

**Messprobleme bei der profilometrischen Quantifizierung
von erosiv bedingten Zahnhartsubstanzverlusten an
humanem Dentin:
Eine systematische Methodenevaluation**

Inauguraldissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Katja Schulze
aus Karl-Marx-Stadt

Gießen 2013

Aus dem Medizinischen Zentrum für Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde
Poliklinik für Zahnerhaltungskunde und Präventive Zahnheilkunde

der Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH
Standort Giessen

Leiter: Prof. Dr. J. Klimek

Gutachterin: Prof. Dr. Ganss

Gutachter: Prof. Dr. Lotzmann

Tag der Disputation: 24.06.2013

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	4
2.1 Ätiologie und klinisches Erscheinungsbild von Erosionen	4
2.2 Histologie von gesundem Dentin.....	6
2.3 Histopathologie von Dentinerosionen.....	8
2.4 Messverfahren in der Erosionsforschung	10
2.4.1 Chemische Testverfahren	10
2.4.2 Messung des Härtegrades	11
2.4.3 Rasterelektronenmikroskopie	12
2.4.4 Mikroradiografie.....	12
2.4.5 Profilometrie	14
2.5 Hinführung zur Fragestellung und Zielsetzung	17
3. Material und Methoden	20
3.1 Versuchsaufbau.....	20
3.1.1 Herstellung der Dentinproben.....	20
3.1.2 Herstellung der Lösungen	21
3.1.3 Versuchsdurchführung	21
3.1.4 Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung.....	26
3.2 Messmethoden.....	26
3.2.1 Optische Profilometrie	26
3.2.2 Mechanische Profilometrie	29
3.3 Reproduzierbarkeit	30
3.3.1 Reproduzierbarkeit der Messungen.....	30
3.3.2 Reproduzierbarkeit der Auswertung	32
3.4 Rasterelektronenmikroskopie	33
3.5 Statistik.....	34
3.6 Materialliste	35
3.7 Chemikalienliste	37
4. Ergebnisse	38
4.1 Allgemeines.....	38
4.2 Übersicht der Mittelwerte und Standardabweichungen	39
4.2.1 Optische Profilometrie	39

4.2.2	Mechanische Profilometrie	40
4.3	Trocknungsreihen.....	41
4.4	Einfluss der Dehydrierung der Proben auf die durch optische Profilometrie ermittelten Messwerte	44
4.4.1	Ergebnisse vor Entfernung der organischen Matrix.....	44
4.4.2	Ergebnisse nach Entfernung der organischen Matrix.....	47
4.5	Einfluss der Dehydrierung der Proben auf die durch mechanische Profilometrie ermittelten Messwerte	50
4.5.1	Ergebnisse vor Entfernung der organischen Matrix.....	50
4.5.2	Ergebnisse nach Entfernung der organischen Matrix.....	52
4.6	Bland-Altman-Plots.....	53
4.7	Rasterelektronenmikroskopische Bilder	55
4.8	EDX-Linescans der einzelnen Demineralisationszeiten vor und nach Entfernung der organischen Matrix.....	59
5.	Diskussion	61
5.1	Messprobleme aufgrund der komplexen Histologie des Dentins	61
5.2	Bisherige Anwendung der Profilometrie am Dentin und dadurch entstehende Messprobleme	65
5.2.1	Allgemeine Anwendungsverfahren der Profilometrie.....	65
5.2.2	Profilometrische Messbedingungen.....	66
5.3	Methodendiskussion.....	69
5.3.1	Probenherstellung	69
5.3.2	Demineralisationslösung	69
5.3.3	Demineralisationszeiten	70
5.3.4	Messbedingungen	71
5.3.5	Reproduzierbarkeit	73
5.3.6	Enzymatischer Abbau der organischen Matrix	74
5.4	Betrachtung der Ergebnisse	77
5.4.1	Betrachtung der Ergebnisse vor Entfernung der organischen Matrix	77
5.4.2	Betrachtung der Ergebnisse nach Entfernung der organischen Matrix	83
5.5	Bewertung der Daten anhand der Literatur	85
5.6	Schlussfolgerungen und Empfehlungen	88

6. Zusammenfassung.....	90
7. Abstract.....	93
8. Literaturverzeichnis	95
9. Anhang	105
9.1 Trocknungsreihen.....	105
9.1.1 Optisch vor Entfernung der organischen Matrix	105
9.1.2 Optisch nach Entfernung der organischen Matrix.....	106
9.1.3 Mechanisch vor Entfernung der organischen Matrix.....	107
9.1.4 Mechanisch nach Entfernung der organischen Matrix.....	108
9.2 Ehrenwörtliche Erklärung	109
9.3 Danksagung	110

1. Einleitung

Es ist ein deutlicher Rückgang der Karies, der bislang häufigsten oralen Erkrankung, zu verzeichnen. Vom Jahr 1997 bis 2005 wurde in der Bevölkerung bei Erwachsenen (DMFT > 20) und bei Senioren (DMFT > 27) ein Rückgang von 10%, bei Kindern (DMFT > 2) von 20% dokumentiert [Micheelis und Schiffner, 2006]. Umso häufiger werden nicht kariesbedingte Zahnhartsubstanzdefekte diagnostiziert.

Zähne sind direkt nach dem Durchbruch in die Mundhöhle allgemeinen Verschleißerscheinungen ausgesetzt. Zu diesen Verschleißerscheinungen zählen Abrasionen, Attritionen, Abfraktionen und Erosionen. Auch wenn meist eine Art der Verschleißerscheinungen dominiert, können sie gleichzeitig vorkommen und sich gegenseitig verstärken [Lussi et al., 2004].

Erosionen nehmen hierbei eine besondere Rolle ein, da sie schon im jugendlichen Alter schwerwiegende Defekte verursachen können. Sie entstehen auf sauberen Zahnoberflächen ohne Beteiligung von Mikroorganismen [Pindborg, 1970] und sind aufgrund des Pathomechanismus eindeutig von der Karies zu unterscheiden [tenCate und Imfeld, 1996].

Bei Erosionen handelt es sich um eine erworbene Läsion [Miller, 1907] multifaktorieller Ätiologie, die durch die orale Einwirkung exogener und/oder endogener Säuren hervorgerufen wird und zu einem zentripetal voranschreitenden irreversiblen Mineralverlust führt. Der Ausprägungsgrad von Erosionen reicht von minimalen Schmelzverlusten bis hin zur Dentinexposition und kann bei schneller Progression zur Eröffnung der Pulpa führen [Jaeggi und Lussi, 2006].

Besonders häufig kommt es zu Erosionsdefekten bei Personen mit einem hohen Konsum säurehaltiger Lebensmittel, Personen, die beruflich säurehaltigen Dämpfen ausgesetzt sind oder Personen mit Essstörungen in Kombination mit Erbrechen oder chronischem Reflux [Lussi et al., 2011].

Die Prävalenz von Erosionen wird sehr unterschiedlich angegeben. Zudem sind die Prävalenzstudien aufgrund der unterschiedlichen Studiendesigns nur schwer miteinander vergleichbar und weisen starke Unterschiede in den Ergebnissen auf. So liegt die Prävalenz im Milchgebiss bei 39,5% [Wiegand et al., 2006b] bis 71% [Ganss et al., 2001]. In der bleibenden Dentition werden 12% [Ganss et al., 2001]

bis 67% bei Jugendlichen [El Karim et al., 2007] und bis zu 82% bei Erwachsenen [Jaeggi und Lussi, 2006] angegeben.

Aufgrund der hohen Prävalenz und des mit Erosionen einhergehenden irreversiblen Substanzverlustes sind frühzeitige Diagnosen und die Entwicklung adäquater Präventionsstrategien nötig. Dazu kommen in der Erosionsforschung viele verschiedene Messmethoden zum Einsatz. Eine der am häufigsten genutzten Methoden zum Nachweis von Mineralverlusten stellt dabei die Profilometrie dar. Diese Methode ist für Schmelz validiert, wird jedoch auch im Dentin angewendet.

Allerdings kann, angesichts der unterschiedlichen Histopathologie von Dentin- und Schmelzerosionen, nicht jede Messmethode gleichermaßen auf beide Gewebe angewendet werden. Beim Schmelz führt ein erosiver Säureangriff zu einem Schicht für Schicht voranschreitenden Mineralverlust, während beim Dentin das Mineral aus der organischen Matrix herausgelöst wird. Es verbleibt ein Geflecht aus Kollagen, das die weitere Diffusion der Säure beeinflusst [Hara et al., 2005; Ganss et al., 2009b] und die Mineralisationsfront verdeckt.

Das persistierende Kollagengeflecht stellt bei der profilometrischen Quantifizierung des Mineralverlustes die größte Herausforderung dar. Während der optische Sensor nur die Oberfläche des Kollagengeflechtes darstellen kann, dringt der mechanische Taster bis zu einem unbestimmten Anteil in die organische Matrix ein. Beide Systeme sind demnach nicht in der Lage, die Mineralisationsfront abzubilden, solange sich das Kollagengeflecht über der Mineralisationsfront befindet. Dieses Problem wurde erstmalig in der Studie von Ganss et al. [2007] untersucht und beschrieben. Zudem führt eine kurze Verzögerung des Messbeginns zu einer Austrocknung der organischen Matrix, die mit einer Veränderung der profilometrischen Messergebnisse einhergeht [Ganss et al., 2007].

Nach der Studie von 2007 folgte die erste Methodenstudie zur Quantifizierung von Mineralverlusten am Dentin. In dieser Methodenstudie wurden die Ergebnisse verschiedener Messmethoden miteinander verglichen. Dabei bestätigte sich, dass der Mineralverlust profilometrisch erst nach Entfernung der organischen Matrix mit dem mechanischen Taster suffizient quantifiziert werden kann. Gleichzeitig wurde festgestellt, dass es keine Proportionalität zwischen der Kollagenoberfläche

beziehungsweise der Eindringtiefe des mechanischen Tasters und der Mineralisationsfront gibt [Ganss et al., 2009b].

In dieser ersten Methodenstudie wurden lange Demineralisationszeiten von 30 bis 120 Minuten gewählt. Dennoch sind vor allem zur Entwicklung von Präventionsstrategien kürzere Demineralisationszeiten von großer Bedeutung und sollen deshalb in der vorliegenden Studie besonders berücksichtigt werden.

Darüber hinaus soll in der vorliegenden Studie eruiert werden, ob der mechanische Taster bei kleineren Mineralverlusten und einer folglich geringeren Ausprägung der organischen Matrix bis zur Mineralisationsfront vordringen kann. Dadurch wäre die Quantifizierung des Mineralverlustes ohne aufwendiges Entfernen der organischen Matrix möglich.

Zusätzlich sollen Messungen zur Dimensionsänderung des Dentins, im Speziellen der organischen Matrix, durch Trocknungseffekte untersucht werden. Bereits nach wenigen Minuten, die bei der Positionierung der Proben oder bei Einstellungen am Profilometer verloren gehen, kommt es zu Schrumpfungprozessen, die die profilometrischen Messergebnisse erheblich beeinflussen. Es ist allerdings bislang noch unklar, in welchem Zeitraum und in welcher Größenordnung solche Dimensionsänderungen stattfinden.

Zur Klärung dieser Fragestellungen wird der durch Zitronensäure erzeugte erosive Mineralverlust im Dentin vor und nach Entfernung der organischen Matrix sowohl mit einem optischen Sensor als auch mit einem mechanischen Taster im feuchten und im dehydrierten Zustand erfasst. Zusätzlich werden die Messprobleme und Trocknungseffekte durch rasterelektronenmikroskopische Strukturaufnahmen visualisiert.

2. Literaturübersicht

2.1 Ätiologie und klinisches Erscheinungsbild von Erosionen

Erosionen werden als oberflächliche Zahnhartsubstanzverluste definiert, die durch einen chemischen Prozess ohne Einwirkung von Bakterien entstehen [Pindborg, 1970]. Dabei handelt es sich um einen pathologischen, chronischen und irreversiblen Zahnhartsubstanzverlust, der durch Säuren und/oder Chelatoren hervorgerufen wird [tenCate und Imfeld, 1996]. Eine Säureelimination führt zur Stagnation des Prozesses.

Die ursächlichen Säuren unterscheidet man nach extrinsischer (exogener) und intrinsischer (endogener) Herkunft. Säuren extrinsischer Herkunft sind Säuren aus Lebensmitteln [Hartles und Wagg, 1962], Säuren in Nahrungsergänzungsmitteln [Hellwig und Lussi, 2006] oder säurehaltige Dämpfe am Arbeitsplatz [Petersen und Gormsen, 1991].

Das erosive Potential einer Säure ist allerdings nicht allein vom pH-Wert abhängig. Ausschlaggebend sind die Menge der titrierbaren Säure, der Gehalt an Kalzium und Phosphat sowie die komplexbildenden Eigenschaften eines Lebensmittels. Es geht kein Zahnmineral in Lösung, wenn die dem Zahn umgebende Flüssigkeit einen ausreichenden Sättigungsgrad in Bezug auf das Zahnmineral aufweist [Larsen und Nyvad, 1999; Lussi et al., 2004].

Zu den durch intrinsische Säurequellen hervorgerufenen Erosionen kommt es bei Personen mit ausgeprägtem Reflux mit Regurgitationen sowie bei Patienten mit Essstörungen in Kombination mit Erbrechen, wie bei den Krankheitsbildern Bulimie und Anorexie [Eccles, 1979; Lussi et al., 1991; tenCate und Imfeld, 1996; Lussi et al., 2004; Bartlett, 2006; Pace et al., 2008].

Das klinische Erscheinungsbild von Erosionen variiert je nach Ursache, Häufigkeit und Dauer der einwirkenden Säure [Eccles, 1979; Ganss et al., 2002]. Erste Anzeichen für Erosionen können glatte, matte Zahnoberflächen ohne Perikymatien sein [Lussi et al., 2004]. Danach schreitet der Mineralverlust zentripetal voran und kann über eine reine Dentinexposition bis hin zur Pulpaeröffnung führen [Jaeggi und Lussi, 2006].

Erosionsdefekte sind meist lange Zeit schmerzlos [Lussi et al., 1991]. Seltener kann es jedoch bei einer Dentinexposition zu schmerzhaften Hypersensibilitäten bei Berührung sowie Wärme oder Kälte kommen [Lussi et al., 1991; tenCate und Imfeld, 1996]. Zudem können funktionelle und/oder ästhetische Beeinträchtigungen auftreten [Meurman et al., 1991].

Erosionsdefekte, die durch intrinsische Säuren hervorgerufen werden, manifestieren sich meist an Palatinal- und Okklusalflächen, wohingegen Erosionsdefekte, die durch extrinsische Säuren hervorgerufen werden, meist an Vestibulär- und Okklusalflächen vorzufinden sind [Scheutzel, 1996; Lussi und Jaeggi, 2008].

Vestibuläre und orale Manifestationen zeichnen sich durch eine flächenhafte Reduktion des Schmelzes bis hin zur Stufenbildung aus. Dabei verbleibt zervikal der Zahnkrone eine intakte Schmelzleiste. Dies ist zum einen durch marginale Plaquerückstände zu begründen, welche eine Diffusionsbarriere gegen den Säureangriff darstellen [Cheung et al., 2005]. Andererseits wirkt die ständig austretende Sulkusflüssigkeit neutralisierend auf die Säuren [Lussi et al., 2004]. An den Okklusalflächen verschwinden zuerst die konvexen Flächen, danach entstehen kleine Mulden bis hin zum kompletten Verlust der typischen Oberflächenstrukturen [Lussi und Jaeggi, 2008]. Füllungsrän­der können sich in diesem Bereich über dem Zahnniveau befinden und überkonturiert wirken [Schmidt et al., 2003].

Erosionen sind von anderen nicht kariesbedingten Zahnhartsubstanzdefekten wie Abrasionen (durch Kontakt zwischen einem Zahn und einem anderem Medium), Attritionen (durch Kontakt zwischen Zahn und Zahn) und Abfraktionen (keilförmige Defekte) klinisch abzugrenzen [Ganss und Lussi, 2006]. Diese nicht kariesbedingten Zahnhartsubstanzdefekte können zu unterschiedlichen Anteilen gleichzeitig auftreten und das klinische Erscheinungsbild eines Defektes verstärken [Eccles, 1979; Nunn et al., 1996; Jaeggi und Lussi, 1999; Attin et al., 2000].

Zur klinischen Beurteilung von Erosionen eignet sich der von Bartlett, Ganß und Lussi erarbeitete Basic Erosive Wear Examination Index (BEWE). Diese Methode dient der Quantifizierung von Erosionen und liefert eine Empfehlung zur weiteren Therapie. Die Therapie von Erosionen beginnt zunächst mit der Erkennung und

Reduktion der Säurequellen. Die Notwendigkeit restaurativer Maßnahmen hängt dabei vom Aktivitätszustand und dem Schweregrad der Erosionen ab [Bartlett et al., 2008].

Wie bereits erwähnt betreffen initiale Erosionsdefekte zunächst nur den Schmelz. Zervikal und im Bereich der mesiobukkalen Höcker ist der Schmelzmantel jedoch sehr dünn [Kono et al., 2002], sodass es an diesen Stellen schon frühzeitig zur Exposition von Dentin kommen kann.

Erosionsdefekte im Dentin können im Gegensatz zu einer Dentinkaries durch spezielle Behandlungsmaßnahmen zu jedem Zeitpunkt gestoppt werden. Dementsprechend stellt Dentin eine wichtige Struktur in der Erosionsforschung dar.

2.2 Histologie von gesundem Dentin

In der Erosionsforschung werden viele Messmethoden auf gleiche Art und Weise sowohl für Schmelz als auch für Dentin angewendet. Allerdings unterscheidet sich die Zusammensetzung beider Zahnhartsubstanzen erheblich voneinander. Aus diesem Grund sind einige Messmethoden nicht einfach von Schmelz auf Dentin übertragbar.

Im Nachfolgenden soll die komplexe Histologie von Dentin erläutert werden, um die Histopathologie von Dentinerosionen sowie die für einige Messmethoden entstehenden Probleme verständlich zu machen.

Ein entscheidender Unterschied zwischen beiden Geweben ist der organische Anteil. Im Gegensatz zu Schmelz besteht Dentin zu 30 Vol% aus organischem Material (Schmelz zu 2 Vol%). Dies wiederum besteht zu 90% aus Kollagen (Typ I, Typ V, Typ VI, bei der frühen Dentinmatrixbildung auch Typ III) und nur zu 10% aus nichtkollagener Grundsubstanz (Proteoglykane, Glykoproteine/Sialoproteine, Phosphoproteine, Lipide, Serumproteine, Wachstumsfaktoren) [Radlanski, 2011]. Weiterhin besteht ausgereiftes Dentin zu 45-50 Vol% aus anorganischem Material und ist demnach nur halb so stark mineralisiert wie Schmelz (86 Vol%) [Nikiforuk, 1985; Radlanski, 2011]. Auch die Hydroxylapatitkristalle sind wesentlich kleiner und dünner als im Schmelz. Sie setzen sich hauptsächlich aus Kalzium und Phosphat im Gewichtsverhältnis 1:2,13 zusammen. Bei dem Apatit handelt es sich um ein kalziumarmes, karbonatreiches Apatit [Radlanski, 2011] mit einem

Karbonatanteil zwischen 5-6% [Featherstone und Lussi, 2006]. Außerdem sind geringe Mengen an Magnesium sowie einige Spurenelemente vorzufinden [Radlanski, 2011]. Bei den restlichen 25 Vol% handelt es sich um Dentinliquor [Radlanski, 2011], der zu 95% aus Wasser besteht [Pashley, 1996]. Dadurch wird Dentin im Gegensatz zu Schmelz (12 Vol%) zu einem wasserreichen Gewebe, das anfällig gegenüber Austrocknung ist.

Dentin macht den größten Teil des menschlichen Zahnes aus und wird von Odontoblasten aus ektomesenchymaler Herkunft zeitlebens gebildet. Die Morphologie variiert je nach Lokalisation im Zahn und unterliegt Veränderungen durch Alterungs- und Erkrankungsprozesse.

Den Hauptanteil des Primär- und Sekundärdentins bildet zirkumpulpaes Dentin, welches von der Schmelz-Dentin-Grenze bis zur Pulpa von Dentintubuli durchzogen wird, in denen sich Odontoblastenfortsätze sowie Kollagenfibrillen, afferente Nervenendigungen und Dentinliquor befinden [Schroeder, 2000b]. Im koronalen Dentin haben die Dentintubuli einen s-förmigen Verlauf, während sie apikal eher geradlinig verlaufen. Die Kanaldichte wird mit 10.000-25.000 Kanälen/mm² im Bereich der Schmelz-Dentin-Grenze und 30.000-52.000 in Pulpanähe angegeben [Radlanski, 2011] und variiert stark mit dem Alter des Zahnes [Carrigan et al., 1984].

Im Gegensatz zu Schmelz wird Dentin in zwei unterschiedlich stark mineralisierte Anteile unterteilt. Dazu zählen das weniger stark mineralisierte, kollagenreiche intertubuläre Dentin, welches sich zwischen den Dentintubuli befindet, und das stärker mineralisierte peritubuläre Dentin, welches die Kanalwand der Dentintubuli auskleidet.

Das weniger stark mineralisierte intertubuläre Dentin bildet das organische Grundgerüst des Dentins [Radlanski, 2011]. Es setzt sich hauptsächlich aus Fasern, die zu 90% aus Kollagenfasern (davon 97% Typ I Kollagen [Shuyuan M. et al., 2009]) bestehen, sowie aus nichtkollagenen Proteinen und Proteoglykanen zusammen [Gotliv et al., 2006]. Das Kollagengeflecht verläuft quer zur Verlaufsrichtung der Dentintubuli. Zwischen den Kollagenfasern befindet sich sowohl intrafibrillär als auch extrafibrillär bis zu 30 Vol% mineralisches Material [Pashley, 1996], das in unregelmäßig angeordneten Hydroxylapatitkristallen

vorliegt [Kinney et al., 2003]. Die Mikrohärtigkeit des intertubulären Dentins nimmt von 0,52 GPa nahe der Schmelz-Dentin Grenze zu 0,18 GPa in Pulpanähe ab [Kinney et al., 1996].

Im Gegensatz dazu ist peritubuläres Dentin sehr dicht und homogen mineralisiert (95 Vol% anorganisches Material) [Pashley, 1996]. Es enthält größere Mengen an sauren und neutralen Mukopolysacchariden [Schroeder, 2000a] und keine Kollagenfasern [Habelitz et al., 2007].

Die Bildung des peritubulären Dentins setzt im Gegensatz zum intertubulären Dentin etwas später ein und beginnt im koronalen Anteil. Demzufolge ist in den koronalen Dentinschichten mehr peritubuläres Dentin vorzufinden als in Pulpanähe und im apikalen Bereich [Takuma und Eda, 1966]. Durch die Bildung des peritubulären Dentins kommt es zu einer Verringerung der Tubulidurchmesser von ursprünglich 3 µm auf 0,6-0,8 µm [Garberoglio und Cozzani, 1979; Pashley, 1996] und kann sogar zur vollständigen Obliteration der Kanäle führen, da es zeitlebens gebildet wird.

Die Zusammensetzung des peritubulären Dentins ist im Zahn überall gleich. Die Mikrohärtigkeit des peritubulären Dentins ist daher im Gegensatz zum intertubulären Dentin unabhängig von der Lokalisation im Zahn und liegt zwischen 2,23 und 2,54 GPa [Kinney et al., 1996]. Im Bereich des Prädentins und des Interglobulärdentins bleibt die Bildung des peritubulären Dentins jedoch aus.

2.3 Histopathologie von Dentinerosionen

Dadurch, dass Dentin einen hohen organischen Anteil besitzt, handelt es sich bei einem Säureangriff nicht um einen reinen Substanzverlust, sondern eher um eine Freisetzung organischer Verbindungen auf der Oberfläche. Dabei geht das kalziumarme, karbonatreiche Hydroxylapatit schneller in Lösung als reines Hydroxylapatit [Featherstone und Lussi, 2006]. Zunächst löst die Säure das stärker mineralisierte peritubuläre Dentin auf. Es kommt zu einer Vergrößerung der Tubulidurchmesser. Anschließend werden die Kollagenfasern des intertubulären Dentins freigelegt, durch den Säureangriff an sich jedoch nicht abgebaut. Extrafibrilläre Kristalle lösen sich vollständig auf, während intrafibrillär einzelne unterschiedlich große Mineralkristalle verbleiben können [Selvig, 1968].

Das Kollagenflechtwerk wird bereits nach einem 30 Sekunden andauernden Kontakt der Dentinoberfläche mit Zitronensäure sichtbar [Breschi et al., 2002]. Das Ausmaß der Demineralisation hängt von der Säureart, der Säurekonzentration sowie der Einwirkungsdauer ab. Mit zunehmender Dicke des Kollagengeflechts wird die Diffusion der Säure behindert und damit die Demineralisationsgeschwindigkeit reduziert [Ganss et al., 2009a]. Nach Entfernung der organischen Matrix steigt die Demineralisationsgeschwindigkeit an [Hara et al., 2005].

Das freigelegte Kollagengeflecht ist resistent gegenüber physikochemischen Einflüssen. Das Bürsten des Kollagens mit einem Bürstdruck von 2 N und mehr führt weder zur Entfernung des Kollagens, noch zu Strukturveränderungen [Ganss et al., 2007]. Die Zugfestigkeit des Kollagengeflechts wird mit 26-32 MPa angegeben und ist abhängig von der Ausrichtung der Tubuli zur Zugrichtung [Sano et al., 1994].

Nach der Säureeinwirkung kann Dentin histologisch in unterschiedliche Schichten eingeteilt werden. Bei der obersten Schicht handelt es sich um eine vollständig demineralisierte Kollagenschicht. Dieser Schicht folgt eine teilweise mineralisierte Schicht, die wiederum in eine vollständig mineralisierte Schicht übergeht [Kinney et al., 1995]. Rasterelektronenmikroskopische Bilder zeigen, dass die teilweise mineralisierte Schicht nicht immer vorhanden ist, sondern auch ein trennscharfer Übergang zwischen der demineralisierten Kollagenschicht und dem mineralisierten Dentin vorliegen kann [Lussi et al., 2011].

Das durch die Säure freigelegte Kollagengeflecht liegt über der Mineralisationsfront und kann in vitro nur enzymatisch vollständig entfernt werden. Dementsprechend muss die organische Matrix bei vielen Messmethoden hinreichend berücksichtigt werden und die Art der Probenvorbereitung an die Fragestellung angepasst werden.

Bereits aus der Studie von 2007 ist bekannt, dass eine kurze Verzögerung des Messbeginns zu einer Dehydrierung und dadurch zu einem Zusammenbruch der organischen Matrix führt [Ganss et al., 2007]. Die kurzen Verzögerungen können durch Einstellungen am Profilometer oder durch die Positionierung der Probe auf dem Messtisch entstehen. Aber auch zu lange Messzeiten bei mehrfach

hintereinander getätigten Profilschrieben oder einer großen einzuscannenden Fläche können eine ungewollte Dehydrierung verursachen. Bislang ist allerdings noch nicht geklärt, in welchem Zeitraum und in welcher Dimension dieser Zusammenbruch der organischen Matrix einen Einfluss auf die profilometrischen Messergebnisse hat.

2.4 Messverfahren in der Erosionsforschung

Abhängig vom Studiendesign und der Fragestellung kommen in der Erosionsforschung viele verschiedene Messmethoden zum Einsatz, um die Komplexität des Mineralverlustes verstehen und messen zu können. Diese Methoden können in chemische, optische und physikalische Verfahren eingeteilt werden und dabei destruktiv oder nicht destruktiv auf das zu untersuchende Material wirken. Weiterhin werden quantitative und qualitative Messmethoden angewendet. Die meistgenutzten Methoden werden für in vitro Studien am Schmelz angewendet. Sie wurden bereits validiert und ausführlich beschrieben [Barbour und Rees, 2004; Hannig et al., 2008]. Diese Methoden können allerdings aufgrund der im Kapitel 1.2.2 dargestellten Eigenschaften von Dentin nicht einfach von Schmelz auf Dentin übertragen werden und bedürfen einer anderen Handhabung. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über Messverfahren gegeben werden, die für die Erosionsforschung relevant sind.

2.4.1 Chemische Testverfahren

Chemische Testverfahren sind sensitive Verfahren, die gelöste Mineralien in einer Flüssigkeit bestimmen. Diese quantitativen Verfahren finden sowohl bei Dentin- als auch bei Schmelzproben Anwendung und gehören zu den etablierten Methoden in der Erosionsforschung. Meist wird der Gehalt von gelöstem Kalzium und Phosphat in einer Erosionslösung bestimmt. Es kann jedoch auch die Änderung des pH-Wertes durch die Freisetzung von OH^- Ionen bei der Demineralisation von Hydroxylapatit bestimmt werden. Bei diesen Verfahren werden die Daten in Echtzeit gewonnen [Barbour und Rees, 2004]. Sie geben jedoch weder Aufschluss über einen Mineralgewinn noch über die physikalischen oder morphologischen Veränderungen des verbleibenden Gewebes [Schlueter et al., 2011]. Kalzium und Phosphat können sowohl mit einer ionenselektiven Elektrode als auch mit der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) oder photometrisch bestimmt werden [Barbour und Rees, 2004; Ganss et al., 2005;

Attin et al., 2005a; Attin et al., 2005b; Hara und Zero, 2008; Wiegand et al., 2009a; Ganss et al., 2009b].

Speziell im Dentin haben diese Methoden den Vorteil, dass der Mineralverlust unabhängig vom Vorhandensein der organischen Matrix gemessen werden kann. Es ist jedoch darauf zu achten, dass vor allem bei der Beurteilung initialer Läsionen der smear layer der Probe vor der Messung entfernt wird, da sonst die Menge des gelösten Minerals nicht suffizient bestimmt werden kann [Schlueter et al., 2011].

Kalzium und Phosphatanalysen wurden sowohl in Studien in vitro und in vivo [Young et al., 2006] angewendet. Allerdings ist bei in vivo Studien darauf zu achten, dass es nicht zur Kontamination mit Speichel kommt [Schlueter et al., 2011].

2.4.2 Messung des Härtegrades

Bei der Messung des Härtegrades misst man den mechanischen Widerstand, den ein Werkstoff einem härteren Prüfkörper entgegensetzt. Es handelt sich um ein destruktives Verfahren, bei dem ein Prüfkörper (Brinell-Härte: Stahlkugel; Vickers-Härte: Gleichseitige Diamantpyramide; Knoop-Härte: Rhomboide Diamantpyramide) mit einer bestimmten Kraft für eine bestimmte Zeit auf die Zahnoberfläche gebracht wird. Die Impression wird mikroskopisch vermessen und in μm angegeben. Die Differenz zwischen dem Ausgangswert und dem Messwert nach dem Versuch gibt Aufschluss über den Mineralverlust oder Mineralgewinn auf der Probenoberfläche [Arends und ten Bosch, 1992]. Die Messung des Härtegrades kann sowohl bei Studien in vitro als auch in situ angewendet werden. Dazu sind plane sowie parallele Versuchsflächen erforderlich, natürliche Zahnoberflächen können nicht verwendet werden [Arends und ten Bosch, 1992].

Mikrohärtemessungen werden meist in der Kariesforschung angewendet. Dabei unterscheidet man zwischen der Messung der Oberflächenmikrohärte und der Querschnittsmikrohärte.

Diese Methoden liefern jedoch nur begrenzt zuverlässige Ergebnisse im Dentin. Aufgrund der unterschiedlich mineralisierten Bereiche greift man auf atomkraftmikroskopiegestützte Nanoindentationstechniken zurück, um selektiv peritubuläres oder intertubuläres Dentin messen zu können. Allerdings ist dabei zu

beachten, dass die Mikrohärtigkeit des intertubulären Dentins von der Lokalisation im Zahn abhängig ist [Kinney et al., 1996].

In der Erosionsforschung ist diese Methode nur bei initialen erosiven Demineralisationen anwendbar, da sie lediglich Aufschluss über die Änderung des Härtegrades als Surrogatkriterium für die Änderung des Mineralgehalts gibt. Bei längeren Demineralisationszeiten kommt es vor allem bei Schmelzerosionen zu einem zusätzlichen Volumenverlust, der mit einer Mikrohärtigkeitmessung nicht dargestellt werden kann. Bei Messungen am Dentin werden durch den erosiven Säureangriff kollagene Fasern freigelegt. Diese Kollagenfasern besitzen jedoch eine zu hohe Rückstellungskraft, um suffiziente, reproduzierbare Härtemessungen durchführen zu können. Zudem können Härtemessungen durch Trocknungsartefakte beeinflusst werden [Herkstroter et al., 1989].

2.4.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie ermöglicht die optische Beurteilung der Proben und kann durch Elementanalysen ergänzt werden. Dabei handelt es sich um ein vorwiegend qualitatives, destruktives Verfahren. Es können natürliche und polierte Oberflächen betrachtet werden. Abhängig von der Fragestellung muss Dentin jedoch aufgrund des hohen Wasseranteils vorher getrocknet werden. Die Entwässerung erfolgt entweder durch Kritisch-Punkt-Trocknung oder durch Gefriertrocknung [Attin, 2006]. Anschließend werden die Proben mit Gold bedampft, um eine ausreichende Leitfähigkeit zu erreichen. Bei der atmosphärischen Rasterelektronenmikroskopie (ESEM) können biologische Zellen oder biologische Gewebe im feuchten Zustand [Gwinnett, 1994] und ohne Metall- oder Kohlenstoffbedampfung mit geringem Vakuum mikroskopiert werden [Attin, 2006]. Dennoch kann auch mit dieser Methode der Kollaps der organischen Matrix nicht verhindert werden [Dusevich und Eick, 2002; Wang und Yao, 2010].

2.4.4 Mikroradiografie

Die Mikroradiografie wird hauptsächlich bei De- und Remineralisationsvorgängen in der Kariesforschung angewendet. Das Prinzip besteht in der Messung der Röntgenstrahlenabsorption der Zahnhartsubstanz. Dazu können sowohl Proben mit einer natürlichen Zahnoberfläche als auch planoparallele Proben benutzt werden [de Josselin de Jong et al., 1988].

Der Mineralgehalt einer Probe wird dabei densitometrisch bestimmt. Der zugrundeliegende Algorithmus berechnet den Mineralgehalt unter der Annahme, dass die Probe zu 100% aus Mineral (stöchiometrischem Hydroxylapatit) besteht. Diese Methode wurde eigentlich ausschließlich für Schmelz entwickelt und validiert, wird aber auch im Dentin angewandt. Da der Mineralgehalt im Dentin deutlich geringer ist, muss die Methode entsprechend modifiziert werden.

In der Erosionsforschung finden die longitudinale Mikroradiografie und die transversale Mikroradiografie Anwendung. Die longitudinale Mikroradiografie gehört zu den nicht destruktiven Methoden [Ganss et al., 2005] und dient der quantitativen Erfassung des Gesamtmineralgehaltes. Für Messungen am Dentin werden die Proben parallel zur Zahnoberfläche präpariert und müssen eine Dicke von mindestens 800 µm aufweisen. Die erste Aufnahme (Basescan) erfolgt vor Versuchsbeginn und dient zur Bestimmung des Basismineralgehaltes der Probe. Der Mineralgehalt wird im Vergleich zu einer Aluminiumkalibriertreppe mit definierter Röntgenabsorption bestimmt. Nach der Durchführung des Versuches werden erneut Mikroradiogramme erstellt und mit dem Basescan verglichen. Die Differenz beider Mikroradiogramme drückt den Mineralgewinn beziehungsweise den Mineralverlust aus. Um mit dieser Methode reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, muss der erosive Mineralverlust im Schmelz mindestens 25 µm aufweisen [Ganss et al., 2009b]. Für Dentin muss der Wert entsprechend umgerechnet werden.

Bei der transversalen Mikroradiografie werden die Proben mit einer Dicke von 90-200 µm senkrecht zur Zahnoberfläche präpariert [Arends und ten Bosch, 1992]. Anschließend wird der Mineralgehalt als Funktion der Tiefe dargestellt. Durch die Modifikation von Hall et al. [Hall et al., 1997] und Amaechi et al. [Amaechi et al., 1998] ist die Quantifizierung eines erosiven Substanzverlustes möglich.

Sowohl die longitudinale Mikroradiografie als auch die transversale Mikroradiografie misst den Mineralverlust unabhängig vom Vorhandensein der organischen Matrix im Dentin, liefert jedoch keinerlei Informationen bezüglich der Struktur des verbleibenden Gewebes. Zudem ist diese Methode vor allem bei kurzen Demineralisationszeiten nicht sensitiv genug [Ganss et al., 2009b].

2.4.5 Profilometrie

Die Profilometrie gehört zu den am häufigsten genutzten Methoden, um Erosionen im Schmelz, aber auch im Dentin zu quantifizieren. Dazu werden sowohl optische Sensoren, die die Oberfläche mit Hilfe der Konfokaltechnik oder eines Lasertriangulationssensors berührungslos abscannen, als auch mechanische Taster, die mit einer Diamant- oder Stahlspitze taktil die Oberflächen abfahren, genutzt. Dabei werden die Referenzflächen der Schmelz- oder Dentinproben vor Versuchsbeginn mit säureresistenten Materialien abgedeckt. Nach der Versuchsdurchführung wird die Abdeckung entfernt und der Taster fährt die unbehandelte polierte oder natürliche Referenzfläche [Ganss et al., 2000] sowie die erodierte Versuchsfläche ab. Der vertikale Abstand beider Flächen stellt den Substanzverlust beziehungsweise den Substanzgewinn einer Probe dar. Die abgefahrenen Strecken werden danach digital als zwei- oder dreidimensionale Profile dargestellt und von der dazugehörigen Software ausgewertet.

Profilometrische Auswertungen finden sowohl bei Studien *in vitro*, *in situ* als auch *in vivo* Anwendung [Schlueter et al., 2011]. Bei *in vivo* Studien werden beispielsweise säureresistente sternförmige Marker, die als Referenzfläche dienen, auf von Erosionen betroffene Zähne geklebt. Durch das Vermessen zeitlich aufeinanderfolgender Studienmodelle kann die Progression beziehungsweise Stagnation von Erosionen beurteilt werden [Schlueter et al., 2005]. Die höchste Sensitivität wird jedoch bei planen polierten Proben erreicht, was in klinischen Studien nicht realisierbar ist [Ganss et al., 2000].

Mit dieser Methode können sowohl initiale als auch ausgeprägte Substanzverluste gemessen werden [Ganss et al., 2009b]. Die Proben werden dabei nicht irreversibel geschädigt. Damit zählt diese Methode zu den nicht destruktiven Verfahren.

Bei der mechanischen Profilometrie spielen Größe, Art und Form des Tasters eine Rolle. Der Radius der Spitze des Tasters beeinflusst dabei die Auflösung des Profils [Field et al., 2010]. Auch Vibrationen oder elektrische Interferenzen können die Messungen negativ beeinflussen. Außerdem können weiche oder locker auf der Probe liegende Substanzen von mechanischen Tastern verdrängt oder zerstört werden. Dies stellt beispielsweise ein Problem bei der Vermessung von Abformungen (Vinylpolysiloxane) dar [Rodriguez et al., 2009]. Einer der größten

Vorteile ist die gute Feuchtigkeitsresistenz des mechanischen Tasters. Bei der optischen Profilometrie liegen die Fehlerquellen in der Farbe und der Transparenz des zu vermessenden Materials, was vor allem beim Messen von Abformungen zu berücksichtigen ist [DeLong et al., 2001; Rodriguez et al., 2009]. Ein weiteres Problem besteht bei Wasserrückständen auf der Probe, da Wasser die Reflektion beeinflussen kann.

Die profilometrische Ermittlung des Substanzverlustes bei Erosionsdefekten im Schmelz stellt kein Problem dar. Aufgrund der komplexen Histologie des Dentins, des großen Anteils organischer Komponenten und des hohen Wasseranteils ist diese Methode jedoch nicht einfach von Schmelz auf Dentin übertragbar. Daher ist sowohl die Auswahl des Tasters als auch die Methode der Probenvorbereitung davon abhängig, ob man den Mineralverlust, den Abbau der organischen Matrix oder die Dicke der organischen Matrix an sich messen möchte.

In der Studie von 2007 konnte gezeigt werden, dass der optische Sensor ausschließlich die Oberfläche des freigelegten Kollagengeflechts abscannt. Im Gegensatz dazu gräbt sich der mechanische Taster bis zu einem unbestimmten Anteil in die organische Matrix ein, erreicht jedoch nicht die Mineralisationsfront [Ganss et al., 2007]. Es konnte keine Proportionalität zwischen der Eindringtiefe des Tasters und der Mineralisationsfront der Probe festgestellt werden [Ganss et al., 2009b]. Dieses Phänomen wurde bei langen Demineralisationszeiten von 30 bis 120 Minuten festgestellt.

Nach enzymatischer Entfernung der organischen Matrix konnten sowohl in der Studie von 2007 als auch in der ersten Methodenstudie mit dem optischen Sensor sowie mit dem mechanischen Taster annähernd gleiche Ergebnisse erzielt werden. Dennoch wurde mit dem optischen Sensor ein geringerer Mineralverlust als mit dem mechanischen Taster gemessen. Dies ist auf kleine organische Rückstände auf der Dentinprobe zurückzuführen, die mit dem Rasterelektronenmikroskop nachgewiesen wurden. Diese Auflagerungen kommen bei größeren Demineralisationszeiten häufiger vor, was die zunehmende Differenz zwischen den Werten des optischen Sensors und des mechanischen Tasters bei längeren Demineralisationszeiten erklärt [Ganss et al., 2009b]. Es ist jedoch noch unklar, ob der mechanische Taster die Rückstände verdrängt oder sogar in die teilmineralisierte beziehungsweise vollständig mineralisierte Oberfläche eindringt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass profilometrisch die Mineralisationsfront bei größeren Substanzverlusten erst nach Entfernung der organischen Matrix unter suffizienter Befeuchtung der Proben adäquat quantifiziert werden kann. Die Werte, die unter diesen Messbedingungen erhoben wurden, stimmen mit den Werten der Kalziumanalyse, die unabhängig vom Vorhandensein der organischen Matrix den Mineralverlust quantifiziert, überein. Daher können sie als die „wahren Werte“ für den profilometrisch quantifizierten Mineralverlust angesehen werden.

2.5 Hinführung zur Fragestellung und Zielsetzung

Die Profilometrie ist ein etabliertes Verfahren zur Quantifizierung von erosiven Substanzverlusten im Schmelz. Die komplexe histologische Struktur von Dentin führt jedoch zu Messproblemen, die bislang nicht hinreichend bearbeitet worden sind.

Erstmalig wurde der Einfluss der organischen Matrix auf die profilometrische Quantifizierung des Mineralverlustes in der Studie von Ganss et al. [2007] beschrieben. Ziel der Studie war es, den Einfluss von Abrasionen auf die organische Matrix zu untersuchen und dabei die Messergebnisse etablierter Messmethoden zur Quantifizierung des Mineralverlustes miteinander zu vergleichen. Dazu wurde der Substanzverlust sowohl mit dem mechanischen als auch mit dem optischen Profilometer sowie mit der longitudinalen Mikroradiografie ermittelt. Alle drei Messverfahren führten jedoch zu unterschiedlichen Messergebnissen, was durch das persistierende Kollagengeflecht zu begründen ist. Während der optische Taster die Oberfläche der organischen Matrix abfährt, dringt der mechanische Taster in die organische Matrix ein, erreicht jedoch nicht die Mineralisationsfront. Zudem wurde in dieser Studie festgestellt, dass eine kurze Dehydration der Probe an der Raumluft zu Dimensionsveränderungen des Kollagengeflechtes führt und dadurch die profilometrischen Messergebnisse zusätzlich beeinflusst.

Erst nach Entfernung der organischen Matrix erzielten die verschiedenen Messverfahren annähernd gleiche Ergebnisse. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der Mineralverlust erst nach enzymatischer Entfernung des Kollagengeflechtes profilometrisch quantifiziert werden kann.

Es folgte eine erste Methodenstudie zur Quantifizierung des Mineralverlustes am Dentin, in der die Ergebnisse verschiedener Messmethoden wie der Kalziumanalyse, der longitudinalen Mikroradiografie und der mechanischen und optischen Profilometrie miteinander verglichen wurden. Die Werte der Kalziumanalyse wurden dazu als Bezugswerte für den tatsächlichen Mineralverlust angesehen und als „wahre Werte“ betrachtet, da diese Methode unabhängig vom Vorhandensein der organischen Matrix den Mineralverlust quantifiziert. Für die longitudinale Mikroradiografie waren die gewählten

Demineralisationszeiten von 30 bis 120 Minuten zu kurz, um adäquate Ergebnisse zu erzielen.

In dieser Studie konnte bestätigt werden, dass der Mineralverlust profilometrisch erst nach Entfernung der organischen Matrix suffizient quantifiziert werden kann. Dabei kann der mechanische Taster die Mineralisationsfront präziser abbilden, da der optische Taster die organischen Rückstände auf der Probenoberfläche mit abscaant und infolgedessen den Mineralverlust, vor allem bei längeren Demineralisationszeiten, leicht unterschätzt.

Um eine Austrocknung der organischen Matrix und eine dadurch resultierende Änderung der Messergebnisse zu vermeiden, wurden in dieser Methodenstudie die Messungen jeweils unter feuchten Messbedingungen durchgeführt [Ganss et al., 2009b].

Dennoch blieben weitere Fragen zur profilometrischen Quantifizierung des Mineralverlustes am Dentin offen, die in dieser vorliegenden Studie eruiert werden sollen.

Nachfolgend werden noch einmal die drei wichtigsten Aspekte, die zu Messproblemen bei der profilometrischen Quantifizierung des Mineralverlustes am Dentin führen, dargestellt:

1. Die Messsysteme:

Bei der Quantifizierung größerer Substanzverluste hat sich gezeigt, dass optische und mechanische Messsysteme zu unterschiedlichen Ergebnissen führen und dass beide Systeme den Verlust mineralisierten Gewebes erst nach aufwendiger Entfernung der organischen Matrix darstellen können.

2. Die Handhabung der Proben:

Dentin hat einen hohen Wasseranteil und unterliegt unter Raumluft Trocknungsphänomenen. Besonders die organische Matrix kann während der Messung Schrumpfungsprozessen unterliegen, die die Messergebnisse erheblich verändern können. Bislang ist jedoch nichts über die zeitliche und zahlenmäßige Dimension dieser Phänomene bekannt.

3. Die organische Matrix:

Säureeinwirkungen führen zur Demineralisierung der organischen Dentinmatrix, die als Struktur auf der Probenoberfläche persistiert und deutlich andere

Eigenschaften aufweist als das mineralisierte Gewebe. Je nach Fragestellung ist die organische Matrix Zielgewebe oder Störgröße, was eine entsprechende Vorbereitung und Handhabung der Proben bei profilometrischen Messungen erforderlich macht.

Vor diesem Hintergrund sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Sind mechanische Tastsysteme bei geringen Substanzverlusten zur Quantifizierung von Mineralverlusten geeignet, ohne die organische Matrix zu entfernen?
2. In welchem Zeitraum kommt es zu Dimensionsänderungen von Proben aufgrund von Trocknungsphänomenen?
3. In welcher Größenordnung finden solche Dimensionsänderungen statt und wie stellen sich diese Dimensionsänderungen bei unterschiedlichen Substanzverlusten, mit und ohne demineralisierte organische Matrix und bei Verwendung optischer und mechanischer Messsysteme dar?

Um die dargestellten Messprobleme zu veranschaulichen, wird zusätzlich zu den profilometrischen Messungen die histologische Struktur von Proben nach Einwirkung des erosiven Mediums, nach Entfernung der entmineralisierten organischen Matrix und nach verschiedenen Trocknungsverfahren elektronenmikroskopisch dargestellt. Dimensionsänderungen der Proben durch Exposition an der Raumluft werden durch 3D-Scans visualisiert.

Aus den Ergebnissen sollen schließlich Empfehlungen für geeignete Verfahren zur profilometrischen Analyse von Dentinproben abgeleitet werden.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchsaufbau

3.1.1 Herstellung der Dentinproben

Zur Herstellung der Dentinproben wurden humane, vollständig retinierte dritte Molaren verwendet. Unmittelbar nach der Osteotomie wurden die Zähne zur Desinfektion und Konservierung in einer vollständig gesättigten Thymol-Lösung (Chem. 1) aufbewahrt.

Zur Weiterverarbeitung wurden die Zähne mit einem Skalpell (Mat. 1) von eventuell anhaftenden Gewebe- und Blutresten befreit. Danach wurde jeder Zahn mit einem lichthärtenden Fixationskleber (Mat. 2) und einem Polymerisationslichtgerät (Mat. 3) mit der Okklusalfäche auf einem Plexiglasobjektträger (Mat. 4) befestigt. Mit dem mit einer diamantierten Bandsäge ausgestatteten Exakt-Trennschleifsystem (Mat. 5) wurde die Wurzel unter ausreichender Wasserkühlung im Bereich der Schmelz-Zement-Grenze von der Krone abgetrennt und verworfen. Die Schlittenbelastung betrug dabei ca. 150 g. Von den verbliebenen Zahnkronen wurde der äußere Schmelzmantel abgetrennt und longitudinale Dentinproben mit einer Dicke von ca. 1,0 mm präpariert. Diese Dentinschnitte wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei 100% Luftfeuchtigkeit gelagert. Die Dicke der Dentinproben wurde einzeln mit einer Mikrometerschraube (Mat. 6) überprüft und dokumentiert.

Für den Schleifvorgang wurden die Proben zunächst mit der pulpalen Seite nach oben plan auf einem Plexiglasobjektträger befestigt und mit dem Exakt-Mikroschleifsystem (Mat. 7) und Diamantschleifscheiben der Körnung 15 μm (Mat. 8) plan geschliffen. Das Auflagegewicht betrug bei diesem Vorgang 400 g. Die pulpale Probenfläche wurde markiert und anschließend vorsichtig vom Plexiglasobjektträger abgelöst. Die Probe wurde mit der noch unbeschliffenen Seite nach oben auf den Plexiglasobjektträger aufgeklebt und nach dem oben stehenden Schema auf eine Dicke von etwa 800 μm reduziert. Abschließend wurden die Proben mit einer Diamantschleifscheibe der Körnung 3 μm (Mat. 9) und einem Auflagegewicht von 100 g poliert, bis eine Probendicke von 750 μm ($\pm 20 \mu\text{m}$) erreicht wurde. Es resultierten planoparallele Dentinschliffe mit einem

mindestens 3x3 mm großem Versuchsfeld. Alle Schleif- und Polierschritte wurden unter ausreichender Wasserkühlung durchgeführt.

Die so angefertigten Proben wurden profilometrisch auf ihre Planheit untersucht und bei einer Abweichung von mehr als 0,5 µm aussortiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei 100% Luftfeuchtigkeit gelagert.

Insgesamt wurden auf diese Weise 125 Proben hergestellt.

3.1.2 Herstellung der Lösungen

Demineralisationslösung:

Zur Herstellung einer 0,05 molaren Zitronensäure wurden 10,21 g Zitronensäure Monohydrat (Chem. 2) mit Aqua dest. auf 1000 g aufgefüllt.

Kollagenaselösung:

Zunächst wurde eine Mineralsalzlösung nach den Angaben von Gerrard und Winter [1986] angesetzt. Dazu wurden 0,4 g Orthophosphorsäure (Chem. 3) in 40 ml Aqua dest., 1,5 g Kaliumchlorid (Chem. 4) in 100 ml Aqua dest. und 1 g Natriumhydrogenkarbonat (Chem. 5) in 100 ml Aqua dest. gelöst. Diese Lösungen wurden zusammengefügt und bis zu 600 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Anschließend wurden 0,2 g Kalziumchlorid (Chem. 6) in 100 ml Aqua dest. gelöst und unter Rühren hinzugefügt. Der Ansatz wurde mit Aqua dest. zu einem Volumen von 1 Liter aufgefüllt.

Anschließend wurden 15 kU Kollagenase (Chem. 7) in 150 ml Mineralsalzlösung gelöst. Dies entspricht einer Konzentration von 100 U/ml.

3.1.3 Versuchsdurchführung

Für die spätere Auswertung wurden Glasobjektträger (Mat. 10) mit jeweils 5 Bohrungen versehen (Abb. 1). Diese dienen bei der profilometrischen Auswertung zum wiederholten Auffinden desselben zu untersuchenden Areals. Die Bohrungen wurden unter Verwendung eines Winkelstücks (Mat. 11) und eines Diamantbohrers (Mat. 12) parallel zur Längsachse des Objektträgers auf eine Linie gesetzt und beschriftet. Danach wurden die Bohrungen mit einem wasserfesten Filzstift markiert. Der untere Teil des Glasobjektträgers wurde mit

einem Sandstrahlgerät (Mat. 13) bestrahlt, um ein späteres Befestigen der Proben auf dem Glasobjektträger zu ermöglichen.

Anschließend wurden die Proben mit dem lichthärtenden Fixationskleber nach dem unten stehenden Schema (Abb. 1) auf den Glasobjektträgern angebracht und zur Hälfte mit dem lichthärtenden Fixationskleber abgedeckt. Diese durch Kunststoff abgedeckte Fläche diente später als Referenzfläche für die profilometrischen Messungen, während der nicht abgedeckte Bereich das Versuchsareal darstellte. Das Versuchsareal wurde anschließend sorgfältig auf Verunreinigungen untersucht.

Fünf Proben pro Gruppe wurden mit einer diamantierten Trennscheibe (Mat. 14) in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte wurde mit einer Probennummer und die andere Hälfte mit derselben Probennummer und dem Buchstaben „a“ gekennzeichnet. Demnach entstammen die Proben 11 und 11a einem Dentinschliff. Entsprechendes gilt für die Proben 12-15.

Insgesamt wurden die Proben in 8 Gruppen (A-H) mit jeweils 20 Proben eingeteilt. Zur profilometrischen Auswertung wurden 10 Proben (1-10) verwendet. Von weiteren 5 Proben (11-15) wurde eine Hälfte profilometrisch ausgewertet und danach rasterelektronenmikroskopische Bilder und EDX-Linescans angefertigt. Von den zweiten Probenhälften (11a-15a) wurden ausschließlich rasterelektronenmikroskopische Bilder und EDX-Linescans angefertigt.

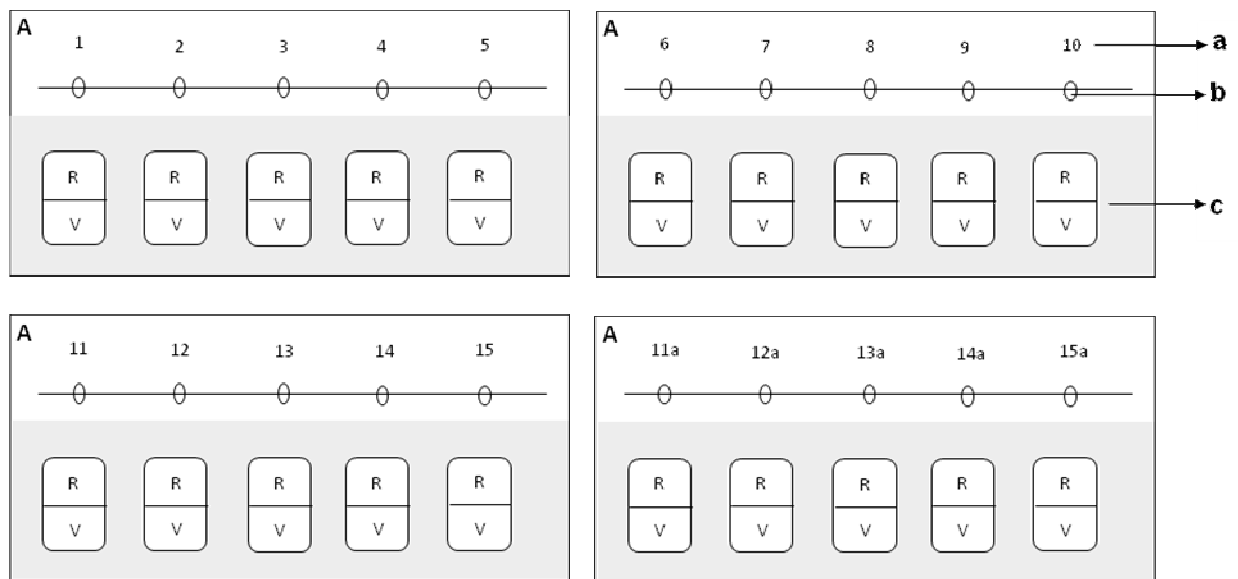


Abb. 1: Beispiel der Probenvorbereitung für die Gruppe A. „a“ entspricht der jeweiligen Probennummer, „b“ sind die Vorbohrungen zum Wiederauffinden desselben zu untersuchenden Areals. „c“ sind die zu untersuchenden Proben, wobei „V“ das Versuchsareal und „R“ das Referenzareal einer Probe entspricht. Bei den Proben 11 bis 15 handelt es sich jeweils um eine Dentinhälfte. Die korrespondierende Dentinhälfte wurde mit derselben Probennummer und einem zusätzlichen Buchstaben gekennzeichnet.

Den einzelnen Gruppen (A-H) wurde jeweils eine bestimmte Demineralisationsdauer zugeordnet. Die Demineralisationszeit für die Gruppe A betrug 5 Minuten, für die Gruppe B 10 Minuten, für die Gruppe C 15 Minuten, für die Gruppe D 20 Minuten, für die Gruppe E 30 Minuten, für die Gruppe F 60 Minuten, für die Gruppe G 90 Minuten und für die Gruppe H 120 Minuten.

Die Demineralisation erfolgte in einem Wasserbad (Mat. 15) mit einer 0,05 molaren Zitronensäure bei einer Schüttelfrequenz von 35 pro Minute und einer Temperatur von 37°C. Dazu wurden die Glasobjektträger mit den Proben einer Gruppe jeweils in ein Färbegestell eingebracht (Mat. 16), um ein gleichzeitiges Herausnehmen der Proben zu ermöglichen. Nach entsprechender Demineralisationszeit wurden die Proben für eine Minute unter fließendem Wasser abgespült.

Die Auswertung der Proben 1-15 aller Gruppen erfolgte nach Entfernung der Kunststoffabdeckungen zunächst mit einem optischen Sensor (Mat. 17). Dabei durchlief jede Probe drei Durchgänge mit unterschiedlichen Messbedingungen.

Der Substanzverlust wurde pro Probe mit je drei Schrieben charakterisiert, die anschließend zu einem Mittelwert zusammengefasst wurden. Eine schematische Darstellung der Versuchsdurchführung findet sich in 3.1.4.

Im ersten Durchgang wurde jede Probe für 30 Sekunden mit einem Wassertropfen befeuchtet und sofort nach Entfernung des Wassertropfens mit einem saugfähigen Tuch (Mat. 18) gemessen. Dieser Vorgang wiederholte sich zwei Mal. Für den zweiten Durchgang wurden die Proben nach Entfernung des Wassertropfens 2 Minuten lang der Raumluft ausgesetzt. Zwischen den drei Messungen erfolgte eine Rehydrierung der Probe mit einem Wassertropfen für jeweils 30 Sekunden. Im dritten Durchgang wurden die Proben 10 Minuten der Raumluft ausgesetzt, dabei erfolgten die drei Messungen direkt hintereinander, ohne die Probe zwischendurch erneut zu befeuchten.

Anschließend wiederholten sich dieselben Durchgänge bei der Auswertung mit dem mechanischen Tastsystem (Mat. 19).

Zusätzlich wurden bei einer einzelnen Probe jeder Gruppe Trocknungseffekte über die Zeit beobachtet. Insgesamt betrug die Beobachtungszeit 30 Minuten. In dieser Zeit wurden die Proben nach einer Minute, zwei Minuten, drei Minuten, vier Minuten, fünf Minuten, zehn Minuten, fünfzehn Minuten und letztmalig nach 30 Minuten profilometrisch untersucht. Die sogenannten Trocknungsreihen wurden drei Mal pro Probe durchgeführt. Zwischen den drei Durchgängen erfolgte ein erneutes Befeuchten der Probe für jeweils eine Minute. Die Messungen erfolgten sowohl mit dem optischen Sensor als auch mit dem mechanischen Tastsystem.

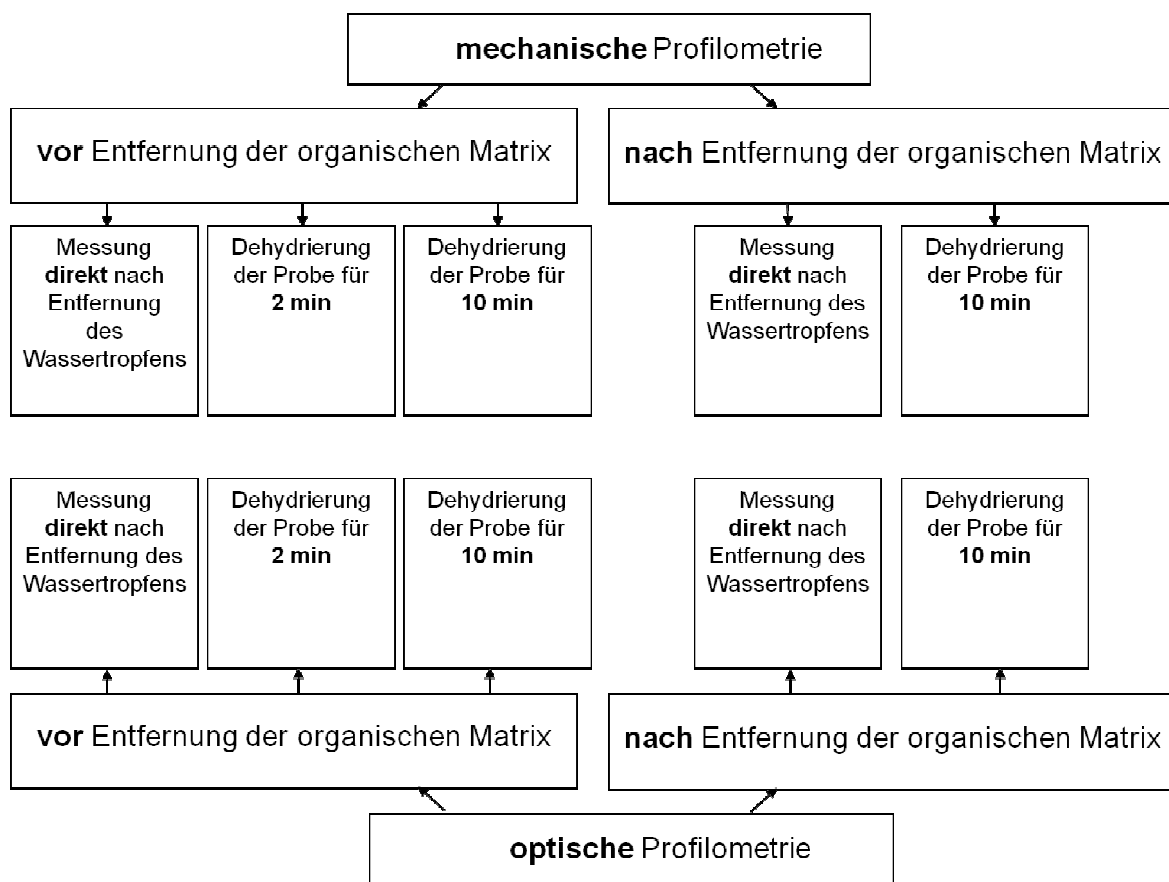
Nach vollständiger Auswertung der Proben wurde die organische Matrix mit der Kollagenaselösung entfernt. Dazu wurden die Proben in der Kollagenaselösung im Schüttelbad bei einer Schüttelfrequenz von 35 pro Minute bei 37°C für 96 Stunden gelagert. Etwaige lose Auflagerungen auf den Probenoberflächen wurden mit NaOCl (Chem. 8) und einem Wattekügelchen (Mat. 20) unter einem Mikroskop (Mat. 21) entfernt.

Alle Messungen wiederholten sich für den optischen Sensor und das mechanische Tastsystem nach dem oben beschriebenen Schema. Die Messungen für 2 Minuten Trocknung bei Raumluft entfielen.

Von den Proben 11a-15a wurden direkt nach entsprechender Demineralisationszeit mit organischer Matrix und von den Proben 11-15 nach vollständiger profilometrischer Auswertung ohne organische Matrix rasterelektronenmikroskopische Bilder und EDX-Linescans erstellt. Dazu wurden die Proben zunächst mit dem Skalpell vom Glasobjektträger abgelöst und gespalten. Die Spaltung erfolgte senkrecht zur Grenze zwischen Versuchs- und Referenzfläche. Anschließend wurden die Proben einer Kritisch-Punkt-Trocknung unterzogen, die unter 3.4 ausführlich beschrieben wird. Da die Proben 11 und 11a bis 15 und 15a aus einem Dentinschliff stammen, sind die rasterelektronenmikroskopischen Bilder vom Querschnitt der Probe vor und nach Entfernung der organischen Matrix direkt miteinander vergleichbar.

In einem zusätzlichen Versuch wurden 5 weitere Dentinproben auf die zuvor beschriebene Art und Weise hergestellt und in dem gleichen Wasserbad (37°C), bei gleicher Schüttelfrequenz (35 pro Minute) und in der gleichen Demineralisationslösung (0,05 molare Zitronensäure) für 120 Minuten demineralisiert. Anschließend wurden die Proben senkrecht zur Grenzfläche zwischen Versuchs- und Referenzfläche gespalten. Die eine Probenhälfte wurde für mindestens 4 Tage der Raumluft ausgesetzt, die andere Probenhälfte wurde einer Kritisch-Punkt-Trocknung unterzogen. Danach wurden von diesen Dentinproben ebenfalls Querschnittsbilder mit dem Rasterelektronenmikroskop angefertigt.

3.1.4 Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung



3.2 Messmethoden

3.2.1 Optische Profilometrie

Zur optischen Profilometrie wurde der MikroProf® mit dem FRT CWL Sensor benutzt. Der Sensor arbeitet dabei nach dem Prinzip der chromatischen Aberration. Dabei wird die Probe mit fokussiertem Weißlicht (LED) bestrahlt. Aus der spektralen Verteilung des an der Oberfläche gestreuten Lichtes wird die Höhe der Probe bestimmt. Die vertikale Auflösung des Sensors beträgt dabei 10 nm mit einem lateralen Auflösungsvermögen von 1-2 µm. Der maximale Höhenmessbereich liegt bei 300 µm.

Der Sensor des MikroProf® lässt sich durch die manuelle Eingabe der Koordinaten an ein und dieselbe Stelle fahren. Deshalb wurden vor der ersten Messung für jede Probe zum einen die x-Achsen Koordinaten der Vorbohrung und zum anderen die x-Achsen Koordinaten für den Beginn der Messstrecke genau definiert und notiert.

Auf dem Messtisch des Systems wurde ein Lineal mit Klebeband fixiert, um die Proben in x-Richtung reproduzierbar platzieren zu können. Anschließend wurde der Sensor an die für jede Probe spezifischen x-Achsen Koordinaten der Vorbohrung gefahren. Durch manuelle Verschiebung des Objektträgers in y-Richtung konnte die Vorbohrung danach im Fadenkreuz der Kamera zentriert werden. Um ein Verrutschen des Glasobjektträgers in y-Richtung zu vermeiden, wurde dieser mit Knete fixiert.

Abschließend konnte durch eine erneute Eingabe der zuvor definierten Koordinaten der Sensor an den Anfang der Messstrecke gefahren werden. Die nachfolgende Messstrecke wurde mit einer Gesamtlänge von 2 mm, also 1 mm Versuchsareal und 1 mm Referenzareal, definiert, sodass sich die Grenzfläche beider Areale mittig befindet.

Nach der ersten Messung wurden die Koordinaten um 200 μm in y-Richtung verändert, um einen zweiten Profilschrieb zu erhalten. Eine erneute Verschiebung um 200 μm erfolgte für den dritten Profilschrieb.

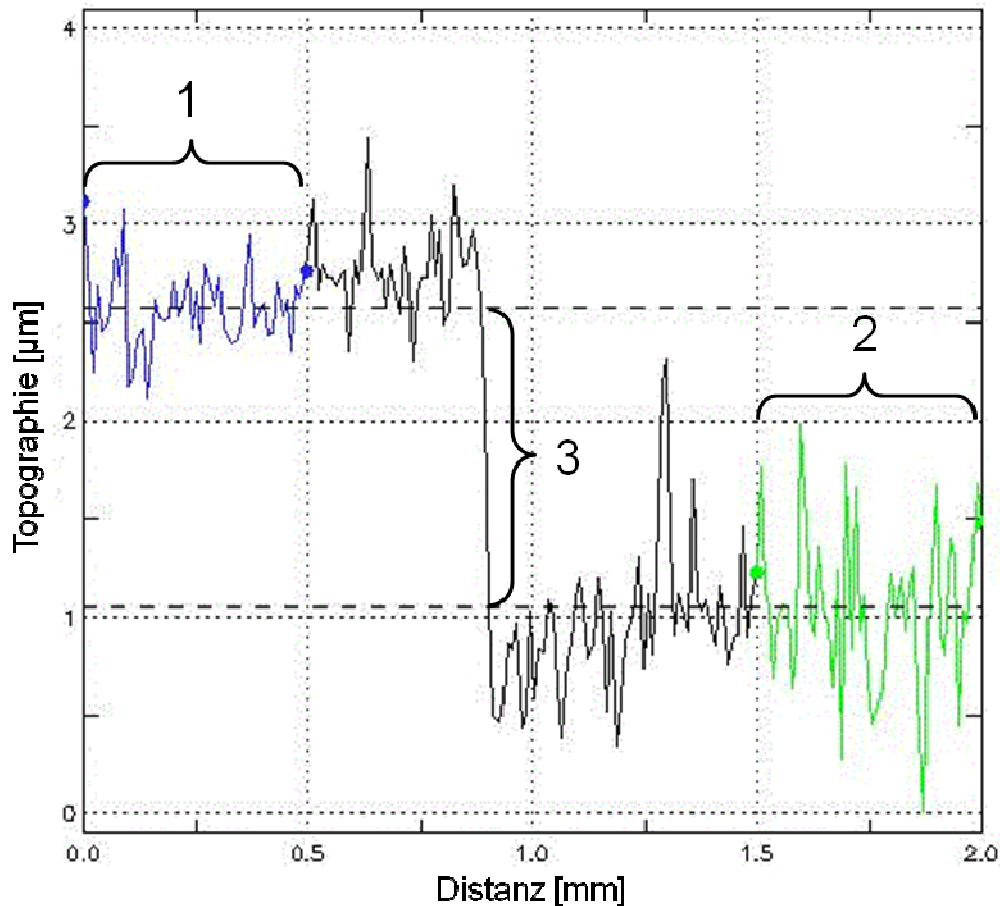


Abb. 3: Bei der Auswertung der Messstrecke stellt „1“ sowohl den Ausrichtungsbereich als auch die Messstrecke auf der Referenzfläche dar. „2“ ist die Messstrecke auf der Versuchsfläche. Der vertikale Abstand „3“ beider Strecken entspricht der berechneten Stufenhöhe.

Abschließend wurden 3D-Bilder einer Probe nach 5-minütiger Demineralisationszeit erstellt. Dabei wurde ein Bereich von 2x2 mm gescannt. Die Auflösung der Bilder betrug dabei 400x400 Pixel. Bei diesen Messbedingungen beträgt die Scanzeit 10 Minuten. Die graphische Darstellung der 3D-Bilder erfolgte mit dem Mark III Standard- Analyse-Programm.

3.2.2 Mechanische Profilometrie

Zur Profilometrie unter Verwendung eines mechanischen Tastarms wurde das Perthometer S8P verwendet. Das Perthometer ist auf einem pneumatisch gelagerten Spezialtisch positioniert, um Erschütterungen abzufangen.

Der Radius der Nadelspitze des mechanischen Tastarms beträgt 10 µm, die vertikale Auflösung des Systems liegt bei 0,015 µm.

Auf dem Messtisch des Perthometers wurde wie beim optischen Profilometer ein Lineal mit Klebeband befestigt, um eine genaue Repositionierung der Glasobjektträger auf der x-Achse zu erreichen. Anschließend wurde der Glasobjektträger mit den Proben mit Knete fixiert. Nach Zentrierung des Tasters in der Vorbohrung folgte die Einstellung des Abstandes zwischen Vorbohrung und Beginn der Messstrecke. Dieser Abstand wurde aus den Koordinaten von der Vorbohrung und dem Beginn der Messstrecke des optischen Profilometers errechnet.

Für den zweiten und dritten Profilschrieb wurde der Tastarm manuell um jeweils 200 µm in y-Richtung verschoben.

Um Abweichungen durch zwei verschiedene Auswertungssysteme zu vermeiden, wurden die Profilschriebe des Perthometer S8P auch mit dem FRT Mark III Standard-Analyseprogramm nach oben stehendem Schema ausgewertet.

3.3 Reproduzierbarkeit

3.3.1 Reproduzierbarkeit der Messungen

Die Reproduzierbarkeit der Messungen wurde an beiden Geräten untersucht. Dabei wurde jeweils eine Probe mit einer Demineralisationszeit von 5 sowie 120 Minuten vor und nach Entfernung der Matrix erneut gemessen. Die Messungen erfolgten direkt nach Entfernung des Wassertropfens mit einem Tuch sowie erneut nach 10-minütiger Dehydrierung der Probe bei Raumluft. Zwischen allen Messungen wurden die Proben für eine Minute mit einem Wassertropfen rehydriert, um Trocknungsartefakte zu vermeiden. Die Messungen starteten wie im Hauptversuch direkt nach Entfernung des Wassertropfens. Alle Messungen wurden 10-mal ohne Entfernung der Probe vom Messtisch und 10-mal nach Entfernung und erneuter Repositionierung der Probe gemessen.

Tab. 1: Diese Tabelle zeigt die Reproduzierbarkeit der Messungen am mechanischen Perthometer S8P. Es wurde jeweils 1 Probe mit 5 sowie 120 Minuten Demineralisationszeit vor und nach Entfernung der organischen Matrix gemessen. Die Messungen erfolgten jeweils 10-mal, sowohl ohne Veränderung der Probenposition als auch nach erneuter Repositionierung der Probe. In dieser Tabelle sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardabweichung aufgeführt. Die Messungen erfolgten sofort nach Entfernung des Wassertropfens (feucht) sowie nach 10-minütiger Dehydrierung der Probe.

Reproduzierbarkeit für mechanische Profilometrie					
		ohne Veränderung der Position der Probe		nach erneuter Repositionierung der Probe	
		feucht	Dehydrierung der Probe bei Raumluft für 10 min	feucht	Dehydrierung der Probe bei Raumluft für 10 min
Deminerali- sationszeit					
vor Entfernung der organischen Matrix	5 Minuten	$2,2 \pm 0,3$	$-0,9 \pm 0,4$	$2,5 \pm 0,2$	$-0,8 \pm 0,4$
	120 Minuten	$33,3 \pm 0,3$	$29,8 \pm 1,3$	$34,4 \pm 0,8$	$32,9 \pm 0,9$
nach Entfernung der organischen Matrix	5 Minuten	$3,1 \pm 0,3$	$-1,8 \pm 1,0$	$2,6 \pm 0,3$	$-0,2 \pm 0,6$
	120 Minuten	$63,7 \pm 0,4$	$55,4 \pm 0,8$	$58,7 \pm 2,8$	$56,6 \pm 3,1$

Tab. 2: Diese Tabelle zeigt die Reproduzierbarkeit der Messungen am optischen Profilometer MikroProf®. Es wurde jeweils 1 Probe mit 5 und 120 Minuten Demineralisationszeit vor und nach Entfernung der organischen Matrix gemessen. Die Messungen erfolgten jeweils 10-mal mit und ohne Veränderung der Einstellungen. In dieser Tabelle sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardabweichungen aufgeführt. Die Messungen erfolgten einmal sofort nach Entfernung des Wassertropfens (feucht) sowie nach 10-minütiger Dehydrierung der Probe an der Raumluft.

Reproduzierbarkeit für optische Profilometrie					
		ohne Veränderung der Position der Probe		nach erneuter Repositionierung der Probe	
		feucht	Dehydrierung der Probe bei Raumluft für 10 min	feucht	Dehydrierung der Probe bei Raumluft für 10 min
Deminerali- sationszeit					
Vor Entfernung der organischen Matrix	5 Minuten	$0,1 \pm 0,6$	$-1,4 \pm 0,9$	$0,2 \pm 0,4$	$-1,3 \pm 0,6$
	120 Minuten	$0,6 \pm 0,5$	$32,4 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,3$	$29,8 \pm 0,4$
Nach Entfernung der organischen Matrix	5 Minuten	$2,1 \pm 0,5$	$-1,3 \pm 0,5$	$1,1 \pm 0,5$	$-2,1 \pm 1,1$
	120 Minuten	$59,2 \pm 0,3$	$57,4 \pm 0,7$	$59,5 \pm 0,6$	$55,5 \pm 1,0$

3.3.2 Reproduzierbarkeit der Auswertung

Zur Reproduzierbarkeit der Auswertung wurde jeweils die letzte Messung aller Durchgänge 10-mal hintereinander ausgewertet. Dabei ergab sich eine Standardabweichung aller Auswertungen von ± 0 .

3.4 Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Probenvorbereitung für die rasterelektronenmikroskopischen Bilder fand zunächst eine Entwässerung der Proben statt. Dies geschah mit einer aufsteigenden Acetonreihe. Dabei wurden die Proben jeweils für mindestens 8 Stunden in 70%-, 80%-, 90%-, 95%- und zweimal in 100%iger Acetonlösung gelagert.

Anschließend wurde das Aceton gegen CO₂ in der Druckkammer des Kritisch-Punkt-Apparates (Mat. 23) ausgetauscht. Dazu wurde die Kammer mit flüssigem CO₂ gefüllt und das CO₂-Aceton-Gemisch aus der Druckkammer abgelassen. Dieser Vorgang wurde sechs Mal wiederholt, bis ein vollständiger Austausch gegen CO₂ stattgefunden hatte.

Im Anschluss wurde die Druckkammer auf eine Temperatur von 40°C und einen Druck von 80 bar eingestellt. Dabei wurde der kritische Punkt des CO₂ von 74 bar und 31°C [Mulisch, 2010] umgangen, um eine Rekondensation während des Ablassens des Gases zu vermeiden.

Nun wurden die getrockneten Proben mit einem vakuumfesten, leitenden graphithaltigen Kleber (Mat. 24) auf einem Aluminiumprobenhalter (Mat. 25) mit leitfähigen Tabs (Mat. 26) befestigt und für 60 Sekunden bei 20 mA mit Gold bedampft (Mat. 27), um eine entsprechende Leitfähigkeit der Proben zu erreichen.

Anschließend wurden von den Proben sowohl Strukturaufnahmen von den Querschnitten als auch EDX-Linescans mit einem Rasterelektronenmikroskop (Mat. 28) angefertigt.

Die Beschleunigungsspannung für die Strukturaufnahmen betrug dabei 5 kV bei einem Arbeitsabstand von 10 mm. Die Strukturaufnahmen der Proben nach 5- bis 20-minütiger Demineralisationszeit wurden mit einer 500fachen Vergrößerung aufgenommen, während die Strukturaufnahmen nach 30- bis 120-minütiger Demineralisationszeit mit einer 300fachen Vergrößerung angefertigt wurden. Der Strahldurchmesser (Spot-Size) lag jeweils bei 30. Alle anderen Einstellungen wurden während der Aufnahmen konstant gehalten.

Zusätzlich wurden EDX-Linescans mit Hilfe eines energiedispersiven Röntgenspektrometers (Mat. 29) angefertigt. Dazu wurde die Beschleunigungsspannung auf 15 kV, der Arbeitsabstand auf 15 mm und die Zählrate auf rund 1 kcps (kilo counts per second) erhöht. Aus den Versuchsflächen der Proben wurde ein repräsentatives Areal ausgewählt und 2000fach vergrößert. Dadurch entstand eine 45 µm lange Strecke, die sich sowohl im demineralisierten als auch im mineralisierten Bereich der Probe befand. Auf dieser Strecke wurden 99 einzelne Messpunkte erstellt und die Elemente Kalzium, Phosphor, Kohlenstoff und Sauerstoff quantitativ gemessen. Die Ergebnisse wurden später in Form eines Liniendiagramms dargestellt und mit Hilfe des Quantax Systems (Mat. 29) ausgewertet. Das zur Verfügung stehende Auswertungsprogramm gibt die Menge der detektierten Röntgenquanten für jeden Messpunkt ausschließlich in der Einheit kcps an.

3.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 20.0 für Windows. Aus den jeweils gemessenen Werten wurden die arithmetischen Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen sowie Minima und Maxima errechnet, um die Versuchsgruppen zu vergleichen. Dabei ergab der Kolmogoroff-Smirnoff-Test keine signifikante Abweichung von der Gauss-Verteilung. Für den Vergleich innerhalb einer Demineralisationszeit wurde der t-Test für abhängige Stichproben verwendet. Der Vergleich eines Messzeitpunktes zwischen den verschiedenen Demineralisationszeiten erfolgte durch die einfache Varianzanalyse (ANOVA) mit Ausschlusstest nach Tukey.

Zum Vergleich der Übereinstimmung von Ergebnissen unterschiedlicher Messmethoden und unterschiedlicher Messzeitpunkte wurden Bland-Altman-Plots verwendet. Dabei wird der Mittelwert beider Methoden auf der x-Achse gegen die absolute Differenz auf der y-Achse aufgetragen [Bland und Altman, 2003]. Ein systematischer Fehler liegt vor, wenn die Differenz der Mittelwerte (δ) mit dem t-Test signifikant von 0 abweicht. Ein proportionaler Fehler liegt vor, wenn die Steigung der Regressionslinie signifikant von 0 abweicht [Ludbrook, 2002].

Das Signifikanzniveau wurde bei 0,05 festgelegt.

3.6 Materialliste

- Mat. 1: Einmalskalpell, Feather disposable Scalpel No. 15, Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
- Mat. 2: Lichthärtender Fixierungskleber, Technovit 7230 VLC, Heraeus-Kulzer GmbH, Wehrheim/Ts., Deutschland
- Mat. 3: Polymerisationsgerät Translux CL, Heraeus-Kulzer GmbH, Wehrheim/Ts., Deutschland
- Mat. 4: Plexiglasobjektträger 50 x 100 mm, Glas Kontor, Giessen, Deutschland
- Mat. 5: Exakt-Trennschleifsystem, Exakt Apparatebau O. Herrmann, Norderstedt, Deutschland
- Mat. 6: Mikrometerschraube mit Digitalanzeige (0-35 mm; 0,001 mm), Mitutoyo, Japan
- Mat. 7: Exakt-Mikroschleifsystem, Exakt Apparatebau O. Hermann, Norderstedt, Deutschland
- Mat. 8: Diamantschleifscheiben der Körnung 15 μm , Buehler, Düsseldorf, Deutschland
- Mat. 9: Diamantschleifscheiben der Körnung 3 μm , Buehler, Düsseldorf, Deutschland
- Mat. 10: Glasobjektträger, 76 x 26 mm, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
- Mat. 11: Winkelstück, rot, schnelldrehend, Siemens, Bensheim, Deutschland
- Mat. 12: Diamantbohrer, Kugeldiamant ISO No. 806 104 001 524 014, HORICO, Berlin, Deutschland
- Mat. 13: Ausbett- und Kombistrahlanlage EWL Typ 5423, KaVo Dental GmbH, Biberach/Riß, Deutschland

Material und Methoden

- Mat. 14: Diamantierte Trennscheibe, ISO 806 104 317524 220, Komet, Lemgo, Deutschland
- Mat. 15: Wasserbad, Modell 1083, GFL, Burgwedel, Deutschland
- Mat. 16: Färbekasten, Schott, Mainz, Deutschland
- Mat. 17: Optisches Profilometer, MikroProf[®] mit FRT CWL F 300 µm Sensor und der Aufnahme-Software „Acquire“ (Version 1.42), Fries Research & Technology GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
- Mat. 18: Tork Advanced Hand Towel Green Zigzag Fold, SCA Hygiene Products AB, Göteborg, Schweden
- Mat. 19: Mechanisches Profilometer, Perthometer S8P, FRW 750, Tastspitzenradius 10 µm, Kegelwinkel 90°, Messkraft 6 mN, Perthen Mahr, Göttingen, Deutschland
- Mat. 20: Wattekügelchen, Ref. 210 110, 4 g, Langenau, Deutschland
- Mat. 21: Auflichtmikroskop, SMZ-2T, Vergrößerung 10x, Nikon, Tokyo, Japan
- Mat. 22: Auswertungs-Software, „FRT Mark III“, Version 3.9.2.2 Standard-Analyseprogramm, Fries Research & Technology, Bergisch Gladbach, Deutschland
- Mat. 23: Kritisch-Punkt-Trockner CPD 030, Baltec, Witten, Deutschland
- Mat. 24: Leit C Spezialkleber für die Rasterelektronenmikroskopie, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
- Mat. 25: Stiftprobenteller G301, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
- Mat. 26: Leit-Tabs G3347, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
- Mat. 27: Sputtergerät, JEOL Fine Coater JFC-1200, JEOL Germany GmbH, Eching bei München, Deutschland

Mat. 28: Rasterelektronenmikroskop JSM-6510 mit der Software „SEM Control User Interface“ Version 3.04, JEOL Germany GmbH, Echting bei München, Deutschland

Mat. 29: Energiedispersives Röntgenspektrometer Bruker Nano QUANTAX XFlash® 410-M mit der Auswertungssoftware „Bruker Esprit“, Version 1.9.2.2558, Bruker Nano GmbH, Berlin, Deutschland

3.7 Chemikalienliste

Chem. 1: Thymol Pulver, Art.- Nr. 89330, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

Chem. 2: Zitronensäure-Monohydrat, CAS-Nummer 5949-29-1, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Chem. 3: Orthophosphorsäure, CAS-Nummer 7664-38-2, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Chem. 4: Kaliumchlorid, CAS-Nummer 7447-40-7, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Chem. 5: Natriumhydrogencarbonat, CAS-Nummer 144-55-8, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Chem. 6: Kalziumchlorid, CAS-Nummer 10043-52-4 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Chem. 7: Kollagenase *Clostridium histolyticum* Typ VII, Art.Nr.: C-0733 Collagen digestion activity: 1,680 units/mg solid, Sigma Aldrich Chemie GmbH, St. Louis (MO), USA

Chem. 8: Natriumhypochlorit, Mischungsverhältnis 1,2 Liter Aqua dest. mit 1 Liter Natriumhypochloritlösung, Art. Nr. 90623, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland

4. Ergebnisse

4.1 Allgemeines

Alle 160 Proben konnten ausgewertet werden. Bei der makroskopischen Untersuchung war sowohl vor als auch nach Entfernung der organischen Matrix ein deutlicher Unterschied zwischen Versuchs- und Referenzfläche erkennbar. Mit zunehmender Demineralisationszeit entwickelte sich eine Stufe zwischen beiden Flächen. Vor Entfernung der organischen Matrix stellte sich die Versuchsfläche als eine weißliche, kreidige, opake, mit einem Skalpell eindrückbare Oberfläche dar. Unmittelbar nach Entfernung der organischen Matrix wurden sowohl auf der Versuchsfläche als auch auf der Referenzfläche weiß-opake Auflagerungen sichtbar. Diese Auflagerungen konnten ohne Zerstörung der Oberfläche vorsichtig mit NaOCl entfernt werden. Anschließend wirkte die Versuchsfläche weiterhin matt und kreidig, jedoch hart und unveränderbar. Die Referenzfläche hingegen wirkte sowohl vor als auch nach Entfernung der organischen Matrix glatt und glänzend. Vereinzelt waren Polierstreifen auf der Oberfläche sichtbar.

4.2 Übersicht der Mittelwerte und Standardabweichungen

4.2.1 Optische Profilometrie

Tab. 3: Diese Tabelle liefert einen Überblick über die mit der optischen Profilometrie ermittelten Werte bei unterschiedlichen Messbedingungen vor und nach Entfernung der organischen Matrix (arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung).

optische Profilometrie					
Demineralisationszeit	vor Entfernung der organischen Matrix			nach Entfernung der organischen Matrix	
	Messung direkt nach Entfernung des Wassertropfens	Dehydrierung der Probe bei Raumluft		Messung direkt nach Entfernung des Wassertropfens	Dehydrierung der Probe bei Raumluft für 10 min
		2 min	10 min		
5 min	0,3 \pm 0,7	0,8 \pm 1,3	0,6 \pm 1,3	3,5 \pm 0,8	1,1 \pm 1,2
10 min	0,4 \pm 1,2	2,7 \pm 1,6	2,7 \pm 1,6	6,1 \pm 1,2	4,3 \pm 1,8
15 min	0,5 \pm 1,3	4,5 \pm 1,7	4,3 \pm 1,6	9,6 \pm 1,8	7,5 \pm 2,4
20 min	0,8 \pm 1,7	7,0 \pm 1,8	7,6 \pm 2,0	13,2 \pm 2,6	10,5 \pm 2,7
30 min	1,0 \pm 1,1	9,6 \pm 2,0	9,6 \pm 2,1	18,6 \pm 3,4	15,9 \pm 3,4
60 min	1,9 \pm 1,5	15,4 \pm 2,1	16,4 \pm 2,1	32,4 \pm 3,1	29,6 \pm 3,6
90 min	3,1 \pm 1,5	17,7 \pm 4,6	23,7 \pm 3,7	42,1 \pm 4,8	39,9 \pm 4,5
120 min	3,4 \pm 1,5	22,1 \pm 6,7	30,0 \pm 4,3	55,5 \pm 7,4	53,9 \pm 7,2

4.2.2 Mechanische Profilometrie

Tab. 4: Diese Tabelle liefert einen Überblick über die mit der mechanischen Profilometrie ermittelten Werte bei unterschiedlichen Messbedingungen vor und nach Entfernung der organischen Matrix (arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung).

mechanische Profilometrie					
	vor Entfernung der organischen Matrix			nach Entfernung der organischen Matrix	
Demineralisationszeit	Messung direkt nach Entfernung des Wassertropfens	Dehydrierung der Probe bei Raumluft für		Messung direkt nach Entfernung des Wassertropfens	Dehydrierung der Probe bei Raumluft für 10 min
		2 min	10 min		
5 min	2,9 \pm 1,1	0,9 \pm 1,2	0,8 \pm 0,8	4,2 \pm 1,3	0,5 \pm 1,0
10 min	4,9 \pm 1,3	3,4 \pm 1,3	2,5 \pm 1,6	7,1 \pm 1,6	3,5 \pm 2,0
15 min	6,9 \pm 1,6	5,2 \pm 2,2	4,3 \pm 1,7	11,1 \pm 2,0	7,1 \pm 2,8
20 min	9,0 \pm 1,7	8,5 \pm 2,2	6,8 \pm 2,2	14,8 \pm 2,5	13,1 \pm 2,0
30 min	12,1 \pm 1,7	11,6 \pm 2,2	10,2 \pm 2,4	19,6 \pm 3,6	16,9 \pm 3,2
60 min	17,9 \pm 1,9	18,0 \pm 2,6	16,1 \pm 2,4	34,1 \pm 4,4	30,0 \pm 2,8
90 min	24,8 \pm 4,2	26,1 \pm 3,9	24,6 \pm 3,8	43,9 \pm 5,6	39,0 \pm 5,6
120 min	30,6 \pm 5,8	33,0 \pm 5,5	32,1 \pm 4,4	57,8 \pm 8,1	53,5 \pm 6,8

4.3 Trocknungsreihen

Für jede Demineralisationszeit wurde jeweils eine Probe drei Mal einer Trocknungsreihe unterzogen. Die Mittelwerte dieser drei Schriebe werden in den folgenden Liniendiagrammen (siehe Abbildung 4-7) dargestellt. Jeder Graph stellt dabei die gemessene Stufenhöhe zu einer Demineralisationszeit dar. Der erste Graph mit der kleinsten gemessenen Stufenhöhe entspricht einer Demineralisationszeit von 5 Minuten. Den folgenden Graphen sind Demineralisationszeiten von 10 Minuten, 15 Minuten, 20 Minuten, 30 Minuten, 60 Minuten und 90 Minuten zuzuordnen. Der letzte Graph stellt die gemessene Stufenhöhe nach 120 Minuten Demineralisationszeit dar.

Die Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse der optischen Profilometrie vor Entfernung der organischen Matrix. In den ersten 3 Minuten zeichnet sich ein unregelmäßiger Anstieg der gemessenen Stufenhöhen ab. Anschließend wird bei allen Demineralisationszeiten ein Plateau mit kleinen unregelmäßigen Schwankungen erreicht.

Die Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse der optischen Profilometrie nach Entfernung der organischen Matrix. Die Abbildungen 6 und 7 stellen die Ergebnisse der mechanischen Profilometrie vor und nach Entfernung der organischen Matrix dar. Bei allen drei Abbildungen liegen die gemessenen Werte von Anfang an auf einem Plateau. Dabei variiert die Höhe des Plateaus je nach Art der Probenvorbereitung und nach Art des Tasters. Innerhalb jedes Plateaus ist bei allen drei Abbildungen bis zur 10-minütigen Dehydrierung der Probe ein leichter Abfall, gefolgt von einem leichten Anstieg der gemessenen Werte erkennbar.

Eine Ausnahme stellt bei allen drei Abbildungen die Probe nach 120 Minuten Demineralisationszeit dar. Bei den Messungen mit dem optischen Sensor nach Entfernung der organischen Matrix (Abbildung 5) ist ein leichter Anstieg bis zur einminütigen Dehydrierung der Probe zu erkennen. Danach fallen die Werte leicht ab und steigen nach 15-minütiger Dehydrierung wieder an. Mit dem mechanischen Taster vor Entfernung der organischen Matrix (Abbildung 6) ist der anfängliche Anstieg bis zur 2-minütigen Dehydrierung der Probe erkennbar. Es folgt ein leichter Abfall der Werte bis zur 10-minütigen Dehydrierung. Danach steigen die Werte wieder leicht an. Bei den Messungen mit dem mechanischen Taster nach

Entfernung der organischen Matrix (Abbildung 7) ist ausschließlich ein Abfall der gemessen Werte zu erkennen.

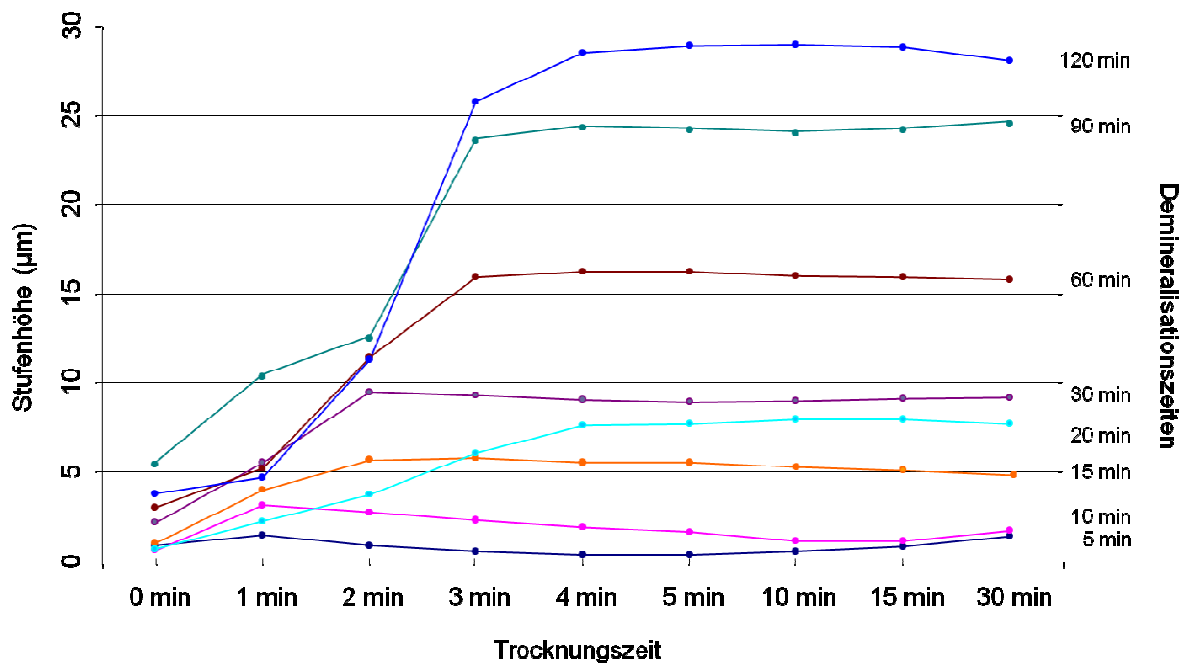


Abb. 4: Ergebnisse der durch den optischen Sensor ermittelten Werte vor Entfernung der organischen Matrix.

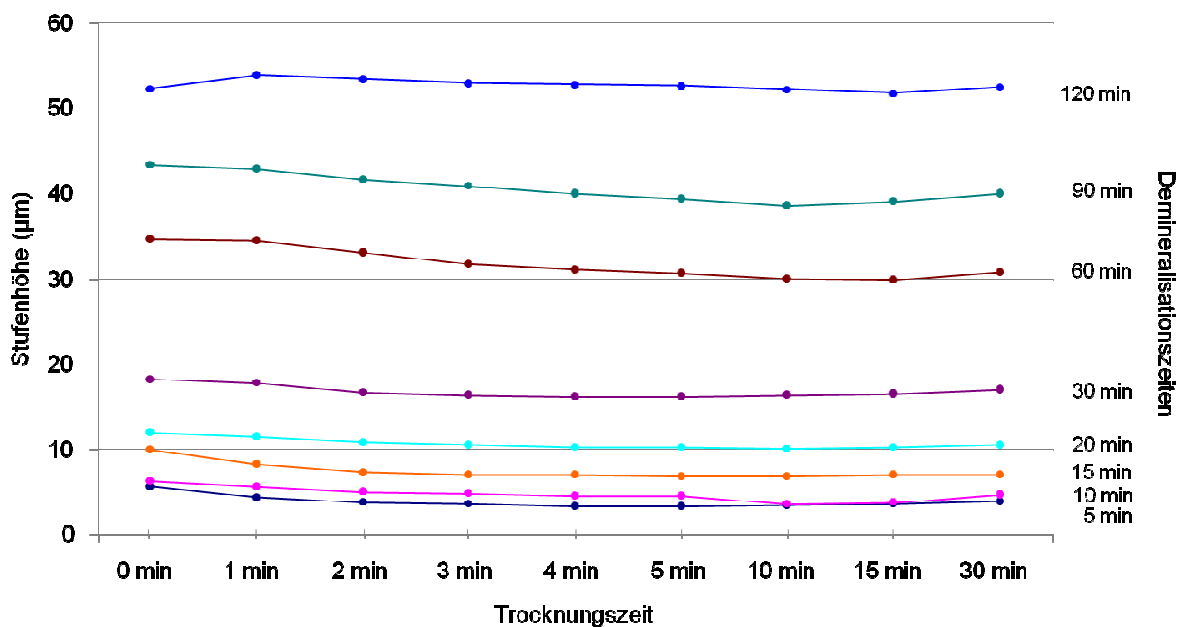


Abb. 5: Ergebnisse der durch den optischen Sensor ermittelten Werte nach Entfernung der organischen Matrix.

Ergebnisse

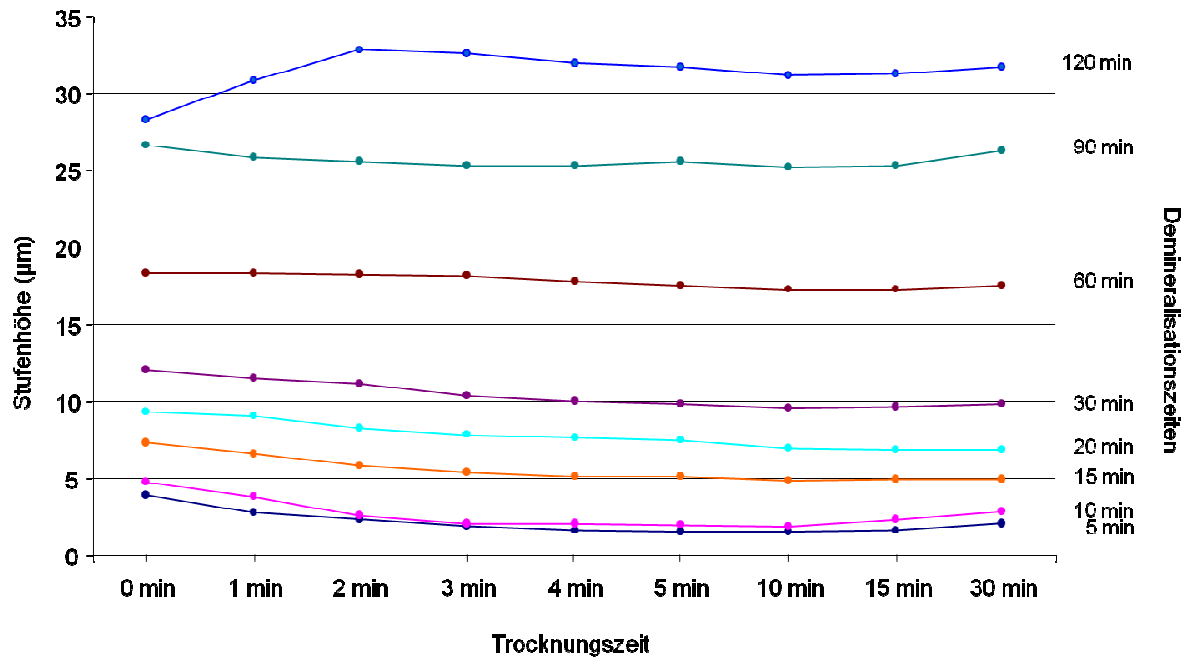


Abb. 6: Ergebnisse der durch den mechanischen Taster ermittelten Werte vor Entfernung der organischen Matrix.

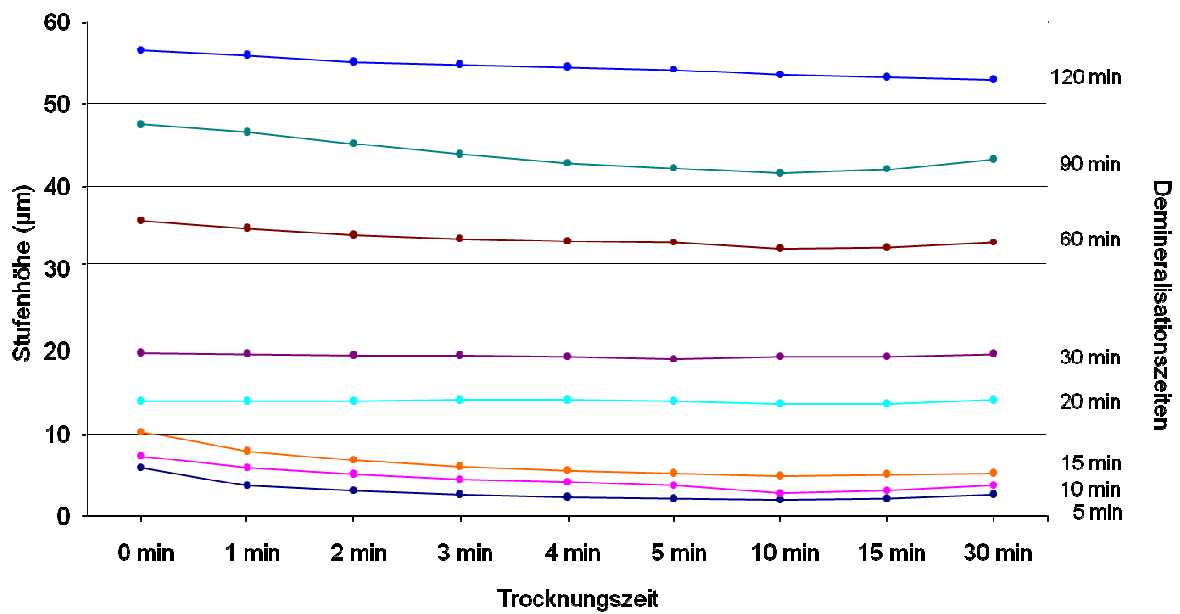


Abb. 7: Ergebnisse der durch den mechanischen Taster ermittelten Werte nach Entfernung der organischen Matrix.

4.4 Einfluss der Dehydrierung der Proben auf die durch optische Profilometrie ermittelten Messwerte

4.4.1 Ergebnisse vor Entfernung der organischen Matrix

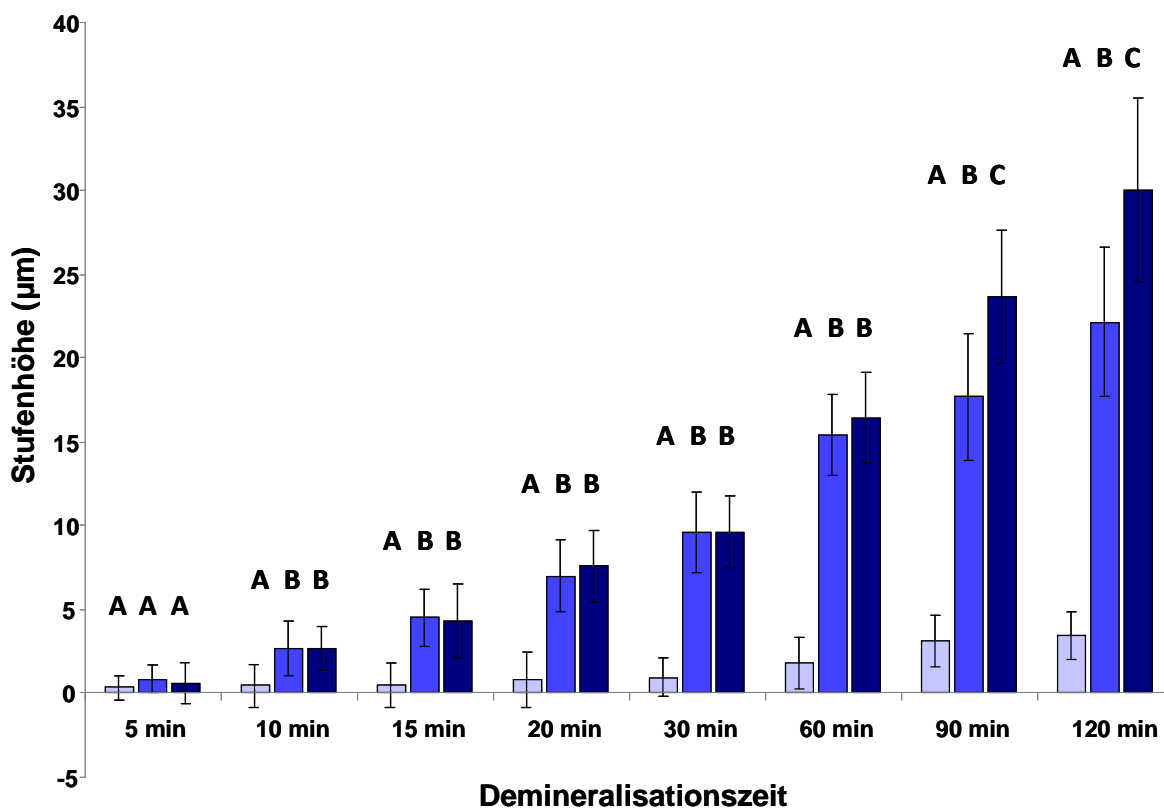


Abb. 8: Darstellung der arithmetischen Mittelwerte \pm Standardabweichungen der durch optische Profilometrie ermittelten Stufenhöhen vor Entfernung der organischen Matrix. Die Balken zeigen den Substanzverlust direkt nach Entfernung des Wassertropfens (hellblaue Balken) sowie nach 2-minütiger (blaue Balken) und nach 10-minütiger Dehydrierung der Probe (dunkelblaue Balken). Gleiche Buchstaben bedeuten, dass sich die gemessenen Stufenhöhen innerhalb einer Demineralisationszeit nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Generell ist mit zunehmender Demineralisationszeit eine Zunahme der Stufenhöhe bei allen Messbedingungen erkennbar. Der visuell erkennbare Unterschied ist jedoch bei den Messungen direkt nach Entfernung des Wassertropfens (hellblaue Balken) von einer zur nächst längeren Demineralisationszeit nicht signifikant. Erst nach einer Dehydrierungszeit von

2 Minuten¹ und 10 Minuten² wird der Unterschied mit wenigen Ausnahmen signifikant.

Betrachtet man die unterschiedlichen Messbedingungen innerhalb einer Demineralisationszeit, ist mit Ausnahme der 5-minütigen Demineralisationszeit ein deutlicher Unterschied zwischen der Messung direkt nach Entfernung des Wassertropfens und nach der Dehydrierung der Probe erkennbar. Dieser Unterschied wird mit zunehmender Demineralisationszeit deutlicher. So steigt die gemessene Stufenhöhe bei einer Demineralisationszeit von 10 Minuten unter feuchten Messbedingungen im Vergleich zur 10-minütigen Dehydrierung von $0,4 \mu\text{m}$ ($\pm 1,2$) auf $2,7 \mu\text{m}$ ($\pm 1,6$) und nach einer Demineralisationszeit von 120 Minuten von $3,4 \mu\text{m}$ ($\pm 1,5$) auf $30,0 \mu\text{m}$ ($\pm 4,3$) an.

Demgegenüber unterscheiden sich die Werte bei dem Vergleich der Dehydrierungszeiten von 2 und 10 Minuten nur geringfügig. Erst nach einer Demineralisationszeit von 90 und 120 Minuten wird der Unterschied deutlicher.

¹ 5 zu 10 Minuten, 15 zu 20 Minuten und 20 zu 30 Minuten jeweils $p \leq 0,05$; 30 zu 60 Minuten $p \leq 0,001$

² 5 zu 10 Minuten und 90 zu 120 Minuten jeweils $p \leq 0,01$; 15 zu 20 Minuten, 30 zu 60 Minuten und 60 zu 90 Minuten jeweils $p \leq 0,001$

In der folgenden Abbildung wird ein 3D-Scan einer Probe nach 5-minütiger Demineralisationszeit vor Entfernung der organischen Matrix gezeigt. Die Scandauer betrug 10 Minuten.

Der Profilschrieb A, dargestellt durch die untere schwarze Linie in Abbildung 9, entspricht dem Zustand direkt nach Entfernung des Wassertropfens. Der Profilschrieb B, dargestellt durch die obere schwarze Linie in Abbildung 9, entspricht dem Zustand nach 10-minütiger Dehydrierung bei Raumluft. Die Dentinprobe hat sich während der Aufzeichnungsdauer von 10 Minuten gewölbt. Visuell ist die konkave Wölbung durch den helleren Bereich in der rechten oberen Ecke auf der Versuchsfläche zu erkennen. Zudem ist die Wölbung im Profilschrieb B durch den Anstieg des Graphen sowohl auf der Referenzfläche als auch, noch deutlicher, auf der Versuchsfläche (links) zu sehen.

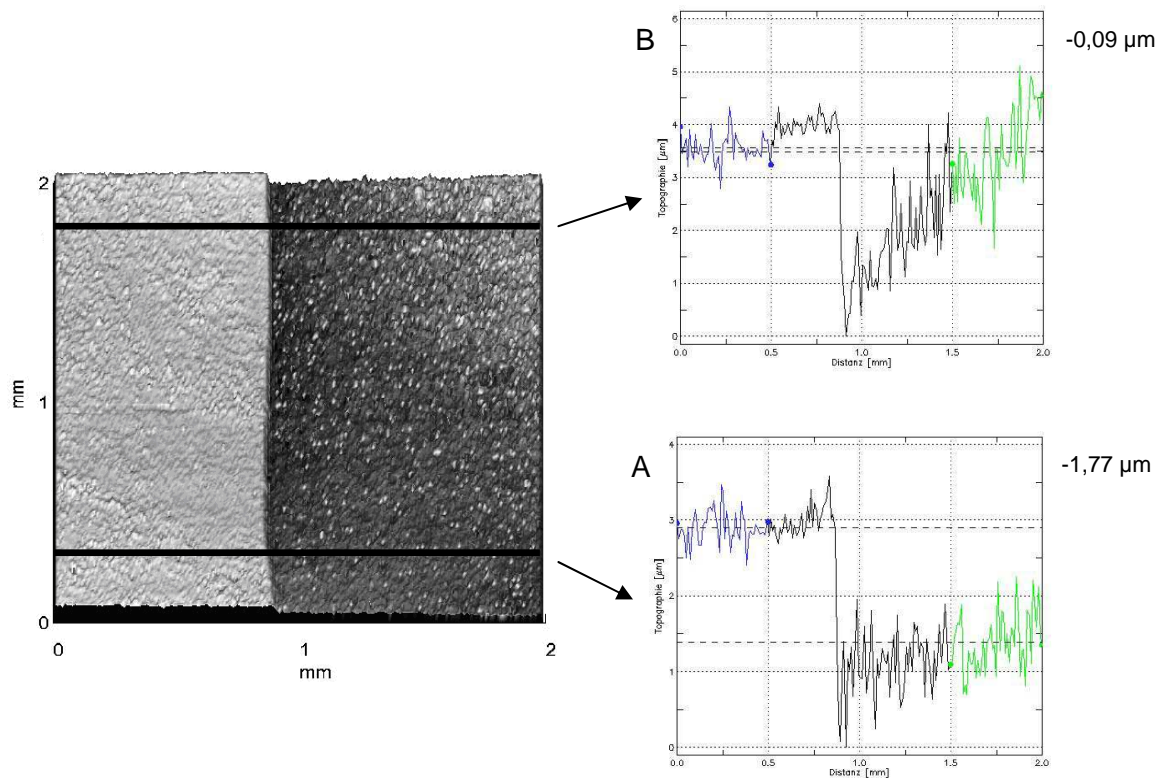


Abb. 9: 3D-Scan mit dem optischen Profilometer nach 5 Minuten Demineralisationszeit. Der hellere Bereich der Probe (links) stellt die unbehandelte Referenzfläche, der dunklere Bereich (rechts) die Versuchsfläche dar. Daneben befinden sich die entsprechenden Profilschriebe. Schrieb A (unten) entspricht dem Zustand nach Entfernung des Wassertropfens, Schrieb B (oben) entspricht dem Zustand am Ende der Scanzzeit von 10 Minuten.

4.4.2 Ergebnisse nach Entfernung der organischen Matrix

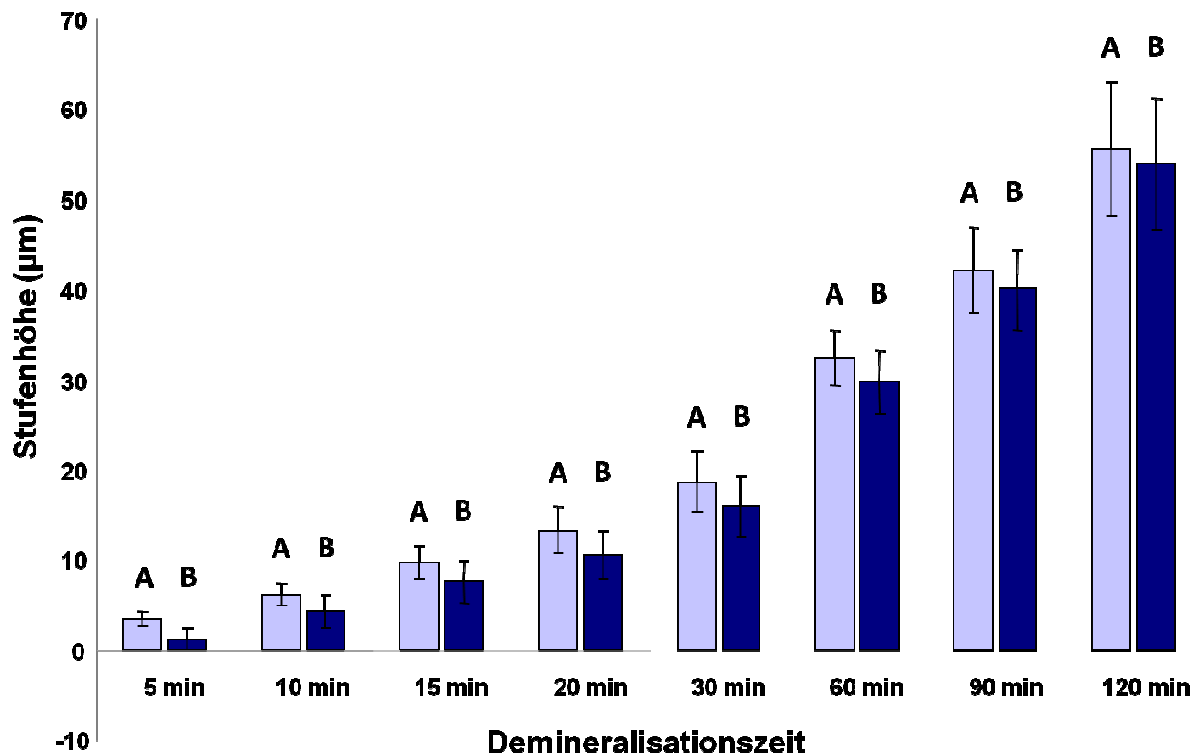


Abb. 10: Diese Abbildung zeigt die durch optische Profilometrie ermittelten arithmetischen Mittelwerte \pm Standardabweichung nach Entfernung der organischen Matrix. Die Balken zeigen den Substanzverlust direkt nach Entfernung des Wassertropfens (hellblaue Balken) sowie nach 10-minütiger Dehydrierung der Probe durch Raumluft (dunkelblaue Balken). Gleiche Buchstaben bedeuten, dass sich die gemessenen Stufenhöhen innerhalb einer Demineralisationszeit nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Bei dem Vergleich der Säulendiagramme vor und nach Entfernung der organischen Matrix wird ersichtlich, dass nach Entfernung der organischen Matrix ausnahmslos größere Stufenhöhen unter jeder Messbedingung gemessen wurden.

Auch in dem hier dargestellten Säulendiagramm nach Entfernung der organischen Matrix wird bei der Betrachtung der einzelnen Werte von einer zur nächst längeren Demineralisationszeit ein deutlicher Anstieg der Stufenhöhe mit zunehmender Demineralisationszeit erkennbar.

Dieser Anstieg ist sowohl für die Werte direkt nach Entfernung des Wassertropfens³, als auch nach 10-minütiger Dehydrierung⁴ mit wenigen Ausnahmen signifikant.

Beim Vergleich der Messbedingungen innerhalb einer Demineralisationszeit ist ein deutlicher Abfall der Stufenhöhe um durchschnittlich 2,3 μm nach 10-minütiger Dehydrierung der Proben im Vergleich zu den feuchten Messbedingungen feststellbar.

³ 15 zu 20 Minuten $p \leq 0,01$; 5 zu 10 Minuten, 10 zu 15 Minuten, 20 zu 30 Minuten, 30 zu 60 Minuten, 60 zu 90 Minuten und 90 zu 120 Minuten $p \leq 0,001$

⁴ 10 zu 15 Minuten, 20 zu 30 Minuten $p \leq 0,01$; 5 zu 10 Minuten, 30 zu 60 Minuten, 60 zu 90 Minuten und 90 zu 120 Minuten $p \leq 0,001$

In der folgenden Abbildung wird ein 3D-Scan nach Entfernung der organischen Matrix gezeigt. Auch hier betrug die Scanzeit 10 Minuten.

Trotz gleicher Demineralisationszeit der Probe von 5 Minuten ist die Stufenhöhe im Vergleich zum 3D-Scan unter 4.4.1 wesentlich größer. Der Profilschrieb A, dargestellt durch die untere schwarze Linie in Abbildung 11, entspricht dem Zustand direkt nach Entfernung des Wassertropfens. Der Profilschrieb B, dargestellt durch die obere schwarze Linie in Abbildung 11, entspricht dem Zustand nach 10-minütiger Dehydrierung bei Raumluft. Auch hier ist wieder eine Wölbung der Probe erkennbar, die den Abfall der gemessenen Stufenhöhe nach 10-minütiger Dehydrierung erklärt.

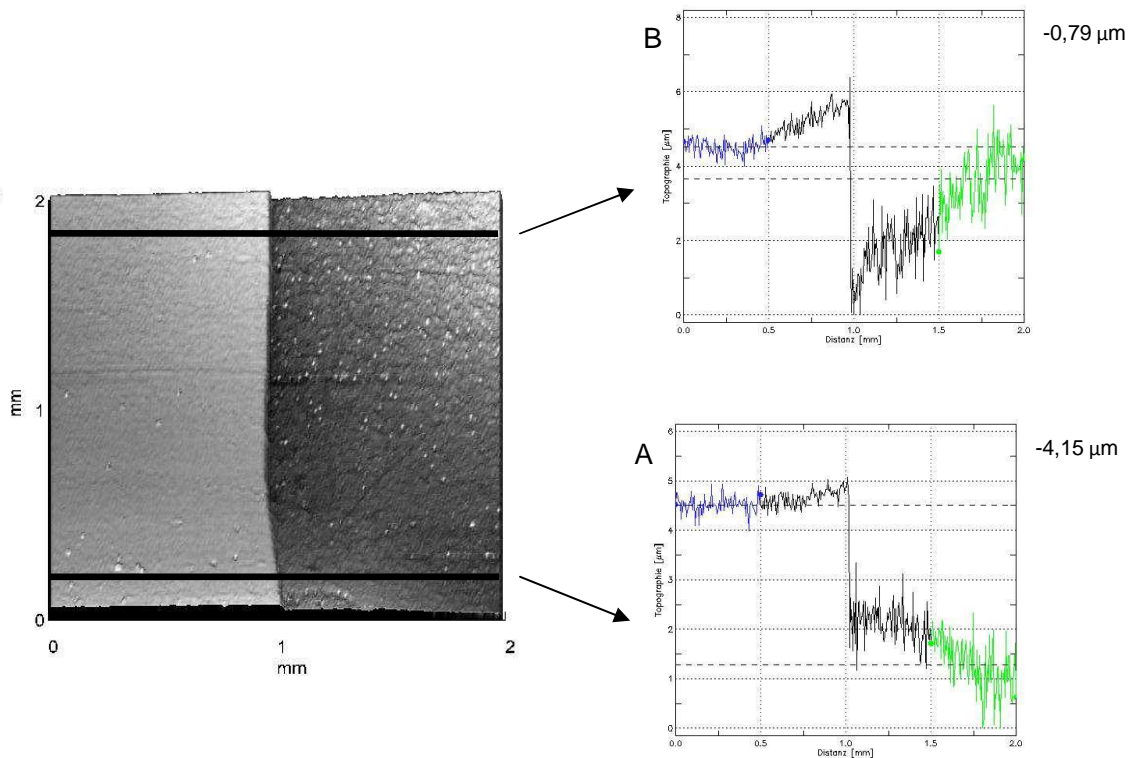


Abb. 11: 3D-Scan mit dem optischen Profilometer nach 5 Minuten Demineralisationszeit. Der hellere Bereich der Probe (links) stellt die unbehandelte Referenzfläche, der dunklere Bereich (rechts) die Versuchsfläche dar. Daneben befinden sich die entsprechenden Profilschriebe. Schrieb A (unten) entspricht dem Zustand nach Entfernung des Wassertropfens, Schrieb B (oben) entspricht dem Zustand am Ende der Scanzeit von 10 Minuten.

4.5 Einfluss der Dehydrierung der Proben auf die durch mechanische Profilometrie ermittelten Messwerte

4.5.1 Ergebnisse vor Entfernung der organischen Matrix

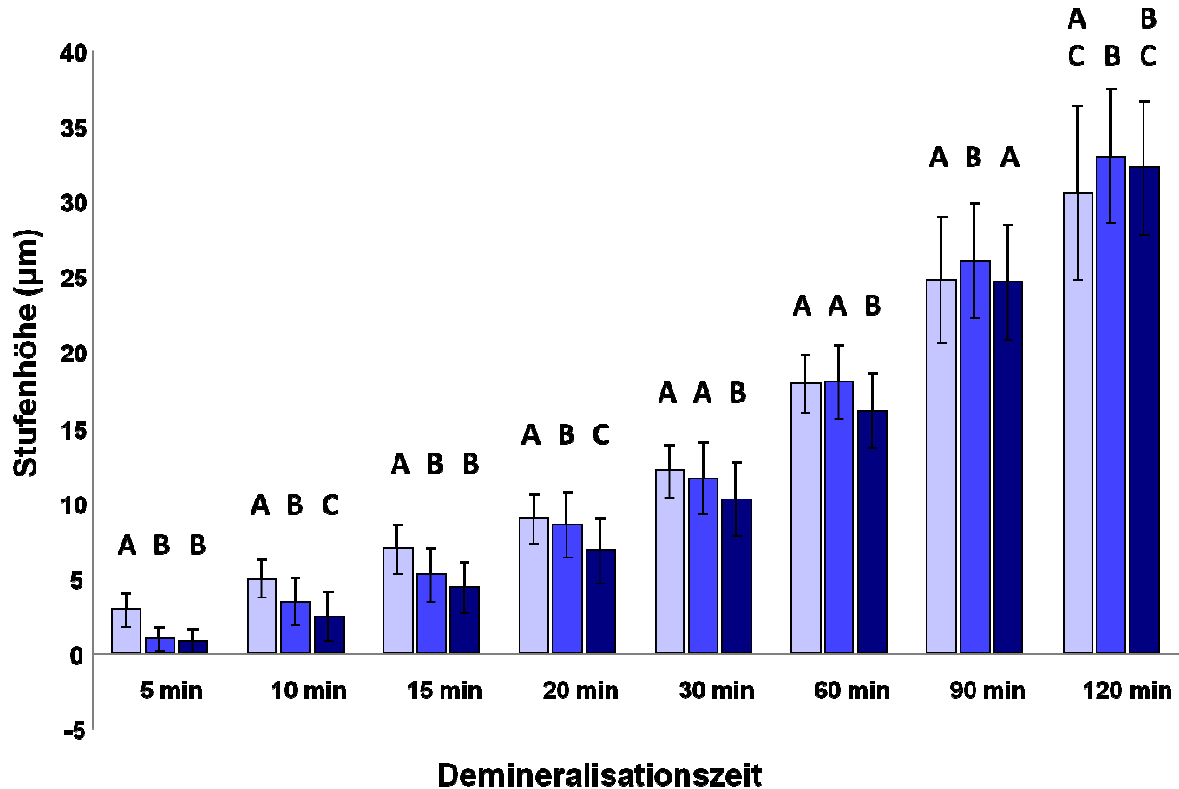


Abb. 12: Darstellung der arithmetischen Mittelwerte \pm Standardabweichungen der durch mechanische Profilometrie ermittelten Stufenhöhen vor Entfernung der organischen Matrix. Die Balken zeigen den Substanzverlust direkt nach Entfernung des Wassertropfens (hellblaue Balken) sowie nach 2-minütiger (blaue Balken) und nach 10-minütiger Dehydrierung der Probe (dunkelblaue Balken). Gleiche Buchstaben bedeuten, dass sich die gemessenen Stufenhöhen innerhalb einer Demineralisationszeit nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Mit zunehmender Demineralisationszeit ist auch hier wieder ein deutlicher Anstieg der Stufenhöhe bei allen Messbedingungen erkennbar. Diese stetige Zunahme ist bei den Messbedingungen direkt nach Entfernung des Wassertropfens⁵, nach

⁵ 10 zu 15 Minuten und 15 zu 20 Minuten $p \leq 0,05$; 5 zu 10 Minuten $p \leq 0,01$; 20 zu 30 Minuten, 30 zu 60 Minuten und 60 zu 90 Minuten $p \leq 0,001$

2-minütiger Dehydrierung⁶ der Probe und nach 10-minütiger Dehydrierung⁷ der Probe, mit wenigen Ausnahmen signifikant.

Betrachtet man die unterschiedlichen Messbedingungen innerhalb einer Demineralisationszeit, erkennt man bei den kurzen und mittleren Demineralisationszeiten bis 60 Minuten eine Abnahme der gemessenen Stufenhöhe mit zunehmender Dehydrierungszeit. Beim direkten Vergleich der Werte nach Entfernung des Wassertropfens und nach 10-minütiger Dehydrierung ist ein Abfall der Werte um durchschnittlich 2,2 μm zu erkennen.

Bei den Demineralisationszeiten von 90 und 120 Minuten ist zuerst eine Zunahme der Stufenhöhe vom Zustand direkt nach Entfernung des Wassertropfens im Vergleich zur 2-minütigen Dehydrierung der Probe zu erkennen. Darauf folgt eine Abnahme der Werte nach einer Dehydrierungszeit von 10 Minuten.

⁶ 15 zu 20 Minuten, 20 zu 30 Minuten und 90 zu 120 Minuten $p \leq 0,05$; 5 zu 10 Minuten, 30 zu 60 Minuten und 60 zu 90 Minuten $p \leq 0,001$

⁷ 15 zu 20 Minuten $p \leq 0,05$; 20 zu 30 Minuten $p \leq 0,01$; 30 zu 60 Minuten, 60 zu 90 Minuten und 90 zu 120 Minuten $p \leq 0,001$

4.5.2 Ergebnisse nach Entfernung der organischen Matrix

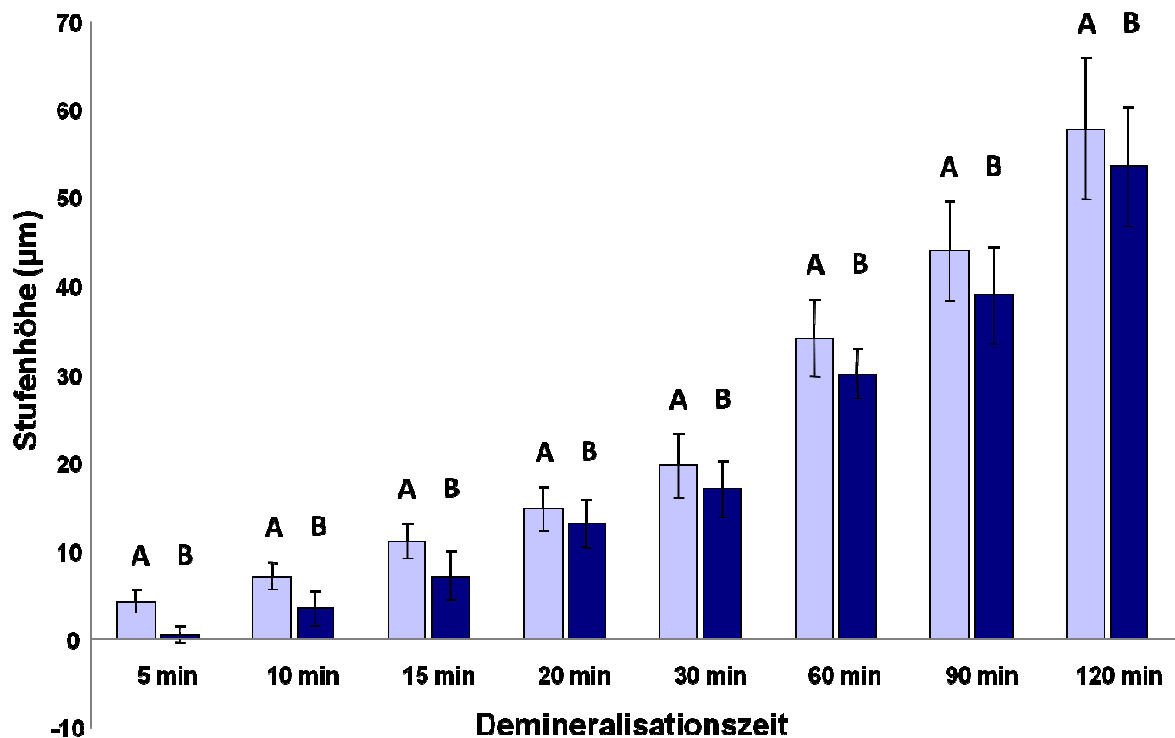


Abb. 13: Diese Abbildung zeigt die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardabweichung der durch mechanische Profilometrie ermittelten Stufenhöhen nach Entfernung der organischen Matrix. Die Balken zeigen den Substanzverlust direkt nach Entfernung des Wassertropfens (hellblaue Balken) und nach 10-minütiger Dehydrierung der Probe durch Raumluft (dunkelblaue Balken). Gleiche Buchstaben bedeuten, dass sich die gemessenen Stufenhöhen innerhalb einer Demineralisationszeit nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Nach Entfernung der organischen Matrix kommt es auch bei der Verwendung des mechanischen Tasters zu einer generellen Erhöhung der Stufenhöhen. Dabei ist auch hier wieder mit zunehmender Demineralisationszeit ein deutlicher Anstieg der Stufenhöhen sowohl direkt nach Entfernung des Wassertropfens⁸ als auch nach 10-minütiger Dehydrierung⁹ der Probe erkennbar.

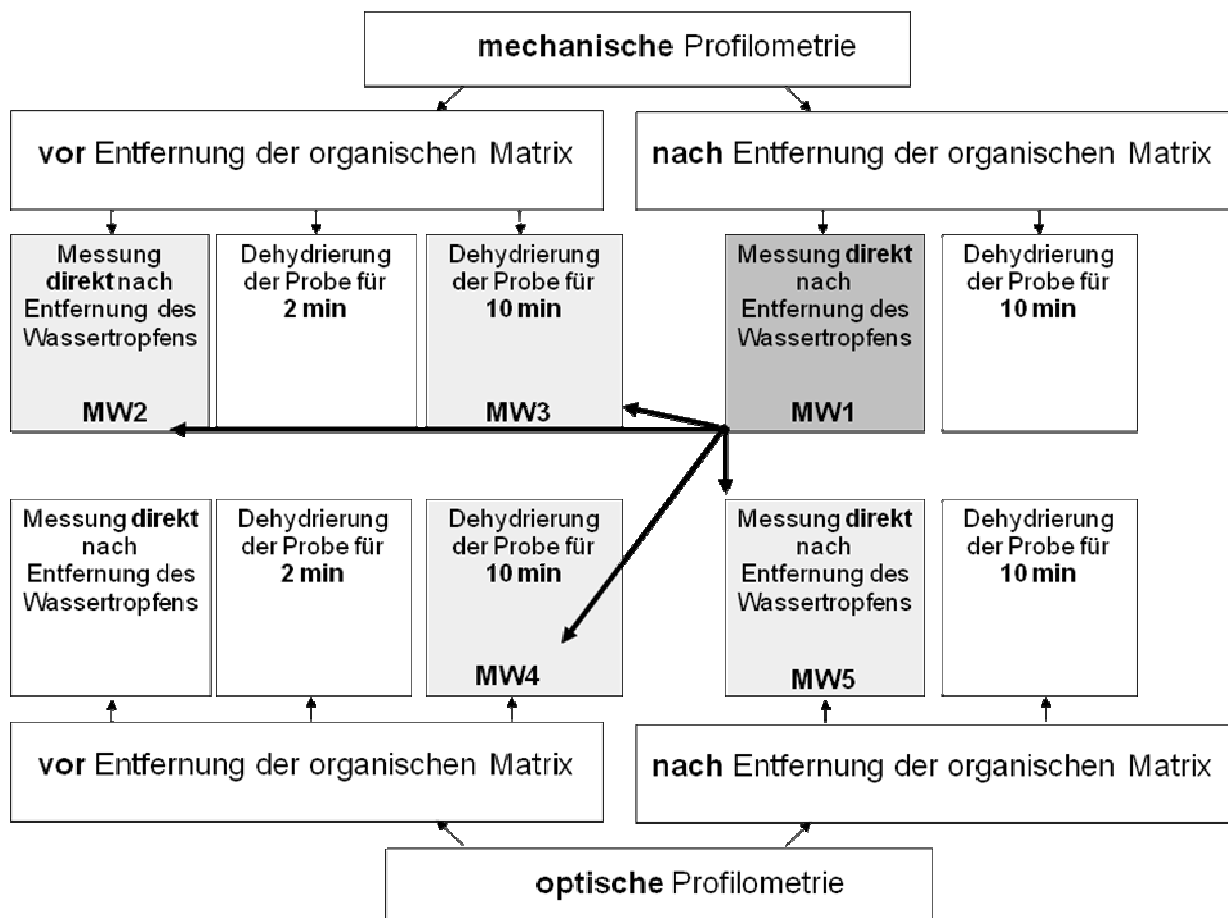
⁸ 15 zu 20 Minuten, 20 zu 30 Minuten, $p \leq 0,01$; 5 zu 10 Minuten, 10 zu 15 Minuten, 30 zu 60 Minuten, 60 zu 90 Minuten, 90 zu 120 Minuten $p \leq 0,001$

⁹ 20 zu 30 Minuten $p \leq 0,05$; 10 zu 15 Minuten $p \leq 0,01$; 5 zu 10 Minuten, 15 zu 20 Minuten, 30 zu 60 Minuten, 60 zu 90 Minuten, 90 zu 120 Minuten $p \leq 0,001$

Beim Vergleich der Messbedingungen innerhalb einer Demineralisationszeit ist wie bei den Ergebnissen, die durch den optischen Sensor ermittelt wurden, ein deutlicher Abfall der Stufenhöhe um durchschnittlich $3,6 \mu\text{m}$ nach 10-minütiger Dehydrierung der Probe zu erkennen.

4.6 Bland-Altman-Plots

Im Folgenden werden vier Bland-Altman-Plots gezeigt, in denen die Übereinstimmung zwischen fünf verschiedenen Messbedingungen untersucht wird. Dabei wird, Bezug nehmend auf die erste Methodenstudie [Ganss et al., 2009b], der Substanzverlust, der durch den mechanischen Taster nach Entfernung der organischen Matrix im hydrierten Zustand gemessen wurde, als „wahrer Wert“ für den Mineralverlust angesehen und gegen die anderen Messbedingungen überprüft.



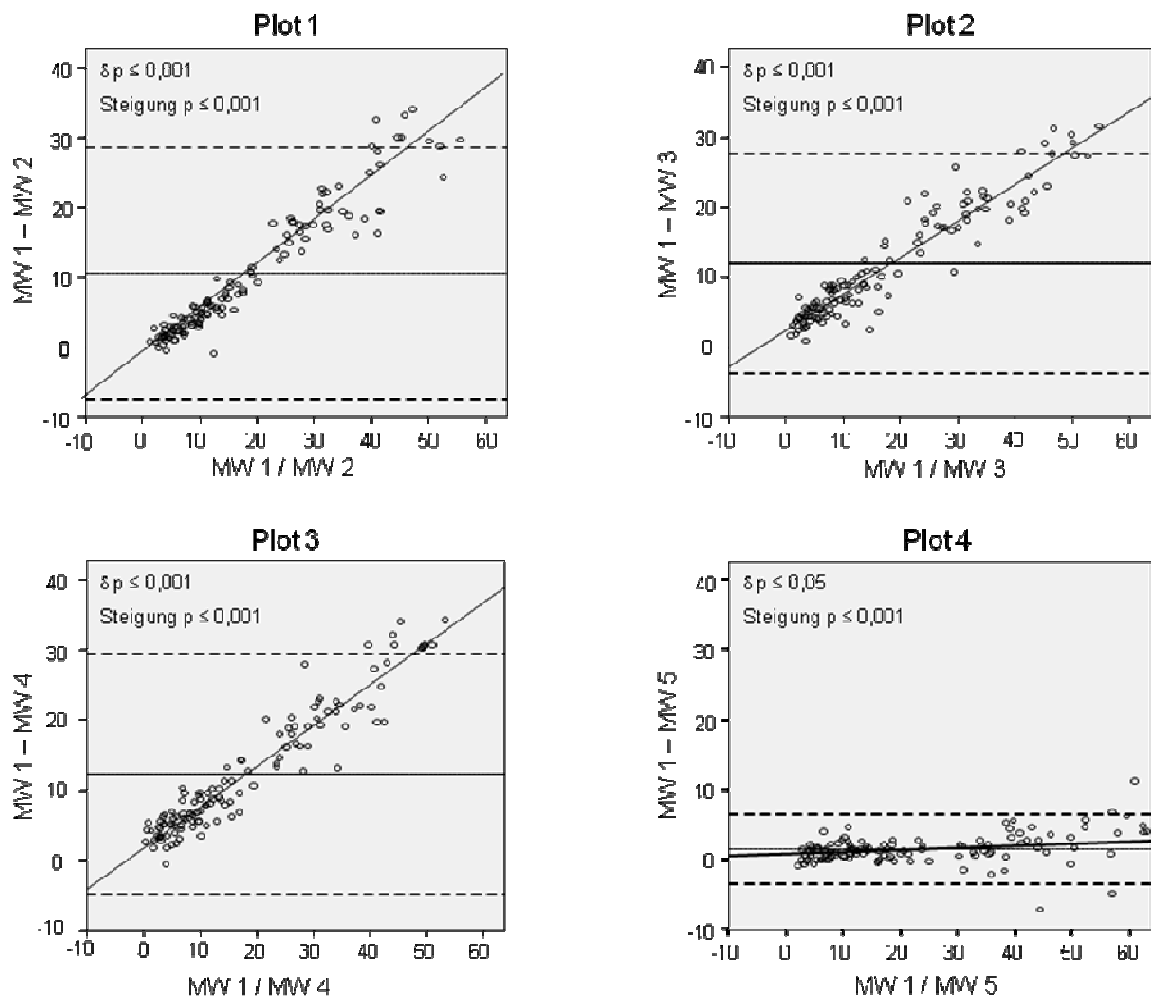


Abb. 14: Bland-Altman-Plots 1-4 zur Darstellung der Übereinstimmung unterschiedlicher Messbedingungen mit den durch den mechanischen Profilometer ermittelten Stufenhöhen nach Entfernung der organischen Matrix im hydrierten Zustand. Dargestellt wird der arithmetische Mittelwert für die Differenz aus beiden Methoden (durchgezogene Linie) $\pm 1,96 \times SD$ (gestrichelte Linien).

MW1: **mechanischer** Taster, **nach** Entfernung der organischen Matrix,
direkt nach Entfernung des Wassertropfens

MW2: **mechanischer** Taster, **vor** Entfernung der organischen Matrix,
direkt nach Entfernung des Wassertropfens

MW3: **mechanischer** Taster, **vor** Entfernung der organischen Matrix,
nach **10**-minütiger Dehydrierung der Probe

MW4: **optischer** Taster, **vor** Entfernung der organischen Matrix,
nach **10**-minütiger Dehydrierung der Probe

MW5: **optischer** Taster, **nach** Entfernung der organischen Matrix,
direkt nach Entfernung des Wassertropfens

Die Bland-Altman-Plots 1-3 zeigen einen systematischen und proportionalen Fehler sowie eine mit zunehmender Demineralisationszeit verbundene Zunahme der Streuung.

Der Bland-Altman-Plot 4 zeigt einen geringen, jedoch signifikanten systematischen sowie einen ebenfalls geringen, jedoch signifikanten proportionalen Fehler mit zunehmender Streuung bei zunehmender Demineralisationsdauer.

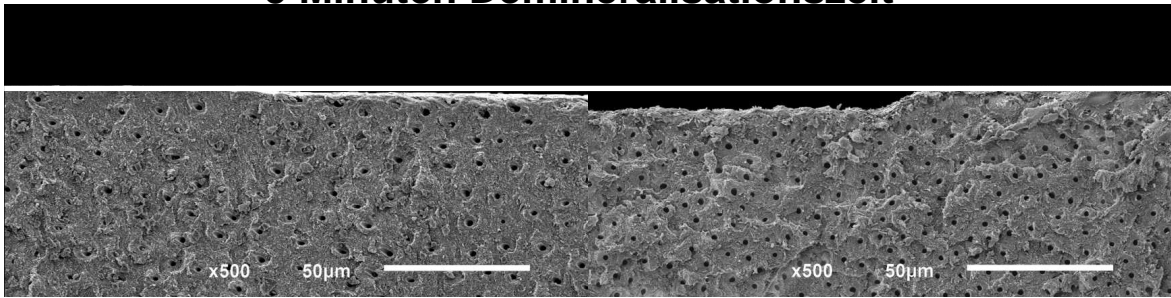
4.7 Rasterelektronenmikroskopische Bilder

Die nachfolgenden rasterelektronenmikroskopischen Bilder stammen je Demineralisationszeit aus einer Dentinprobe, die vor Versuchsbeginn in zwei Hälften gespalten wurde. Die eine Hälfte mit organischer Matrix (Probe 11a -15a pro Demineralisationszeit siehe 3.1.3) wurde nicht profilometrisch ausgewertet. Bei der anderen Hälfte (Probe 11-15 pro Demineralisationszeit siehe 3.1.3) handelt es sich um Proben, die vor und nach Entfernung der organischen Matrix profilometrisch vermessen wurden. Erst danach wurden rasterelektronenmikroskopische Bilder angefertigt.

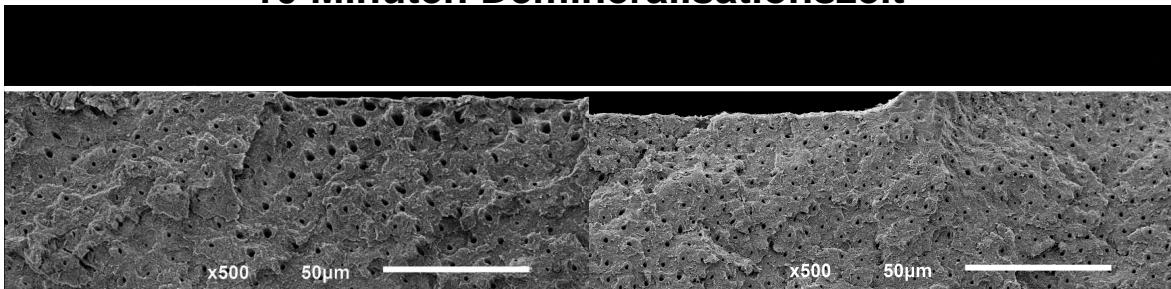
Auf den rasterelektronenmikroskopischen Bildern ist mit zunehmender Demineralisationszeit ein zunehmender Mineralverlust sowohl vor als auch nach Entfernung der organischen Matrix erkennbar. Die Mineralisationsfront befindet sich auf beiden Probenhälften ungefähr auf gleicher Höhe.

Bei der linken Bilderhälfte handelt es sich um Proben mit entmineralisierter organischer Matrix. Hier wird die Demineralisation durch die Freilegung des Kollagengeflechts und eine damit einhergehende Erweiterung der Dentintubuli sowie bei größeren Demineralisationszeiten zusätzlich durch einen leichten Zusammenfall des Kollagengeflechts ersichtlich. Bei den auf der rechten Seite dargestellten Proben wurde die organische Matrix enzymatisch entfernt. Der Mineralverlust ist hier als Substanzverlust in Bezug zur Referenzfläche gekennzeichnet.

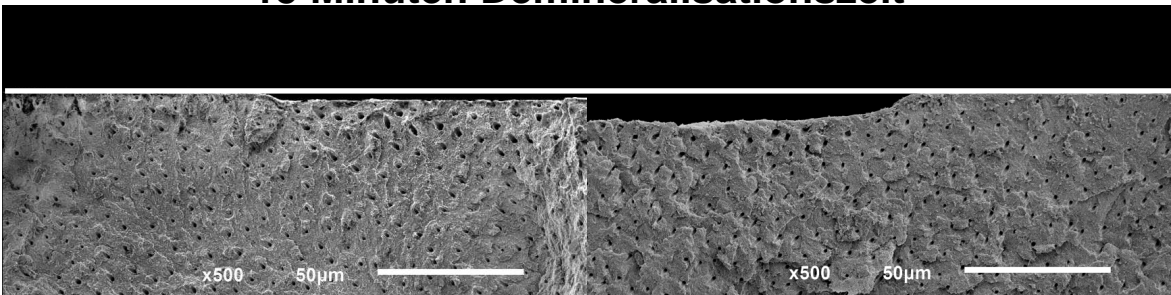
5 Minuten Demineralisationszeit



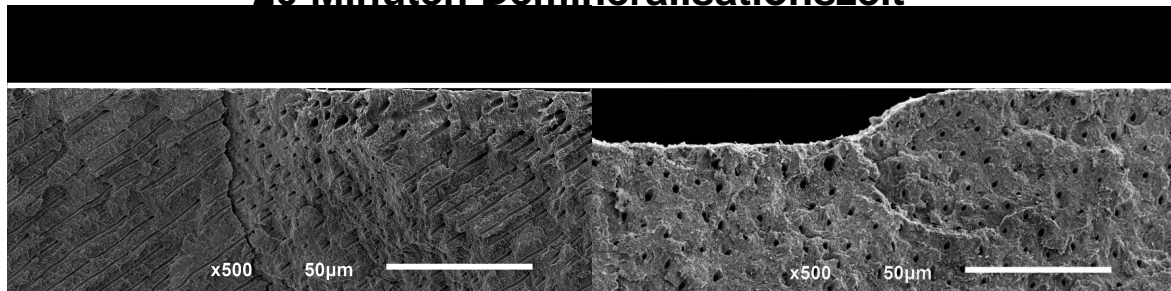
10 Minuten Demineralisationszeit



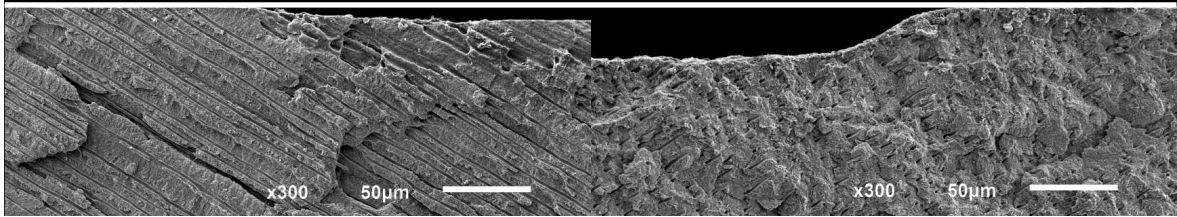
15 Minuten Demineralisationszeit



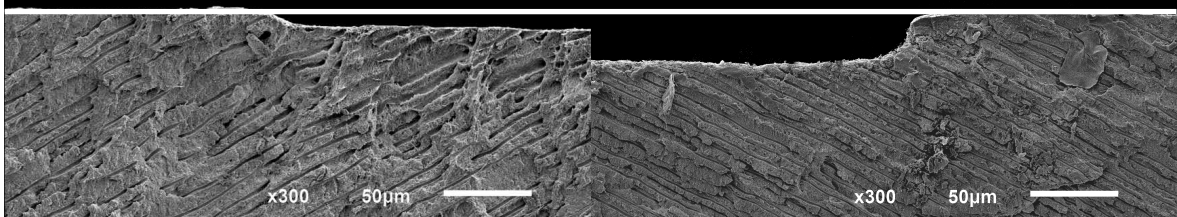
20 Minuten Demineralisationszeit



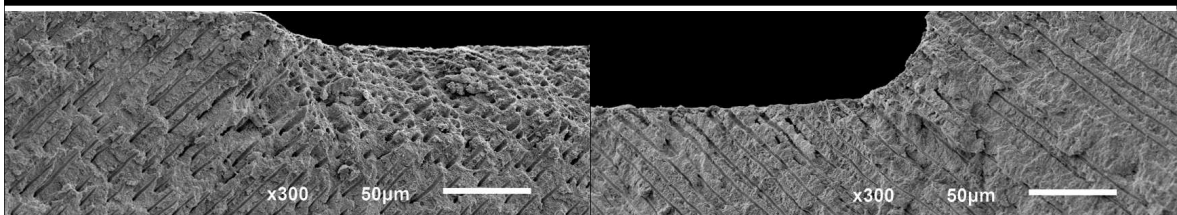
30 Minuten Demineralisationszeit



60 Minuten Demineralisationszeit



90 Minuten Demineralisationszeit



120 Minuten Demineralisationszeit

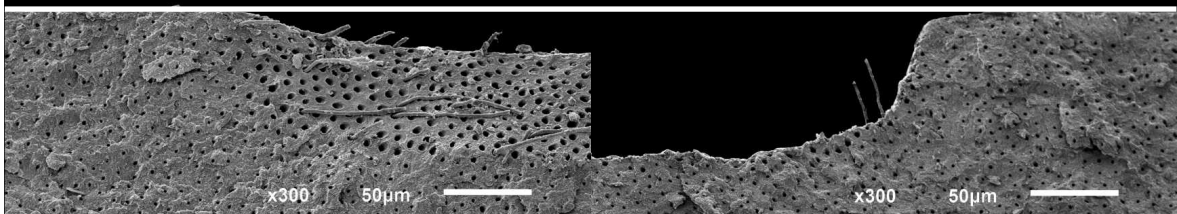


Abb. 15: Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder zeigen den Mineralverlust einer Dentinprobe je Demineralisationszeit. Auf der linken Seite befindet sich die Strukturaufnahme vor Entfernung der entmineralisierten organischen Matrix und auf der rechten Seite befindet sich die Strukturaufnahme nach Entfernung der entmineralisierten organischen Matrix. Die durchgezogene Linie stellt die Höhe der Referenzfläche dar.

In der unten stehenden Abbildung werden exemplarisch zwei für 120 Minuten demineralisierte Dentinproben sowohl nach der Kritisch-Punkt-Trocknung als auch nach ausschließlicher Trocknung an der Raumluft dargestellt.

Auf den linken Bilderhälften erkennt man, dass die organische Matrix durch die Kritisch-Punkt-Trocknung weitestgehend im Originalzustand dargestellt werden konnte. Dennoch ist ein leichter Zusammenfall des Kollagengeflechts nach 120 Minuten Demineralisationszeit erkennbar. Die entmineralisierte Matrix imponiert hier durch deutlich vergrößerte Tubulilumen.

Werden die Proben, wie in der rechten Bilderhälfte dargestellt, ausschließlich an der Raumluft getrocknet wird der Zusammenfall der organischen Matrix deutlich sichtbar. Die entmineralisierte organische Matrix wirkt eingefallen und die Tubulilumen sind vor allem in der oberen Probe kaum voneinander abgrenzbar.

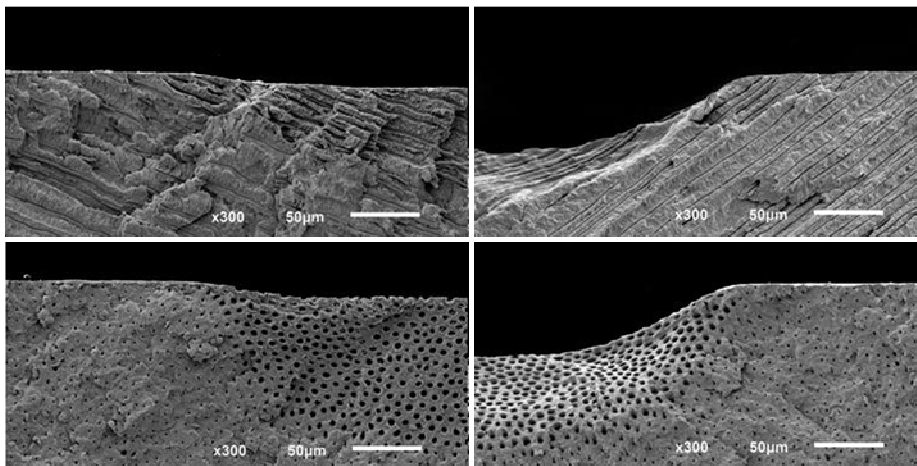


Abb. 16: Zu sehen sind zwei Dentinproben, die nach 120 Minuten Demineralisationszeit gespalten wurden. Die jeweils linke Probenhälfte wurde einer Kritisch-Punkt-Trocknung unterzogen, während die rechte Probenhälfte für mindestens vier Tage der Raumluft ausgesetzt war, bevor die rasterelektronenmikroskopischen Bilder angefertigt wurden.

4.8 EDX-Linescans der einzelnen Demineralisationszeiten vor und nach Entfernung der organischen Matrix

In den nachfolgenden Diagrammen finden sich die EDX-Linescans vor und nach Entfernung der organischen Matrix. Zwecks besserer Übersichtlichkeit werden nur die Kalziumwerte dargestellt.

Durch die EDX-Linescans kann der Kalziumanstieg als Funktion der Tiefe in Abhängigkeit von der Mineralisationsfront dargestellt werden. Vor Entfernung des freigelegten Kollagengeflechtes ist in der obersten entmineralisierten organischen Schicht kaum Kalzium nachweisbar. Es folgt eine teilweise mineralisierte Schicht, in der der Kalziumwert zügig ansteigt. Dem folgt ein Plateau, in dem der Kalziumwert von vollständig mineralisiertem Dentin widergespiegelt wird. Die Unregelmäßigkeiten in diesem Plateau sind durch die unterschiedlich stark mineralisierten Anteile im Dentin zu begründen.

Nach Entfernung der organischen Matrix steigt der Kalziumgehalt bei allen Proben innerhalb von wenigen μm stark an.

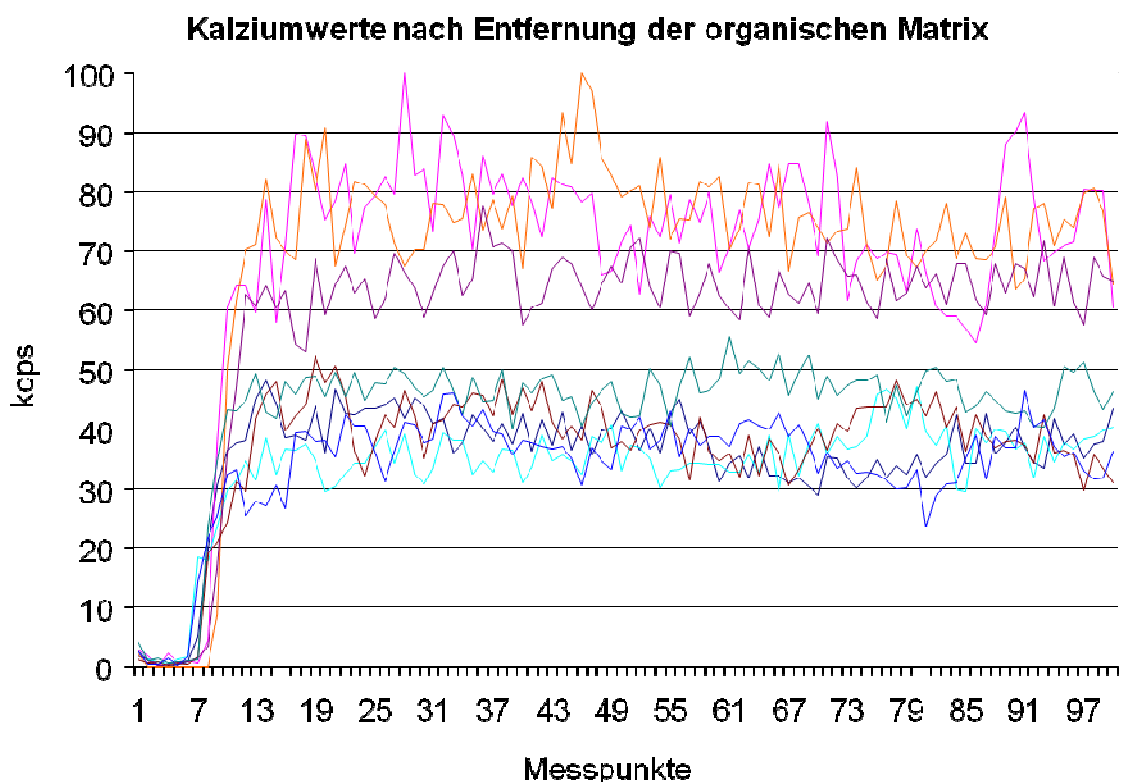
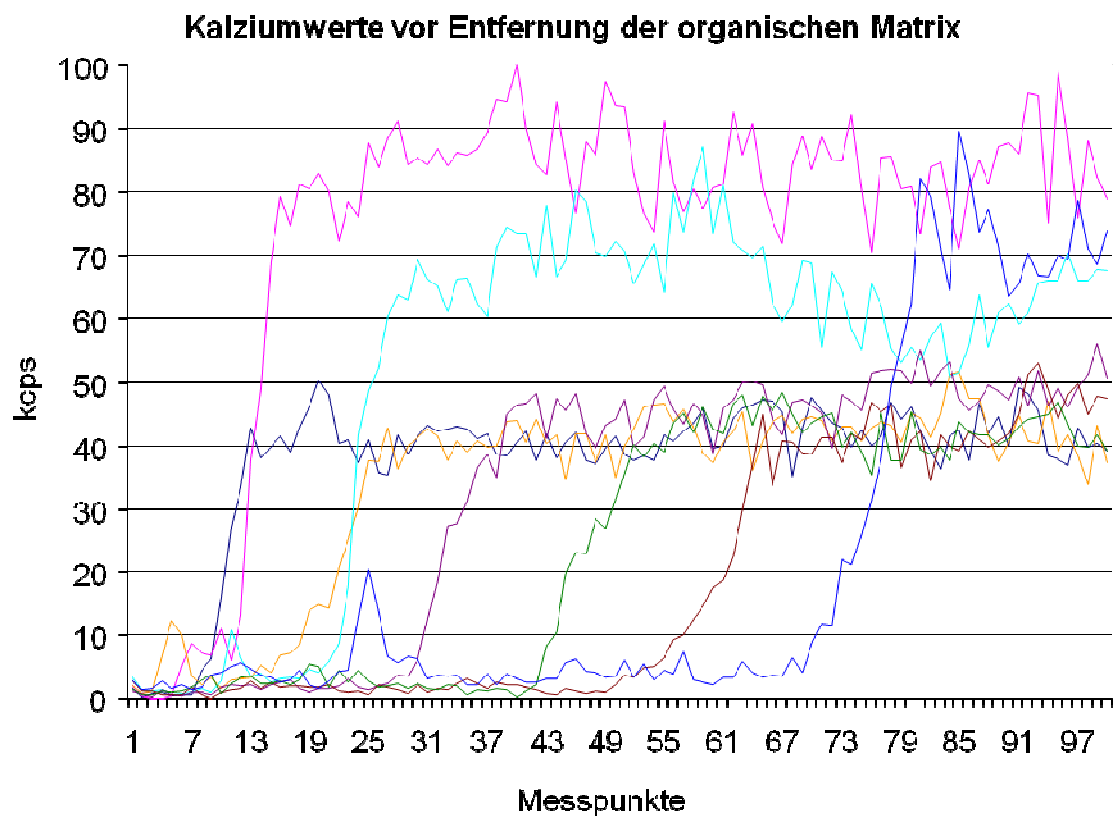


Abb. 17:

Die Abbildung zeigt den Anstieg der Kalziumwerte sowohl vor als auch nach Entfernung der organischen Matrix in Abhängigkeit der Demineralisationszeiten. Auf der x-Achse wird die 45 μm lange Messstrecke in 99 Messpunkte unterteilt. Auf der y-Achse wird die Menge der detektierten Röntgenquanten in kcps angegeben.

Demineralisationszeiten:

5 Minuten, 10 Minuten, 15 Minuten, 20 Minuten, 30 Minuten, 60 Minuten, 90 Minuten, 120 Minuten

5. Diskussion

5.1 Messprobleme aufgrund der komplexen Histologie des Dentins

Die Profilometrie ist in der Erosionsforschung ein etabliertes Verfahren zur Quantifizierung von Läsionstiefen am Schmelz. Bei Erosionen am Schmelz handelt es sich um einen kontinuierlich zentripetal voranschreitenden Mineralverlust, der durch einen Volumenverlust gekennzeichnet ist. Das verbleibende Gewebe ist bis zu einer Tiefe von wenigen μm teilweise demineralisiert [Cheng Z.J. et al., 2009; Lussi et al., 2011].

Ungeachtet der komplexen Histologie wird die Profilometrie auch am Dentin angewendet. Bei einem erosiven Säureangriff am Dentin handelt es sich jedoch, zumindest in vitro, nicht wie beim Schmelz um einen Volumenverlust, sondern um Strukturveränderungen des Gewebes. Der mineralische Anteil wird herausgelöst, während die organischen strukturbildenden Elemente persistieren und sich die Mineralisationsfront in tieferen Gewebsschichten darstellt.

Das auf der Mineralisationsfront verbleibende organische Gewebe stellt ein erhebliches Problem bei der profilometrischen Quantifizierung des Mineralverlustes dar. Dies wurde bereits 2007 thematisiert [Ganss et al., 2007] und in der ersten Methodenstudie zur Quantifizierung des Mineralverlustes am Dentin von 2009 ausführlich eruiert [Ganss et al., 2009b]. Beide Studien zeigten bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse, dass aufgrund des persistierenden Kollagengeflechtes weder der optische Sensor noch der mechanische Taster in der Lage sind, die Mineralisationsfront korrekt abzubilden [Ganss et al., 2007; Ganss et al., 2009b].

Aufgrund der unterschiedlichen Messverfahren beider Systeme werden zudem unterschiedliche Messergebnisse erzielt. Während der optische Sensor die organische Matrix abscannt, gräbt sich der mechanische Taster in die organische Matrix ein. Dementsprechend ist der messbare vertikale Abstand mit dem optischen Sensor sehr klein. In der ersten Methodenstudie wurden Werte zwischen $4,6 \mu\text{m}$ nach 30 Minuten Demineralisationszeit und $5,4 \mu\text{m}$ nach 120 Minuten Demineralisationszeit gemessen. In der vorliegenden Studie

reduzierten sich die Werte, durch die Verwendung eines anderen optischen Profilometers mit schnellerer Messzeit, nochmals und lagen zwischen 1 μm und 3,4 μm für die entsprechenden Demineralisationszeiten.

Größere Stufenhöhen werden durch den mechanischen Taster ermittelt. In der ersten Methodenstudie wurden Werte zwischen 11,9 μm nach 30 Minuten Demineralisationszeit und 27,8 μm nach 120 Minuten Demineralisationszeit gemessen [Ganss et al., 2009b]. Ähnliche Messwerte wurden auch in der vorliegenden Studie unter Verwendung desselben mechanischen Profilometers und mit den gleichen Messbedingungen für die entsprechenden Demineralisationszeiten erzielt.

Erst nach enzymatischer Entfernung der organischen Matrix liegt die Mineralisationsfront frei und kann profilometrisch dargestellt werden. In der ersten Methodenstudie wurde dies durch den Vergleich der ermittelten Werte, mit den Ergebnissen der Kalziumanalyse, die unabhängig von Vorhandensein der organischen Matrix den Mineralverlust quantifiziert, bestätigt. Zudem bestätigten die rasterelektronenmikroskopischen Bilder die vollständige Entfernung der organischen Matrix. Die ermittelten Werte lagen in der ersten Methodenstudie bei 18,1 μm mit dem optischen Sensor (OP) beziehungsweise 18,3 μm mit dem mechanischen Taster (MP) nach 30-minütiger Demineralisationszeit und bei 43,0 μm (OP) beziehungsweise 46,9 μm (MP) nach 120-minütiger Demineralisationszeit [Ganss et al., 2009b]. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in der vorliegenden Studie unter den gleichen Messbedingungen ermittelt werden.

Die unterschiedlichen Werte zwischen den zwei Tasterarten sind durch Rückstände auf der Dentinoberfläche begründet. Während der optische Sensor die Oberfläche mit den Rückständen des organischen Materials abscaant, drängt der mechanische Taster diese zur Seite oder gräbt sich in die teilmineralisierte Mineralisationsfront ein [Ganss et al., 2009b].

Bereits die Studie von 2007 zeigt, dass eine Dehydrierung der Probe einen erheblichen Einfluss auf die profilometrischen Messergebnisse hat. Im feuchten Zustand der Probe befindet sich das Kollagengeflecht trotz des erheblichen Mineralverlustes auf Höhe der Referenzfläche. Eine Dehydrierung führt zu einem Zusammenfall des Kollagengeflechtes, das sich jedoch durch Wiederbefeuchtung in den Ausgangszustand aufrichtet [Ganss et al., 2007].

Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden, dass nicht nur die organische Matrix anfällig gegenüber Austrocknung ist, sondern auch der mineralisierte Anteil Schrumpfungsprozessen während der Austrocknung unterliegt. Dies wird bei der Betrachtung der Histologie von mineralisiertem Dentin verständlich. Das mineralisierte Dentin ist ein wasserreiches Gewebe mit einem Wasseranteil von 25 Vol% [Radlanski, 2011]. Damit ist Dentin wesentlich feuchter als Schmelz (12 Vol%) [Radlanski, 2011]. Das Wasser liegt sowohl in gebundener als auch in nichtgebundener Form vor und nimmt von 1 Vol% nahe der Schmelz-Dentin-Grenze bis hin zur Pulpa stetig zu [Pashley, 1996]. Durch den hohen Wasseranteil unterliegt Dentin während der Austrocknung einer dimensional Veränderung [Van der Graaf und ten Bosch, 1993]. Diese Schrumpfungsprozesse von mineralisiertem Dentin sind bereits aus der Kariologie bekannt und werden mit 0,3% [Ruben und Arends, 1993] bzw. 0,5% bis 2% [Kinney et al., 1993] angegeben. Wie die Ergebnisse und der 3D-Scan dieser Studie zeigen, führt diese dimensionale Veränderung zu einer Wölbung der Probe und damit zu einer Verkleinerung der gemessenen Werte.

Dehydrierungsbedingte Schrumpfungen des Dentins wurden auch in der Arbeitsgruppe von Attin et al. beobachtet. Dazu wurde sowohl Schmelz als auch Dentin verschiedenen Messbedingungen unterzogen und profilometrisch vermessen. In dem Versuchsaufbau wurden die erodierten Proben in einem Keramikring befestigt, der eine dehydrierungsunabhängige Referenzfläche darstellte.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass Schmelz keinen Dehydrierungseffekten unterliegt. Auch bei den Messungen von Dentin im Wasser konnten keine schrumpfungsbedingten Veränderungen über die Zeit festgestellt werden. Erst durch die Dehydrierung der Probe an der Raumluft wurde ein Anstieg des vertikalen Abstandes durch den Zusammenfall des Kollagengeflechtes beschrieben. In dieser Studie stiegen die Werte bis zur 30- bis 60-minütigen Dehydrierung stetig an. Erst danach wurde ein Plateau erreicht. Die Austrocknung der Proben im Exsikkator für 7 Tage und ein anschließendes Vermessen der Probe im Wasser führte wider Erwarten auch zu einem stetigen Anstieg der Messergebnisse. Dies ist wahrscheinlich durch das Ablösen der Probe vom Keramikring und durch eine irreversible Verformung der Probe zu erklären.

Da die Messungen ausschließlich mit organischer Matrix durchgeführt wurden, ist keine Unterscheidung zwischen Austrocknungseffekten im entmineralisierten beziehungsweise mineralisierten Anteil möglich. Darüber hinaus wurden die Proben langen Trocknungszeiten unterzogen, wahrscheinlich mit dem Ziel, eine bewusste beziehungsweise vollständige Austrocknung der Proben zu simulieren. Die Messdauer lag bei 181 Minuten beziehungsweise 7 Tagen im Eksikkator. Demgegenüber wurde in der vorliegenden Studie der Schwerpunkt auf kurze Dehydrierungszeiten gelegt, um die Auswirkungen einer ungewollten Verzögerung des Messbeginns oder einer zu langen Messdauer zu untersuchen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass im Gegensatz zum Schmelz nach einem erosiven Säureangriff die profilometrische Quantifizierung des Mineralverlustes am Dentin nur nach enzymatischer Entfernung des organischen Materials im hydrierten Zustand der Probe möglich ist. Ob der mechanische Taster in der Lage ist, bei geringeren Substanzverlusten den Mineralverlust zu quantifizieren, ohne die organische Matrix zu entfernen, sollte in der vorliegenden Studie eruiert werden.

Zudem ist Dentin durch die komplexe Histologie sowohl im demineralisierten als auch im mineralisierten Zustand anfällig gegenüber Austrocknung. Schon nach kurzer Zeit an der Raumluft kommt es zu einem dehydrierungsbedingten Zusammenfall der organischen Matrix sowie zu einer Verformung des mineralischen Anteils, was zu einer Verfälschung der Ergebnisse führt. Ziel dieser Studie war es, den Zeitraum und die Größenordnung, in denen solche Dimensionsveränderungen stattfinden, unter verschiedenen Messbedingungen, zu evaluieren.

Alle diese Aspekte führen jedoch dazu, dass die Profilometrie nicht einfach von Schmelz auf Dentin übertragbar ist, sondern besondere Anforderungen an die Messmethode stellt, die bislang in der Literatur nur unzureichend berücksichtigt wurden.

5.2 Bisherige Anwendung der Profilometrie am Dentin und dadurch entstehende Messprobleme

5.2.1 Allgemeine Anwendungsverfahren der Profilometrie

Für die profilometrische Darstellung von Erosionsdefekten am Dentin sind die Messbedingungen nicht standardisiert. Folglich variieren die Abdeckungsverfahren der Referenzfläche, die Tasterart, Anzahl und Länge der einzelnen Profilschriebe sowie die Art der Auswertung. Hinzu kommt, dass Angaben zu den Messbedingungen zum Teil ungenügend sind oder ganz fehlen.

Vor Versuchsbeginn werden die Proben meist zu einem bestimmten Anteil abgedeckt. Dieser abgedeckte Bereich stellt die Referenzfläche dar, die später die Ausgangssituation bei der Auswertung widerspiegelt. Die Abdeckung erfolgte entweder mit lichthärtendem Kunststoff [Ganss et al., 2007], einem PVC-Band [Stafne und Lovestedt, 1947], Tesafilm [Pretty et al., 2003] oder Nagellack [Sales-Peres et al., 2007]. Die Abdeckung wird dabei so angebracht, dass sich die Versuchsfläche entweder einseitig an der Referenzfläche befindet [Ganss et al., 2009b] oder mit einem definierten Abstand zwischen zwei Referenzflächen liegt [Wetton et al., 2007].

Die Arbeitsgruppe von Attin et al. [2009] fixierte die Dentinproben adhäsiv in einem Keramikring. Dieser Keramikring stellte dabei eine probenunabhängige Referenzfläche dar, während die gesamte Dentinprobe als Versuchsfläche diente. Liegen die Versuchs- und Referenzfläche auf einer Probe, wird zur Ermittlung des Substanzverlustes nach der Versuchsdurchführung die Abdeckung der Referenzfläche entfernt. Anschließend fährt der Taster oder Sensor des Profilometers sowohl über die Referenzfläche als auch über die Versuchsfläche. Der vertikale Abstand beider Flächen stellt die gemessene Stufenhöhe dar.

Bei der Ermittlung des Substanzverlustes wird in der Literatur bei der Auswahl der Tasterart die mechanische Profilometrie für die Darstellung der Läsionstiefe am Dentin bevorzugt [Ponduri et al., 2005; Wetton et al., 2006; Wiegand et al., 2010; Magalhaes et al., 2010; Kato et al., 2010a]. Die optische Profilometrie wurde hingegen nur vereinzelt angewendet [Wiegand et al., 2004; Austin et al., 2010] oder vergleichend zu den Ergebnissen des mechanischen Profilometers hinzugezogen [Ganss et al., 2007; Ganss et al., 2009b]. In anderen Studien

wurde die Profilometerart nicht dokumentiert [Sales-Peres et al., 2007; Wiegand et al., 2007].

Die Anzahl der Profilschriebe variiert pro Probe zwischen 2 [Stafne und Lovestedt, 1947] und 6 Profilschrieben [Wiegand et al., 2007], die später zu einem Mittelwert zusammengefasst werden. Der Abstand zwischen den einzelnen Profilschrieben liegt zwischen 0,2 mm [Wiegand et al., 2007] bis 0,5 mm [Wiegand et al., 2006a]. Zudem variiert die Profilschrieblänge zwischen 250 µm [Wiegand et al., 2006a] und 2 mm [Magalhaes et al., 2012].

Besonders bei der Quantifizierung sehr kleiner Substanzverluste ist die initiale Planheit der Proben von zentraler Bedeutung. Die Toleranzgrenzen für die Abweichung von der Planheit liegen in der Literatur zwischen $\pm 0,1 \mu\text{m}$ [Macdonald et al., 2010] und $\pm 0,5 \mu\text{m}$ wie in der vorliegenden Studie und sind abhängig von der Dimension der Zielgröße.

Eine andere Möglichkeit, Differenzen zwischen der Versuchs- und Referenzfläche zu umgehen, ist die Überlagerung von Profilschrieben der Ausgangssituation mit der Situation nach der Versuchsdurchführung. Der vertikale Abstand der Versuchsfläche nach Überlagerung des ersten und zweiten Profilschriebs, also vor und nach der Versuchsdurchführung, stellt die Stufenhöhe dar [Wiegand et al., 2006a].

Vereinzelt wurde die Stufenhöhe auch mit Hilfe eines 3D-Scans bestimmt. Dazu wurde eine definierte Fläche von 2x2 mm eingescannt und mit Hilfe der dazugehörigen Software ausgewertet. Durch die Differenz zweier aufeinanderfolgenden 3D-Scans konnte der Höhenunterschied zur Ausgangssituation bei voranschreitender Läsionstiefe dargestellt werden [Macdonald et al., 2010]. Allerdings stellt die lange Messzeit eines 3D-Scans ein Problem dar.

5.2.2 Profilometrische Messbedingungen

Unabhängig von der Art der Messverfahren nimmt die Feuchtigkeitskontrolle der Proben, wie die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, eine besondere Rolle bei der profilometrischen Quantifizierung des Mineralverlustes am Dentin ein. Obwohl die Anfälligkeit des freigelegten Kollagengeflechtes gegenüber Austrocknung bereits aus der Kariologie bekannt ist, wurde der

Feuchtigkeitskontrolle bislang bei nahezu allen Studien eine unzureichende Bedeutung beigemessen. Folglich werden die Messbedingungen in den meisten Studien nicht dokumentiert [Vanuspong et al., 2002; Pretty et al., 2003; Wetton et al., 2006; Sales-Peres et al., 2007; Wetton et al., 2007; Wiegand et al., 2010]. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass die Proben für eine unbestimmte Zeit der Raumluft ausgesetzt wurden, bevor sie profilometrisch vermessen wurden.

In anderen Studien wurden die Messbedingungen unvollständig beschrieben. So wird in zwei Studien eine Trocknung der Dentinproben mit einem Wattepellet angegeben, die Dauer bis zur Messung der Probe wird jedoch nicht erwähnt [Wiegand et al., 2004; Wiegand et al., 2006a]. In einer weiteren Studie wurden die Dentinproben absichtlich vorher der Raumluft zur Trocknung ausgesetzt, die Trocknungsdauer ist jedoch unbekannt [Austin et al., 2010].

Vereinzelt wird die Feuchtigkeitskontrolle in den Studiendesigns beachtet, allerdings nicht konsequent durchgeführt. So wurden beispielsweise in den Studien von Magalhaes et al. die Dentinproben vor der Messung feucht gelagert und das überschüssige Wasser direkt vor der Messung entfernt [Magalhaes et al., 2008; Magalhaes et al., 2012]. Nach der Entfernung des Wassertropfens wurden jedoch 5 Profilschriebe hintereinander im Abstand von 0,5 mm aufgezeichnet, ohne die Proben zwischendurch erneut zu befeuchten. Basierend auf den Erkenntnissen der Studie von 2007 und den Ergebnissen dieser Studie kann je nach Art des Profilometers die Aufzeichnungsdauer aller 5 Profilschriebe und die Dauer, bis alle Einstellungen am Profilometer vorgenommen wurden, um den entsprechenden Abstand zwischen den Profilschrieben zu gewährleisten, zu einer deutlichen Austrocknung der Probe führen.

Zusätzlich wurden diese Dentinproben mit Hilfe eines Aceton-Wasser-Gemisches (1:1) gesäubert, um den Nagellack zur Abdeckung der Referenzfläche vollständig zu entfernen. Durch mögliche Rückstände des Acetons auf der Probe könnte es zu einer noch schnelleren Austrocknung der Probe gekommen sein.

Das gleiche Problem besteht bei der Stufenhöhenmessung durch aufeinanderfolgende 3D-Scans. In der Studie von Macdonald et al. [2010] wurde eine 2x2 mm große Fläche eingescannt. Die Scandauer beziehungsweise die Auflösung des 3D-Scans ist unbekannt. Dennoch nimmt abhängig von der

gewählten Scanfläche, Auflösung und Art des Profilometers ein 3D-Scan einige Zeit in Anspruch, die zu einer Austrocknung der Probe führen kann. In der vorliegenden Studie wurde ein 3D-Scan mit der gleichen Fläche von 2x2 mm und einer Auflösung von 400x400 Pixel gewählt (siehe 4.4.1 Abbildung 9 und 4.4.2 Abbildung 11). Die Scandauer betrug hierbei 10 Minuten.

Es gibt nur wenige Studien, in denen die Dentinproben zu jedem Zeitpunkt im vollständig hydrierten Zustand vermessen wurden. Dazu zählt die Methodenstudie von Attin et al., in der die Dentinproben im Wasser vermessen wurden [Attin et al., 2009] und die Studien der Arbeitsgruppe von Ganss et al. In diesen Versuchen wurden die Dentinproben vor jedem Profilschrieb erneut befeuchtet und das überschüssige Wasser direkt vor der Messung entfernt [Ganss et al., 2009b; Ganss et al., 2010a; Ganss et al., 2010b].

Neben der unzureichenden Feuchtigkeitskontrolle der Proben wurde in fast allen Studien das Kollagengeflecht nach dem Säureangriff auf der Probenoberfläche belassen. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse der vorangegangenen [Ganss et al., 2007, Ganss et al., 2009b] und der vorliegenden Studie bedeutet das, dass keine der Studien die Mineralfront gemessen hat, sondern einen beliebigen Wert in oder auf der ausgetrockneten organischen Matrix.

5.3 Methodendiskussion

5.3.1 Probenherstellung

Zur Probenvorbereitung wurden ausschließlich vollständig retinierte humane Weisheitszähne verwendet, um Veränderungen der Zahnstruktur durch Karies oder andere Abnutzungserscheinungen in der Mundhöhle sowie altersbedingte Unterschiede im Probenmaterial ausschließen zu können.

Erosionen manifestieren sich meist koronal der Schmelz-Zement-Grenze. Aus diesem Grund wurden für den Versuchsaufbau Dentinproben aus dem koronalen Dentin verwendet. Pro Zahn entstanden 3-4 Dentinproben. In einer Studie wurde gezeigt, dass zwischen den verschiedenen Probeentnahmestellen (mesial, distal, oral, vestibulär) des koronalen Dentins nach einem erosiven Säureangriff keine signifikanten Unterschiede in der Läsionstiefe auftreten [Ganss et al., 2000].

Auf die Verwendung von Wurzeldentin wurde verzichtet, da infolge der unterschiedlichen Zusammensetzung von radikulärem und koronalem Dentin signifikante Unterschiede in der Läsionstiefe zwischen beiden Geweben festgestellt wurden [Ganss et al., 2000].

Zudem wurde bei der Probenvorbereitung darauf geachtet, als Versuchsfläche ausschließlich Probenoberflächen aus der dem Schmelz zugewandten Seite zu verwenden.

5.3.2 Demineralisationslösung

Für die Demineralisation der Proben wurde Zitronensäure verwendet. 1994 wurde über die Hälfte der industriell hergestellten Zitronensäure in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Dabei wurde der größte Anteil zur Herstellung von Getränken verwendet [Bundesinstitut für Risikobewertung, 2004]. Die durchschnittliche Konzentration von Zitronensäure in Getränken liegt zwischen 0,1% und 1% [West et al., 2001].

Zitronensäure findet in der Erosionsforschung häufig als Demineralisationslösung Anwendung. Um einen Vergleich der gemessenen Werte innerhalb der Arbeitsgruppe gewährleisten zu können, wurde in der vorliegenden Studie eine 0,05 molare Zitronensäure verwendet [Ganss et al., 2009b; Ganss et al., 2010b; Ganss et al., 2010c]. Diese Konzentration entspricht ungefähr der Konzentration von Zitronensäure in Orangensaft [West et al., 2001].

Während der gesamten Erosionszeit wurden die Proben einer konstanten Temperatur von 37 °C ausgesetzt. Diese Temperatur wurde auch in der vorangegangenen Methodenstudie von 2009 gewählt, um eine konstante Temperatur während des Versuches gewährleisten zu können.

Neben der Temperatur beeinflussen auch die dynamischen Verhältnisse an der Grenzfläche zwischen Hartgewebe und flüssiger Phase das Ausmaß der Läsion. Durch den Kontakt einer Säure auf die Zahnoberfläche dissoziieren Mineralien. Je schneller diese freiwerdenden Ionen an der Oberfläche durch ein anderes Medium abtransportiert werden, desto größer ist der Substanzverlust. Bislang wurde dies nur bei Schmelzproben untersucht [Eisenburger und Addy, 2003]. Es ist aber anzunehmen, dass dieser Zusammenhang auch auf Dentin übertragbar ist.

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Werte wurde die Schüttelfrequenz von 35 pro Minute ebenfalls aus der vorangehenden Methodenstudie übernommen und während der gesamten Versuchsdurchführung konstant gehalten.

5.3.3 Demineralisationszeiten

Ziel bei der Auswahl von Demineralisationszeiten war es, ein möglichst großes Spektrum der am häufigsten verwendeten Erosionszeiten zu verwenden. Allerdings werden zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen neben den unterschiedlichen Demineralisationszeiten auch unterschiedliche Demineralisationslösungen, unterschiedliche Temperaturen und Schüttelfrequenzen gewählt. Durch die Abänderung der einzelnen Parameter ist eine Vergleichbarkeit zwischen den erhobenen Werten dieser vorliegenden Studie und den Werten anderer Arbeitsgruppen kaum möglich.

In der Erosionsforschung unterscheidet man hauptsächlich zwischen zwei verschiedenen Modellen der Säureapplikation. Zum einen werden wiederkehrende kurze Demineralisationszeiten angewendet und zum anderen werden die Proben der Säure einmalig für eine bestimmte Zeit ausgesetzt.

Bei der erstgenannten Methode werden klinisch relevante Situationen dargestellt, indem hochfrequente Säureeinwirkungen simuliert werden, wie sie beispielsweise bei Patienten mit Essstörungen in Kombination mit Erbrechen auftreten. Dafür werden täglich mehrmals auftretende kurze Demineralisationszeiten gewählt. Die

Erosionszeiten solcher Studiendesigns liegen zwischen 1 und 10 Minuten, 2 bis 6-mal täglich über eine Dauer von 5 bis 15 Tagen [Hunter et al., 2000b; Sales-Peres et al., 2007; Fejerskov und Kidd, 2008; Magalhaes et al., 2008; Magalhães AC et al., 2012]. Zwischen den einzelnen Demineralisationsvorgängen folgt eine Remineralisationsphase. Die Gesamtdemineralisationszeit solcher Studiendesigns liegt zwischen 18 Minuten [Wiegand et al., 2010] und 600 Minuten [Hunter et al., 2000a], mit einer Spannbreite von Stufenhöhenmessungen zwischen 0,6 µm [Wiegand et al., 2010] und 123 µm [Ganss et al., 2009a]. Die gebräuchlichsten Gesamtdemineralisationszeiten am Dentin liegen jedoch bei ungefähr 100 Minuten [Ganss et al., 2007; Wetton et al., 2007; Kato et al., 2009; Kato et al., 2010b].

Die zweite Art der Säureapplikation wurde auch in der vorliegenden Studie angewendet. Dabei wurden die Proben nur einmalig der Säure ausgesetzt. Die Erosionszeiten wurden dabei so gewählt, dass ein großes Spektrum häufig verwendeter Demineralisationszeiten abdeckt wird. Dazu wurden kurze Demineralisationszeiten von 1-5 Minuten wie in den Studien von [Wiegand et al., 2007; Attin et al., 2009; Austin et al., 2010], mittlere Demineralisationszeiten von 10-20 Minuten wie in den Studien [West et al., 2001; Pretty et al., 2003] und längere Demineralisationszeiten von 30-120 Minuten wie in den Studien [Hara et al., 2005; Wetton et al., 2006; Ganss et al., 2009b; Wiegand et al., 2009b] gewählt.

Die in der vorliegenden Studie resultierenden Stufenhöhen variieren zwischen 0,3 µm und 58 µm und entsprechen damit der in der Literatur vorhandenen Spannbreite von 0,1 µm wie in der Studie [Wetton et al., 2006] und ca. 50 µm wie in den Studien von Wiegand et al. [2004] und Ganss et al. [2009b].

5.3.4 Messbedingungen

Die Messzeitpunkte wurden zunächst nach den Erkenntnissen der vorangegangenen Studie von 2007 am Dentin definiert [Ganss et al., 2007].

Dazu zählte zum einen der Zustand direkt nach Entfernung des Wassertropfens. Bei dieser Messbedingung wurde die Probe vor jeder Messung erneut befeuchtet, alle Einstellungen am Profilometer getätigt und nach Entfernung des Wassertropfens mit einem saugfähigen Tuch die Messung sofort gestartet.

Dadurch konnte eine vollständig Rehydrierung der Probe und eine damit verbundene vollständige Aufrichtung des Kollagengeflechts gewährleistet werden. Zum anderen wurde der Zeitpunkt nach 10-minütiger Dehydrierung gewählt. In der Studie von 2007 wurde nach dieser Trocknungszeit ein Plateau festgestellt, in dem sich die Werte nur noch geringfügig änderten [Ganss et al., 2007].

Bei der Anfertigung der Trocknungsreihen mit dem optischen Profilometer vor Entfernung der organischen Matrix sind jedoch nach 2-minütiger Dehydrierung der Proben starke Schwankungen der Werte aufgetreten. Aus diesem Grund wurde ein dritter Messzeitpunkt nach 2-minütiger Dehydrierung hinzugefügt.

Nach Entfernung der organischen Matrix fielen die gemessenen Werte in den Trocknungsreihen relativ konstant aus. Demzufolge wurden die Messzeitpunkte wieder auf je eine Messung direkt nach Entfernung des Wassertropfens und nach 10-minütiger Dehydrierung reduziert.

Die Rehydrierungszeiten wurden bei den Messungen unter den verschiedenen Messbedingungen auf 30 Sekunden festgelegt. In der Studie von 2007 wie auch in eigenen Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass diese Zeit ausreicht, um das Kollagengeflecht bei einer Probe, die zuvor der Raumluft ausgesetzt war, vollständig zu rehydrieren [Ganss et al., 2007].

Eine Ausnahme stellt die Rehydrierungszeit bei der Erstellung der Trocknungsreihen dar. Aufgrund der langen Dehydrierungsdauer von 3-mal 30 Minuten wurde die Wiederbefeuchtungsdauer auf eine Minute verlängert. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass die Proben auch nach dieser langen Dehydrierungsphase suffizient rehydriert sind.

Zwischen den Messungen wurden alle Proben in einer feuchten Kammer gelagert, um Dehydrierungsartefakte zu vermeiden.

Bei der profilometrischen Messung von Schmelz wurden in einer Studie Kratzer mit einer Tiefe von bis 607,6 nm gemessen. Diese entstanden durch einen diamantierten Taster mit einem Tastspitzenradius von 1,95 μm und einer Auflagekraft von 1,60 mN. Die Tiefe der Kratzer ist dabei abhängig von der Erosionszeit und dem pH-Wert der verwendeten Säure [Heurich et al., 2010].

Auch in rasterelektronenmikroskopischen Bildern der vorliegenden Studie wurden Spuren auf der Versuchsfläche nach Verwendung des mechanischen Tasters nachgewiesen. Zu welchem Ausmaß sich der mechanische Taster in die Oberfläche eingräbt oder nur die organischen Rückstände auf der Probenoberfläche verdrängt, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Aus diesem Grund wurden die Proben erst nach vollständiger Auswertung mit dem optischen Profilometer erneut mit dem mechanischen Taster vermessen. Diese Reihenfolge wurde auch nach Entfernung der organischen Matrix beibehalten.

5.3.5 Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit der Messungen zu ermitteln, wurde nach dem Versuch jeweils eine Probe nach 5-minütiger Demineralisationszeit sowie nach 120-minütiger Demineralisationszeit jeweils vor und nach Entfernung der organischen Matrix mit dem mechanischen Taster und dem optischen Sensor mehrfach vermessen. Die Messungen erfolgten jeweils 10-mal, ohne Veränderung der Position und ebenso 10-mal nach erneuter Repositionierung in das Messsystem.

Beim Vergleich der Werte für die Reproduzierbarkeit erkennt man, dass die Methode zum Wiederfinden derselben Stelle ausreichend genau war. Die Standardabweichungen ohne Veränderung der Position der Probe und nach erneuter Reposition der Probe waren für jede Demineralisationszeit unter den gewählten Messbedingungen für beide Tasterarten annähernd gleich.

Anhand der Standardabweichungen ohne erneute Repositionierung der Probe wird ersichtlich, dass die Probe durch die ständigen De- und Rehydrierungsprozesse Dimensionsveränderungen unterliegt, die nicht beeinflusst werden können. Dementsprechend sind vor allem die Werte bis 1 μm eher Verformungen in der Probe als einem messbaren vertikalen Abstand zwischen Versuchs- und Referenzfläche zuzuschreiben. Folglich müssen die Werte, die durch den optischen Sensor direkt nach Entfernung des Wassertropfens ermittelt wurden, kritisch betrachtet werden. Uneinheitliche Messergebnisse aufgrund der Auswertung können ausgeschlossen werden, da die Standardabweichung aller Auswertungen bei ± 0 lag.

5.3.6 Enzymatischer Abbau der organischen Matrix

In der Mundhöhle befinden sich natürlich vorkommende Enzyme, die durch Säure freigelegtes Kollagen abbauen können. Aus diesem Grund ist die Präsenz der organischen Matrix in vivo noch nicht vollständig geklärt.

Bei in vitro Versuchen ist die Versuchsfläche nach ausreichend langer Demineralisationszeit sichtbar eindrückbar. Bei Erosionsdefekten am Patienten fühlt sich die Oberfläche bei Sondierung jedoch glatt und hart an. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die organische Matrix durch Enzyme in der Mundhöhle in einem noch unbekanntem Ausmaß degradiert wird. Dafür kommen Enzyme in Frage, die sowohl spezifisch als auch unspezifisch das freigelegte Kollagen abbauen können.

Die proteolytischen Enzyme wie beispielsweise Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) und Cathepsine befinden sich im Speichel, in der Sulkusflüssigkeit, im Plaque und im Dentin [Söder, 1972; Ingman et al., 1994; van Strijp et al., 2003; Chaussain-Miller et al., 2006; Scaffa et al., 2012] und können Kollagen Typ I degradieren [Zhang und Kern, 2009].

Allerdings befinden sich in der Mundhöhle auch Inhibitoren, die zu einer Inaktivierung proteolytischer Enzyme führen [Chaussain-Miller et al., 2006].

Inwiefern sich das Verhältnis zwischen proteolytischen Enzymen und Inhibitoren auf den Abbau des Kollagengeflechts nach erosiver Freilegung auswirkt, ist bislang noch unklar und bedarf weiterer Erforschung.

Wird in der Mundhöhle freigelegtes Kollagen sofort durch körpereigene Enzyme abgebaut, entwickelt sich aus einem von Diffusion abhängigen Geschehen unter in vitro Bedingungen ein oberflächliches Geschehen. Die für die Dentinerosionen charakteristischen Eigenschaften würden entfallen und die Läsionstiefen deutlich verstärken.

Die organische Matrix besteht vorwiegend aus Kollagen Typ I. Kollagen Typ I wiederum besteht aus 3 Polypeptidketten, die sich umeinander zu einer Tripelhelix winden. Durch den Säureangriff werden Hydroxylapatitkristalle sowohl zwischen den einzelnen Polypeptidketten (interfibrillär) der Tripelhelix als auch zwischen den Kollagenfasern (extrafibrillär) herausgelöst. Die Tripelhelix der Kollagenfasern bleibt jedoch erhalten und kann auch nach längerer Einwirkdauer der Säure nicht degradiert werden [Selvig, 1968].

Rasterelektronenmikroskopische Bilder zeigen auch in dieser Studie den Erhalt der organischen Matrix nach einem Säureangriff.

Proteolytische Enzyme hingegen können je nach Lokalisation der verbleibenden Hydroxylapatitkristalle die Tripelhelix spalten und demnach das Kollagen denaturieren.

Sowohl in der Erosionsforschung als auch in der Kariologie wurde die Degradation des Kollagengeflechts durch verschiedene proteolytische Enzyme untersucht. Je nach Agens wird dabei die organische Matrix unterschiedlich stark abgebaut und ist damit für die vorliegende Studie mehr oder weniger gut geeignet um die Mineralisationsfront darzustellen. Im Folgenden wird auf die Enzyme Pepsin und Trypsin, das Agens NaOCl und eine Kollagenase näher eingegangen.

Pepsin und Trypsin sind Peptidasen des Verdauungssystems und können durch Erbrechen in die Mundhöhle gelangen. Trypsin ist ein Enzym des Pankreas, während Pepsin durch die Hauptzellen der Magenschleimhaut gebildet wird. Beide Enzyme sind jedoch nicht in der Lage, die organische Matrix vollständig zu degradieren [Kleter et al., 1997; Schlueter et al., 2010]. Auch die Kombination beider Enzyme führte unter den in der Studie gewählten Versuchsbedingungen lediglich zu einem erhöhten, jedoch nicht zu einem vollständigen Abbau der organischen Matrix [Schlueter et al., 2007; Schlueter et al., 2010]. Aus diesem Grund sind beide Enzyme nicht geeignet, die Mineralisationsfront darzustellen.

Demgegenüber ist NaOCl als unspezifisches proteolytisches Agens (2,5%) nach 10-minütiger Einwirkzeit bei 37 °C und 150 UpM (Umdrehungen pro Minute) in der Lage, die Kollagenfasern vollständig abzubauen. Allerdings wird dabei auch die teilweise demineralisierte Schicht entfernt. Bei dieser Schicht handelt es sich um Kollagenfasern mit extra- und intrafibrillären Hydroxylapatitkristallen [Ahmed et al., 2008]. Dadurch würde durch die Entfernung der organischen Matrix mit NaOCl der Mineralverlust überschätzt.

Kollagenasen sind spezifische Matrixmetalloproteinasen, die in der Lage sind, die Kollagenmoleküle an verschiedenen Stellen zu hydrolysieren und das Kollagen bis zur teilmineralisierten Dentinschicht abzubauen. Die Spaltung der Tripelhelix ist nicht mehr möglich, sobald sich die Hydroxylapatitkristalle extrafibrillär an den Kollagenfasern befinden [Ahmed et al., 2008]. Dadurch bleibt bei Verwendung

dieser Enzyme sowohl das teilweise als auch das vollständig mineralisierte Dentin erhalten, womit es möglich wird, die Mineralisationsfront suffizient darzustellen.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie eine Kollagenase verwendet. Es handelt sich dabei um Kollagenasen des Bakterienstammes *Clostridium Histolyticum* Typ VII. Die Kollagenaselösung bestand aus mindestens sieben verschiedenen Kollagenasen mit einem Molekulargewicht von 68.000 bis 125.000 [Klont und ten Cate, 1991], die unspezifisch am Abbau des Kollagens beteiligt sind. Das Reaktionsmaximum der Enzyme wird im neutralen Bereich unter Anwesenheit von Kalziumionen erzielt [Angleton und Van Wart, 1988] und wurde bereits erfolgreich in der Kariologie sowie in der Erosionsforschung eingesetzt [Klont und ten Cate, 1991; Kleter et al., 1997].

Da vorherige Studien zeigten, dass Kollagenasen in der Konzentration von 100 Units pro ml (1 Unit entspricht 0,5325 µg Kollagenase) in einer Mineralsalzlösung das exponierte Kollagen zuverlässig abbauen [Ganss et al., 2007; Ganss et al., 2009b], wurde die Kollagenaselösung in dieser Studie auf die gleiche Weise angesetzt und verwendet. Sowohl rasterelektronenmikroskopische Bilder als auch die EDX-Linescans dieser Studie belegen den vollständigen Abbau des freigelegten Kollagens.

Das Einlegen der Proben in die Kollagenaselösung kann zu unspezifischen Auflagerungen auf der Probenoberfläche führen, die sich vor allem in den Ergebnissen kurzer Demineralisationszeiten durch eine deutlich positive Stufenbildung äußerten. Daher wurden diese Auflagerungen durch ein in NaOCl getränktes Wattepellet entfernt.

Aufgrund der kurzen Kontaktzeit von NaOCl mit der Probenoberfläche kann ein zusätzlich induzierter Kollagenabbau jedoch ausgeschlossen werden. Sowohl rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen als auch EDX-Linescans bestätigen dies durch die nach der NaOCl-Behandlung noch vorhandene teilmineralisierte Schicht auf der Probenoberfläche.

5.4 Betrachtung der Ergebnisse

5.4.1 Betrachtung der Ergebnisse vor Entfernung der organischen Matrix

Bei der Betrachtung der rasterelektronenmikroskopischen Bilder unter 4.7 fällt auf, dass mit zunehmender Demineralisationszeit die Ausprägung der organischen Matrix zunimmt. Der demineralisierte Anteil lässt sich durch den Vergleich der Ergebnisse, die zum einen durch den optischen Sensor vor Entfernung der organischen Matrix nach vollständiger Rehydrierung und zum anderen durch die Ergebnisse, die durch den mechanischen Taster nach Entfernung der organischen Matrix im feuchten Zustand gemessen wurden, errechnen. Dabei wird nach 5 Minuten Demineralisationszeit eine Dicke von $3,9\ \mu\text{m}$ und nach 120 Minuten Demineralisationszeit eine Dicke von $54,4\ \mu\text{m}$ erreicht.

EDX-Linescans bestätigen die von der Demineralisationszeit abhängige Ausprägung der entmineralisierten organischen Matrix. Der Bereich, in dem mineralisiertes Gewebe, gekennzeichnet durch den Anstieg von Kalzium und Phosphat, nachgewiesen werden kann, verschiebt sich in Abhängigkeit der Demineralisationszeit stetig nach hinten.

Dennoch liegt keine lineare Zunahme des entmineralisierten Gewebes vor, da das freigelegte Kollagengeflecht mit zunehmender Dicke als Diffusionsbarriere für die erosive Säure wirkt. Zusätzlich zeigt sie auch Puffereigenschaften und beeinflusst als polare Membran den Diffusionsprozess [Wiegand et al., 2004]. Das heißt, der Mineralverlust pro Minute nimmt mit zunehmender Dicke der organischen Matrix ab [Kleter et al., 1994; Ganss et al., 2004; Hara et al., 2005]. Dieses Phänomen wird auch in der vorliegenden Studie deutlich. Nach 5 Minuten Demineralisationszeit liegt der Mineralverlust bei $0,84\ \mu\text{m}$ pro Minute. Die Demineralisationsgeschwindigkeit verringert sich nach 120 Minuten Demineralisationszeit auf $0,48\ \mu\text{m}$ pro Minute. Dies entspricht einer Reduktion um fast die Hälfte. Demnach beeinflusst die organische Matrix erheblich die Erosionsgeschwindigkeit und nimmt dadurch eine bedeutende Rolle ein.

Bei der profilometrischen Vermessung der Proben mit dem optischen Sensor, der die Oberfläche des Kollagengeflechts berührungsfrei abscannt, wird trotz suffizienter Befeuchtung der Proben ein kleiner, aber mit zunehmender

Demineralisationszeit ansteigender vertikaler Abstand zur Referenzfläche gemessen. Der geringe messbare Abstand wurde sowohl in der Studie von 2007 als auch in der ersten Methodenstudie durch Dehydrierungserscheinungen während des Messvorganges begründet. Das in beiden Studien verwendete optische Profilometer benötigt zum Fokussieren des Systems und zum Aufzeichnen eines Profilschriebs ungefähr 30 Sekunden [Ganss et al., 2007].

Im Gegensatz dazu wurden die Messungen in der vorliegenden Studie ohne ein weiteres Nachfokussieren direkt nach der Entfernung des Wassertropfens gestartet. Zudem reduzierte sich in dieser Studie die Messdauer eines Profilschriebs durch die Verwendung eines anderen optischen Profilometers auf circa 1 Sekunde. Durch die Veränderung der Aufnahmedauer reduzierte sich der vertikale Abstand im Vergleich zur ersten Methodenstudie von 5 μm [Ganss et al., 2009b] auf 1 μm bei 30-minütiger Demineralisationszeit und von 5,4 μm [Ganss et al., 2009b] auf 3,4 μm bei 120-minütiger Demineralisationszeit der Proben.

Der mit zunehmender Demineralisationszeit dennoch steigende vertikale Abstand ist durch die geringe Schrumpfung des Kollagengeflechts zu begründen. Es handelt sich dabei um ein passives Zusammenfallen der größer werdenden Kollagenschicht nach mehrfacher De- und Rehydrierung durch fehlende stabilisierende Hydroxylapatitkristalle. Allerdings kann man erst ab einer Demineralisationszeit von 20 Minuten von einem messbaren Zusammenfall der organischen Matrix sprechen. Bei allen anderen Proben handelt es sich vielmehr um dimensionale Veränderungen der Probe, wie die Standardabweichungen der Reproduzierbarkeitsmessungen ohne erneutes Repositionieren der Probe zeigen.

Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder bestätigen die geringe Schrumpfung der organischen Matrix mit zunehmender Demineralisationszeit. Allerdings ist bei der Betrachtung der rasterelektronenmikroskopischen Bilder zu beachten, dass durch die Kritisch-Punkt-Trocknung die entmineralisierte organische Matrix nur weitestgehend in dem Zustand abgebildet werden kann, wie sie auch nach vollständiger Rehydrierung vorzufinden ist. Zu einer weiteren Schrumpfung der Probe kommt es im Hochvakuum des Rasterelektronenmikroskops [Carvalho et al., 1996]. Folglich sind in den rasterelektronenmikroskopischen Bildern, vor allem bei den längeren Demineralisationszeiten, größere Stufen zwischen Referenzfläche und der Oberfläche des freiliegenden Kollagengeflechtes im

Vergleich zu den gemessenen Stufenhöhen nach vollständiger Rehydrierung zu erwarten.

Im Gegensatz zum optischen Sensor gräbt sich der mechanische Taster bis zu einer unbestimmten Tiefe in die organische Matrix ein und erzielt unter den gleichen Messbedingungen größere Werte. Dieser Effekt wird in der nachfolgenden Abbildung bildlich dargestellt. Es besteht jedoch keine Proportionalität zwischen der Dicke der organischen Matrix und der Eindringtiefe des Tasters.

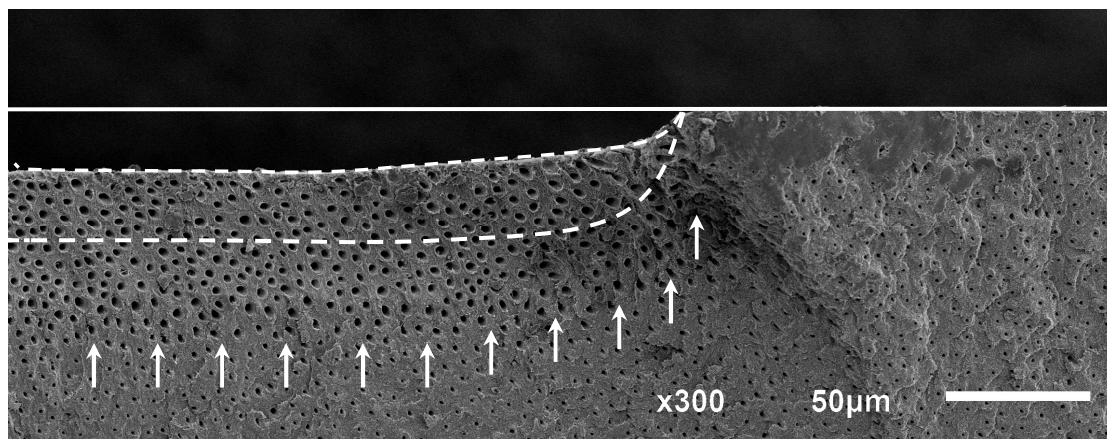


Abb. 18: Dieses rasterelektronenmikroskopische Bild zeigt eine Dentinprobe nach 120-minütiger Demineralisationszeit mit nahezu vollständig aufgerichteter organischer Matrix, wie sie im feuchten Zustand vorzufinden ist. Die obere durchgängige Linie ist die Referenzlinie. Der optische Sensor scannt die Oberfläche des Kollagengeflechts ab (obere gestrichelte Linie), während sich der mechanische Taster in die organische Matrix gräbt (untere gestrichelte Linie). Die Pfeile stellen die tatsächliche Mineralisationsfront dar.

Durch die Änderung des Messsystems von einem optischen Sensor zu einem mechanischen Taster erhöhten sich die Werte von $0,3 \pm 0,7 \mu\text{m}$ auf $2,9 \pm 1,1 \mu\text{m}$ nach 5 Minuten Demineralisationszeit und von $3,4 \pm 1,5 \mu\text{m}$ auf $30,6 \pm 5,8 \mu\text{m}$ nach 120 Minuten Demineralisationszeit.

Dennoch kann keine der beiden Tasterarten die Mineralisationsfront abbilden. Zudem besteht keine Proportionalität zwischen den ermittelten Werten und dem tatsächlichen Mineralverlust. In dem Bland-Altman-Plot 2 unter 4.6 erkennt man beim Vergleich der unterschiedlichen Messbedingungen vor und nach Entfernung der organischen Matrix einen deutlichen signifikanten, proportionalen und systematischen Fehler sowie eine Zunahme der Streuung bei längeren Demineralisationszeiten.

Dementsprechend kann bei Messungen vor Entfernung der organischen Matrix nicht von „Substanzverlust“ oder „Mineralverlust“ gesprochen werden. Vielmehr handelt es sich um einen messbaren „vertikalen Abstand“ oder eine messbare „Stufenhöhe“ zur Referenzfläche.

Werden die Proben für eine bestimmte Zeit der Raumluft ausgesetzt, kollabiert die organische Matrix. Dieser Effekt konnte durch rasterelektronenmikroskopische Bilder in 4.7 Abbildung 16 bildlich dargestellt werden. Dazu wurden die Proben nicht Kritisch-Punkt getrocknet, sondern für mindestens 4 Tage der Raumluft ausgesetzt. Durch die Trocknung kollabiert das entmineralisierte Kollagengeflecht, sodass die einzelnen Tubuli kaum voneinander abgrenzbar sind.

Bei der Betrachtung der Dehydrierungseffekte mit dem optischen Tastsystem wird durch den Vergleich der Messzeitpunkte nach Entfernung des Wassertropfens sowie nach 2- und 10-minütiger Dehydrierung der schnelle Zusammenfall der organischen Matrix deutlich. Innerhalb der ersten 2 Minuten kommt es zu einem deutlichen Anstieg der gemessenen Stufenhöhe. Dabei wurde zum Teil eine Erhöhung der Werte um das 9-fache erreicht. Danach wird ein Plateau erreicht, in dem sich die Werte bis zur 10-minütigen Dehydrierung kaum noch ändern. Nur bei den längeren Demineralisationszeiten von 90 und 120 Minuten ist nach 2-minütiger Dehydrierung aufgrund der ausgeprägten Kollagenschicht noch Restfeuchtigkeit vorhanden. Folglich kommt es nach 2 Minuten zu einer weiteren Dehydrierung des Kollagengeflechtes, das sich in einem signifikanten Anstieg der gemessenen Stufenhöhe bis zur 10-minütigen Dehydrierung äußert.

Auch beim Vergleich der Werte in den Trocknungsreihen erkennt man bei den Proben, die bis zu 30 Minuten demineralisiert wurden, ein Plateau nach 2 Minuten, während bei 60 und 90 Minuten Demineralisationszeit erst nach 3 Minuten und bei 120 Minuten Demineralisationszeit sogar erst nach 4 Minuten ein Plateau erreicht wird. Danach ändern sich die Werte bis zur 30-minütigen Dehydrierung nur noch geringfügig.

Solche ausgeprägten Änderungen der Werte durch Dehydrierungseffekte können durch den mechanischen Taster nicht ermittelt werden. Bei dem direkten Vergleich der einzelnen Messzeitpunkte untereinander erkennt man bei den kurzen und mittleren Demineralisationszeiten bis 60 Minuten eine Verkleinerung

des vertikalen Abstandes um circa 2 μm bis zur 10-minütiger Dehydrierung. Die Verringerung des vertikalen Abstandes könnte durch den Zusammenbruch der organischen Matrix und einer damit verbunden Verdichtung des Kollagenflechts erklärbar sein. Dadurch kann der mechanische Taster nicht mehr so weit in das Kollagenflecht vordringen und ermittelt kleinere Werte.

Bei den längeren Demineralisationszeiten von 90 und 120 Minuten kommt es zunächst zu einem Anstieg und später zu einem erneuten Abfall der gemessenen Stufenhöhe. Aufgrund der Restfeuchtigkeit nach 2 Minuten Dehydrierung kann sich der Taster möglicherweise zunächst weiter in Richtung Mineralisationsfront eingraben als nach vollständiger Dehydrierung nach 10 Minuten.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse in den Trocknungsreihen wird noch einmal deutlich, dass sich die Werte von Beginn an bis zur 30-minütigen Dehydrierung kaum ändern. Es ist ein Plateau zu erkennen, in dem es nur noch zu geringfügigen Änderungen durch den Dehydrierungsprozess kommt. Dennoch ist ein anfänglicher Abfall der Werte mit einem leichten Anstieg nach 10-minütiger Dehydrierung zu erkennen. Nur bei den Werten nach 120-minütiger Dehydrierung ist zuerst ein deutlicher Anstieg der Werte mit einem anschließenden Abfall zu erkennen.

Neben der Austrocknung des Kollagenflechtes muss bei der Betrachtung der Ergebnisse der mineralisierte Anteil der Probe betrachtet werden. Bei einer Dehydrierung kommt es zur Verformung der Probe, die bildlich in dem 3D-Scan unter 4.4.1 in Abbildung 9 dargestellt ist und nach Entfernung der organischen Matrix noch deutlicher wird. Demnach kommt es neben dem Zusammenfall der organischen Matrix zu einer Wölbung der Probe, die eine Verkleinerung der tatsächlichen Stufenhöhe bei beiden Tasterarten verursacht.

Auch nach nahezu vollständiger Austrocknung der Proben sowie einem vollständigen Zusammenfall der organischen Matrix sind beide Systeme nicht in der Lage, die Mineralisationsfront abzubilden. In den Bland-Altman-Plots unter 4.6 erkennt man beim Vergleich der unterschiedlichen Messbedingungen vor und nach Entfernung der organischen Matrix einen deutlichen signifikanten, proportionalen und systematischen Fehler sowie auch hier eine Zunahme der Streuung bei längeren Demineralisationszeiten.

Durch die nur noch sehr geringfügige Änderung der Werte nach 30 Minuten Dehydrierungszeit wird in der vorliegenden Studie davon ausgegangen, dass die Proben nahezu vollständig ausgetrocknet sind.

In der Studie von Attin et al. [2009] wird die vollständige Austrocknung der Probe auch nach 30-60 Minuten erreicht. Die Änderungen der Werte bis zur 60-minütigen Dehydrierung könnte in der Studie von Attin et al. durch den Keramikring, der als Referenzfläche diente, zu erklären sein. Vermutlich wurde durch die dehydrierungsunabhängige Referenzfläche eine zusätzliche Verzerrung der gesamten Dentinprobe gemessen. In der vorliegenden Studie befinden sich die Versuchs- und Referenzfläche jedoch nebeneinander angrenzend auf derselben Probe. Dadurch ist nur der vertikale Unterschied zwischen beiden Flächen und nur in geringem Maße die Dehydrierung der gesamten Probe messbar.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es durch die Präsenz der organischen Matrix nach einem erosiven Säureangriff nicht möglich ist, unter den in dieser vorliegenden Studie gewählten Messbedingungen die Mineralisationsfront profilometrisch darzustellen. Selbst mechanische Tastsysteme können bei kurzen Demineralisationszeiten nicht bis zur Mineralisationsfront vordringen und sind demnach auch nicht geeignet, den Mineralverlust zu quantifizieren, solange das Kollagengeflecht auf der Probenoberfläche persistiert.

Hinzukommend unterliegen die Proben sowohl im entmineralisierten als auch im mineralisierten Anteil Trocknungsphänomenen. Hierbei nimmt die entmineralisierte organische Matrix eine besondere Rolle ein. Durch die Dehydrierung kollabiert das Kollagengeflecht, sodass bis zu 9-fach höhere Werte gemessen werden. Dabei handelt es sich um einen schnellen Prozess, der bei den kurzen Demineralisationszeiten nach 2 Minuten abgeschlossen ist. Danach treten nur noch kleine Veränderungen in den Messergebnissen auf. Bei den längeren Demineralisationszeiten dauert der Zusammenfall aufgrund der ausgeprägten organischen Matrix bis zu 4 Minuten an.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Wichtigkeit der Feuchtigkeitskontrolle. Bereits eine kurze Verzögerung des Messbeginns führt zu einer Verfälschung der Ergebnisse. Dementsprechend ist es von großer Bedeutung, dass die Proben

direkt nach Entfernung des Wassertropfens vermessen werden, die Rehydrierung vor jedem Messbeginn wiederholt und die Messdauer möglichst gering gehalten wird.

5.4.2 Betrachtung der Ergebnisse nach Entfernung der organischen Matrix

Der vollständige Abbau der organischen Matrix durch die Kollagenaselösung konnte durch rasterelektronenmikroskopische Bilder bestätigt werden. Bei dem verbleibenden Gewebe handelt es sich um eine wenige μm dünne Schicht teilmineralisierten Dentins, an die sich vollständig mineralisiertes Gewebe anschließt. Die teilmineralisierte Schicht imponiert durch nahezu vollständig mineralisiertes intertubuläres Dentin und eine Vergrößerung der Dentintubuli durch fehlendes peritubuläres Dentin.

EDX-Linescans nach Entfernung der organischen Matrix bestätigen die schmale teilweise mineralisierte Schicht durch einen schnellen Anstieg der Kalzium- und Phosphatwerte.

Durch die Entfernung des Kollagengeflechtes konnten sowohl mit dem optischen Sensor als auch mit dem mechanischen Taster wesentlich größere Stufenhöhen gemessen werden als vor Entfernung der organischen Matrix.

Sowohl bei den in der vorliegenden Studie als auch in der Studie von 2007 und der Methodenstudie von 2009 ermittelten Werten konnte dennoch ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Tasterarten festgestellt werden. Dies ist zum einen durch mögliche Abbauprodukte oder Verunreinigungen, die sich auf der Oberfläche der Dentinprobe befinden, zu begründen. Diese organischen Rückstände werden durch den mechanischen Taster verdrängt, während sie durch den optischen Sensor abgescannt werden. Mit zunehmender Demineralisationszeit werden die Unterschiede zwischen den Werten des mechanischen Tasters und des optischen Sensors größer. Nach 5 Minuten Demineralisationszeit liegt der Unterschied beider Messsysteme bei $0,7 \mu\text{m}$, während nach 120 Minuten Demineralisationszeit der Unterschied bei $2,3 \mu\text{m}$ liegt. Die Menge des verbleibenden organischen Materials scheint demnach in Korrelation mit der Dicke der organischen Matrix vor dem enzymatischen Abbau zu stehen.

Zudem zeigen rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen Spuren des mechanischen Tasters auf der Versuchsfläche. Dadurch ist ein Vordringen des mechanischen Tasters in die teilmineralisierte Schicht nicht auszuschließen. Wie tief der Taster in die teilmineralisierte Schicht vordringt oder ob der Taster ausschließlich die organischen Rückstände auf der Probenoberfläche zur Seite drängt, ist jedoch unklar.

Der Bland-Altman-Plot 4 im Kapitel 4.6 zeigt beim Vergleich beider Messarten einen geringen signifikanten, proportionalen und systematischen Fehler mit einer zunehmenden Streuung bei zunehmender Demineralisationszeit. Folglich sollte der Mineralverlust durch den optischen Sensor nach Entfernung der organischen Matrix im hydrierten Zustand der Probe nur bei kurzen Demineralisationszeiten dargestellt werden. Die Ungenauigkeit nimmt mit steigender Demineralisationszeit zu.

Nach 10-minütiger Dehydrierung der Probe ist eine deutliche Verkleinerung der Werte bei allen Demineralisationszeiten und bei beiden Messsystemen erkennbar. Bei dem optischen Taster wird eine Verkleinerung des vertikalen Abstandes von durchschnittlich $2,4 \mu\text{m}$ ermittelt. Bei dem mechanischen Taster wurde eine Verkleinerung des vertikalen Abstandes von durchschnittlich $3,6 \mu\text{m}$ gemessen. Hier entfällt der Einfluss der organischen Matrix. Es handelt sich um eine reine Verformung des mineralisierten Anteils der Probe. Auch nach 30-minütiger Dehydrierung ist diese Verformung der Probe noch erkennbar, wie die Trocknungsreihe in Abbildung 2 und Abbildung 4 im Kapitel 4.3 zeigt. Eine bildliche Darstellung findet sich in dem 3D-Scan im Kapitel 4.4.2.

Die Verformung der Probe entstand, obwohl die Proben unterseitig vollständig mit dem Glasobjektträger verklebt waren.

Ob bezüglich des Ausmaßes der Verbiegung ein Zusammenhang mit Befestigungsart und Probendicke besteht, ist momentan noch nicht geklärt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der Mineralverlust am zuverlässigsten nach Entfernung der organischen Matrix unter vollständiger Rehydrierung der Probe mit dem mechanischen Taster dargestellt werden kann. Die Ermittlung des Mineralverlustes durch den optischen Sensor sollte auf kürzere Demineralisationszeiten beschränkt bleiben. Bei längeren

Demineralisationszeiten wird die Mineralisationsfront durch organische Rückstände auf der Probenoberfläche verdeckt und dadurch unzuverlässig.

Nach Entfernung der organischen Matrix betreffen die Trocknungseffekte ausschließlich den mineralischen Anteil der Probe. Die Dehydrierung führt zu einer Wölbung und dadurch zu einer Verkleinerung des messbaren vertikalen Abstandes um 2-4 μm . Es handelt sich hierbei nicht um einen schnellen, sondern vielmehr um einen kontinuierlichen Prozess, der sich bis zu einem Zeitraum von 10 Minuten erstreckt.

5.5 Bewertung der Daten anhand der Literatur

Die in der Literatur verwendeten Messbedingungen führen zu einer Stufenhöhenmessung, die aufgrund der gewählten Messbedingungen nicht die „wahren Werte“ des Mineralverlustes widerspiegelt.

Im Folgenden soll mit Hilfe von Geradengleichungen der tatsächliche Mineralverlust aus den Werten, die in der Literatur ermittelt wurden, berechnet werden. Dazu wurden Geradengleichungen erstellt, die die Beziehung zwischen der Messmethode, die den tatsächlichen Mineralverlust widerspiegelt, und der Messmethode, die in der Literatur verwendet wurde, abbildet. Allerdings können nur Annäherungswerte errechnet werden. Parameter wie beispielsweise die Probendicke, die die Ergebnisse zusätzlich beeinflussen können, können in dieser Berechnung nicht mit berücksichtigt werden.

Für das erste Beispiel dient die Studie von Ranjitkar et al., in der die Wirkung von Casein Phosphopeptide-Amorphes Kalziumphosphat (CPP-ACP) ermittelt wurde. In dieser Studie wurden Dentinproben nach einem Säureangriff mit einer Zahnpastenslurry sowohl mit als auch ohne CPP-ACP behandelt. Die ermittelten Stufenhöhen wurden anschließend mit den Werten einer Kontrollgruppe verglichen [Ranjitkar et al., 2009].

Die Stufenhöhe wurde mit einem optischen Sensor ohne Feuchtigkeitskontrolle gemessen. Daher wird in dem folgenden Rechenbeispiel davon ausgegangen, dass die Proben eine unbestimmte Zeit lang der Raumluft ausgesetzt waren und dehydriert sind.

Um den „wahren“ Mineralverlust zu ermitteln, werden die in der Studie von Ranjitkar et al. erhobenen Werte in eine Geradengleichung eingesetzt.

Die folgende Geradengleichung setzt die Werte, die für den mechanischen Taster im hydrierten Zustand nach Entfernung der organischen Matrix und die Werte, die durch den optischen Sensor vor Entfernung der organischen Matrix nach 10-minütiger Dehydrierung erhoben wurden, in Beziehung.

Geradengleichung: $y = 1,8 * x + 3,0$

In der folgenden Tabelle werden exemplarisch die Werte, die in der Studie von Ranjitkar et al. ermittelt wurden, dem tatsächlichen Mineralverlust durch Einsetzen der Werte in die Geradengleichung gegenübergestellt.

Tab. 5: In dieser Tabelle wird die in der Studie ermittelte Stufenhöhe dem errechneten tatsächlichen Mineralverlust gegenüber gestellt. Die Werte werden in μm angegeben. In Klammern wird die Reduktion des Substanzverlustes in Bezug zur Kontrollgruppe in Prozent angegeben.

	Kontrollgruppe	Slurry ohne CCP-ACP	Slurry mit CCP-ACP
In der Studie ermittelte Werte	10,3	5,8 (44%)	2,2 (79%)
Der tatsächliche Mineralverlust nach dem Einsetzen der Werte in die Geradengleichung	21,5	13,4 (38%)	6,9 (68%)

Bei der Betrachtung der Werte fällt auf, dass sich der tatsächliche Mineralverlust bei den größeren Werten (Kontrollgruppe) verdoppelt, während sich die kleineren Werte, wie in der Versuchsgruppe mit CCP-ACP, verdreifachen.

In diesem Beispiel wird deutlich, dass ungeeignete Messbedingungen zu einer falschen Aussage über die Wirkung von Mundhygieneprodukten führen können. Während sich der Mineralverlust durch die Zugabe von CCP-ACP in der Studie von Ranjitkar et al. um das 5-fache reduziert, führt die Zugabe von CCP-ACP eigentlich nur zu einer 3-fachen Verringerung des Mineralverlustes. Die Wirkung von CCP-ACP wird demnach mit der in der Studie von Ranjitkar et al. gewählten Messmethode um 9% überschätzt.

Würden die ermittelten Werte noch kleiner ausfallen, wäre der Unterschied zum tatsächlichen Mineralverlust dementsprechend größer. So liegt beispielsweise der tatsächliche Mineralverlust bei einer unter den gleichen Messbedingungen ermittelten Stufenhöhe von $0,5 \mu\text{m}$ bei tatsächlichen $3,9 \mu\text{m}$. Demnach wäre der

tatsächliche Mineralverlust 8-mal größer als durch dieses Messverfahren dargestellt werden kann.

In einem zweiten Beispiel wird die Wirkung verschiedener Zahnpasten mit einem mechanischen Profilometer untersucht. Auch hier gibt es keine Angaben zur Feuchtigkeitskontrolle, was eine Dehydrierung der Proben an der Raumluft vermuten lässt. Exemplarisch werden hier die ermittelten Stufenhöhen der Kontrollgruppe, denen unter Verwendung von regulärer Zahnpaste sowie von Backpulver den tatsächlichen Werten gegenüber gestellt.

Um den tatsächlichen Mineralverlust zu ermitteln, werden auch hier die in der Studie erhobene Werte in eine Geradengleichung eingesetzt. Die folgende Geradengleichung setzt die Werte, die für den mechanischen Taster im hydrierten Zustand nach Entfernung der organischen Matrix und die Werte, die durch den mechanischen Taster vor Entfernung der organischen Matrix nach 10-minütiger Dehydrierung erhoben wurden, in Beziehung.

Geradengleichung: $y = 1,7 * x + 3,7$

Tab. 6: In dieser Tabelle wird die in der Studie ermittelte Stufenhöhe dem errechneten tatsächlichen Mineralverlust gegenüber gestellt. Die Werte werden in μm angegeben. In Klammern wird die Erhöhung des Substanzverlustes in Bezug zur Kontrollgruppe in Prozent angegeben.

	Kontrollgruppe	Zahnpaste	Backpulver
In der Studie ermittelte Werte	2,2	10 (455%)	13,1 (595%)
Der tatsächliche Mineralverlust nach dem Einsetzen der Werte in die Geradengleichung	7,5	20,7 (276%)	26 (347%)

Auch hier ist bei der Errechnung des tatsächlichen Mineralverlustes eine Verdopplung der größeren Werte (Backpulver) und eine Verdreifachung der kleineren Werte (Kontrollgruppe) zu erkennen.

Das heißt, umso kleiner die gemessenen Stufenhöhen durch den mechanischen Taster vor Entfernung der organischen Matrix sind, desto größer ist der Abstand zum tatsächlichen Mineralverlust. Dies ist soweit unbedenklich, wenn beispielweise Mundhygieneprodukte in ihrer protektiven Wirkung unterschätzt werden. Klinisch relevant wird es allerdings, wenn Mundhygieneprodukte durch

nicht standardisierte Methoden in ihrer Wirkung überschätzt werden und unter falschen Annahmen zur Anwendung kommen.

Ein weiteres Problem stellt die nicht standardisierte Feuchtigkeitskontrolle dar. Werden die Proben nur am Anfang befeuchtet oder befinden sie sich zur Aufbewahrung in einer feuchten Kammer, sind die Proben zu Beginn der Messung vollständig rehydriert, dehydrieren aber mit der Zeit. Dies führt zu einer Verfälschung der Messergebnisse. Erfolgt die vollständige Dehydrierung zwischen unterschiedlichen Versuchsgruppen, kommt es zu einer deutlichen Verfälschung der Messergebnisse, die ungewollt zu einer falschen Einschätzung der Wirkung von Zusätzen in Mundhygieneprodukten führen kann.

5.6 Schlussfolgerungen und Empfehlungen

Diese Methodenevaluation zeigt auf, dass keine der beiden Tasterarten in der Lage ist, die Mineralisationsfront korrekt abzubilden, solange die organische Matrix auf der Oberfläche persistiert. Selbst die Vermutung, dass der mechanische Taster bei einer geringen Demineralisationszeit durch das Kollagengeflecht dringen kann, hat sich nicht bestätigt. Umso wichtiger ist es, dass vor jeder Planung des Studiendesigns das Zielkriterium genau bestimmt wird und die Messbedingungen daran angepasst werden.

Erst nach vollständiger Entfernung der organischen Matrix ist es möglich, die Mineralisationsfront abzubilden. Dies ist bei kurzen und mittleren Demineralisationszeiten mit Hilfe beider Tastsysteme möglich. Bei längeren Demineralisationszeiten sollte der mechanische Taster bevorzugt verwendet werden, da der optische Sensor die organischen Rückstände mit einscannt, die die Mineralisationsfront verdecken. Dadurch kommt es zu einer geringen Unterschätzung des tatsächlichen Mineralverlustes.

Zudem stellte sich in dieser Studie heraus, dass eine konsequente Feuchtigkeitskontrolle unabdingbar für eine suffiziente profilometrische Messung am Dentin ist. Eine ungewollte Dehydrierung der Proben an der Raumluft führt, innerhalb von 2 Minuten bei kleinen Mineralverlusten und innerhalb von 4 Minuten bei größeren Mineralverlusten zu einer vollständigen Schrumpfung der organischen Matrix. Dieser Prozess äußert sich in einer erheblichen Vergrößerung der gemessenen Werte. Zudem kommt es zu einer Verformung

des mineralisierten Anteils und dadurch zu einer zusätzlichen Verkleinerung der tatsächlichen Ergebnisse. Die Verformung des mineralischen Anteils wird vor allem bei den Proben nach Entfernung der organischen Matrix deutlich.

Beide Aspekte führen dazu, dass bei einer Dehydrierung der Probe keine adäquaten, reproduzierbaren Messergebnisse erzielt werden können. Aus diesem Grund ist es besonders wichtig, vor jeder Messung auf eine vollständige Rehydrierung der Probe zu achten.

6. Zusammenfassung

Die Profilometrie ist eine etablierte Messmethode in der Erosionsforschung. Sie ist für Schmelz validiert, wird aber auch für Dentin angewendet. Doch im Gegensatz zu Schmelz weist Dentin eine komplexe Histologie auf. So wird nach einer Demineralisation ein Kollagengeflecht freigelegt, das innerhalb kurzer Zeit bei Dehydrierung an der Raumluft zusammenfällt. Zudem ist mineralisiertes Dentin im Gegensatz zu Schmelz ein wasserreiches Gewebe. Beide Aspekte führen dazu, dass die Profilometrie nicht einfach von Schmelz auf Dentin übertragbar ist, sondern besonderer Anpassungen bedarf.

Ziel dieser in vitro Studie war es, den Einfluss der Dehydrierung von Proben auf die profilometrischen Messergebnisse vor und nach Entfernung der organischen Matrix sowie den Einfluss der verwendeten Tasterart zu untersuchen.

Dazu wurden Dentinproben (je n=15) mit einer definierten Dicke in Zitronensäure (0,05 molar, pH 2,6) für 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 und 120 Minuten demineralisiert. Anschließend wurde die Stufenhöhe zwischen einer Referenz- und einer Versuchsfläche unter verschiedenen Messbedingungen untersucht.

Die Messungen wurden sowohl vor als auch nach Entfernung der organischen Matrix mit einem mechanischen Taster und einem optischen Sensor durchgeführt. Vor Entfernung der organischen Matrix wurden die Proben unter standardisierten feuchten Messbedingungen und nach 2- und 10-minütiger Dehydrierung der Probe an der Raumluft profilometrisch vermessen. Nach Entfernung der organischen Matrix mit einer Kollagenaselösung wurde die Stufenhöhe unter standardisierten feuchten Messbedingungen und ausschließlich nach 10-minütiger Dehydrierung der Probe an der Raumluft ermittelt. Zusätzlich wurden vor und nach Entfernung der organischen Matrix mit beiden Tasterarten Trocknungseffekte über die Zeit beobachtet. Um die Messergebnisse zu visualisieren, wurden 3D-Scans und rasterelektronenmikroskopische Strukturaufnahmen sowie EDX-Linescans angefertigt.

Vor Entfernung der organischen Matrix konnte im feuchten Zustand der Probe aufgrund der vollständigen Hydrierung der organischen Matrix durch den optischen Sensor kaum eine Stufenhöhe ermittelt werden. Die Werte lagen nach

5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 und 120 Minuten bei $0,3 \pm 0,7$; $0,4 \pm 1,2$; $0,5 \pm 1,3$; $0,8 \pm 1,7$; $1,0 \pm 1,1$; $1,9 \pm 1,5$; $3,1 \pm 1,5$ und $3,4 \pm 1,5$. Im Gegensatz dazu gräbt sich der mechanische Taster in die organische Matrix ein und erzielt dadurch höhere Werte (Werte für 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 Minuten lagen bei $2,9 \pm 1,1$; $4,9 \pm 1,3$; $6,9 \pm 1,6$; $9,0 \pm 1,7$; $12,1 \pm 1,7$; $17,9 \pm 1,9$; $24,8 \pm 4,2$; $30,6 \pm 5,8$). Eine 2- und 10-minütige Dehydrierung der Probe an der Raumluft führte aufgrund des Zusammenfalls der organischen Matrix bei beiden Tasterarten zu einer signifikanten Erhöhung der Werte. Dennoch konnte vor Entfernung der organischen Matrix die Mineralisationsfront durch beide Tasterarten nicht dargestellt werden. Dies bestätigte sich bei dem Vergleich der einzelnen Messbedingungen durch Bland-Altman-Plots, bei denen sich sowohl signifikante systematische als auch proportionale Fehler zeigten.

Nach Entfernung der organischen Matrix haben sich die Werte bei beiden Tasterarten erhöht. Die Trocknung der Proben führte jedoch über eine Wölbung der Probe, die durch 3D-Scans visualisiert werden konnte, zu einer Verkleinerung der Werte um 2-4 μm .

Die rasterelektronenmikroskopischen Strukturaufnahmen vor Entfernung der organischen Matrix zeigten eine mit zunehmender Demineralisationszeit dicker werdende, entmineralisierte organische Matrix. Die vollständige Demineralisation des Kollagengeflechts konnte durch die EDX-Linescans bestätigt werden. Nach Entfernung der organischen Matrix wurde auf den Strukturaufnahmen ein mit zunehmender Demineralisationszeit wachsender Substanzverlust erkennbar.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Mineralverlust erst nach Entfernung der organischen Matrix unter feuchten Messbedingungen adäquat quantifiziert werden kann. Die Werte, die sowohl vor als auch nach Entfernung der organischen Matrix unter unterschiedlichen Messbedingungen erhoben wurden, sind nicht proportional zueinander, da eine Dehydrierung der Probe zu einer raschen Veränderung der Messwerte führt.

Diese Studie betont somit die Wichtigkeit eines entsprechenden Studiendesigns, um adäquat den Mineralverlust messen zu können. Dazu zählen sowohl die dem Zielkriterium entsprechende Auswahl des Tasters und die entsprechende

Zusammenfassung

Probenvorbereitung, als auch die Einhaltung einer standardisierten Feuchtigkeitskontrolle.

7. Abstract

Profilometry is a well-established method in erosion research. It has been validated for enamel but is also applied to dentine. However, the histology of dentine is much more complex than that of enamel. After demineralisation, organic structures remain on the surface of the dentine. These are susceptible to dimensional change within a short period of time when exposed to ambient air. Moreover, mineralised dentine, in contrast to enamel, is a physiologically moist tissue. Both aspects lead to the conclusion that established methods of profilometry as applied to enamel are not simply transferable to dentine but require specific adjustments.

The study at hand seeks to evaluate the impact of dehydration prior to and after the removal of the organic structures of the dentine specimens as well as the impact of the applied type of measuring method on the results.

For the profilometric measurement dentine specimens with a defined thickness were eroded with citric acid (0,05 molar, ph 2.6) for 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 and 120 minutes respectively (each n=15). After the demineralisation period, step height was determined between a reference and an experimental area under various conditions.

The measurements were conducted prior to and after the removal of the demineralised surface material using a non-contact, optical measuring device and a contact stylus. Prior to the removal of the demineralised surface material, step height was measured first under standardised moist conditions and also after exposure to ambient air for 2 and 10 minutes respectively. After removing the demineralised surface material with a collagenase solution, step height was again determined under standardised moist conditions as well as after a standardised 10 minute exposure to ambient air. In addition, measurements over the time of 30 minutes prior to and after the removal of the organic structures were made using both non-contact and contact measuring devices. To visualise the results, 3D scans, scanning electron microscopy images and EDX linescans were made.

In the presence of the demineralised surface material and under moist conditions, the non-contact measuring device revealed almost no step height. Values

(μm , mean \pm SD) after 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 minutes were 0.3 ± 0.7 , 0.4 ± 1.2 , 0.5 ± 1.3 , 0.8 ± 1.7 , 1.0 ± 1.1 , 1.9 ± 1.5 , 3.1 ± 1.5 , 3.4 ± 1.5 , caused by the fully hydrated organic structures. In contrast, the contact stylus partly penetrated the surface which revealed significantly higher results than the non-contact measuring device (values for 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 minutes were 2.9 ± 1.1 , 4.9 ± 1.3 , 6.9 ± 1.6 , 9.0 ± 1.7 , 12.1 ± 1.7 , 17.9 ± 1.9 , 24.8 ± 4.2 , 30.6 ± 5.8 respectively). Higher measurement results were revealed after exposure to ambient air for 2 and 10 minutes due to shrinkage of the organic structures caused by dehydration. Nevertheless, prior to the removal of the organic structures neither measuring device was able to picture the mineralisation of organic structures. This has been confirmed by Bland-Altman comparison of the results which revealed distinct significant proportional and relative biases.

After the removal of the demineralised surface material the measurement results were distinctly higher. Dehydration in ambient air resulted in about 2-4 μm warping of the specimens, which reduced the measurement results and could be visualised in a 3D scan.

Scanning electron microscopy images taken before the enzymatic removal of organic structures revealed that the demineralised surface layer increased in thickness depending on the time spans of demineralisation. The fully demineralised organic structure could be pictured by EDX linescans. After the enzymatic removal of the demineralised surface material the loss of mineralisation could be pictured as a loss of tissue which was also dependent on the time spans of demineralisation.

In conclusion, the loss of mineralised tissue cannot be adequately quantified unless demineralised surface material is removed and samples are kept moist. Most importantly, results obtained in the presence or absence of demineralised surface material were not proportional. Exposure to ambient air rapidly altered the measuring results. The study emphasises the necessity of adequate sample preparation, the careful choice of measuring method with regard to the parameter under study, and of meticulous standardisation of the measuring procedures.

8. Literaturverzeichnis

1. Ahmed AAR, Garcia-Godoy F, Kunzelmann KH: Self-limiting caries therapy with proteolytic agents. *Am J Dent* 2008;21:303-312.
2. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM: Use of transverse microradiography to quantify mineral loss by erosion in bovine enamel. *Caries Res* 1998;32:351-356.
3. Angleton EL, Van Wart HE: Preparation and reconstitution with divalent metal ions of class I and class II Clostridium histolyticum apocollagenases. *Biochemistry* 1988;27:7406-7412.
4. Arends J, ten Bosch JJ: Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res* 1992;71:924-928.
5. Attin T: Methods for assessment of dental erosion. *Monogr Oral Sci* 2006;20:152-172.
6. Attin T, Becker K, Hannig C, Buchalla W, Hilgers R: Method to detect minimal amounts of calcium dissolved in acidic solutions. *Caries Res* 2005a;39:432-436.
7. Attin T, Becker K, Hannig C, Buchalla W, Wiegand A: Suitability of a malachite green procedure to detect minimal amounts of phosphate dissolved in acidic solutions. *Clin Oral Investig* 2005b;9:203-207.
8. Attin T, Becker K, Roos M, Attin R, Paqué F: Impact of storage conditions on profilometry of eroded dental hard tissue. *Clin Oral Invest* 2009;13:473-478.
9. Attin T, Buchalla W, Gollner M, Hellwig E: Use of variable remineralization periods to improve the abrasion resistance of previously eroded enamel. *Caries Res* 2000;34:48-52.
10. Austin RS, Rodriguez JM, Dunne S, Moazzez R, Bartlett DW: The effect of increasing sodium fluoride concentrations on erosion and attrition of enamel and dentine in vitro. *J Dent* 2010;38:782-787.
11. Barbour ME, Rees JS: The laboratory assessment of enamel erosion: a review. *J Dent* 2004;32:591-602.
12. Bartlett D: Intrinsic causes of erosion. *Monogr Oral Sci* 2006;20:119-139.
13. Bartlett D, Ganss C, Lussi A: Basic Erosive Wear Examination (BEWE): a new scoring system for scientific and clinical needs. *Clin Oral Invest* 2008;12:S65-S68.
14. Bland JM, Altman DG: Applying the right statistics: analyses of measurement studies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003;22:85-93.

15. Breschi L, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Ellis TH, Stangel I: High resolution SEM evaluation of dentin etched with maleic and citric acid. *Dent Mater* 2002;18:26-35.
16. Bundesinstitut für Risikobewertung: Hohe Gehalte an Zitronensäure in Süßwaren und Getränken erhöhen das Risiko für Zahnschäden. Nr 006/2005 2004.
17. Carrigan PJ, Morse DR, Furst ML, Sinai IH: A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location. *J Endod* 1984;10:359-363.
18. Carvalho RM, Yoshiyama M, Brewer PD, Pashley DH: Dimensional changes of demineralized human dentine during preparation for scanning electron microscopy. *Arch Oral Biol* 1996;41:379-386.
19. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S: The Role of Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Human Caries. *J Dent Res* 2006;85:22-32.
20. Cheng Z.J., Wang X.M., Cui F.Z., Ge J., Yan J.X.: The enamel softening and loss during early erosion studied by AFM, SEM and nanoindentation. *Biomedical Materials* 2009;4:1-7.
21. Cheung A, Zid Z, Hunt D, McIntyre J: The potential for dental plaque to protect against erosion using an in vivo-in vitro model--a pilot study. *Aust Dent J* 2005;50:228-234.
22. de Josselin de Jong E, van der Linden AHIM, Borsboom PCF, ten Bosch JJ: Determination of mineral changes in human dental enamel by longitudinal microradiography and scanning optical monitoring and their correlation with chemical analysis. *Caries Res* 1988;22:153-159.
23. DeLong R, Pintado MR, Ko CC, Hodges JS, Douglas WH: Factors influencing optical 3D scanning of vinyl polysiloxane impression materials. *J Prosthodont* 2001;10:78-85.
24. Dusevich VM, Eick JD: Evaluation of demineralized dentin contraction by stereo measurements using environmental and conventional scanning electron microscopy. *Scanning* 2002;24:101-105.
25. Eccles JD: Dental erosion of nonindustrial origin. A clinical survey and classification. *J Prosthet Dent* 1979;42:649-653.
26. Eisenburger M, Addy M: Influence of liquid temperature and flow rate on enamel erosion and surface softening. *J Oral Rehab* 2003;30:1076-1080.
27. El Karim IA, Sanhoury NM, Hashim NT, Ziada HM: Dental erosion among 12-14 year old school children in Khartoum: a pilot study. *Community Dent Health* 2007;24:176-180.
28. Featherstone JDB, Lussi A: Understanding the chemistry of dental erosion; *Dental Erosion*. Basel, Karger, 2006 S. 66-76.

29. Fejerskov O, Kidd EA: Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management. Munksgaard, Wiley-Blackwell, 2008.
30. Field J, Waterhouse P, German M: Quantifying and qualifying surface changes on dental hard tissues in vitro. *J Dent* 2010;38:182-190.
31. Ganss C, Hardt M, Blazek D, Klimek J, Schlueter N: Effects of toothbrushing force on the mineral content and demineralized organic matrix of eroded dentine. *Eur J Oral Sci* 2009a;117:255-260.
32. Ganss C, Hardt M, Lussi A, Cocks AK, Klimek J, Schlueter N: Mechanism of action of tin-containing fluoride solutions as anti-erosive agents in dentine - an in vitro tin-uptake, tissue loss, and scanning electron microscopy study. *Eur J Oral Sci* 2010a;118:376-384.
33. Ganss C, Klimek J, Borkowski N: Characteristics of tooth wear in relation to different nutritional patterns including contemporary and medieval subjects. *Eur J Oral Sci* 2002;110:54-60.
34. Ganss C, Klimek J, Giese K: Dental erosion in children and adolescents - a cross-sectional and longitudinal investigation using study models. *Community Dent Oral Epidemiol* 2001;29:264-271.
35. Ganss C, Klimek J, Schwarz N: A comparative profilometric in vitro study of the susceptibility of polished and natural human enamel and dentine surfaces to erosive demineralisation. *Arch Oral Biol* 2000;45:897-902.
36. 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* 2004;49:931-935.
37. Ganss C, Lussi A: Diagnosis of erosive tooth wear. *Monogr Oral Sci* 2006;20:32-43.
38. Ganss C, Lussi A, Klimek J: Comparison of calcium/phosphorus analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosive demineralisation. *Caries Res* 2005;39:178-184.
39. 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* 2009b;43:422-429.
40. Ganss C, Lussi A, Sommer N, Klimek J, Schlueter N: Efficacy of fluoride compounds and stannous chloride as erosion inhibitors in dentine. *Caries Res* 2010b;44:172-176.
41. Ganss C, Neutard L, von Hinckeldey J, Klimek J, Schlueter N: Efficacy of a tin/fluoride rinse: a randomized in situ trial on erosion. *J Dent Res* 2010c;89:1214-1218.

42. Ganss C, Schlueter N, Hardt M, von Hinckeldey J, Klimek J: Effects of toothbrushing on eroded dentine. *Eur J Oral Sci* 2007;115:390-396.
43. Garberoglio R, Cozzani G: In vivo effect of oral environment on etched enamel: a scanning electron microscopic study. *J Dent Res* 1979;58:1859-1865.
44. Gerrard WA, Winter PJ: Evaluation of toothpastes by their ability to assist rehardening of enamel in vitro. *Caries Res* 1986;20:209-216.
45. Gotliv BA, Robach JS, Veis A: The composition and structure of bovine peritubular dentin: mapping by time of flight secondary ion mass spectroscopy. *J Struct Biol* 2006;156:320-333.
46. Gwinnett AJ: Chemically conditioned dentin: A comparison of conventional and enviromental scanning electron mircoscopy findings. *Dent Mater* 1994;10:150-155.
47. Habelitz S, Rodriguez BJ, Marshall SJ, Marshall GW, Kalinin SV, Gruverman A: Peritubular dentin lacks piezoelectricity. *J Dent Res* 2007;86:908-911.
48. Hall AF, Sadler JP, Strang R, de Josselin dJ, Foye RH, Creanor SL: Application of transverse microradiography for measurement of mineral loss by acid erosion. *Adv Dent Res* 1997;11:420-425.
49. Hannig C, Becker K, Yankeu-Ngalene VE, Attin T: Applicability of common methods for short time erosion analysis in vitro. *Oral Health Prev Dent* 2008;6:239-248.
50. Hara AT, Ando M, Cury JA, Serra MC, Gonzales-Cabezas C, Zero D: Influence of the organic matrix on root dentine erosion by citric acid. *Caries Res* 2005;39:134-138.
51. Hara AT, Zero DT: Analysis of the erosive potential of calcium-containing acidic beverages. *Eur J Oral Sci* 2008;116:60-65.
52. Hartles RL, Wagg BJ: Erosive effect of drinking fluids on the molar teeth of the rat. *Arch Oral Biol* 1962;7:307-315.
53. Hellwig E, Lussi A: Oral hygiene products and acidic medicines. *Monogr Oral Sci* 2006;20:112-118.
54. Herkstroter FM, Witjes M, Ruben J, Arends J: Time dependency of microhardness indentations in human and bovine dentine compared with human enamel. *Caries Res* 1989;23:342-344.
55. Heurich E, Beyer M, Jandt KD, Reichert J, Herold V, Schnabelrauch M, Sigusch BW: Quantification of dental erosion-A comparison of stylus profilometry and confocal laser scanning microscopy (CLSM). *Dent Mater* 2010;26:326-336.

56. Hunter ML, West NX, Hughes JA, Newcombe RG, Addy M: Erosion of deciduous and permanent dental hard tissue in the oral environment. *J Dent* 2000a;28:257-263.
57. Hunter ML, West NX, Hughes JA, Newcombe RG, Addy M: Relative susceptibility of deciduous and permanent dental hard tissues to erosion by a low pH fruit drink in vitro. *J Dent* 2000b;28:265-270.
58. Ingman T, Sorsa T, Lindy O, Koski H, Konttinen YT: Multiple forms of gelatinases/type IV collagenases in saliva and gingival crevicular fluid of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1994;21:26-31.
59. 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.
60. Jaeggi T, Lussi A: Prevalence, incidence and distribution of erosion. *Monogr Oral Sci* 2006;20:44-65.
61. Kato MT, Lancia M, Sales-Peres SH, Buzalaf MA: Preventive effect of commercial desensitizing toothpastes on bovine enamel erosion in vitro. *Caries Res* 2010a;44:85-89.
62. Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MA: Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. *J Dent Res* 2010b;89:468-472.
63. Kato MT, Magalhaes AC, Rios D, Hannas AR, Attin T, Buzalaf MA: Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. *J Appl Oral Sci* 2009;17:560-564.
64. Kinney JH, Balooch M, Haupt DL Jr, Marshall SJ, Marshall GW: Mineral distribution and dimensional changes in human dentin during demineralisation. *J Dent Res* 1995;74:1179-1184.
65. Kinney JH, Balooch M, Marshall GW, Marshall SJ: Atomic-force microscopic study of dimensional changes in human dentine during drying. *Arch Oral Biol* 1993;38:1003-1007.
66. Kinney JH, Balooch M, Marshall SJ, Marshall GW, Jr., Weihs TP: Hardness and Young's modulus of human peritubular and intertubular dentine. *Arch Oral Biol* 1996;41:9-13.
67. Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW: The mechanical properties of human dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:13-29.
68. 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.
69. 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.

70. Klont B, ten Cate JM: Susceptibility of the collagenous matrix from bovine incisor roots to proteolysis after in vitro lesion formation. *Caries Res* 1991;25:46-50.
71. Kono RT, Suwa G, Tanijiri T: A three-dimensional analysis of enamel distribution patterns in human permanent first molars. *Arch Oral Biol* 2002;47:867-875.
72. Larsen MJ, Nyvad B: Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res* 1999;33:81-87.
73. Ludbrook J: Statistical techniques for comparing measurers and methods of measurement: a critical review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29:527-536.
74. Lussi A, Jaeggi T: Erosion-diagnosis and risk factors. *Clin Oral Invest* 2008;12:5-13.
75. Lussi A, Jaeggi T, Zero D: The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res* 2004;38 (suppl 1):34-44.
76. Lussi A, Schaffner M, Hotz P, Suter P: Dental erosion in a population of Swiss adults. *Community Dent Oral Epidemiol* 1991;19:286-290.
77. Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C: Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res* 2011;45:2-12.
78. Macdonald E, North A, Maggio B, Sufi F, Mason S, Moore C, Addy M, West NX: Clinical study investigating abrasive effects of three toothpastes and water in an in situ model. *J Dent* 2010;38:509-516.
79. Magalhães AC, Levy FM, Rizzante FA, Rios D, Buzalaf MA.: Effect of NaF and TiF(4) varnish and solution on bovine dentin erosion plus abrasion in vitro. *Acta Odontol Scand* 2012;70:160-164.
80. Magalhaes AC, Levy FM, Rios D, Buzalaf MA: Effect of a single application of TiF(4) and NaF varnishes and solutions on dentin erosion in vitro. *J Dent* 2010;38:153-157.
81. Magalhaes AC, Levy FM, Rizzante FA, Rios D, Buzalaf MA: Effect of NaF and TiF(4) varnish and solution on bovine dentin erosion plus abrasion in vitro. *Acta Odontol Scand* 2012;70:160-164.
82. Magalhaes AC, Rios D, Moino AL, Wiegand A, Attin T, Buzalaf MA: Effect of different concentrations of fluoride in dentifrices on dentin erosion subjected or not to abrasion in situ/ex vivo. *Caries Res* 2008;42:112-116.
83. Meurman JH, Drysdale T, Frank RM: Experimental erosion of dentin. *Scand J Dent Res* 1991;99:457-462.

84. Micheelis, W. and Schiffner, U. Die Datenlage der DMS IV aus Sicht von Dental Public Health und der Versorgungsforschung. Institut der Deutschen Zahnärzte. Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). [19], 461-467. 2006. Köln, Deutscher Zahnärzte Verlag.
85. Miller WD: Versuche und Beobachtungen über den Schwund der harten Zahngewebe, der verschiedentlich als Erosion, Abrasion, chemische Abrasion, Denudation, keilförmiger Defekt usw. bezeichnet wird. Schweiz Vierteljahrsschrift f Zahnheilkunde 1907.
86. Mulisch M: Präparationsmethoden; Romeis - Mikroskopische Technik. Spektrum Akademischer Verlag, 2010 S. 143-148.
87. Nikiforuk G: Understanding dental caries. Basel, New York, Karger, 1985.
88. Nunn J, Shaw L, Smith A: Tooth wear-dental erosion. Br Dent J 1996;180:349-352.
89. Pace F, Pallotta S, Tonini M, Vakil N, Bianchi Porro G: Systematic review: gastro-oesophageal reflux disease and dental lesions. Aliment Pharmacol Ther 2008;27:1179-1186.
90. Pashley DH: Dynamics of the pulpo-dentin complex. Crit Rev Oral Biol Med 1996;7:104-133.
91. Petersen PE, Gormsen C: Oral conditions among German battery factory workers. Community Dent Oral Epidemiol 1991;19:104-106.
92. Pindborg JJ: Chemical and physikal injuries; Pathology of the dental hard tissues. Philadelphia, Munksgaard, 1970 S. 312-321.
93. Ponduri S, Macdonald E, Addy M: A study in vitro of the combined effects of soft drinks and tooth brushing with fluoride toothpaste on the wear of dentine. Int J Dent Hyg 2005;3:7-12.
94. Pretty IA, Edgar WM, Higham SM: The erosive potential of commercially available mouthrinses on enamel as measured by Quantitative Light-induced Fluorescence (QLF). J Dent 2003;31:313-319.
95. Radlanski RJ: Dentin; Orale Struktur- und Entwicklungsbiologie. Berlin, 2011 S. 257-308.
96. Ranjitkar S, Rodriguez JM, Kaidonis JA, Richards LC, Townsend GC, Bartlett DW: The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on erosive enamel and dentine wear by toothbrush abrasion. J Dent 2009;37:250-254.
97. Rodriguez JM, Curtis RV, Bartlett DW: Surface roughness of impression materials and dental stones scanned by non-contacting laser profilometry. Dent Mater 2009;25:500-505.
98. Ruben J, Arends J: Shrinkage of sound and demineralized human coronal dentine slabs. Caries Res 1993;27:266-270.

99. Sales-Peres SH, Pessan JP, Buzalaf MA: Effect of an iron mouthrinse on enamel and dentine erosion subjected or not to abrasion: an in situ/ex vivo study. *Arch Oral Biol* 2007;52:128-132.
100. Sano H, Ciucchi B, Matthews WG, Pashley DH: Tensile properties of mineralized and demineralized human and bovine dentin. *J Dent Res* 1994;73:1205-1211.
101. Scaffa PM, Vidal CM, Barros N, Gesteira TF, Carmona AK, Breschi L, Pashley DH, Tjaderhane L, Tersariol IL, Nascimento FD, Carrilho MR: Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. *J Dent Res* 2012;91:420-425.
102. Scheutzel P: Etiology of dental erosion- intrinsic factors. *Eur J Oral Sci* 1996;104:178-190.
103. 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.
104. Schlueter N, Ganss C, Hardt M, Merz M, Klimek J: Degradation of the organic dentine matrix by pepsin under erosive conditions in vitro [Degradation der organischen Dentinmatrix durch Pepsin unter erosiven Bedingungen in vitro]. *Dtsch Zahnärztl Z* 2007;62:505-513.
105. Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C: Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. *Caries Res* 2011;45 Suppl 1:13-23.
106. Schlueter N, Hardt M, Klimek J, Ganss C: Influence of the digestive enzymes trypsin and pepsin in vitro on the progression of erosion in dentine. *Arch Oral Biol* 2010;55:294-299.
107. Schmidt N, Ganss C, Klimek J: Ätiologie, Epidemiologie und Therapie von Erosionen. *Oralprophylaxe* 2003;25:101-109.
108. Schroeder HE: Dentinogenesis und Dentin; *Orale Strukturbiologie: Entwicklungsgeschichte, Struktur und Funktion normaler Hart- und Weichgewebe der Mundhöhle und des Kiefergelenks*. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag, 2000a S. 85-123.
109. Schroeder HE: *Orale Strukturbiologie: Entwicklungsgeschichte, Struktur und Funktion normaler Hart- und Weichgewebe der Mundhöhle und des Kiefergelenks*. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag, 2000b.
110. Selvig KA: Ultrastructural changes in human dentine exposed to a weak acid. *Arch Oral Biol* 1968;13:719-734.
111. Shuyuan M., Jiye C., Xinwen Z., Yangzhe W.: Effects of Etchant on the Nanostructure of Dentin: An Atomic Force Mikroscope Study. *Scanning* 2009;31:28-34.

112. Söder PO: Proteolytic activity in the oral cavity: proteolytic enzymes from human saliva and dental plaque material. *J Dent Res* 1972;51:389-393.
113. Stafne ECLA, Lovestedt SA: Dissolution of tooth substance by lemon juice, acid beverages and acids from other sources. *J Am Dent Assoc* 1947;34:586-592.
114. Takuma S, Eda S: Structure and Development of the Peritubular Matrix in Dentin. *J Dent Res* 1966;45:683-692.
115. tenCate JM, Imfeld T: Dental erosion, summary. *Eur J Oral Sci* 1996;104:241-244.
116. Van der Graaf ER, ten Bosch JJ: Changes in dimensions and weight of human dentine after different drying procedures and during subsequent rehydration. *Arch Oral Biol* 1993;38:97-99.
117. van Strijp AJ, Jansen DC, DeGroot J, ten Cate JM, Everts V: Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Res* 2003;37:58-65.
118. Vanuspong W, Eisenburger M, Addy M: Cervical tooth wear and sensitivity: erosion, softening and rehardening of dentine; effects of pH, time and ultrasonication. *J Clin Periodontol* 2002;29:351-357.
119. Wang Y, Yao X: Morphological/chemical imaging of demineralized dentin layer in its natural, wet state. *Dent Mater* 2010;26:433-442.
120. West NX, Hughes JA, Addy M: The effect of pH on the erosion of dentine and enamel by dietary acids in vitro. *J Oral Rehab* 2001;28:860-864.
121. Wetton S, Hughes J, Newcombe RG, Addy M: The effect of saliva derived from different individuals on the erosion of enamel and dentine. A study in vitro. *Caries Res* 2007;41:423-426.
122. Wetton S, Hughes J, West NX, Addy M: Exposure time of enamel and dentine to saliva for protection against erosion: a study in vitro. *Caries Res* 2006;40:213-217.
123. Wiegand A, Gutsche M, Attin T: Effect of olive oil and an olive-oil-containing fluoridated mouthrinse on enamel and dentin erosion in vitro. *Acta Odontol Scand* 2007;65:357-361.
124. Wiegand A, Hiestand B, Sener B, Magalhaes AC, Roos M, Attin T: Effect of TiF₄, ZrF₄, HfF₄ and AmF on erosion and erosion/abrasion of enamel and dentin in situ. *Arch Oral Biol* 2010;55:223-228.
125. Wiegand A, Lemmrich F, Attin T: Influence of rotating-oscillating, sonic and ultrasonic action of power toothbrushes on abrasion of sound and eroded dentine. *J Periodontal Res* 2006a;41:221-227.

126. Wiegand A, Magalhaes AC, Sener B, Waldheim E, Attin T: TiF(4) and NaF at pH 1.2 but not at pH 3.5 are able to reduce dentin erosion. *Arch Oral Biol* 2009a;54:790-795.
127. 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* 2006b;12:117-124.
128. Wiegand A, Waldheim E, Sener B, Magalhaes AC, Attin T: Comparison of the effects of TiF4 and NaF solutions at pH 1.2 and 3.5 on enamel erosion in vitro. *Caries Res* 2009b;43:269-277.
129. Wiegand A, Wolmershäuser S, Hellwig E, Attin T: Influence of buffering effects of dentifrices and fluoride gels on abrasion on eroded dentine. *Arch Oral Biol* 2004;49:259-265.
130. Young A, Thrane PS, Saxegaard E, Jonski G, Rölla G: Effect of stannous fluoride toothpaste on erosion-like lesions: an in vivo study. *Eur J Oral Sci* 2006;114:180-183.
131. Zhang SC, Kern M: The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. *Int J Oral Sci* 2009;1:163-176.

9. Anhang

9.1 Trocknungsreihen

9.1.1 Optisch vor Entfernung der organischen Matrix

Tab. 7: Diese Tabelle liefert einen Überblick über die mit der optischen Profilometrie ermittelten Werte aufeinanderfolgender Messzeitpunkte vor Entfernung der organischen Matrix. MW entspricht dem Mittelwert, SD der Standardabweichung aller 15 gemessenen Proben pro Demineralisationszeit.

	0 min	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min	10 min	15 min	30 min
5 min	0,8 ±0,3	1,4 ±0,2	0,8 ±0,2	0,5 ±0,2	0,3 ±0,3	0,4 ±0,3	0,5 ±0,2	0,8 ±0,1	1,4 ±0,3
10 min	0,6 ±0,4	3,1 ±0,3	2,7 ±0,6	2,2 ±0,7	1,9 ±0,7	1,6 ±0,5	1,1 ±0,4	1,1 ±0,5	1,7 ±0,5
15 min	1,0 ±0,6	4,0 ±1,1	5,7 ±0,5	5,8 ±0,5	5,5 ±0,4	5,5 ±0,3	5,2 ±0,3	5,1 ±0,3	4,8 ±0,4
20 min	0,7 ±0,9	2,2 ±1,2	3,7 ±2,6	6,1 ±3,2	7,6 ±0,8	7,7 ±0,7	7,9 ±0,6	7,9 ±0,6	7,6 ±0,7
30 min	2,1 ±0,7	5,5 ±2,4	9,5 ±0,6	9,3 ±0,2	9,0 ±0,2	8,9 ±0,1	8,9 ±0,2	9,1 ±0,4	9,1 ±0,6
60 min	3,0 ±2,1	5,2 ±0,7	11,4 ±1,9	15,9 ±0,5	16,2 ±0,7	16,2 ±0,4	16,0 ±0,2	15,9 ±0,1	15,8 ±0,4
90 min	5,4 ±1,4	10,3 ±1,4	12,5 ±1,1	23,6 ±2,1	24,3 ±0,2	24,2 ±0,4	23,9 ±0,5	24,2 ±0,4	24,6 ±0,1
120 min	3,8 ±1,4	4,7 ±0,5	11,3 ±2,5	25,8 ±2,1	28,5 ±0,7	28,9 ±0,8	28,9 ±1,1	28,9 ±1,1	28,1 ±0,4

9.1.2 Optisch nach Entfernung der organischen Matrix

Tab. 8: Diese Tabelle liefert einen Überblick über die mit der optischen Profilometrie ermittelten Werte aufeinanderfolgender Messzeitpunkte nach Entfernung der organischen Matrix. MW entspricht dem Mittelwert, SD der Standardabweichung aller 15 gemessenen Proben pro Demineralisationszeit.

	0 min	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min	10 min	15 min	30 min
5 min	5,5 ±1,0	4,4 ±1,0	3,7 ±0,8	3,5 ±0,7	3,3 ±0,7	3,2 ±0,7	3,4 ±0,4	3,5 ±0,3	3,9 ±0,3
10 min	6,2 ±0,2	5,5 ±0,8	5,0 ±1,3	4,7 ±1,5	4,5 ±1,6	4,4 ±1,5	3,6 ±0,2	3,7 ±0,5	4,6 ±0,4
15 min	9,8 ±0,2	8,1 ±0,5	7,2 ±0,2	6,9 ±0,1	6,8 ±0,2	6,7 ±0,2	6,8 ±0,3	6,9 ±0,3	6,9 ±0,3
20 min	11,8 ±0,1	11,4 ±0,2	10,8 ±0,4	10,4 ±0,3	10,1 ±0,1	10,1 ±0,1	9,9 ±0,1	10,2 ±0,1	10,5 ±0,1
30 min	18,1 ±0,2	17,6 ±0,5	16,6 ±0,5	16,2 ±0,5	16,2 ±0,5	16,2 ±0,5	16,3 ±0,2	16,5 ±0,1	16,9 ±0,1
60 min	34,6 ±1,3	34,4 ±0,8	33,0 ±0,4	31,6 ±1,3	31,0 ±1,6	30,6 ±1,5	29,9 ±0,3	29,8 ±0,4	30,7 ±0,4
90 min	43,3 ±0,4	42,8 ±0,4	41,6 ±0,8	40,7 ±1,3	39,9 ±1,0	39,3 ±0,5	38,6 ±0,3	38,9 ±0,1	39,9 ±0,2
120 min	52,2 ±0,7	53,6 ±0,3	53,2 ±0,5	52,8 ±0,6	52,6 ±0,6	52,4 ±0,6	52,0 ±0,4	51,5 ±1,1	52,3 ±0,3

9.1.3 Mechanisch vor Entfernung der organischen Matrix

Tab. 9: Diese Tabelle liefert einen Überblick über die mit der mechanischen Profilometrie ermittelten Werte aufeinanderfolgender Messzeitpunkte vor Entfernung der organischen Matrix. MW entspricht dem Mittelwert, SD der Standardabweichung aller 15 gemessenen Proben pro Demineralisationszeit.

	0 min	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min	10 min	15 min	30 min
5 min	3,8 ±1,0	2,7 ±0,8	2,3 ±0,5	1,8 ±0,7	1,5 ±0,8	1,5 ±0,8	1,4 ±0,6	1,6 ±0,6	2,0 ±0,4
10 min	4,8 ±0,6	3,8 ±1,1	2,6 ±0,7	2,0 ±0,7	2,0 ±0,3	1,9 ±0,2	1,9 ±0,4	2,2 ±0,2	2,8 ±0,4
15 min	7,3 ±0,7	6,5 ±0,7	5,7 ±0,7	5,3 ±0,6	5,1 ±0,5	5,0 ±0,6	4,8 ±0,3	4,9 ±0,2	4,9 ±0,2
20 min	9,3 ±0,7	9,0 ±0,2	8,2 ±0,5	7,8 ±0,6	7,6 ±0,5	7,4 ±0,5	7,0 ±0,4	6,9 ±0,3	6,8 ±0,1
30 min	12,0 ±0,5	11,5 ±1,2	11,1 ±0,9	10,4 ±0,7	10,0 ±0,6	9,8 ±0,5	9,6 ±0,5	9,6 ±0,5	9,8 ±0,4
60 min	18,3 ±1,1	18,3 ±1,0	18,2 ±1,2	18,1 ±0,8	17,8 ±0,7	17,5 ±0,7	17,2 ±0,5	17,2 ±0,4	17,5 ±0,2
90 min	26,6 ±0,2	25,8 ±0,2	25,5 ±0,2	25,3 ±0,2	25,3 ±0,4	25,5 ±1,1	25,2 ±1,1	25,3 ±0,7	26,2 ±0,8
120 min	28,3 ±0,5	30,8 ±0,9	32,8 ±1,8	32,5 ±1,6	32,0 ±1,6	31,7 ±1,6	31,1 ±1,6	31,2 ±1,4	31,7 ±1,4

9.1.4 Mechanisch nach Entfernung der organischen Matrix

Tab. 10: Diese Tabelle liefert einen Überblick über die mit der mechanischen Profilometrie ermittelten Werte aufeinanderfolgender Messzeitpunkte nach Entfernung der organischen Matrix. MW entspricht dem Mittelwert, SD der Standardabweichung aller 15 gemessenen Proben pro Demineralisationszeit.

	0 min	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min	10 min	15 min	30 min
5 min	5,7 ±1,2	3,7 ±1,4	2,9 ±1,4	2,5 ±1,4	2,2 ±1,4	2,1 ±1,3	1,9 ±1,1	2,0 ±0,9	2,5 ±0,6
10 min	7,2 ±0,4	5,8 ±0,2	5,0 ±0,3	4,4 ±0,3	4,1 ±0,4	3,5 ±0,4	2,7 ±0,7	3,0 ±0,4	3,6 ±0,1
15 min	10,1 ±0,7	7,8 ±0,9	6,6 ±0,7	5,9 ±0,6	5,5 ±0,4	5,2 ±0,4	4,8 ±0,3	4,9 ±0,3	5,1 ±0,3
20 min	13,8 ±0,4	13,9 ±0,4	13,9 ±0,5	14,0 ±0,2	13,9 ±0,1	13,8 ±0,5	13,5 ±0,3	13,6 ±0,6	13,9 ±0,2
30 min	19,8 ±0,6	19,6 ±0,3	19,4 ±0,4	19,4 ±0,3	19,2 ±0,4	19,0 ±0,3	19,3 ±0,3	19,3 ±0,1	19,6 ±0,1
60 min	35,8 ±1,5	34,9 ±1,2	34,1 ±0,7	33,5 ±0,5	33,2 ±0,6	33,1 ±0,5	32,3 ±0,8	32,4 ±0,9	33,2 ±0,6
90 min	47,4 ±1,3	46,4 ±1,3	45,0 ±1,0	43,9 ±0,9	42,7 ±0,3	42,1 ±0,2	41,4 ±0,1	41,9 ±0,2	43,2 ±0,3
120 min	56,5 ±1,6	55,8 ±1,6	55,1 ±1,2	54,7 ±1,1	54,4 ±1,0	54,2 ±0,8	53,5 ±0,8	53,1 ±1,0	52,9 ±0,9

9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

9.3 Danksagung

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. Carolina Ganss für die Überlassung des Themas und die unermüdliche freundliche und kompetente Betreuung. An dieser Stelle möchte ich auch Frau Dr. Schlüter für die Motivation und die zahlreichen Anregungen in allen Bereichen danken.

Frau Birgitt Meier danke ich für die Unterstützung im medizinisch-technischen Labor, die Bereitstellung der Geräte und die Hilfe bei der Kritisch-Punkt-Trocknung der Proben.

Ein weiterer Dank gilt meiner Freundin und Kollegin Alexandra Tolle für die Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Auch möchte ich mich bei Katharina Zilles für das Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir das Studium ermöglicht und mich in allen Situationen unterstützt und ermutigt hat.

Ebenso danke ich besonders herzlich meinem Lebensgefährten für die Unterstützung und Motivation im Studium sowie bei der Anfertigung dieser Arbeit.