 387-393
- Lussi, A; Kohler, N; Zero, D; Schaffner, M; Mergert, B.  
A comparison of the erosive potential of different beverages in primary and permanent teeth using an in vitro model  
Eur J Oral Sci 2000; 108: 110-114
- 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
- Lussi, 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.  
[The erosion of dental hard substance. Its epidemiology, clinical appearance, risk factors and preventive rules]  
Erosion der Zahnhartsubstanz. Epidemiologie, klinisches Erscheinungsbild, Risikofaktoren und Verhaltensregeln  
Schweiz Monatsschr Zahnmed 1992; 102: 320-329
- Mäkelä, M; Salo, T; Uitto, V; Larjava, H.  
Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status  
J Dent Res 1994; 73: 1397-1406
- Marshall, R; Anggiansah, A; Owen, W; Manifold, D; Owen, W.  
The extent of duodenogastric reflux in gastro-oesophageal reflux disease  
Eur J Gastroenterol Hepatol 2001; 13: 1-3
- Mehl, A; Gloger, W; Kunzelmann, KH; Hickel, R.  
A new optical 3-D device for the detection of wear  
J Dent Res 1997; 76: 1799-1807

Meurman, JH; Frank, RM.  
Progression and surface ultrastructure of in vitro caused erosive lesions in human and bovine enamel  
Caries Res 1991; 25: 81-87

Meurman, JH; Rytomaa, I; Kari, K; Laakso, T; Murtomaa, H.  
Salivary pH and glucose after consuming various beverages, including sugar-containing drinks  
Caries Res 1987; 21: 353-359

Meurman, JH; Toskala, J; Nuutinen, P; Klemetti, E.  
Oral and dental manifestations in gastroesophageal reflux disease  
Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994; 78: 583-589

Milosevic, A; Brodie, DA; Slade, PD.  
Dental erosion, oral hygiene, and nutrition in eating disorders  
Int J Eat Disord 1997; 21: 195-199

Moazzez, R; Anggiansah, A; Bartlett, DW.  
The association of acidic reflux above the upper oesophageal sphincter with palatal tooth wear.  
Caries Res 2005; 39: 475-478

Munoz, J; Herreros, B; Sanchiz, V; Amoros, C; Hernandez, V; Pascual, I; Mora, F; Minguez, M; Bagan, J; Benages, A.  
Dental and periodontal lesions in patients with gastro-oesophageal reflux disease  
Dig Liver Dis 2003; 35: 461-467

Newton, JL; James, OF; Williams, GV; Allen, A.  
The diurnal profile of gastric pepsin activity is reduced with Helicobacter pylori infection  
Dig Dis Sci 2004; 49: 1103-1108

Nilsson, K; Abrahamsson, E; Torbiornsson, A; Hägglöf, B.  
Causes of adolescent onset anorexia nervosa: patient perspectives.  
Eat Disord 2007; 15: 125-133

Nunn, JH.  
Prevalence of dental erosion and the implications for oral health  
Eur J Oral Sci 1996; 104: 156-161

Oehler, G; Krause, C.  
Innere Medizin für Zahnmediziner Schattauer Verlag; Stuttgart, New York 2002; 339-341

Öhrn, R; Enzell, K; Angmar-Månsson, B.  
Oral status of 81 subjects with eating disorders  
Eur J Oral Sci 1999; 107: 157-163

Okada, T; Hayashi, T; Ikada, Y.  
Degradation of collagen suture in vitro and in vivo  
Biomaterials 1992; 13: 448-454

- Osebold, W; Pedrini, V.  
Pepsin-solubilized collagen of human nucleus pulposus and annulus fibrosus.  
Biochem Biophys Acta 1976; 434: 390-405
- Pace, F; Pallota, S; Tonini, M; Vakil, N; Bianchi Porro, G.  
Systematic review: gastro-oesophageal reflux disease and dental lesions.  
Aliment Pharmacol Ther 2008; 27: 1179-1186
- Parry, J.  
Investigation of mineral waters and soft drinks in relation to dental erosion.  
J Oral Rehabil 2001; 28: 766-772
- Pashley, DH; Michelich, V; Kehl, T.  
Dentin permeability: effects of smear layer removal.  
J Prosthet Dent 1987; 46: 531-537
- Prati, C; Montebugnoli, L; Suppa, P; Valdrè, G; Mongiorgi, R.  
Permeability and morphology of dentin after erosion induced by acidic drinks  
J Peridontol 2003; 74: 428-436
- Pretty, IA; Edgar, WM; Higham, SM.  
The validation of quantitative light-induced fluorescence to quantify acid erosion of human enamel  
Arch Oral Biol 2004; 49: 285-294
- Robb, ND; Smith, BG.  
Prevalence of pathological tooth wear in patients with chronic alcoholism  
Br Dent J 1990; 169: 367-369
- Robb, ND; Smith, BG; Geidrys, LE.  
The distribution of erosion in the dentitions of patients with eating disorders  
Br Dent J 1995; 178: 171-175
- Rytömaa, I; Järvinen, V; Kanerva, R; Heinonen, OP.  
Bulimia and tooth erosion  
Acta Odontol Scand 1998; 56: 36-40
- Rytömaa, I; Meurman, JH; Koskinen, J; Laakso, T; Gharazi, L; Turunen, R.  
In vitro erosion of bovine enamel caused by acidic drinks and other foodstuffs  
Scand J Dent Res 1988; 96: 324-333
- Saxegaard, E; Rølla, 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

- Schiffner, U; Micheelis, W; Reich, E.  
Erosionen und keilförmige Zahnhalsdefekte bei deutschen Erwachsenen und Senioren  
Dtsch Zahnärztl Z 2002; 57: 102-106
- Schlueter, N; Ganss, C; De Sanctis, S; Klimek, J.  
Evaluation of a profilometrical method for monitoring erosive tooth wear  
Eur J Oral Sci 2005; 113: 505-511
- Schlueter, N; Ganss, C; Klimek, J.  
Effect of titanium tetrafluoride and sodium fluoride on erosion progression in enamel and dentine in vitro  
Caries Res 2007; 41: 141-145
- Schlueter, N; Klimek, J; Ganss, C.  
In vitro efficacy of experimental tin- and fluoride-containing mouth rinses as anti-erosive agents in enamel.  
J Dent 2009; 37: 944-948
- Schröder, HE.  
Orale Strukturbiologie. Entwicklungsgeschichte, Struktur und Funktion normaler Hart- und Weichgewebe der Mundhöhle und des Kiefergelenks  
Thieme Stuttgart; New York, 2000
- Schroeder, PL; Filler, SJ; Ramirez, B; Lazarchik, DA; Vaezi, MF; Richter, JE.  
Dental Erosion and Acid Reflux Disease  
Ann Intern Med 1995; 122: 809-815
- Scott, P; Leaver, A.  
The degradation of human dentine collagen by trypsin  
Connect Tissue Res 1974; 2: 299-307
- Shellis, RP.  
A microcomputer program to evaluate the saturation of complex solutions with respect to biominerals.  
Comput Appl Biosci 1988; 4: 373-379
- Smith, BG; Robb, ND.  
The prevalence of toothwear in 1007 dental patients  
J Oral Rehabil 1996; 23: 232-239
- Sonnenberg, A.  
Clinical epidemiology and natural history of gastroesophageal reflux disease.  
Yale J Biol Med 1999; 72: 81-92
- Sorsa, T; Saari, H; Konttinen, Y; Suomalainen, K; Lindy, S; Uitto, V.  
Non-proteolytic activation of latent human neutrophil collagenase and its role in matrix destruction in periodontal diseases.  
Int J Tissue React 1989a; 11: 153-159

Sorsa, T; Suomalainen, K; Konttinen, Y; Saari, H; Lindy, S; Uitto, V.  
Identification of protease(s) capable of further degrading native 3/4- and 1/4-  
collagen fragments generated by collagenase from native type I collagen in human  
neutrophils.

Proc Finn Dent Soc 1989b; 85: 3-11

Sorvari, R; Kiviranta, I.

A semiquantitative method of recording experimental tooth erosion and estimation  
occlusal wear in the rat

Arch Oral Biol 1988; 33: 217-220

Spigset, O.

Oral symptoms in bulimia nervosa. A survey of 34 cases

Acta Odontol Scand 1991; 49: 335-339

Stegemann, H; Stalder, K.

Determination of hydroxyproline

Clin Chim Acta 1967; 18: 267-273

Tang, J; Lanier, JP; Liu, D; Huang, WY; Chen, K; Marciniszyn, J; Sepulveda, P;  
Tao, N.

Amino-acid sequence of porcine pepsin

Proc Natl Acad Sci U S A ,3437-3439 1973; 70: 3437-3439

Taylor, G; Taylor, S; Abrams, R; Mueller, W.

Dental erosion associated with asymptomatic gastroesophageal reflux

ASDC J Dent Child 1992; 59: 182-185

tenCate, JM; Imfeld, T.

Dental erosion, summary

Eur J Oral Sci 1996; 104: 241-244

Tjäderhane, L; Larjava, H; Sorsa, T; Uitto, VJ; Larmas, M; Salo, T.

The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix  
breakdown in caries lesions

J Dent Res 1998; 77: 1622-1629

Tonami, KI; Ericson, D.

Protein profile of pepsin-digested carious and sound human dentine

Acta Odontol Scand 2005; 63: 17-20

Tsuzaki, M; Yamauchi, M; Banes, A.

Tendon collagens: extracellular matrix composition in shear stress and tensile  
components of flexor tendons

Connect Tissue Res 1993; 29: 141-152

van Strijp, AJ; Jansen, DC; De Groot, J; ten Cate, JM; Everts, V.

Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ

Caries Res 2003; 37: 58-65

Voutilainen, M.

Gastroesophageal reflux disease: prevalence, clinical, endoscopic and histopathological findings in 1,128 consecutive patients referred for endoscopy due to dyspeptic and reflux symptoms.

Digestion 2000; 61: 6-13

West, NX; Maxwell, A; Hughes, JA; Parker, DM; Newcombe, RG; Addy, M.

A method to measure clinical erosion: the effect of orange juice consumption on erosion of enamel

J Dent 1998; 26: 329-335

White, I; McIntyre, J; Logan, R.

Studies on dental erosion: an in vitro model of root surface erosion

Aust Dent J 2001; 46: 203-207

Wiegand, A; Müller, J; Werner, C; Attin, T.

Prevalence of erosive tooth wear and associated risk factors in 2-7-year-old German kindergarten children.

Oral Diseases 2006; 12: 117-124

Woessner, JFjr.

The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid

Arch Biochem Biophys 1961; 93: 440-447

Zero, DT.

Etiology of dental erosion- extrinsic factors

Eur J Oral Sci 1996; 104: 162-177

Zero, DT; Rahbek, I; Fu, J; Proskin, HM; Featherstone, JD.

Comparison of the iodide permeability test, the surface microhardness test, and mineral dissolution of bovine enamel following acid challenge

Caries Res 1990; 24: 181-188

Zhang, XZ; Anderson, P; Dowker, SEP; Enzell, K.

Optical profilometric study of changes in surface roughness of enamel during in vitro demineralisation

Caries Res 2000; 34: 164-174

Zipkin, J; McClure, F.

Salivary citrate and dental erosion

J Dent Res 1949; 28: 613-626

## Danksagung

Ich bedanke mich zuerst bei Frau Prof. Dr. C. Ganß und bei Frau Dr. N. Schlüter aus der Poliklinik für Zahnerhaltungskunde und präventive Zahnheilkunde der Justus Liebig Universität Gießen für die freundliche Überlassung des Themas und die stets sehr gute Betreuung bei der Entstehung der vorliegenden Arbeit.

Für die freundliche Unterstützung bei der Herstellung der Analyse- und Versuchslösungen und der Anwendung der Laborgeräte bedanke ich mich bei Frau B. Meyer.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. U. Müller und Frau P. Winter aus dem Institut für Humangenetik der Justus Liebig Universität Gießen für die Bereitstellung des Photometers und die Unterstützung bei der Anwendung für die Hydroxyprolinanalyse.

Weiterhin möchte Ich mich bei Herrn Prof. Dr. A. Lussi aus der Klinik für Zahnerhaltung, Präventiv- und Kinderzahnmedizin der Universität Bern für die Berechnung der Löslichkeitsprodukte bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. M. Hardt aus der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit (Leitung: Prof. Dr. Rupert Schmidt) der Justus Liebig Universität in Gießen für die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der rasterelektronenmikroskopischen Bilder bedanken.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Lebensgefährtin, meiner Familie und meinen Freunden für die treue und wichtige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.