

**Evaluation quantitativer Messmethoden zur Bestimmung  
erosiver Mineralverluste im Dentin**  
**-Ein Vergleich von Longitudinaler Mikroradiographie und Kalziumanalyse-**

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

vorgelegt von Hillgärtner, Tina, geb. Weigelt  
aus Gießen

Gießen 2010

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

Gutachter: Frau Prof. Dr. Carolina Ganß

Gutachter: PD Dr. Matthias Oertel

Tag der Disputation: 29.03.2011

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

Gießen, September 2010

---

Tina Hillgärtner

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Literaturübersicht</b> .....	<b>5</b>
2.1 Definition von Erosionen .....	5
2.2 Ätiologie der Erosionen .....	6
2.3 Epidemiologie der Erosionen .....	10
2.4 Klinisches und histologisches Erscheinungsbild von Erosionen .....	14
2.5 Therapie von Erosionen .....	17
2.6 Messmethoden zur Feststellung von Erosionen .....	20
<b>3. Material und Methode</b> .....	<b>26</b>
3.1 Herstellung der Zahnschnitte .....	26
3.2 Herstellung der Lösungen .....	28
3.3 Messmethoden .....	29
3.3.1 Kalziumanalyse .....	29
3.3.2 Longitudinale Mikroradiographie .....	30
3.3.3 Testmessungen zur Reproduzierbarkeit der Messungen .....	34
3.4 Versuchsdurchführung .....	35
3.5 Rasterelektronenmikroskopie .....	35
3.6 Statistische Auswertung .....	36
3.7 Schematische Übersicht des Versuchsablaufes .....	39
3.8 Material- und Chemikalienliste .....	40
3.8.1 Materialien .....	40
3.8.2 Chemikalien .....	41
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>42</b>
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>48</b>
5.1 Versuchsaufbau und -durchführung; Probenmaterial und Erzeugung der Erosionen .....	48
5.2 Betrachtung der Methoden und Ergebnisse .....	51
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>58</b>

---

<b>7. Zusammenfassung</b> .....	<b>66</b>
<b>8. Summary</b> .....	<b>68</b>
<b>9. Anhang</b> .....	<b>70</b>
9.1 Lebenslauf.....	70
9.2 Danksagung.....	71
9.3 Publikation.....	72

## 1. Einleitung

Erosionen zählen zu den allgemeinen Verschleißerscheinungen der Zähne und werden als Zahnhartsubstanzverluste definiert, die aufgrund einer Säureeinwirkung ohne die Beteiligung von Mikroorganismen auf sauberen Zahnoberflächen entstehen. Ursache für die Entstehung von Erosionen sind exogene oder endogene Säuren.

Säurebedingte Zahnhartsubstanzverluste können ein erhebliches Ausmaß annehmen und zu einer Exponation des Dentins führen. Ein erhöhtes Risiko dafür besteht speziell bei Personen, die sich vegetarisch oder vegan ernähren oder bei Patienten, die an einer Essstörung in Kombination mit Erbrechen oder einer Refluxerkrankung leiden.

Durch chronische Säureeinwirkung kommt es zu einem zentripetal voranschreitenden Mineralverlust. Im Gegensatz zur Karies, die bei Beteiligung des Dentins in der Regel einer restaurativen Therapie bedarf, können säurebedingte Zahnhartsubstanzdefekte auch bei einer bestehenden Dentinbeteiligung zum Stillstand kommen, wenn hinreichende kausale und symptomatische Maßnahmen ergriffen werden. Daher kommt der Quantifizierung erosiv bedingter Substanzverluste bei Dentin im Rahmen der Erosionsforschung eine große Bedeutung zu.

Im Schmelz sind erosiv bedingte Zahnhartsubstanzverluste ein reines Oberflächenphänomen, bei dem die Mineral Schicht für Schicht abgetragen wird. Im Gegensatz dazu sind Dentinerosionen durch eine komplexe histologische Struktur charakterisiert. Durch die Säureeinwirkung wird wie im Schmelz die mineralische Komponente herausgelöst, was zu einer zunehmenden Freilegung der organischen Strukturen führt. Da ein Säureeinfluss allein nicht zu einem Abbau dieser Strukturen führt, bleibt die organische Matrix auf der Dentinoberfläche erhalten. Diese organische Matrix stellt ein Problem für die Quantifizierung von erosiven Mineralverlusten dar. Bisher wurden zur Bestimmung erosiver Mineralverluste eine Vielzahl von Messmethoden entwickelt [Grenby, 1996]. Bereits etablierte Methoden für die Quantifizierung von erosiven Mineralverlusten im Schmelz wurden bisher dagegen nicht systematisch für Dentin untersucht.

Dabei stellt sich die Frage nach einer Methode, die es erlaubt, den Mineralverlust im Dentin auf geeignete Weise zu erfassen. Gegenwärtig ist die Profilometrie eine häufig angewandte Messmethode in der Erosionsforschung. Aber auch die longitudinale Mikroradiographie (LMR) wurde bereits mehrfach auf diesem Gebiet eingesetzt. Eine weitere Methode stellt die Quantifizierung von Mineralverlusten durch die Bestimmung von Kalzium oder Phosphat in demineralisierenden Lösungen dar.

Die vorliegende Arbeit war Teil einer größeren Studie zur Methodenevaluation zur Bestimmung von erosiven Mineralverlusten im Dentin. Verglichen wurden Profilometrie, longitudinale Mikroradiographie und Kalziumanalyse. Im Folgenden wird der Vergleich von Mikroradiographie und Kalziumanalyse dargestellt.

Ziel dieser Arbeit war es, in einer Versuchsreihe vor und nach der enzymatischen Entfernung der organischen Matrix den erosiven Mineralverlust von Dentin mit Hilfe verschiedener Messmethoden zu ermitteln und miteinander zu vergleichen.

Aus den Ergebnissen soll eine Empfehlung zum Einsatz von geeigneten Messmethoden abgeleitet werden.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Definition von Erosionen

Zeitlebens sind Zähne zahlreichen physikalischen und chemischen Insulten ausgesetzt, die bis zu einem gewissen Maß zu Abnutzungserscheinungen von Zahnhartsubstanz führen. Zu den Abnutzungserscheinungen zählen Abrasionen (hervorgerufen durch den Kontakt zu einem weiteren Medium), Attritionen (Hartsubstanzverlust durch direkten Zahnkontakt), Abfraktionen (keilförmige Defekte) und Erosionen (säurebedingte Zahnhartsubstanzverluste) [Jaeggi et al., 1999]. All diese Abnutzungserscheinungen kommen in größerem oder kleinerem Ausmaß in der Dentition vor. Gleichzeitig kann es zu einem simultanen oder synergistischen Auftreten dieser Prozesse kommen, was eine eindeutige Diagnose erschweren kann. Obwohl der erosive Einfluss überwiegen mag, muss dennoch von einem multifaktoriellen Geschehen ausgegangen werden [Amaechi et al., 2003; Eisenburger et al., 2003; Hooper et al., 2003]. Morphologie und Schweregrad solcher Defekte können von vorherrschenden ätiologischen Faktoren abhängen.

Erosionen zählen zu den chronischen nicht-kariesbedingten destruktiven Prozessen, die zu einem irreversiblen Verlust von Zahnhartsubstanz führen.

Sie sind als Zahnhartsubstanzverluste definiert, die aufgrund der Einwirkung von Säuren und/oder Chelatoren nicht-bakterieller Genese entstehen [Zipkin und McClure, 1949]. Da die verursachenden Säuren nicht aus dem Stoffwechsel intraoraler Mikroorganismen entstehen, ist der Pathomechanismus von Erosionen deutlich von dem der Karies zu unterscheiden. Erosionen unterscheiden sich von kariösen Läsionen zum einen durch den Ursprung der einwirkenden Säure, zum anderen durch die Wirkungsweise dieser Säuren auf die Zahnhartsubstanzen. Zur Kariesentstehung kommt es, wenn Plaquebakterien durch Zufuhr niedermolekularer Kohlenhydrate organische Säuren produzieren. Zunächst kommt es dabei zu einem Herauslösen von Mineralien unter einer pseudointakten Oberflächenschicht, was zu einer Entstehung des Läsionskörpers führt. Bis zum Erreichen der Schmelz-Dentin-Grenze breiten sich kariöse Läsionen kegelförmig aus, wobei die Basis an der

Zahnoberfläche lokalisiert ist. Nach weiterem progredientem Verlauf kann es so zu einer Beteiligung des Dentins kommen [Hellwig et al., 1999].

Fällt der pH-Wert in der Mundhöhle aufgrund eines Säureangriffes unter den für Erosionen kritischen pH-Wert von 4 bis 4,5 [Larsen und Nyvad, 1999], kommt es im Schmelz zu einem zentripetal, also von außen nach innen, voranschreitenden Mineralverlust. Hinsichtlich der Histologie von säurebedingten Zahnhartsubstanzverlusten wird auf die Abschnitte 2.4 verwiesen. Dort wird auf diese Thematik detaillierter eingegangen.

## **2.2 Ätiologie von Erosionen**

Als Ursachen für die Entstehung von Erosionen werden extrinsische und intrinsische Faktoren verantwortlich gemacht [Imfeld, 1996; Järvinen et al., 1991; Meurman und tenCate, 1996; Zero, 1996]. Zu den exogenen Ursachen zählen die von außerhalb der Mundhöhle zugeführten Säuren verschiedenster Art. Die durch exogene Säurezufuhr hervorgerufenen Erosionen können durch den häufigen Genuss saurer Lebensmittel oder durch die Einnahme bestimmter Vitaminzubereitungen und selten durch dampfförmige Säuren bei beruflicher Exposition hervorgerufen werden [Hannig und Albers, 1993; Järvinen et al., 1991; Zero, 1996].

Zu den potentiell erosiven Speisen und Getränken werden u.a. Zitrusfrüchte, Obst- und Essigkonserven, Fruchtsäfte, Rot- und Weißweine, Limonaden, Sportlergetränke sowie Cola-Getränke und Salatdressings gezählt [Zero, 1996]. Gerade das erosive Potential diverser Erfrischungsgetränke konnte klar nachgewiesen werden. In einer Studie, in der verschiedene Erfrischungsgetränke hinsichtlich ihres erosiven Potentials getestet wurden, konnte bereits nach einer 20-minütigen Einwirkzeit eine Reduktion der Mikrohärtigkeit um 10 bis 30% verzeichnet werden [Lussi et al., 1993]. Jedoch ist nicht der pH-Wert allein ausschlaggebend für das erosive Potential eines Lebensmittels. In zahlreichen in vitro und in situ Studien konnte gezeigt werden, dass das erosive Potential eines Lebensmittels nicht ausschließlich von dem pH-Wert abhängt, sondern auch durch den Mineralgehalt, die Menge an titrierbarer Säure, den Gehalt an Kalzium und Phosphat, als auch von

komplexbildenden Eigenschaften beeinflusst wird [Bartlett, 2005; Grando et al., 1996; Hughes et al., 1999a; Hughes et al., 1999b; Lussi et al., 1993; Lussi et al., 1995; Maupome et al., 1998; Meurman et al., 1990; Mistry und Grenby, 1993; Rytömaa et al., 1988; Sorvari et al., 1994; Sorvari et al., 1996].

So wird Milchprodukten wie zum Beispiel Joghurt (pH 3,8) oder Buttermilch (pH 4,4) aufgrund ihres sauren pH-Wertes ein erosives Potential beigemessen [Hellwig et al., 1999; Hickel, 1993]. Sie zeigten aber durch den hohen Anteil an Kalzium und Phosphat in verschiedenen Versuchen kein erosives Potential. So wurden in einer Studie sieben verschiedene Joghurts im Hinblick auf deren Pufferkapazität und das erosive Potential getestet. Die Untersuchung ergab, dass Früchtejoghurt die höchste und Light-Joghurt die niedrigste Pufferkapazität aufwies. Mit keinem der untersuchten Joghurts war es möglich, eine erosive Läsion im Schmelz zu verursachen [Kargul et al., 2007].

Mineralwässern wird ebenfalls aufgrund des Gehalts an Kohlensäure eine erosive Wirkung zugeschrieben. Der pH-Wert liegt bei den meisten Produkten deutlich über vier und steigt dazu schnell an, wenn CO<sub>2</sub> entweicht [Larsen und Nyvad, 1999]. Es konnte selbst nach einer vierstündigen Einwirkzeit profilometrisch kein Substanzverlust nachgewiesen werden [Eisenburger et al., 2000]. Erst nach einer einwöchigen Expositionszeit konnten bei einigen Produkten Läsionen festgestellt werden, die jedoch um ein Vielfaches geringer waren, als nach Applikation diverser Limonaden [Larsen und Nyvad, 1999].

Im Gegensatz zu den nicht aromatisierten Mineralwässern, kann der Zusatz von Aromastoffen oder Fruchtsäften das erosive Potential erhöhen. In einer Studie von Brown et al. [2007] wurde das erosive Potential von aromatisierten Mineralwässern untersucht. Dabei wurden der pH-Wert und die Menge an titrierbarer Säure von 11 verschiedenen aromatisierten Mineralwässern ermittelt. Als positive Kontrollgruppe diente ein Orangensaft mit bekanntem erosivem Potential. Die pH-Wert-Messungen ergaben Werte zwischen 2,7 und 3,3. Dementsprechend sollten aromatisierte Mineralwässer als potentiell erosiv eingestuft und nicht als Alternative zu anderen erosiven Getränken wie Fruchtsäften und Limonaden angesehen werden. In einer weiteren Untersuchung wurden stilles und kohlenensäurehaltiges Mineralwasser mit diversen Cola-Getränken und einem Orangensaft untersucht. Für die Löslichkeit der Zahnhartsubstanzen ergaben sich bei stillem als auch bei

kohlensäurehaltigem Mineralwasser generell niedrige Werte. Im Gegensatz dazu erreichten die Cola-Getränke und der Orangensaft die hundertfachen Werte des kohlensäurehaltigen Mineralwassers. Die komplexen Zusammensetzungen im Mineralgehalt könnten für die weniger erosiven Eigenschaften der Mineralwässer verantwortlich sein, insbesondere Kalzium [Parry et al., 2001]. In einer anderen Studie wurde die erosive Wirkung von verschiedenen Getränken und Nahrungsmitteln untersucht. Bei den Limonaden und Fruchtsäften konnte ein signifikanter Verlust an Mikrohärtigkeit auf der Zahnoberfläche festgestellt werden. Bei den pH-Wertmessungen lieferten Coca Cola (2,6), Sprite (2,64) und Eistee (3,0) die niedrigsten Werte. Der höchste pH-Wert konnte bei einem Orangen-Joghurt-Drink (4,25) gemessen werden. Bezogen auf die Menge an titrierbarer Säure wiesen frischer Kiwisaft, frischer Orangensaft und Multivitaminsaft die höchsten Werte, und Coca Cola, Sprite und Eistee die niedrigsten Werte auf [Lussi et al., 2000].

Eine berufsbedingte Säureexposition besteht beispielsweise bei Weinverkostern. Die pH-Werte für Rotweine von 3,0 und für Weißweine von 3,7 liegen deutlich unterhalb des kritischen pH-Wertes und können somit zur Entstehung von Erosionen beitragen [Wiktorsson et al., 1997]. Eine weitere Berufsgruppe, die ein erhöhtes Risiko für Erosionen aufweist sind Fabrikarbeiter, die Säuredämpfen oder -aerosolen ausgesetzt sind. Die höchste Prävalenz für Erosionen weisen Arbeiter auf, die in der Batterieindustrie tätig sind. So konnte bei Luftmessungen eine erhöhte Säurekonzentration von 0,4 bis 4,1 mg/m<sup>3</sup> festgestellt werden. 31% der Arbeiter wiesen erosive Läsionen auf, wobei die Frontzähne am häufigsten betroffen waren [Petersen und Gormsen, 1991].

Entsprechend dem erosiven Potential bestimmter Lebensmittel und Getränke, zeigen auch Bevölkerungsgruppen mit bestimmten Ernährungsformen/-gewohnheiten ein erhöhtes Potential Erosionen zu entwickeln. In einer Studie wurden die Häufigkeit und der Schweregrad von Erosionen in Zusammenhang mit Ernährungs- und Mundhygienegewohnheiten untersucht. Insgesamt nahmen an der Studie 130 Personen teil, deren Ernährung seit 39 Monaten zu mehr als 95% aus Rohkost bestand. Die Kontrollgruppe setzte sich aus 76 zufällig ausgewählten Patienten der Universitäts-Zahnklinik Gießen zusammen.

Die Diagnostik erfolgte anhand von Studienmodellen. Die Rohkost-Gruppe nahm durchschnittlich 4,8 mal pro Tag Zitrusfrüchte zu sich. Bezogen auf die Gesamtnahrungsaufnahme betrug der Früchteanteil 62%, was wiederum einer Gesamtmenge von 9,5 kg Früchten pro Woche entsprach. Verglichen mit der Kontrollgruppe konnten in der Rohkost-Gruppe signifikant mehr Erosionen festgestellt werden. Nur 2,3% der Rohkost-Gruppe wiesen keine erosiven Läsionen auf, wobei 37,2% mindestens einen Zahn mit einem moderaten erosiven Defekt und 60,5% eine schwerwiegende Läsion aufwiesen [Ganss et al., 1999]. In einer Studie an 19 schwedischen Weinverkostern wurden bei insgesamt 74% der Personen Erosionen unterschiedlichen Ausmaßes diagnostiziert. Dabei wiesen zwei Personen starke, fünf mittelschwere, sieben geringgradige und nur fünf Personen gar keine Läsionen auf. Schweregrad und Berufsjahre standen dabei in engem Zusammenhang [Wiktorsson et al., 1997].

Alleinige Ursache für endogene Erosionen ist die Einwirkung von Magensäure, die entweder bei chronischem Erbrechen oder bei Refluxerkrankungen in die Mundhöhle gelangt und dort auf die Zahnoberflächen einwirken kann [Scheutzel, 1996]. Dabei bestimmen Häufigkeit und Dauer der einwirkenden Säure das Ausmaß. Säurebedingte Zahnhartsubstanzverluste werden jedoch erst nach chronischer Einwirkung klinisch manifest [Scheutzel, 1996].

Die Magensäure hat einen pH-Wert zwischen 1 und 1,5 und liegt damit weit unter dem für die Entstehung von Erosionen kritischen pH-Wert von 4 bis 4,5 [Scheutzel, 1996]. Zahlreiche Studien zeigen, dass Essstörungen in Kombination mit Erbrechen am deutlichsten mit Erosionen assoziiert sind. So stellte man fest, dass das Erosionsrisiko bei Patienten mit wöchentlichen Symptomen der Regurgitation um das vierfache erhöht war. Patienten mit chronischem Erbrechen wiesen sogar ein 18fach erhöhtes Erosionsrisiko auf [Järvinen et al., 1991]. In einer weiteren Studie mit 81 Personen mit Essstörungen zeigten sich bei 77 Personen Erosionen, die sich bei 45 Patienten bis in das Dentin erstreckten [Öhrn et al., 1999]. Eine andere Studie erbrachte das Ergebnis, dass in einer Untersuchung mit 35 bulimischen Patienten, 63% an erosiv bedingten Zahnhartsubstanzverlusten litten [Rytömaa et al., 1998]. In einer südafrikanischen Studie mit 11 erkrankten Personen wiesen 69% der Probanden Erosionen auf [Jones und Cleaton-Jones, 1989]. Im

Vergleich dazu sind Refluxerkrankungen deutlich weniger mit Erosionen assoziiert. So befanden sich bei 109 Patienten mit gastrointestinaler Erkrankung nur sieben mit Erosionen [Järvinen et al., 1988]. In einer weiteren Studie zeigten sich unter 117 Patienten nur 28 (26%) mit erosiven Läsionen [Meurman et al., 1994]. In einer anderen Studie wiesen 30% der insgesamt 31 Patienten erosive Läsionen auf [Moazzez et al., 2005].

### **2.3 Epidemiologie von Erosionen**

Angaben zur Prävalenz von Erosionen in der Normalbevölkerung liegen bis heute nur in begrenztem Umfang vor. Aufgrund der großen Variationsbreite an diagnostischen Kriterien, an angewandten Indizes sowie verschiedener untersuchter Zahngruppen bzw. -flächen, wird ein Vergleich der Daten zusätzlich erschwert. Die Literatur hat gezeigt, dass Defekte im Schmelz weitaus häufiger auftreten als im Dentin. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit jedoch auf erosiven Defekten mit Dentinbeteiligung liegt, wurde bei Durchsicht der einzelnen Studien der Fokus auf dieses Substrat gerichtet.

Schon bei Zähnen der ersten Dentition sind Erosionen relativ häufig und darüber hinaus mit freiliegendem Dentin verbunden. Wiegand et al. [2006] beschäftigte sich in einer Studie bei Zähnen der ersten Dentition deutscher Kindergartenkinder im Alter von zwei bis sieben Jahren mit dem Auftreten von Erosionen. Insgesamt wurden 463 Kinder in die Studie einbezogen. Als Bewertungsindex diente der Index von O'Sullivan. Ein interessanter Befund war, dass es einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der betroffenen Zähne und Dentinerosionen gab. So hatten 148 Kinder (32%) mindestens einen Zahn mit erosiven Läsionen. Davon wiesen 61 Kinder mindestens einen Zahn mit erosiven Defekten und Dentinbeteiligung auf (13,2%). Das Auftreten von Zahnhartsubstanzverlusten mit Dentinbeteiligung war jedoch vermehrt bei Kindern mit generalisierten Läsionen zu beobachten (78%).

Eine weitere Studie an kieferorthopädischen Modellen von 1000 Kindern und Jugendlichen konnte zeigen, dass im Milchgebiss schwergradige Defekte vorkommen. Das Durchschnittsalter lag bei 11,4 Jahren. Somit konnten, bezogen auf die erste Dentition, nur die Milcheckzähne und -molaren

miteinbezogen werden. In der zweiten Dentition wurden alle Zähne untersucht. An den Okklusalfächen wurden bei 11% der Milchmolaren sowie bei 9% der Milcheckzähne Grad II-Läsionen diagnostiziert. Nur 26,4% der Probanden wiesen keine Erosionen auf. Bei ebenfalls 26,4% war mindestens ein Zahn mit einer Grad II-Läsion betroffen. Im Gegensatz dazu wurden bei Jugendlichen säurebedingte Zahnhartsubstanzverluste im bleibenden Gebiss seltener beobachtet. 88,4% zeigten keine Anzeichen von erosiven Defekten. Lediglich bei 0,2% ließ sich an mindestens einem Zahn eine Grad II-Läsion diagnostizieren [Ganss et al., 2001a].

In einer britischen Studie wurden insgesamt 1035 14-Jährige bezüglich dem Auftreten von dentalen Erosionen untersucht. Bei 30% der Kinder erstreckten sich die säurebedingten Zahnhartsubstanzverluste bis in das Dentin [Milosevic et al., 1994].

In einer Querschnittsstudie konnte gezeigt werden, dass sich die Prävalenz von Erosionen in den Jahren von 1977-1989 bis 1990-1999 im Milchgebiss verdoppelte. In den 80er Jahren zeigten 7% der Milchmolaren und 5% der Milcheckzähne Grad II-Läsionen. Ein Jahrzehnt später wiesen 13% der Milchmolaren und 11% der Milcheckzähne Grad II-Läsionen auf. Schließlich stieg auch die Anzahl der Personen mit mindestens einem Zahn mit einer Grad I- oder II-Läsion signifikant an. Bei Zähnen der zweiten Dentition von Kindern und Jugendlichen kam es während der letzten zehn Jahre ebenfalls zu einem Anstieg der säurebedingten Zahnhartsubstanzverluste, wenn auch in geringerem Maße. In den Jahren 1980 bis 1990 verdoppelte sich die Anzahl an Grad I-Läsionen an den unteren ersten Molaren. Dementsprechend stieg auch die Anzahl derer, die mindestens einen Zahn mit einer Grad I-Läsion aufwiesen [Ganss et al., 2001a].

In einer britischen Studie wurden insgesamt 1753 Schulkinder im Alter von 12 Jahren untersucht von denen 1308 Kinder zwei Jahre später erneut evaluiert wurden. In diesem Zeitraum kam es zu einem Anstieg der Prävalenzzahlen. Dabei wiesen 56,3% der 12-Jährigen und 64,1% 14-Jährigen Erosionen auf [Dugmore und Rock, 2003]. Eine weitere Studie beschäftigte sich mit Veränderungen der Prävalenz von dentalen Erosionen bei jungen Menschen in Großbritannien. Dazu wurden die Daten aus insgesamt drei nationalen Querschnittsstudien herangezogen. Beim Vergleich der Daten zeigte sich auch

hier ein Anstieg der Prävalenzzahlen in den verschiedenen Altersgruppen [Nunn et al., 2003].

Auch bei Erwachsenen werden säurebedingte Zahnhartsubstanzverluste beobachtet. Aus der Schweiz stammt eine Studie, die sich mit der Prävalenz von Erosionen in einer Gruppe von insgesamt 417 Rekruten der Schweizer Armee im Alter von 19 bis 25 Jahren befasst. 14,4% wiesen an den bukkalen Flächen Erosionen auf, wobei bei 0,5% auch das Dentin betroffen war. Signifikant höher war das Auftreten von Erosionen im Bereich der Okklusalfächen mit ca. 80%. Hier war sogar bei etwa 30% das Dentin mitbetroffen [Jaeggi et al., 1999].

Eine andere Studie analysierte das Auftreten von Erosionen bei 391 zufällig ausgewählten Schweizer Erwachsenen aus zwei unterschiedlichen Altersgruppen. Untersucht wurden die Vestibulär-, Okklusal- und Lingualflächen aller Zähne, ausgenommen den dritten Molaren. An den Vestibulärflächen konnten in der Altersgruppe der 26 bis 30-Jährigen 7,7% Grad II-Läsionen beobachtet werden. In der Gruppe der 46 bis 50-Jährigen waren es 13,2%. Im Allgemeinen wiesen 16% aller Probanden mindestens einen Zahn mit Erosionen (Grad 1, 2, 3) an den Vestibulärflächen auf. Im Bereich der Okklusalfächen konnten in der jüngeren Altersgruppe bei 29,9% Grad II-Läsionen festgestellt werden. In der Gruppe der älteren Personen waren es 42,6% [Lussi et al., 1991].

Die Dritte Deutsche Mundgesundheitsstudie befasste sich mit der Prävalenz von erosiven Defekten bei 1260 Erwachsenen und 2520 Senioren in Deutschland. In insgesamt 90 Städten wurden Erwachsene im Alter von 35 bis 44 Jahren und Senioren im Alter von 65 bis 74 Jahren zufällig ausgewählt. In der Gruppe der Erwachsenen wiesen 4,3% Dentinerosionen auf. In der Gruppe der Senioren waren es 3,8%. Generell wurden bei Männern höhere Prävalenzzahlen für Erosionen festgestellt als für Frauen, wobei die Differenz mit dem Alter zugenommen hatte. Im Durchschnitt zeigten Personen beider Altersgruppen an mindestens 2 bis 3 Zähnen erosive Defekte. Bezogen auf die Gesamtheit aller Zähne wiesen 8,7% der Erwachsenen und sogar 16,4% der Senioren Erosionen auf [Schiffner et al., 2002].

Noch weniger ist über die Inzidenz von säurebedingten Zahnhartsubstanzen mit Dentinbeteiligung bekannt.

Eine Longitudinalstudie zeigte, dass bei Zähnen der zweiten Dentition von Kindern und Jugendlichen innerhalb von fünf Jahren die Anzahl von säurebedingten Zahnhartsubstanzverlusten um das vierfache zugenommen hatte. Im Durchschnittsalter von 10,2 Jahren zeigten 2,4% an den Molaren erosive Defekte Grad I. Fünf Jahre später wiesen 17,3% Grad I- und 0,6% Grad II-Läsionen auf. Personen mit säurebedingten Zahnhartsubstanzverlusten im Milchgebiss hatten ein signifikant höheres Risiko für Erosionen im bleibenden Gebiss, als Personen ohne erosive Defekte im Milchgebiss [Ganss et al., 2001a]. Eine britische Studie beschäftigte sich mit der Inzidenz von Erosionen in einem Zeitraum von zwei Jahren. 12,3% der Kinder, die im Alter von 12 Jahren erosionsfrei waren, wiesen nach zwei Jahren diesbezügliche Läsionen auf [Dugmore und Rock, 2003].

Bei Erwachsenen konnte ebenfalls eine Zunahme von erosiven Defekten beobachtet werden. In einer Studie wurden sechs Jahre nach der Erstuntersuchung erneut 55 Probanden im Hinblick auf Erosionen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass es in den vergangenen sechs Jahren zu einem deutlichen Anstieg von Erosionen an den Vestibulär- und Okklusalfächen gekommen war. Eine Zunahme an erosiven Läsionen wurde jedoch primär in der Gruppe der älteren Personen beobachtet. In der jüngeren Altersgruppe wiesen im Bereich der Okklusalfächen 1987 3% und sechs Jahre später 8% erosive Läsionen Grad II auf. Die Häufigkeit von Erosionen mit Dentinbeteiligung im Okklusalbereich stieg in der Gruppe der älteren Personen sogar von 8 auf 26% an. Eine Zunahme erosiver Defekte an den Vestibulärflächen konnte an allen Zähnen, jedoch vor allem im Bereich der Prämolaren und Molaren beobachtet werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es in diesem Beobachtungszeitraum zu einem signifikanten Anstieg von säurebedingten Zahnhartsubstanzverlusten gekommen ist. Alter und Ernährungsgewohnheiten standen dabei mit dem Auftreten von Erosionen in engem Zusammenhang [Lussi und Schaffner, 2000].

Es lässt sich folgern, dass erosive Defekte mit freiliegendem Dentin eine ernstzunehmende Zahnerkrankung darstellen. Befunde aus der Literatur

machen deutlich, wie wichtig die Betrachtung von Dentin als Gegenstand in der klinischen und experimentellen Laborforschung ist.

## **2.4 Klinisches und histologisches Erscheinungsbild von Erosionen**

Klinisch zeigen sich säurebedingte Zahnhartsubstanzverluste zunächst durch den Verlust der Perikymatien. Die Schmelzoberfläche kann dabei glatt und matt erscheinen.

Im Bereich der Okklusalfächen kommt es nach weiterem Fortschreiten der Erosion zu dellenförmigen Vertiefungen auf den Höckerspitzen und zu einem Abflachen der konkaven Strukturen. Die Ausdehnung des Defektes in die Tiefe ist dabei geringer als die Ausdehnung in die Breite. Nach und nach verarmt das Höcker-Fissuren-Relief und wird schließlich ganz eingeebnet. Weiterhin können zahnärztliche Restaurationen über das Niveau der umgebenden Zahnhartsubstanz herausragen. In besonders schwerwiegenden Fällen kann es zu einem vollständigen Verschwinden der typischen morphologischen Strukturen und zu einem deutlichen Verlust der Bisshöhe kommen.

Im Glattflächenbereich entstehen koronal der Schmelz-Zement-Grenze flächige Konkavitäten, wobei der zervikale Rand zumeist intakt bleibt [Eccles, 1979; Linkosalo und Markkanen, 1985]. Dieses Phänomen könnte durch Plaqueanlagerung entlang des Gingivalrandes oder einen neutralisierenden Effekt der Sulkusflüssigkeit begründet sein [Lussi und Jaeggi, 2008]. Mit zunehmendem Verlust des Schmelzmantels kann es zu einer vollständigen Freilegung des Dentins kommen. Temperaturempfindlichkeiten, aber auch Schmerzen bei süß und sauer können die Folge sein. Dennoch werden sowohl Betroffene als auch Zahnärzte oftmals erst durch Farbveränderungen oder beachtliche Substanzverluste mit ästhetischen Defiziten auf Erosionen aufmerksam, da diese in der Regel schmerzlos sind [Lussi et al., 1991].

Anhand der Lokalisation der Defekte können tendenziell Rückschlüsse bezüglich der Säureherkunft gezogen werden. Beispielsweise sind bei Patienten mit chronischem Erbrechen häufig die Palatinalflächen der oberen Front- und Eckzähne betroffen. Erosionen an den Labial- und Okklusalfächen hingegen werden häufiger bei Patienten mit speziellen Ernährungsformen oder

Umwelteinflüssen gefunden. Die Lokalisation der Defekte darf jedoch nicht isoliert betrachtet werden, da diese oft kombiniert auftreten.

Die Ausdehnung der Defekte kann folgendermaßen klassifiziert werden [Lussi, 1996]:

#### Index für Läsionen an Glattflächen

Grad 0: Keine Erosionen, Schmelz glänzend, Verlust der Oberflächenstruktur (Perikymatien) möglich

Grad 1: Größerer flächenhafter Verlust von Schmelz, intakte Schmelzleiste zervikal des Defektes, Eindellungen, Stufenbildung, Schmelz zeigt Seidenglanz, kein Dentinbefall

Grad 2: Dentin liegt auf weniger als der Hälfte der betroffenen Zahnoberfläche frei

Grad 3: Dentin liegt auf mehr als die Hälfte der betroffenen Zahnoberfläche frei

#### Index für orale und okklusale Läsionen

Grad 0: Keine Erosion, Schmelz glänzend, Verlust der Oberflächenstruktur (Perikymatien) möglich

Grad 1: leichte Erosionen, abgerundete Höcker, zahnärztliche Restaurationen höher als benachbarte Zahnhartsubstanz, kein Dentinbefall

Grad 2: ausgeprägte Erosionen, Dentinbefall

Wie bereits erwähnt, müssen Erosionen von anderen nicht-kariesbedingten Zahnhartsubstanzverlusten abgegrenzt werden. Da Zahnhartsubstanzverluste oftmals simultan auftreten, stellen sie häufig bei der zahnärztlichen Untersuchung eine Herausforderung dar. Keilförmige Defekte sind gewöhnlich direkt oder zervikal der Schmelz-Zement-Grenze lokalisiert. Sie weisen im Schmelz im koronalen Bereich meist eine scharfe rechtwinklige Begrenzung auf, wobei der zervikale Teil des Defektes auf der Zahnoberfläche flach ausläuft. Die Oberfläche erscheint dabei glatt und glänzend. Hier überragt die Tiefe des Defektes seine Breite.

Attritionen unterscheiden sich ebenfalls in Herkunft und Erscheinung von säurebedingten Zahnhartsubstanzverlusten. Klinisch erkennt man glatte, plane

und scharf begrenzte Flächen. Die Antagonisten der entsprechenden Zähne weisen die gleichen Merkmale auf und gleiten bei Lateralbewegungen genau auf diesen Flächen aneinander vorbei. Dagegen ist bei Abrasionen der Zahnhartsubstanzverlust durch Fremdkörperabrieb bzw. durch den Abrieb eines anderen Mediums bedingt. Die Zahnkronen können dadurch kürzer werden und Formveränderungen unterliegen.

Betrachtet man das histologische Erscheinungsbild von Erosionen, so kommt es im Schmelz nach einer Säureeinwirkung zuerst zu Auflösungserscheinungen im Bereich der Prismenzentren und -peripherien im Sinne eines klassischen Ätzmusters [Meurman und Frank, 1991]. Später tritt auch eine Demineralisation der interprismatischen Bereiche auf. Gleichzeitig ist ein deutlicher Verlust der Mikrohärtigkeit zu verzeichnen [Lussi et al., 1995; Maupome et al., 1998].

Im Schmelz ist die Zone der größten Demineralisation in der Peripherie lokalisiert, auch wenn Strukturveränderungen bis zu einer Tiefe von 100 µm nachgewiesen werden können [Zentner und Duschner, 1996]. Im Gegensatz dazu ist bei einer initialen Schmelzkaries die Zone der größten Demineralisation zentral unterhalb einer pseudo-intakten Oberfläche lokalisiert [Thylstrup und Fejerskov, 1994].

Im Dentin sind Erosionen kein reines Oberflächenphänomen. Es handelt sich hier aufgrund des hohen Anteils organischer Bestandteile um eine weit komplexere Pathohistologie als bei Schmelzerosionen. Zunächst kommt es nach einer Säureeinwirkung zu Demineralisationserscheinungen im Grenzbereich zwischen peri- und intertubulärem Dentin. Bei weiterer Säureexposition erfolgt eine Aushöhlung und Erweiterung der Dentintubuli, mit rauem und porösem intertubulärem Dentin, bis hin zu einer vollständigen Auflösung des peritubulären Dentins [Meurman et al., 1991; Noack, 1989].

Mit zunehmendem Mineralverlust kommt es zur Exposition der organischen Matrix. Diese organische Matrix besteht im Wesentlichen aus Kollagen Typ I und Typ IV. Aufgrund des hohen Anteils organischer Bestandteile wird die Diffusion der demineralisierenden Noxe in tiefere Areale der Zahnhartsubstanz sowie das Herauslösen von Mineral erschwert [Hara et al., 2005]. Es wird angenommen, dass aufgrund der Pufferkapazität dieser organischen Matrix die Progression der Demineralisation verlangsamt wird. Je dicker die

Kollagenschicht wird, desto geringer ist die Demineralisationsrate [Hara et al., 2005; Kleter et al., 1994]. Im Gegensatz dazu soll eine chemische oder mechanische Degradation dieser organischen Matrix eine weitere Demineralisation begünstigen [Ganss et al., 2004; Hara et al., 2005; Kleter et al., 1994; Lussi, 2006].

## **2.5 Therapie von Erosionen**

Generell kann bei der Therapie von säurebedingten Zahnhartsubstanzverlusten zwischen kausalen und symptomatischen Maßnahmen unterschieden werden. Bei der kausalen Therapie finden alle Maßnahmen Anwendung, die das Erosionspotential der Säureangriffe reduzieren. Werden symptomatische Therapiemaßnahmen ergriffen, so steht die Verringerung der Substanzverluste bei bestehenden Noxen im Vordergrund.

Anders als bei Karies, die ab einem bestimmten Stadium gewöhnlich einer invasiven Therapie bedarf, kann bei säurebedingten Zahnhartsubstanzverlusten soweit es nicht zu ästhetischen oder funktionellen Beeinträchtigungen gekommen ist, dem Patienten eine restaurativ-invasive Therapie erspart bleiben. Erst bei ausgeprägten ästhetischen oder funktionellen Beeinträchtigungen müssen entsprechende Therapiemaßnahmen herangezogen werden.

Der erste Schritt zur Therapie ist immer die Differenzialdiagnostik. Besonders wichtig ist hier die Abgrenzung zu anderen nicht-kariesbedingten Zahnhartsubstanzverlusten wie Abrasion, Attrition, Demastikation und keilförmige Defekte. Da klinisch oft Kombinationsformen vorkommen, kann es die Diagnostik zusätzlich erschweren. Oftmals müssen dann allein aus der Defektform Rückschlüsse auf die Ätiologie gezogen werden. Zusätzlich können ästhetische und funktionelle Beeinträchtigungen unterschiedlich wahrgenommen werden, was wiederum Einfluss auf die Therapieplanung und -entscheidung nehmen kann.

Ist ein pathologischer säurebedingter Zahnhartsubstanzverlust diagnostiziert worden, sollten zuerst kausale Maßnahmen ergriffen werden.

Ziel der kausalen Therapie ist, die Ursache bzw. die auslösende Noxe zu identifizieren und entsprechende Maßnahmen einzuleiten. Dabei ist eine sorgfältige Erhebung der Anamnese von großer Bedeutung. Das anamnestische Gespräch beinhaltet das Fragen nach Ernährungsgewohnheiten, aber auch nach prädisponierenden Faktoren wie Speichelfluss oder Kofaktoren wie Mundhygienegewohnheiten. Ein offenes Ernährungsprotokoll kann dabei zusätzlich Hinweise bezüglich Häufigkeit, Art und Menge von Säureeinwirkungen liefern. Das Ernährungsprotokoll sollte über einen Zeitraum von mindestens fünf aufeinanderfolgenden Tagen einschließlich eines Wochenendes geführt werden. Dabei wird die Aufnahme aller Speisen und Getränke, einschließlich Nahrungsergänzungsmittel wie Vitamin-Brausetabletten, mit der Verzehrart und Verzehrszeit dokumentiert [Lussi, 1996]. Dadurch können oftmals ein oder mehrere Säurequellen identifiziert und die erosive Noxe somit ausgeschaltet werden. Ist die Ursache seitens der Ernährung zu finden, können einfache Veränderungen hinsichtlich der Verzehrergewohnheiten dabei als hilfreich erscheinen. Saure Lebensmittel oder Getränke sollten nicht über einen längeren Zeitraum im Mund behalten und nicht in kleinen Portionen über den Tag verteilt verzehrt werden. Sie sollten vielmehr bewusst, dafür aber weniger häufig konsumiert werden. Beispielsweise lässt sich die Kontaktzeit zwischen den Zähnen und einem erosiven Getränk durch das Trinken mit einem Strohhalm minimieren [Edwards et al., 1998].

In verschiedenen in vitro als auch in situ Studien konnte gezeigt werden, dass das erosive Potential von Lebensmitteln durch den Zusatz von Kalzium deutlich reduziert werden kann [Hughes et al., 1999a; Hughes et al., 1999b]. Larsen und Nyvad [1999] konnten bei einem Orangensaft mit einer Kalziumkonzentration von 43 mmol/l selbst nach einer einwöchigen Expositionszeit keine erosiven Läsionen nachweisen. Dagegen erzeugte der gleiche Orangensaft ohne den Zusatz von Kalzium einen Substanzverlust von über 1 mm. Daraus leitet sich die Empfehlung ab, auf mit Kalzium angereicherte Getränke zurückzugreifen. Eine Kombination von Milch oder Milchprodukten mit potentiell erosiven Lebensmitteln scheint dagegen wirkungsvoll zu sein. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Wirkung von Milch und Käse eine erneute Härtung von demineralisiertem Schmelz festgestellt werden konnte.

Zurückgeführt wurde dieser Effekt auf die verstärkte Aufnahme von Kalzium und Phosphat aus den Milchprodukten in den Schmelz [Gedalia et al., 1991].

Kausale Maßnahmen können jedoch nicht immer angewandt werden. Ist die saure Noxe nicht zu identifizieren oder nicht zu umgehen, wie zum Beispiel im Falle von Essstörungen in Kombination mit Erbrechen, müssen symptomatische Maßnahmen herangezogen werden. Ein wichtiger Ansatz der symptomatischen Therapie ist hier der Einsatz von Fluoriden. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass sich mit dem Einsatz von Fluoriden eine positive Wirkung hinsichtlich einer Reduzierung von erosiven Demineralisationen sowie der Vermeidung eines zusätzlich mechanisch bedingten Zahnhartsubstanzverlustes erzielen lässt [Ganss et al., 2009a; Schlueter et al., 2009b; Schlueter et al., 2009a]. Dabei scheint die Art der Fluoridverbindung von entscheidender Bedeutung zu sein. Zinnfluorid erwies sich in einer Studie, in der verschiedene Fluoridverbindungen untersucht wurden, als besonders erosionsinhibierend [Ganss et al., 2008].

Ziel der symptomatischen Therapie mit Fluoriden ist die Bildung unlöslicher Auflagerungen auf den Zahnoberflächen um so den Zahn widerstandsfähiger zu machen. Die lokale Applikation von Fluoriden führt zu einer Präzipitation einer kalziumfluoridähnlichen Deckschicht auf der Zahnoberfläche, was zu geringeren Erosionen und dadurch auch zu einer Verminderung eines mechanisch bedingten Zahnhartsubstanzverlustes führt. Diese Auflagerungen dienen als Fluoridreservoir, dessen Verbleibdauer von Re- und Demineralisationsvorgängen abhängen kann [Petzold, 2001]. Unter neutralen Bedingungen können diese kalziumfluoridähnlichen Auflagerungen für Wochen bis Monate verbleiben [Ganss et al., 2001b; Nelson et al., 1983].

Bei einem pH-Wertabfall kommt es zunächst zu einer Auflösung dieser Deckschicht, bevor die darunterliegende Zahnhartsubstanz angegriffen wird. Es findet also keine Remineralisation im eigentlichen Sinne statt, wie es bei dem Einsatz von Fluoriden bei Karies der Fall ist.

Bei stark fortgeschrittenen dentalen Erosionen bleibt eine restaurative Versorgung allerdings unumgänglich. Jedoch ist auch hier zu beachten, dass jeder invasiven Therapie eine gründliche Abklärung der möglichen Ursachen der Erosionen vorausgehen muss.

Bei Durchsicht der Literatur lassen sich aus den unterschiedlichen Bereichen verschiedenen Messfragen ableiten. Aus dem Bereich der Ätiologie ergibt sich die Frage nach der Quantifizierung erosiver Mineralverluste im Allgemeinen. Die Epidemiologie leitet die Überlegung ab, Substanzverluste am Patienten zu messen und nachzuverfolgen, wie zum Beispiel im Sinne eines klinischen Monitorings. Hinsichtlich der Therapie ist es wichtig zu überlegen, wie sich Strukturen, wie z.B. die organische Matrix, darstellen und Mineralverluste oder -gewinne im Speziellen erfassen lassen.

In der Kariologie gibt es einen etablierten Methodenkanon, der zum Teil unreflektiert bei Fragen in der Erosionsforschung übertragen worden ist. Bislang sind diese Messmethoden jedoch nicht systematisch evaluiert worden. Dies ist jedoch besonders relevant für Dentin, dessen komplexe histologische Struktur spezielle Überlegungen zur Messmethodik erfordert.

## **2.6 Messmethoden zur Feststellung von Erosionen**

Als Basis für die Entwicklung jeglicher Therapiemaßnahmen dient in erster Linie eine aussagekräftige und zuverlässige Messmethode. Aufgrund zahlreicher Fragestellungen auf dem Gebiet der Erosionsforschung wurde bislang eine Vielzahl von Messmethoden entwickelt, um den Mineralgehalt von Zahnhartsubstanzen im Allgemeinen und den erosiv bedingten Mineralverlust im Speziellen bestimmen zu können [Grenby, 1996]. Dazu zählen chemische, optische und physikalische Analyseverfahren. Allerdings ist aufgrund der Vielzahl an vorliegenden Messmethoden ein Vergleich der Studien schwierig. Generell können die Analysemethoden in destruktive und nicht destruktive Verfahren eingeteilt werden. Zusätzlich lassen sich die Studien nach in vivo, in situ und in vitro Versuchen einteilen, wobei das häufigste Versuchsdesign der in vitro Versuch ist.

Ein wünschenswertes Messverfahren sollte für Schmelz als auch für Dentin geeignet sein, für in situ wie in vitro Versuche infrage kommen sowie nicht destruktiv und reproduzierbar sein. Zusätzlich sollte es quantitativ für einen Mineralverlust als auch für einen Mineralgewinn sein. Das Messverfahren sollte auch auf natürlichen Zahnoberflächen durchzuführen sein, da eine polierte

Oberfläche signifikanten Einfluss auf die Anfälligkeit der Zahnschmelzsubstanz auf einen erosiven Mineralverlust hat [Ganss et al., 2000; Meurman und Frank, 1991].

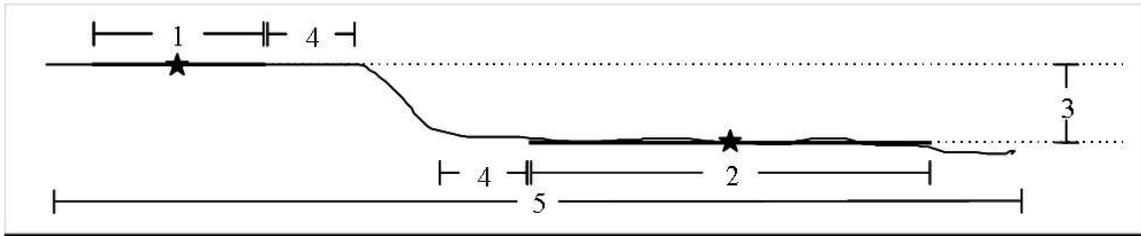
Aufgrund der Vor- und Nachteile dieser Methoden kann daher die Empfehlung eines bestimmten Verfahrens nicht gegeben werden. Die Problematik ergibt sich aus den unterschiedlichen Schwerpunkten der jeweiligen Messmethode. Dieses Kapitel soll nun einen Überblick über die zurzeit verwendeten Methoden liefern.

### Mikroradiographie

Das Prinzip der mikroradiographischen Analyseverfahren besteht in der Messung der Absorption von Röntgenstrahlen durch die Zahnhartsubstanz. Mit Hilfe eines Röntgenfilms kann so ein Mikroradiogramm erzeugt werden, welches im Anschluss densitometrisch ausgewertet wird. Der Mineralgehalt wird im Vergleich zu einer Aluminiumkalibriereinrichtung bestimmt. Je nach Versuchsanordnung werden ein oder mehrere Mikroradiogramme derselben Probe erzeugt. So lässt sich aus der Differenz der ersten und zweiten Aufnahme ein Mineralverlust oder -gewinn feststellen.

### Profilometrie

Die Profilometrie ist ein Prinzip nach dem elektronischen Tastschnittverfahren, das eine quantitative Oberflächenbeurteilung von erosiven Zahnhartsubstanzverlusten ermöglicht. Dazu repräsentieren Profilschriebe die Vertikalbewegungen eines optischen oder mechanischen Tasters beim Vorschub über Zahnoberflächen. Der Substanzverlust wird dabei als Differenz zwischen einer unbehandelten Referenz- und einer behandelten Versuchsfläche dargestellt (siehe Abb.1). Die Auswertung und Bearbeitung der Profildiagramme erfolgt im Anschluss anhand einer speziellen Software.



**Abb. 1:** Beispiel eines Profilschriebs und Auswertung (1: Messstrecke auf der Kontrollfläche, 2: Messstrecke auf der Testfläche, Stern: Mittelpunkte der beiden Messstrecken, 3: Stufenhöhe = Abstand zwischen den beiden Mittelpunkten der Messstrecken, 4: Abstand zum Übergang von Kontroll- zu Testfläche und den Messstrecken, 5: Gesamtlänge des Profilschriebs).

Profilometrische Messungen sind für *in vitro*, *in situ* Versuche sowie *in vivo* Studien geeignet. Sie sind nicht destruktiv und erlauben aufeinander folgende Untersuchungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten [Ganss, 2005]. Desweiteren sind sie auch auf natürlichen Zahnoberflächen anwendbar [Schlueter et al., 2005]. Zur Bestimmung von erosiv bedingten Mineralverlusten ist dieses Verfahren sogar als „Goldstandard“ bezeichnet worden [Hall et al., 1997]. Dagegen ist es mit dieser Methode nicht möglich, Aussagen über demineralisierte Bereiche unterhalb der Oberfläche bzw. innerhalb tubulärer Strukturen zu machen. In der Erosionsforschung wurde dieses Messverfahren bislang von vielen Autoren angewandt [Attin et al., 1998; Ganss et al., 2009a; Hara et al., 2005; West et al., 2001; Wetton et al., 2007; Wiegand et al., 2004].

### Chemische Testverfahren

Bei chemischen Testverfahren wird nicht die Zahnprobe selbst, sondern der Mineralgehalt in demineralisierenden Lösungen bestimmt. Die im erosiven Medium gelösten Kalzium- und Phosphationen geben Auskunft über einen Mineralverlust einer Probe. Der Gehalt an Kalzium kann mit der Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt werden [Willis, 1961]. Die Bestimmung von Phosphat kann kalorimetrisch über die Bildung von farbigen Komplexen mit Molybdat [Chen et al., 1956] oder mit Malachitgrün [Baykov et al., 1988] erfolgen. Dabei handelt es sich um ein sehr sensibles und quantitatives Verfahren. Hervorzuheben sei hier, dass diese Messmethodik nur auf geschlossene Systeme mit definierten Lösungen beschränkt ist und im Wesentlichen nur in *in vitro* Versuchen Anwendung findet.

## Mikrohärtemessungen

Erosiv bedingte Zahnhartsubstanzverluste wurden bislang auch mit Mikrohärtemessungen beurteilt [Attin et al., 1997; Büyükyilmaz et al., 1997; Gedalia et al., 1991; Lussi et al., 1993; Lussi et al., 1997; Maupome et al., 1999]. Dabei spiegeln die durch einen Mineralverlust oder -gewinn bedingten Veränderungen der Mikrohärte die physikalischen Veränderungen der Zahnoberfläche wieder. Bei diesem Messverfahren wird ein Prüfkörper nach Knoop oder Vickers auf der Probenoberfläche mit einer definierten Kraft für eine zuvor festgelegte Zeit positioniert. Als Prüfkörper wird in der Regel ein Diamant mit einer rhomboiden oder pyramidalen Form mit einer Länge von 30-40  $\mu\text{m}$  eingesetzt. Der durch den Diamanten erzeugte Eindruck wird anschließend mit einem Mikroskop vermessen und in  $\mu\text{m}$  ausgedrückt [Arends und ten Bosch, 1992]. Die Reduktion der Mikrohärte erreicht nach einer gewissen Demineralisationszeit ein Minimum, nimmt allerdings bei weiterem Säureeinfluss nicht ab, wenn auch der räumliche Mineralverlust weiter zunehmen kann [Stösser und Nekrashevych, 1998]. Da sich Dentin aufgrund seiner Zusammensetzung und der damit verbundenen physikalisch-chemischen Eigenschaften von Schmelz unterscheidet, ist dieses Verfahren für Dentin weniger geeignet. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass sich die Eindringtiefe bei demineralisiertem Schmelz im zeitlichen Verlauf nicht bzw. kaum verändert, da Schmelz einen im Vergleich zu Dentin hohen Mineralgehalt aufweist und im Prinzip kein Rückstellungsverhalten zeigt. Hingegen konnte bei erodiertem Dentin binnen 24 Stunden Veränderungen hinsichtlich der Eindringtiefe nachgewiesen werden [Herkstroter et al., 1989]. Somit sind Mikrohärtemessungen nur für initiale erosiv bedingte Mineralverluste im Schmelz geeignet. Allerdings ist die Quantifizierung des Gesamtmineralverlustes dabei nicht möglich. Da die Proben planparallel sein müssen, ist es ebenfalls nicht möglich, Untersuchungen an natürlichen Zahnoberflächen anzustellen. Die Methode ist für in vitro als auch in situ Versuche geeignet und nicht destruktiv.

### Digitale Bildanalyse (DBA)

Um quantitative Aussagen treffen zu können, wird bei der digitalen Bildanalyse in einer Zweiphasenanalyse mit einer Videokamera und einem Mikroskop ein Bild der zu untersuchenden Probe erzeugt [Mistry und Grenby, 1993]. Da dieses Verfahren lediglich eine Beurteilung der Oberflächengeometrie zulässt, lassen sich Änderungen des Mineralgehaltes unterhalb der Oberfläche oder innerhalb der tubulären Strukturen nicht erfassen. Diese non-destruktive Methode ist für in vitro und in situ Versuche geeignet.

### Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie wird seit längerem auch für Untersuchungen von Zahnhartgeweben erfolgreich angewandt. Das Verfahren dient der qualitativen Bestimmung morphologischer Veränderungen in Zahnhartgeweben nach De- oder Remineralisationsvorgängen [Zentner und Duschner, 1996]. Jedoch wurde diese Methode primär auf dem Gebiet der Kariologie eingesetzt [Banerjee und Boyde, 1998; de Carvalho et al., 2008]. Sie ist ein Verfahren der mikroskopischen Tomographie und erlaubt sehr genaue dreidimensionale Aufnahmen. Das Prinzip basiert auf einer Lichtlaserquelle, die die Probe abfährt und das aus der Fokusebene reflektierte Licht aufzeichnet. Das Streulicht wird dabei aus Bereichen außerhalb der Fokusebene eliminiert. Diese Methode ist non-destruktiv und macht eine vorhergehende Probenvorbereitung nicht zwingend erforderlich. Strukturveränderungen bis zu einer Tiefe von 150 bis 200  $\mu\text{m}$  können mit dieser Methode erfasst werden [Zentner und Duschner, 1996]. Die Methode ist sowohl für in vitro als auch in situ Versuche geeignet. Dennoch handelt es sich bei dieser Methode um ein qualitatives Verfahren, welches nur begrenzt Aussagen über den genauen Demineralisationsgrad zulässt. Daher wird dieses Verfahren meist mit anderen Verfahren kombiniert.

Es gibt bislang eine Vielzahl von Methoden, die zur Quantifizierung erosiver Mineralverluste verwendet worden sind, die jeweils spezifische Aussagen geben und je nach Fragestellung unterschiedliche Vor- und Nachteile haben.

Wenn sich auch inzwischen profilometrische Verfahren etabliert haben, hat sich bislang noch kein einheitliches Auswertverfahren durchgesetzt. Andere Messverfahren wiederum sind nur von einzelnen Arbeitsgruppen verwendet worden, wiewohl sie durchaus wichtige Aussagen erlauben. Diese Methodenvielfalt erschwert den Vergleich und die Bewertung von Messergebnissen. Zudem sind bislang nur wenige Verfahren validiert. Dieses Problem trifft vor allem für die Quantifizierung von Dentinerosionen zu.

Ziel der Untersuchung war es daher in einer Versuchsreihe vor und nach der enzymatischen Entfernung der organischen Matrix den erosiven Mineralverlust von Dentin mit Hilfe verschiedener Messmethoden zu ermitteln und miteinander zu vergleichen.

Aus den Ergebnissen soll eine Empfehlung zum Einsatz von geeigneten Messmethoden abgeleitet werden.

### 3. Material und Methode

Die vorliegende Arbeit war Teil einer größeren Studie zur Methodenevaluation von erosiven Mineralverlusten im Dentin vor und nach der enzymatischen Entfernung der organischen Matrix.

Für die Studie wurden Profilometrie, longitudinale Mikroradiographie und Kalziumanalyse ausgewertet und miteinander verglichen.

Die vorliegende Arbeit stellt den Teil Mikroradiographie im Vergleich zur Kalziumanalyse dar.

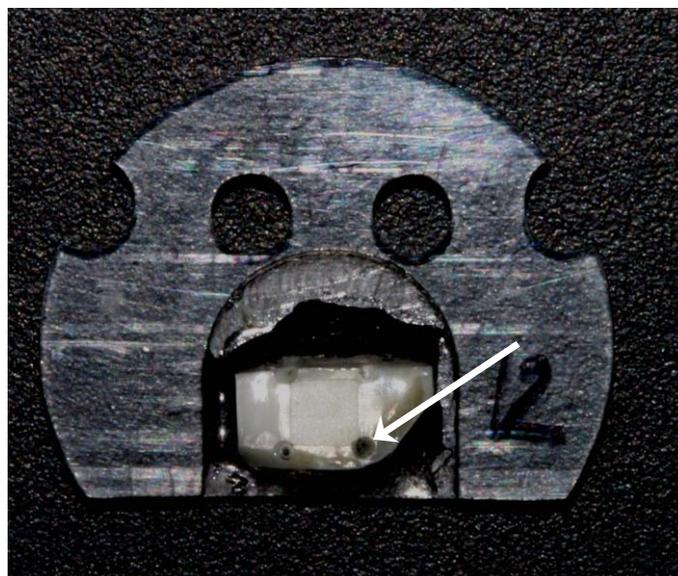
#### 3.1 Herstellung der Zahnschnitte

Für den Versuch wurden vormals voll impaktierte, kariesfreie menschliche dritte Molaren verwendet. Direkt nach der operativen Entfernung wurden die Zähne in gesättigter Thymollösung (Chem. 1) aufbewahrt, um ein Austrocknen zu verhindern und eine Desinfektion zu erreichen. Die Zähne wurden von ihren Wurzeln und Weichgewebsresten befreit und unter einem Stereomikroskop (Mat. 1) auf Unversehrtheit geprüft. Die Proben mussten aufgrund der Anwendung mehrerer Messverfahren den Anforderungen aller Verfahren entsprechen.

Von den verbliebenen Zahnkronen wurde zunächst der Schmelz von allen vier Glatflächen entfernt, so dass ein Würfel koronalen Dentins resultierte. Anschließend wurden planparallele Dentinschnitte mit einer definierten Schichtstärke von 800 µm angefertigt und diese mit Schleifpapier der Körnung P800 und P4000 (Mat. 5) einheitlich poliert. Die Probendicke wurde mit einer Mikrometerschraube (Mat. 2) überprüft und anschließend dokumentiert. Alle Trenn- und Schleifprozeduren wurden unter ausreichender Wasserkühlung durchgeführt (Mat. 3, 4, 5). Die fertigen Dentinschnitte wurden bis zur weiteren Verwendung in einer feuchten Kammer bei 100% Luftfeuchtigkeit im Kühlschrank aufbewahrt.

Zunächst wurden die Proben mit einem säurefesten, lichthärtenden Kunststoff (Mat. 6) in spezielle LMR-Probenhalter aus Plexiglas (Mat. 7) für die spätere

mikroradiographische Untersuchung eingeklebt. Diese LMR-Probenhalter gewährleisten eine exakte, immer wieder gleiche Positionierung der Proben während der mikroradiographischen Messungen. Das plangeschliffene und polierte Probenareal wurde mit einem 2 mm x 2 mm großen Klebeband bedeckt und die vier Ecken mit einem spitzzulaufenden Feinkorndiamanten (Mat. 8) im Schnelllaufwinkelstück (Mat. 9) unter Wasserkühlung mit kleinen Bohrlöchern markiert. Die Bohrlöcher dienen dabei als Markierungshilfe zum Einstellen des Tasters bei den profilometrischen Messungen. Da sie auch auf den Mikroradiogrammen zu identifizieren waren, ließ sich das Versuchsfeld immer eindeutig bestimmen. Im Anschluss wurde die gesamte Probe mit lichthärtendem Kunststoff (Mat. 6) überzogen. Nach dem Aushärten wurde das Klebeband entfernt und das daraus resultierende Versuchsfeld unter dem Stereomikroskop (Mat. 1) sorgfältig im Hinblick auf Defekte oder Verunreinigungen durch den Kunststoff kontrolliert. Zwischen den Arbeitsschritten wurden die Proben bei 100% Luftfeuchtigkeit aufbewahrt.



**Abb. 2:** Darstellung einer Dentinprobe im LMR-Probenhalter mit vier Bohrlöchern (←) zur Versuchsfeldmarkierung.

### 3.2 Herstellung der Lösungen

Zum Abmessen der einzelnen Chemikalien wurde eine Feinanalysewaage (Mat. 10) verwendet. Die pH-Werte der fertigen Lösungen wurden mit einer pH-Elektrode (Mat. 11) bei Zimmertemperatur bestimmt.

#### Demineralisationslösung

Die Herstellung der 0,05 M Zitronensäure (Chem. 2) erfolgte aus 10,51 g pulverisiertem Zitronensäuremonohydrat, gelöst in einem Liter destilliertem Wasser. Der pH-Wert der fertigen Lösung betrug 2,5.

#### Mineralsalzlösung

Die gesättigte Mineralsalzlösung wurde nach Vorgabe der Rezeptur von Gerrard und Winter [Gerrard und Winter, 1986] hergestellt und setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

- $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Chem.3): 0,4 g in 80 ml destilliertem Wasser
- KCl (Chem.4): 1,5 g in 200 ml destilliertem Wasser
- $\text{NaHCO}_3$  (Chem.5): 1,0 g in 200 ml destilliertem Wasser
- $\text{CaCl}_2$  (Chem.6): 0,22 g in 200 ml destilliertem Wasser

Die jeweiligen Chemikalien wurden zunächst getrennt in der angegebenen Menge destillierten Wassers gelöst, bevor sie im Anschluss vermischt und mit weiteren 600 ml destilliertem Wasser zur fertigen Mineralsalzlösung ergänzt wurden. Der pH-Wert der fertigen Lösung betrug 6,7.

#### Kollagenaselösung

Zur Herstellung der Kollagenaselösung wurden 15.000 Units Kollagenase (Chem. 3) in 150 ml der Mineralsalzlösung gelöst, was einer Enzymkonzentration von 100 Units/ml entspricht.

Im Anschluss an die Herstellung wurden die Lösungen in 10 ml-Einheiten direkt in luftdicht verschließbare Reaktionsgefäße (Mat. 12) gefüllt, mit einer Nummer versehen und im Kühlschrank bzw. im Gefrierschrank bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.3 Messmethoden

#### 3.3.1 Kalziumanalyse

Die Menge an gelöstem Kalzium (mmol/l) in der Erosionslösung wurde mit der Atomabsorptionsspektrometrie (Instrumentation Laboratory AA/AE Spectrophotometer IL 157) bestimmt.

Um eventuelle Interferenzen mit Phosphat zu unterdrücken wurden die Messungen in Anwesenheit von Lanthan (0,01%) durchgeführt. Wiederholte Messungen ergaben eine Standardabweichung von 2%.

Aus der gemessenen Kalziumkonzentration wurde zunächst der Mineralverlust in  $\mu\text{g}$  bestimmt. Dabei wurde angenommen, dass der Mineralanteil im Dentin aus Hydroxylapatit (HA) nach der stöchiometrischen Formel  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  besteht.

$$\text{Mineralverlust } (\mu\text{g}) = \frac{\text{Ca-Konz.}(\text{mmol/l}) \times \text{Probenmenge} \times \text{Atomgewicht von Ca}}{\text{Anteil von Ca in HA}}$$

Die Probenmenge betrug 10 ml. Das Molgewicht von Kalzium beträgt 40,08 g und der Anteil von Kalzium in HA 0,399 w/w oder 39,9 Trockengewichtsprozent [Nikiforuk, 1985].

Aus diesen Werten wurde der Substanzverlust in  $\mu\text{m}$  berechnet:

$$\text{Substanzverlust } (\mu\text{m}) = \frac{\text{Mineralverlust } (\mu\text{g})}{\text{Dichte von Dentin } (\text{g/cm}^3) \times \text{Versuchsfeld } (\text{mm}^2)}$$

bei einer Dichte von Dentin von  $2,35 \text{ g/cm}^3$  [Nikiforuk, 1985]. Die Größe des Versuchsfeldes ( $\text{mm}^2$ ) wurde für jede Probe mit einem Messmikroskop bestimmt (Mat. 13).

Die Messungen wurden in der Zahnklinik der Universität Bern, Abteilung für Zahnerhaltungskunde, Präventive Zahnheilkunde und Kinderzahnheilkunde

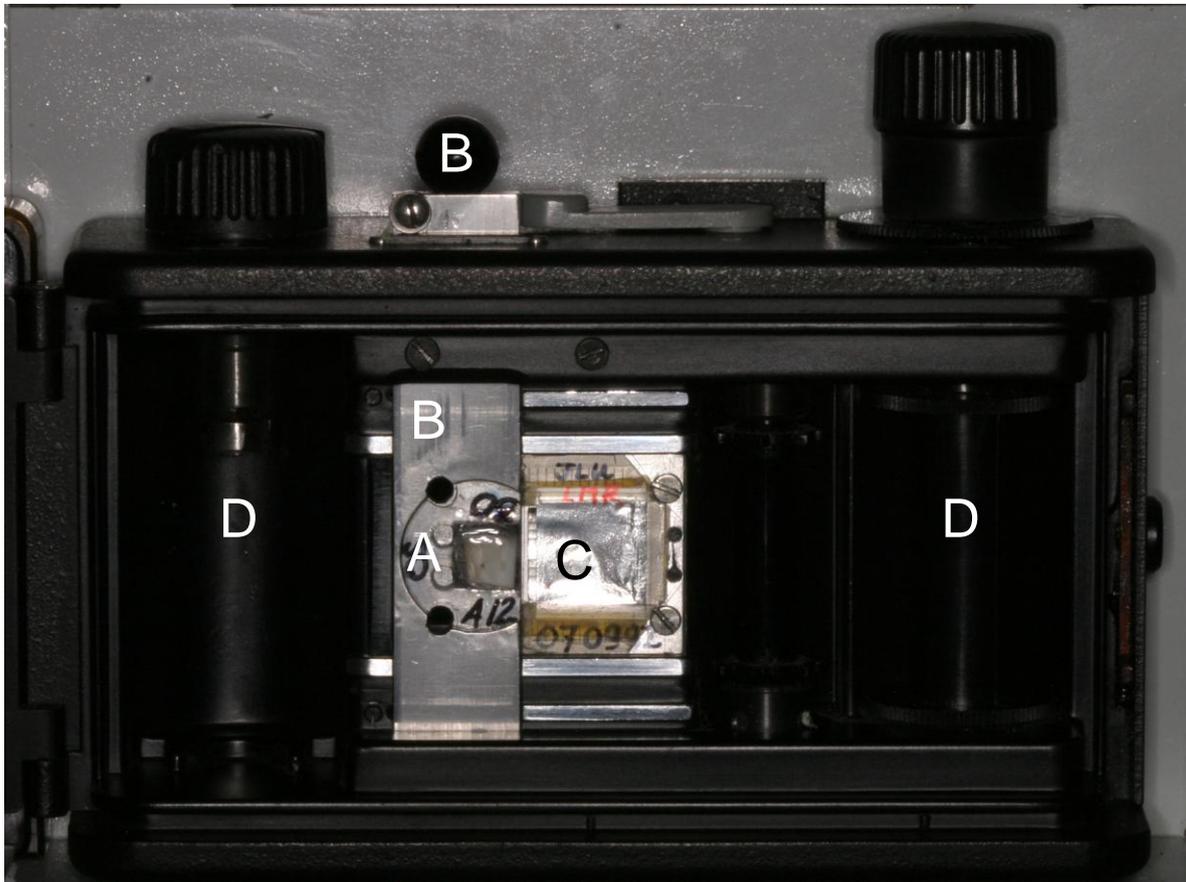
durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. A. Lussi und Frau B. Megert für Ihre Unterstützung herzlich danken.

### 3.3.2 Longitudinale Mikroradiographie (LMR)

Die longitudinale Mikroradiographie wurde als Standardverfahren durchgeführt [de Josselin de Jong et al., 1988]. Die Mikroradiographie ist eine nicht destruktive Methode zur Bestimmung des Mineralgehaltes von Schmelz und Dentin. Dadurch können Veränderungen des Mineralgehaltes während eines De- und Remineralisationsprozesses im Verlauf dargestellt und quantitativ erfasst werden. Veränderungen im Mineralgehalt ergeben sich als Differenz aus zwei oder mehr aufeinanderfolgenden mikroradiographischen Aufnahmen derselben Probe.

Die Apparatur besteht aus einem Röntgengenerator (Mat. 14), einer Röntgenröhre und einem linsenlosen Kameragehäuse (Abb.2). In diesem Kameragehäuse befindet sich neben einem Aluminiumschlitten zur Aufnahme der Probenhalterung eine Aluminium-Kalibriereinrichtung (100 Stufen mit Intervallen von  $0,025 \text{ kg} \times \text{m}^{-2}$ ), welche genau auf Filmhöhe installiert ist. Die Kalibriereinrichtung besteht aus zwei hintereinander liegenden und senkrecht zueinander angeordneten Aluminiumtreppen. Dabei besteht jede Aluminiumtreppe aus 10 Stufen, die jeweils eine Breite von 1 mm aufweisen. Die Stufen beider Aluminiumtreppen nehmen von der einen zur anderen Seite an Dicke zu. Steigt bei der einen Treppe die Stufe um je  $10 \text{ } \mu\text{m}$  an, so erhöht sich die Stufendicke bei der anderen Treppe um je  $100 \text{ } \mu\text{m}$ . Durch die Kombination der beiden Treppen ergeben sich insgesamt 100 Stufen mit unterschiedlichen Schichtstärken von 110 bis  $1100 \text{ } \mu\text{m}$  und somit auch unterschiedlicher mittlerer Masse pro Flächeneinheit. Auf diese Weise erhält man 100 verschiedene Röntgenabsorptionswerte. Die Aluminium-Kalibriereinrichtung wird bei Röntgenaufnahmen mit auf den Film projiziert und dient der Kalibrierung des Mikrocomputers bei der nachfolgenden densitometrischen Auswertung der Filme. Der Probenhalter wird mit einem Aluminiumschlitten ohne Lichteinfall in das Innere der Kamera geschoben und dabei immer in der gleichen Position zur Aluminium-Kalibriereinrichtung fixiert.

Abhängig vom Probenmaterial wird mit verschiedener Energie und Belichtungszeit ein Spezialfilm (Mat. 15) belichtet und somit ein Mikroradiogramm erstellt. Die Cu-K $\alpha$ -Strahlung wird in einer vertikal angeordneten Röntgenröhre mit einer Kupferanode und Nickelfilter erzeugt.



**Abb. 3:** Kameragehäuse des Mikroradiographen: (A) eingebrachter LMR-Probenhalter mit Dentinprobe; (B) Aluminiumschlitten als Probenhalterung; (C) Aluminium-Kalibriereinrichtung; (D) Filmspulen.

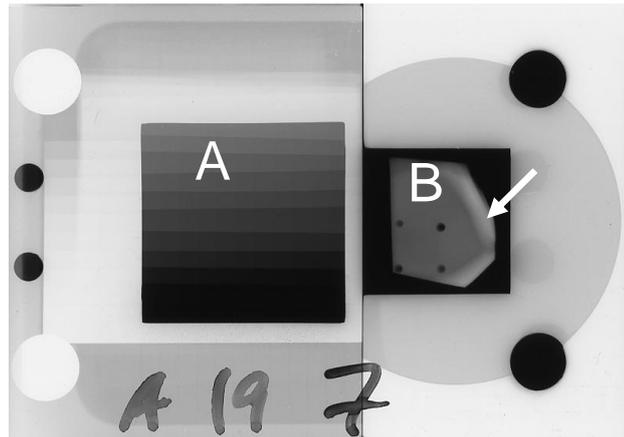
### Herstellung der Mikroradiogramme

Von den in die LMR-Probenhalter (Mat. 7) fixierten Dentinproben wurden vor Versuchsbeginn, nach der erosiven Demineralisation und nach der Enzymbehandlung Röntgenaufnahmen angefertigt. Die Dentinproben wurden in den Aluminiumschlitten eingelegt und bis zum Anschlag in das Kameragehäuse zurückgeschoben. Der Aluminiumschlitten garantierte, dass die Dentinprobe immer in gleicher Position zum Film und zur Aluminium-Kalibriereinrichtung hin ausgerichtet war.

Die mikroradiographische Untersuchung der Dentinproben erfolgte mit einer Röhrenspannung von 20 kV und einer Stromstärke von 50 mA. Die Belichtungszeit pro Probe betrug 2,5 Minuten. Nach Angaben von Josselin de Jong et al. [1987] führt diese Belichtungszeit bei Schmelzproben mit einer Schichtdicke von 400 µm zu einer optimalen optischen Diskriminierung. Da in dieser Studie Dentinschnitte verwendet wurden, und diese Angaben für Dentin mit einem geringeren Mineralgehalt als Schmelz nicht zutreffen, wurden Dentinproben mit einer Schichtdicke von 800 µm verwendet. Vor jedem Einsetzen des Probenhalters in das Kameragehäuse wurden die Proben mit einem Luftpüster vorsichtig getrocknet um Qualitätsverluste aufgrund verbliebener Flüssigkeitsreste zu vermeiden.

### **Filmentwicklung**

Die Filmentwicklung erfolgte nach Herstellerangaben unter standardisierten Bedingungen. Dazu wurde der belichtete Film bei absoluter Dunkelheit in eine Entwicklungsspule eingelegt und bei Raumtemperatur für 6 Minuten entwickelt (Chem. 4). Anschließend wurde der Film 2 Minuten lang unter fließendem Leitungswasser gespült, für 5 Minuten fixiert (Chem. 5) und nach erneuter Wässerung für 5 Minuten in Ethylalkohol (Chem. 6) geschwenkt. Im Anschluss wurde der Film für 20 Minuten erneut unter fließendem Wasser abgespült und mit einem Netzmittel (Chem. 7) behandelt. Vor der endgültigen Auswertung wurden die Filme für 60 Minuten in einem Trockenschrank hängend getrocknet. Abschließend wurden sie auf Vollständigkeit geprüft und entsprechend der Protokolle beschriftet.



**Abb. 4:** Typisches Mikroradiogramm: (A) Aluminium-Kalibriereinrichtung, (B) Dentinprobe mit den 4 Bohrlöchern (←) zur Identifikation des Versuchfeldes.

## Auswertung

Mit Hilfe des Inspektor Mikroradiographiesystems (Mat. 16) erfolgte die Auswertung der Mikroradiogramme. Das System besteht aus einem Mikrocomputer, der mit einem Stereomikroskop verbunden ist. Die dazugehörige Software führt den Anwender über mehrere Schritte bis zur vollständigen Auswertung des Mikroradiogramms.

Vor Beginn der Versuchsreihe wurde innerhalb jedes Mikroradiogramms ein 1 mm x 1 mm großes Messfeld mit Hilfe des beweglichen x-y-Tisches des Densitometers festgelegt, welches bei den darauf folgenden Messungen automatisch wieder aufgefunden werden konnte.

Das auszuwertende Feld wurde automatisch von einem Scanner abgetastet. Anschließend wurde die Aluminium-Kalibriereinrichtung angefahren, um die optische Filmtransmission zu kalibrieren.

Der Mineralgehalt der Probe wird nach der Formel von Ericsson [Ericsson, 1965] bestimmt:

$$m(x, y) = \frac{A_{n, \text{slice}}(x, y)}{(\mu/\rho)_m} = \frac{(\mu/\rho)_{Al} \times m_{Al, \text{slice}}(x, y)}{(\mu/\rho)_m}$$

$m(x, y)$	=	absoluter Mineralgehalt am Scanpunkt $x, y$ auf der Probe
$A_{n, \text{slice}}$	=	Röntgenabsorption der Probe auf der $x, y$ - Position
$(\mu/\rho)_m$	=	Massenschwächungskoeffizient von Hydroxylapatit
$(\mu/\rho)_{Al}$	=	Massenschwächungskoeffizient von Aluminium
$m_{Al, \text{slice}}(x, y)$	=	Masse von Aluminium bestimmt aus der optischen Filmtransmission am Scanpunkt $x, y$ der Probe

Es wird davon ausgegangen, dass der Mineralanteil in Zahnhartsubstanzen aus Hydroxylapatit nach der stöchiometrischen Formel  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  besteht und dass die Röntgenstrahlung monochromatisch ( $\lambda = 0,154 \text{ nm}$ ) ist. Der Massenschwächungskoeffizient von Hydroxylapatit beträgt  $(\mu/\rho)_m = 8,32 \text{ kg} \times \text{m}^{-2}$  und von Aluminium  $(\mu/\rho)_{Al} = 4,86 \text{ kg} \times \text{m}^{-2}$  [de Josselin de Jong et al., 1988].

Der Mineralverlust ist dabei immer auf reines Hydroxylapatit bezogen, sodass ein Umrechnungsfaktor für den tatsächlichen Mineralverlust nötig war. Dieser Faktor errechnet sich anhand von Probendicke und der dazugehörigen Baseline-Aufnahme wie folgt:

$$\text{Umrechnungsfaktor} = \text{Probendicke } [\mu\text{m}] / \text{Baseline } [\mu\text{m}]$$

Die nachfolgenden, vom Computer ermittelten Werte für einen Mineralverlust oder -gewinn einer Probe wurden anschließend mit dem jeweiligen Faktor multipliziert.

### 3.3.3 Testmessungen zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurden mehrere Wiederholungsmessungen durchgeführt.

Zunächst wurde eine Dentinprobe auf mehrere Filme projiziert ( $n=15$ ) und ausgewertet. Es ergab sich eine Standardabweichung von  $11,4 \mu\text{m}$ .

Außerdem wurde eine Probe mehrfach auf einen Film projiziert. Aus 10 Messungen ergab sich eine Standardabweichung von  $3,2 \mu\text{m}$ .

Weiterhin wurde ein Mikroradiogramm mehrfach ausgewertet (n=10) um eventuelle Ungenauigkeiten der computergestützten Berechnung des Mineralgehaltes festzustellen. Es ergab sich eine Standardabweichung von 0,3  $\mu\text{m}$ .

### **3.4 Versuchsdurchführung**

Um den Ausgangsmineralgehalt der jeweiligen Probe für die longitudinale Mikroradiographie zu ermitteln, wurde vor Versuchsbeginn von jeder Probe eine Baseline-Aufnahme angefertigt. Die fertigen Dentinproben wurden randomisiert auf 4 Versuchsgruppen mit je 25 Proben aufgeteilt.

Die Demineralisation mit Zitronensäure (Chem. 2) erfolgte je nach Gruppe für 30, 60, 90 oder 120 Minuten in Einzelgefäßen (Mat. 12) im Schwenkbad (Mat. 17) bei 37°C. Nach erfolgter Demineralisation wurden die Proben für eine Minute mit destilliertem Wasser gespült.

Anschließend folgte die mikroradiographische Untersuchung. Nach Abschluss der Messungen wurden die Proben der jeweiligen Versuchsgruppen für 96 Stunden mit einer Kollagenaselösung (Chem.3) behandelt um die durch die Demineralisation freigelegten organischen Strukturen zu entfernen. Alle Behandlungen wurden im Schwenkbad bei 37°C ausgeführt. Nach der 96-stündigen Inkubation wurden die Proben erneut für 1 Minute mit destilliertem Wasser gespült und anschließend mikroradiographisch vermessen. Alle verwendeten Lösungen wurden für die Kalziumanalyse sorgfältig im Kühlschrank bzw. Gefrierschrank aufbewahrt.

Außerdem wurden Proben für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen vorbereitet.

### **3.5 Rasterelektronenmikroskopie**

Für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung wurden 5 zufällig ausgewählte Proben nach Entfernung der organischen Matrix verwendet. 5 weitere zufällig ausgewählte Proben stammen aus den Gruppen, die nur

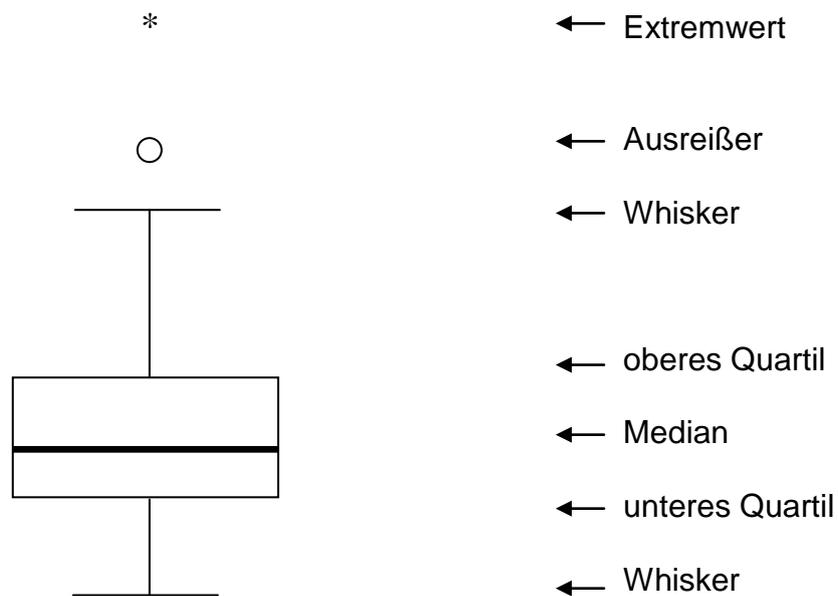
erodiert jedoch nicht mit Enzym behandelt wurden. Die Proben wurden in der Mitte gebrochen und über die Alkoholreihe kritisch punktgetrocknet (Mat. 18). Anschließend wurden sie mit einer Gold-Paladium-Schicht bedampft. Betrachtet wurden die Proben mit einem Rasterelektronenmikroskop (Mat. 19), welches mit einer LaB<sub>6</sub>- Kathode ausgestattet ist. Die Beschleunigungsspannung betrug 10 kV. Die Bilder wurden mit Hilfe eines Sekundärelektronendetektors (SE-Detektors) aufgenommen. Zur Verbesserung des Signals und des topographischen Kontrastes wurde das Detektorgitter mit einer Spannung von +300 V betrieben. Die Einstellungen des REM, einschließlich Neigungswinkel, Punktgröße und Scan-Modus waren konstant. Die REM-Aufnahmen wurden mit einer 500fachen Vergrößerung angefertigt.

### 3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Statistical Package for Social Science (SPSS) Version 17.0 (SPSS GmbH, München, Deutschland) für Windows. Der Shapiro-Wilk-Test ergab keine signifikante Abweichung von der Gauss Verteilung. Der Vergleich zwischen den einzelnen Erosionsgruppen innerhalb einer Methode wurde mit der einfachen Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Da eine signifikante Abweichung von der Varianzhomogenität nachgewiesen werden konnte (Levene-Test), wurde der Anschlussstest nach Tamhane gewählt. Die Methoden wurden anhand von Bland-Altman-Plots miteinander verglichen, wobei die x-Achse den Mittelwert beider Methoden repräsentiert und die y-Achse die absolute Differenz beider Methoden wiedergibt [Bland und Altman, 2003]. Ein relativer Bias ist angezeigt, wenn die Differenz der Mittelwerte ( $\delta$ ) mit dem t-Test signifikant von 0 abweicht. Ein proportionaler Bias ist angezeigt, wenn die Regressionslinie eine Steigung hat, die ebenfalls signifikant von 0 abweicht [Ludbrook, 2002]. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

Zur graphischen Darstellung der Daten wurden Box-and-Whisker-Plots (Abb.6) sowie Bland-and-Altman-Plots (Abb.7) verwendet.

Der Kasten (Box) der Box-and-Whisker-Plots entspricht dabei dem Bereich, indem die mittleren 50% der Daten liegen. Die untere und obere Begrenzung des Kastens (Box) stellen das untere bzw. obere Quartil (25. bzw. 75. Perzentil) dar. Der breite Balken innerhalb des Kastens stellt dabei den Median dar und teilt das Diagramm in zwei Hälften, in denen jeweils 50% der Daten liegen. Die Minimal- bzw. Maximalwerte werden durch senkrechte Linien, auch Whisker genannt, markiert. Als Ausreißer werden die Werte bezeichnet, die mehr als 1,5 Kastenlängen außerhalb der Kastengrenzen liegen. Gekennzeichnet werden diese durch einen Kreis. Werte, die mehr als den dreifachen Kastenlängenabstand besitzen werden als Extremwerte bezeichnet und mit einem Stern kenntlich gemacht.

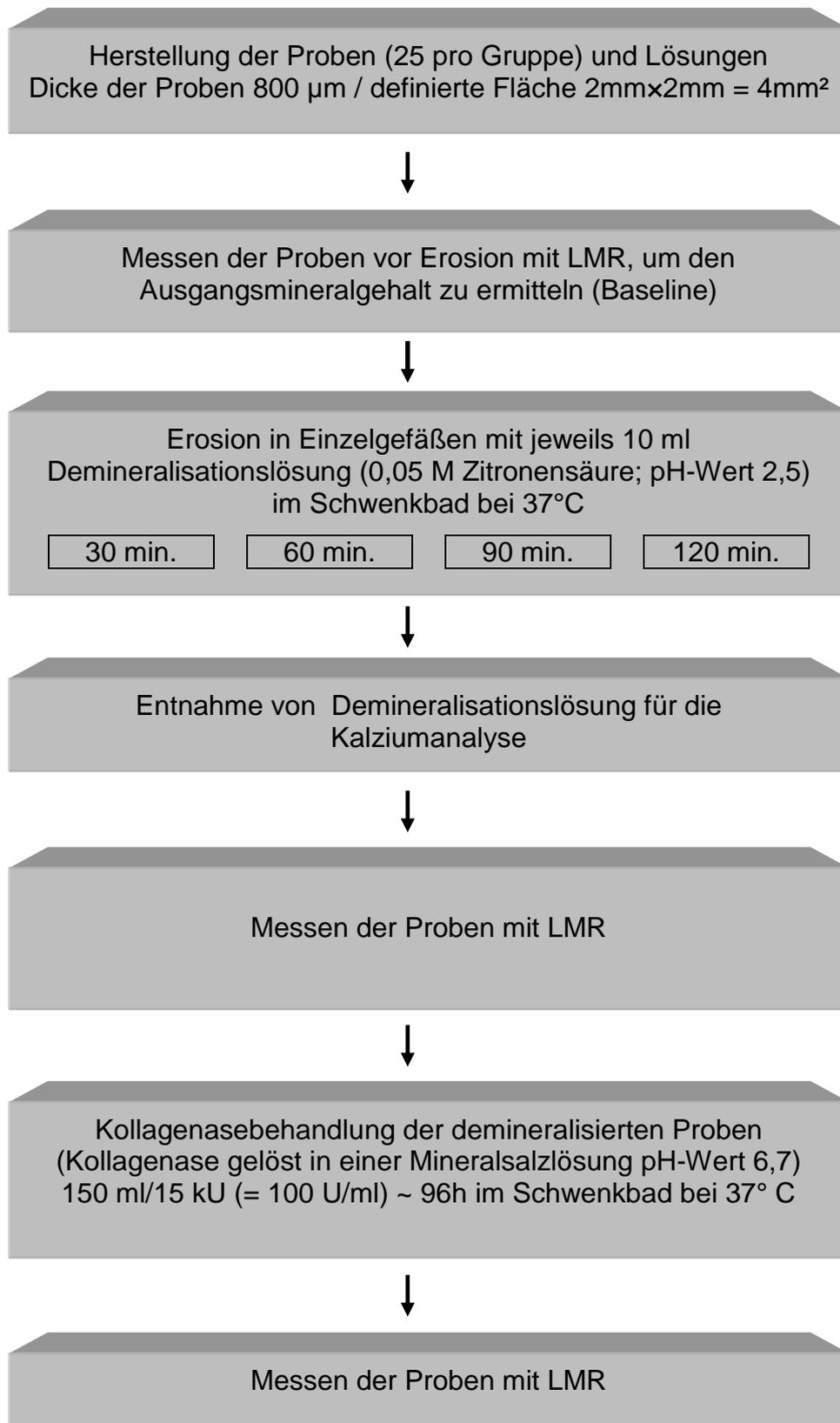


**Abb. 5:** Schema eines Box-and-Whisker-Plots mit Median, 1. und 3. Quartil, Minima, Maxima sowie Ausreißer und Extremwert.

Folgende Abkürzungen werden verwendet:

x	=	arithmetischer Mittelwert
SD	=	Standardabweichung
n	=	Anzahl
MIN	=	Minimalwert
MAX	=	Maximalwert
p	=	Irrtumswahrscheinlichkeit
n.s.	=	nicht signifikant
*	=	$p \leq 0,05$ ; signifikant
**	=	$p \leq 0,01$ ; hoch signifikant
***	=	$p \leq 0,001$ ; höchst signifikant

### 3.7 Schematische Übersicht des Versuchsablaufs



### 3.8 Materialien- und Chemikalienliste

#### 3.8.1 Materialien

- Mat. 1: Stereomikroskop SMZ-1, Nikon, Düsseldorf, Deutschland
- Mat. 2: Mikrometerschraube, Mitutoyo, Tokio, Japan
- Mat. 3: Exact Trennschleifsystem  
Exact Apparatebau, Otto Hermann, Norderstedt, Deutschland
- Mat. 4: Exact Mikroschleifsystem, Exact Apparatebau, Otto Hermann,  
Norderstedt, Deutschland
- Mat. 5: P800 und P4000 Silizium-Karbid-Schleifpapier, Leco, St. Joseph,  
USA
- Mat. 6: Fixationskleber Technovit 7230 VLC,  
Kulzer-Exact, Wehrheim, Deutschland
- Mat. 7: LMR-Plexiglashalter, Inspektor Research Systems BV,  
Amsterdam, Niederlande
- Mat. 8: Feinkorndiamant  
ISO 806 314 540534 009, Komet, Lemgo, Deutschland
- Mat. 9: Schnelllaufwinkelstück  
24 LN Intra Matik Lux 2, KaVo, Biberach, Deutschland
- Mat. 10: Waage DL-2, Denver Instrument, USA
- Mat. 11: pH-Meter 761 Calimatic, Knick, Berlin, Deutschland
- Mat. 12: Szintillationsgefäß 20 ml, Maßanalytische Glas- und Laborgeräte  
Vertriebsgesellschaft, Rabenau, Deutschland
- Mat. 13: Messmikroskop, Leica M 420, Leitz, Wetzlar, Deutschland mit  
Messeinrichtung Mitutoyo, Tokyo, Japan
- Mat. 14: Mikroradiograf, Röntgengenerator PW 1830/40 DY 1054  
Philipps, Kassel, Deutschland
- Mat. 15: Fuji positive, Sonderanfertigung, Rolle 58 bezogen über  
Inspektor Research Systems BV, Amsterdam, Niederlande
- Mat. 16: Inspektor Mikroradiographie System  
Inspektor Research Systems BV, Amsterdam, Niederlande
- Mat. 17: Schwenkbad 3306, GFL, Burgwedel, Deutschland

- Mat. 18: Kritisch Punkt Trockner CPD 030, Bal-tec, Witten, Deutschland
- Mat. 19: REM / Type: XL20, Philips Electron Optics, Eindhoven, Niederlande

### 3.8.2 Chemikalien

- Chem. 1: Thymol Pulver, Art.-Nr. 89330  
Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- Chem. 2: Zitronensäure-Monohydrat, Art.-Nr.2021,  
Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland
- Chem. 3: Kollagenase *Clostridium histolyticum* type VII, Art.- Nr.: C-0733  
Sigma Aldrich Chemie GmbH, St Louis, MO, USA
- Chem. 4: Entwickler Kodak D-19  
Kodak AG, Stuttgart, Deutschland
- Chem. 5: Express Fixierbad Superfix Plus Art.-Nr. 102762  
Tetenal Ag & Co. KG Norderstedt, Deutschland
- Chem. 6: Ethylalkohol 70%  
Merck, Darmstadt, Deutschland
- Chem. 7: Agepon, Netzmittel für Fotomaterial  
Agfa-Gevaert AG, Leverkusen, Deutschland

## 4. Ergebnisse

Es konnten alle 100 Proben ausgewertet werden. Bei allen Proben zeigte sich makroskopisch entsprechend der Vorbehandlung auf der Referenzfläche eine hochglänzende Oberfläche. Auf der Versuchsfläche stellte sich nach der erosiven Demineralisation und vor der Kollagenasebehandlung das typisch kreidig matte Erscheinungsbild dar, während sich bei vorsichtiger Kompression die Oberfläche leicht eindrücken ließ. Die Versuchsfläche war eindeutig von der Referenzfläche zu unterscheiden. Nach der Kollagenasebehandlung zeigte sich eine deutliche Stufe zwischen der Referenz- und Versuchsfläche.

Eine Übersicht der Werte für den Mineralverlust findet sich in der folgenden Tab. 1:

**Tab. 1:** Mineralverlust (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung;  $\mu\text{m}$ ) im Dentin gemessen mit der longitudinalen Mikroradiographie (LMR) und der Kalziumanalyse (Ca); gleiche Buchstaben bedeuten, dass die Unterschiede nicht signifikant sind. Kleine Buchstaben beziehen sich auf die Spalten; große Buchstaben beziehen sich auf die Reihen.

Erosionsdauer (min)	LMR	LMR	Ca-Analyse
	vor Kollagenasebehandlung	nach Kollagenasebehandlung	
30	29,8 $\pm$ 17,5 <sup>a,b</sup> <sub>A</sub>	27,8 $\pm$ 14,2 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	15,9 $\pm$ 4,6 <sup>a</sup> <sub>B</sub>
60	27,0 $\pm$ 12,4 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	31,0 $\pm$ 20,6 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	30,3 $\pm$ 10,8 <sup>b</sup> <sub>A</sub>
90	26,8 $\pm$ 14,0 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	36,7 $\pm$ 15,2 <sup>a</sup> <sub>B</sub>	49,3 $\pm$ 13,7 <sup>c</sup> <sub>C</sub>
120	38,4 $\pm$ 13,3 <sup>b</sup> <sub>A</sub>	36,5 $\pm$ 12,2 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	55,4 $\pm$ 11,5 <sup>c</sup> <sub>B</sub>

Bei der Kalziumanalyse zeigte sich ein nahezu linearer Anstieg des Mineralverlustes von 30 bis 90 Minuten ( $p \leq 0,001$ ), jedoch nicht mehr zwischen 90 und 120 Minuten (n.s.). Bei den letzten beiden Messzeitpunkten wurde vielmehr eine Art Plateau erreicht.

Im Gegensatz dazu konnte bei den Messungen mit der longitudinalen Mikroradiographie (LMR) keine Zunahme des Mineralverlustes für die verschiedenen Messzeitpunkte nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigten sich sowohl vor als auch nach der Entfernung der organischen Matrix. Bei den mikroradiographischen Messungen ergaben sich außerdem hohe Standardabweichungen.

Mit Ausnahme des Messzeitpunktes 90 Minuten zeigten sich zwischen der longitudinalen Mikroradiographie (LMR) vor und nach der Kollagenasebehandlung keine signifikanten Unterschiede.

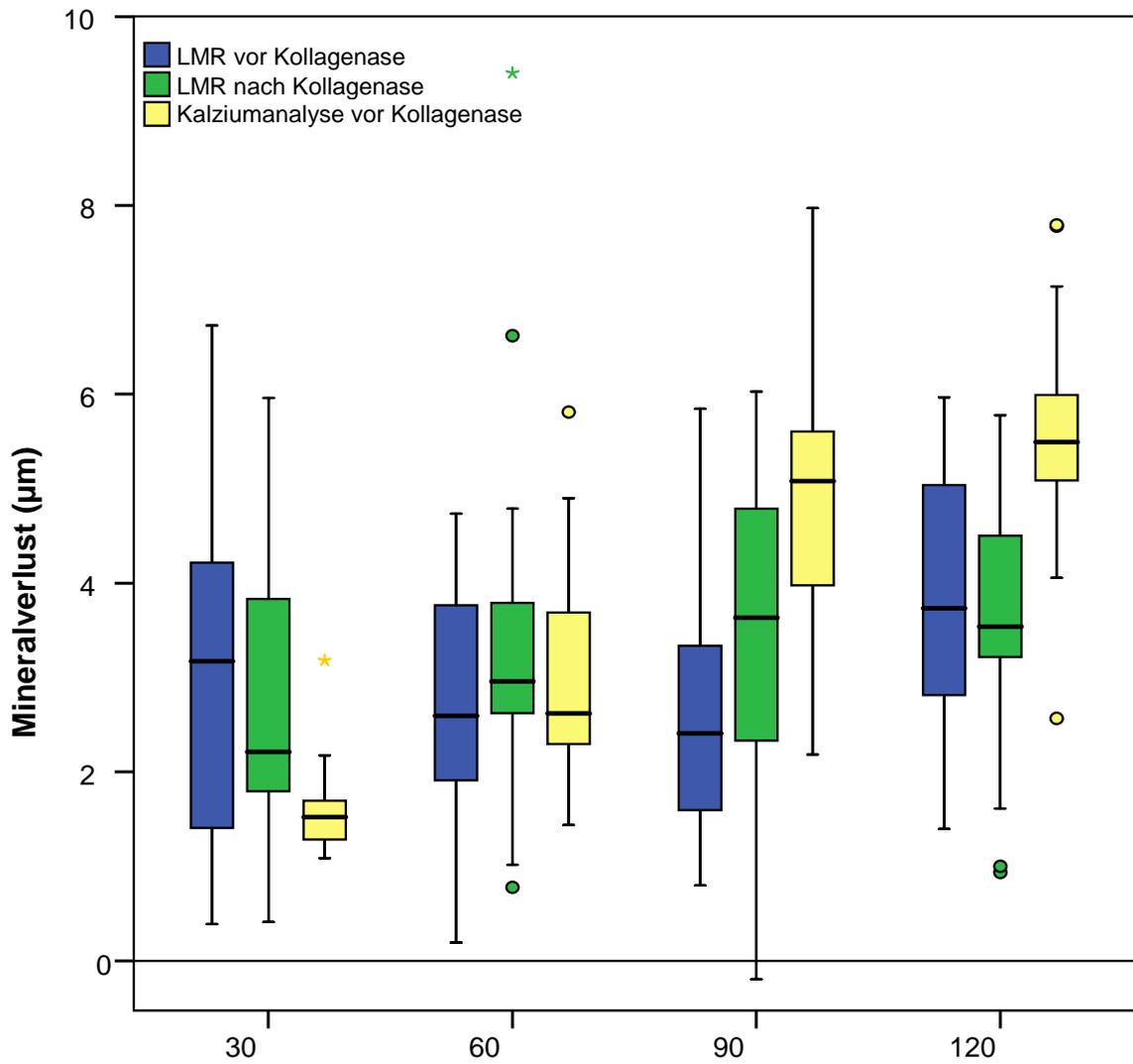
Im Vergleich zwischen Kalziumanalyse und LMR vor Kollagenase (nach Kollagenase) war der Wert der LMR nach 30 Minuten um 87% (75%) größer, wobei sich nach 60 Minuten keine Unterschiede zeigten. Dagegen war der Wert der LMR nach 90 Minuten um 46% (26%) und nach 120 Minuten ebenfalls um 31% (34%) kleiner. Die Werte der LMR spiegelten nur nach 60 Minuten die Werte der Kalziumanalyse wider.

Die Progredienz der Mineralverluste in den einzelnen Versuchsgruppen sowie der Vergleich zwischen den Gruppen sind in der Abbildung 6 in Form von Box- und-Whisker-Plots dargestellt.

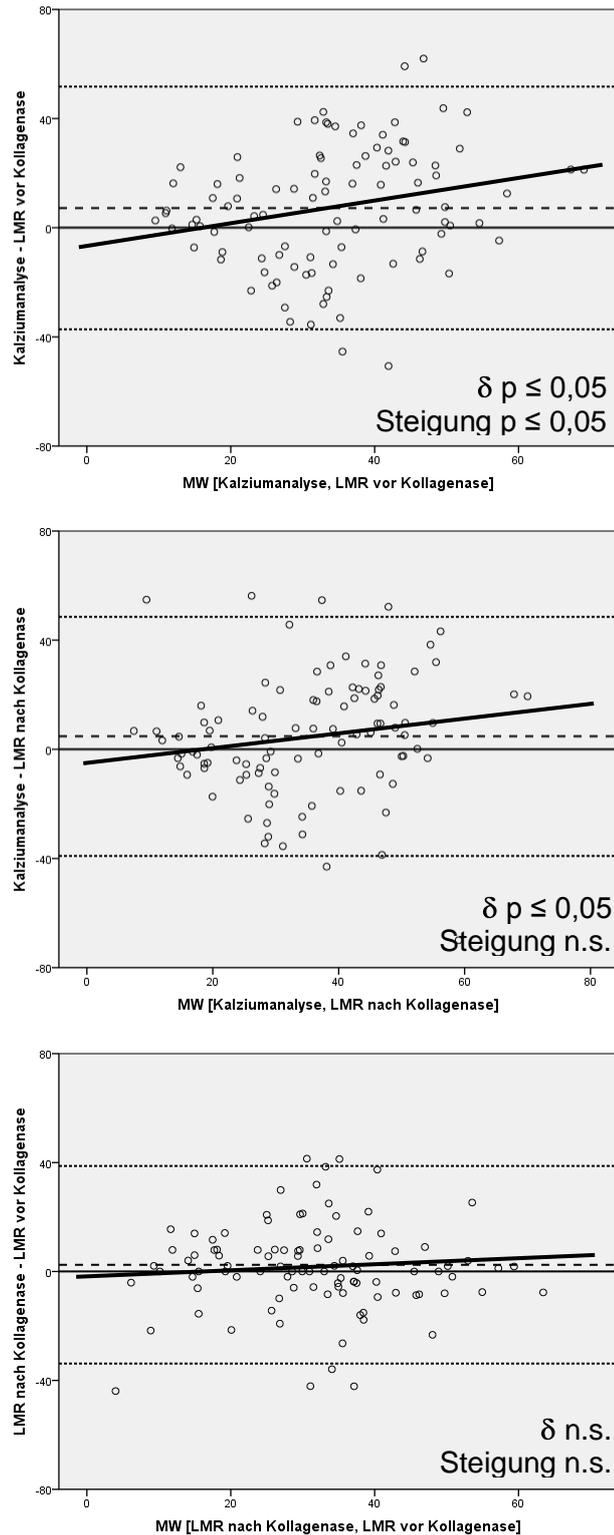
Zur graphischen Darstellung der Übereinstimmung der Ergebnisse von longitudinaler Mikroradiographie (vor und nach Kollagenase) und Kalziumanalyse, sowie longitudinaler Mikroradiographie vor und nach Kollagenase, werden in Abbildung 7 die Zusammenhänge als Bland-Altman-Plots gezeigt.

Die Grafik zeigt für die Übereinstimmung von LMR und Kalziumanalyse einen geringen jedoch signifikanten systematischen Fehler (Bias) sowie eine deutliche Streuung. Zudem findet sich ein geringer proportionaler Fehler. Legt man die Kalziumanalyse als „wahren Wert“ zugrunde wird deutlich, dass die longitudinale Mikroradiographie (LMR) den Mineralverlust bei niedrigen Werten überschätzt und bei höheren Werten unterschätzt.

Die Darstellung der longitudinalen Mikroradiographie vor und nach Kollagenase zeigt zwar eine gute Übereinstimmung der Werte, allerdings findet sich auch hier eine große Streuung.



**Abb. 6:** Mineralverlust ( $\mu\text{m}$ ) gemessen mit der longitudinalen Mikroradiographie (LMR) und der Kalziumanalyse (Ca).

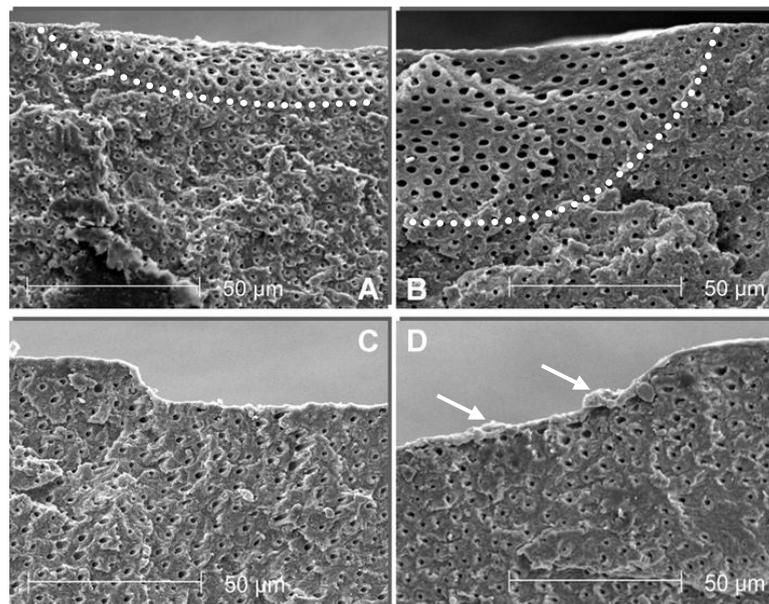


**Abb. 7:** Bland-Altman Plot zur Darstellung der Übereinstimmung der Messmethoden zur Bestimmung des Mineralverlustes ( $\mu\text{m}$ ) (oben: Kalziumanalyse - LMR vor Kollagenase; mittig: Kalziumanalyse - LMR nach Kollagenase; unten: LMR nach Kollagenase - LMR vor Kollagenase). Dargestellt ist die Referenzlinie für die angenommene völlige Übereinstimmung beider Methoden (durchgezogene Nulllinie), der arithmetische Mittelwert für die tatsächliche Differenz aus beiden Methoden (gestrichelte Linie), sowie  $\pm 1,96 \times SD$  (gepunktete Linien).

## Rasterelektronenmikroskopie

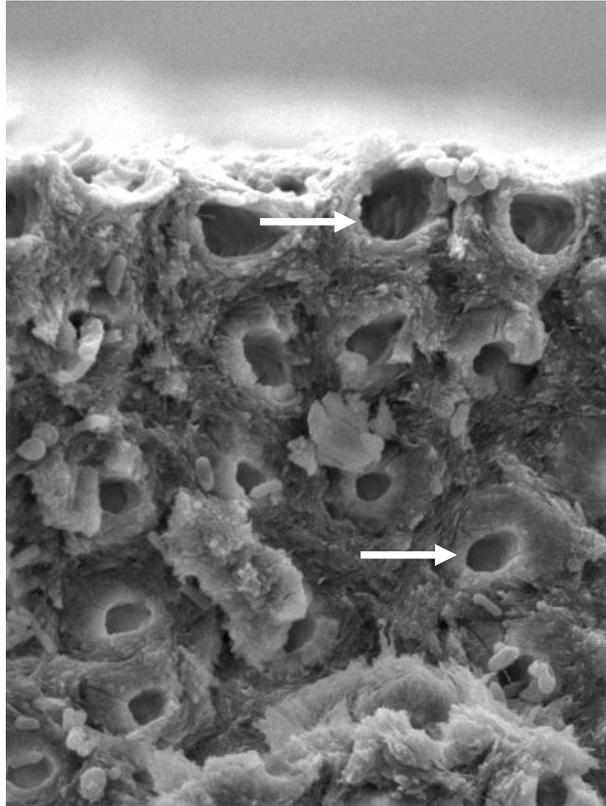
In allen Proben zeigte sich nach der Erosion mit Zitronensäure und vor der Enzymbehandlung mit Kollagenase eine Demineralisationszone, die mit zunehmender Erosionszeit an Dicke zugenommen hatte. Das demineralisierte Dentin war von gesundem Dentin deutlich zu unterscheiden. Im oberen Bereich der Dentinprobe ließ sich die vollständig demineralisierte organische Matrix mit erweiterten Dentintubuli erkennen. Im unteren Bereich hingegen zeigte sich normales Dentin mit engen Dentintubuli, umgeben von peri- und intertubulärem Dentin. Das Oberflächenniveau der Demineralisationsfront erreichte beinahe das Niveau der Referenzfläche (Abb. 8A, 8B).

Nach der Enzymbehandlung war eine deutliche Stufe zwischen Versuchs- und Referenzfläche zu erkennen (Abb. 8C, 8D). Das demineralisierte Gewebe wurde durch die Enzymbehandlung auch bei den Proben mit der längsten Demineralisationszeit nahezu komplett entfernt (Abb. 9). Kleinere Rückstände von verbliebenem organischem Material waren auf der Oberfläche zu sehen (weiße Pfeile).



**Abb. 8:** Transversalschnitte von Dentinproben, die mit Zitronensäure (0,05 M Zitronensäure; pH 2,5) und Kollagenase (*Clostridium histolyticum*) behandelt wurden (Originalvergrößerung 250fach).

(A) nach 30-minütiger Erosion; (B) nach 120-minütiger Erosion; (C) nach 30-minütiger Erosion und Kollagenasebehandlung; (D) nach 120-minütiger Erosion und Kollagenasebehandlung; die gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen demineralisierter organischer Matrix und gesundem Dentin. Die weißen Pfeile deuten auf kleine Rückstände von verbliebenem organischem Material auf der Oberfläche; (A und B) nach Herauslösen der anorganischen Komponente ist eine Vergrößerung der Lumina der Dentintubuli deutlich zu erkennen.



**Abb. 9:** Transversalschnitt einer zuvor mit Zitronensäure demineralisierten und anschließend mit Kollagenase behandelten Dentinprobe (Originalvergrößerung 2000fach). Im oberen Bereich lässt sich das teilweise demineralisierte Dentin mit vergrößerten Tubuli erkennen (oberer Pfeil). Das teilweise demineralisierte Dentin wurde durch die Enzymbehandlung nicht degradiert. Im unteren Bereich zeigt sich gesundes Dentin. Die Tubuli sind eng und von peritubulärem sowie intertubulärem Dentin umgeben (unterer Pfeil).

## 5. Diskussion

### 5.1 Versuchsaufbau und -durchführung; Probenmaterial und Erzeugung der Erosionen

Um eine möglichst gleiche Beschaffenheit des Probenmaterials zu gewährleisten, wurden Dentinproben von vollständig retinierten menschlichen dritten Molaren verwendet. Da sich koronales Dentin aufgrund seiner Zusammensetzung und der damit verbundenen physikalisch-chemischen Eigenschaften von Wurzeldentin unterscheidet, wurden für die vorliegende Untersuchung nicht beide Gewebe verwendet [Ganss et al., 2000; Yoshiyama et al., 1996]. Außerdem manifestieren sich Erosionen bei betroffenen Patienten primär im koronalen Bereich, weswegen für die vorliegende Untersuchung ausschließlich Zahnschnitte aus koronalem Dentin verwendet wurden.

Die bereits zuvor ausführlich beschriebene Versuchsanordnung mit vier progressiven Messzeitpunkten wurde gewählt, um die große Bandbreite vorhandener Versuchsprotokolle abzudecken und einen Vergleich mit den Ergebnissen anderer Studien zu ermöglichen [Ganss et al., 2005; Hara et al., 2005].

Die erosive Demineralisation wurde mit Zitronensäure durchgeführt. Zitronensäure weist aufgrund ihres sauren Charakters und der Eigenschaft Kalzium zu binden ein hohes erosives Potential auf [Meurman und Frank, 1991]. Desweiteren ist Zitronensäure eine diätetische Säure, welche häufig in Getränken und Früchten zu finden ist [Imfeld, 1983]. Die Konzentration wurde entsprechend dem Vorkommen in gängigen Erfrischungsgetränken wie z.B. Sprite Light mit 0,05 M gewählt [Attin et al., 1996; Lussi et al., 1992; Lussi et al., 1993]. Die Zitronensäure zeigte während des Versuches einen konstanten pH-Wert von 2,5. Der erosive Charakter von Zitronensäure ist schon lange bekannt und so wurde Zitronensäure bereits in einer Reihe von anderen Untersuchungen zur erosiven Demineralisation von Zahnhartsubstanzen eingesetzt [Attin et al., 2003; Brosowsky, 1966; Davis und Winter, 1977; Ganss et al., 2001c; Ganss et al., 2008; Lussi et al., 2008; McClure und Ruzicka, 1946; Meurman et al., 1991; Schlueter et al., 2007].

Die Dentinproben wurden entsprechend dem Demineralisationsprotokoll erodiert und anschließend mit den verschiedenen Testverfahren vermessen. Im Anschluss daran wurden die Proben mit der Kollagenaselösung behandelt und erneut untersucht.

Da 90% der Dentinmatrix aus Kollagen Typ I und V bestehen, wurde zur Entfernung dieser organischen Matrix das Enzym Kollagenase (*Clostridium histolyticum type VII*) verwendet. Dieses Enzym besteht aus insgesamt 7 verschiedenen Kollagenasen, die sich in ihrer Wirkungsweise hinsichtlich der Degradation von nativem Kollagen unterscheiden und Kollagen unspezifisch spalten. Wird Dentin durch Säureeinwirkung entmineralisiert, bleibt auf der Oberfläche eine vollständig demineralisierte organische Matrix zurück, der sich eine teilweise entmineralisierte Schicht anschließt. Liegt vollständig demineralisiertes Kollagen an der Oberfläche frei, so kann es durch die Einwirkung von Enzymen trennscharf abgebaut werden. Laut Herstellerangaben entfaltet das verwendete Enzym Kollagenase (*Clostridium histolyticum type VII*) seine größte Aktivität im neutralen Bereich und bei Anwesenheit von Kalziumionen, weswegen es einer gesättigten Mineralsalzlösung zugesetzt wurde [Angleton und Van Wart, 1988].

Die im Versuch verwendete Konzentration an Kollagenase (100 U pro ml, 1 U  $\cong$  0,5325  $\mu$ g Kollagenase) wurde entsprechend einer vorherigen Untersuchung gewählt [Ganss et al., 2004]. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die genannte Konzentration an Kollagenase ausreicht, um das durch die erosive Demineralisation freigelegte Dentinkollagen zu entfernen. In einer kürzlich publizierten Studie konnten diese Annahmen mit rasterelektronischen Bildern untermauert werden [Ganss et al., 2010].

Zur Entfernung der organischen Matrix gibt es jedoch nicht nur enzymatische Verfahren, sondern auch unspezifische chemische Verfahren wie z.B. die Entfernung mit einer Natriumhypochlorid-Lösung.

Die Studie von Hara et al. [2005] untersuchte, wie sich die organische Matrix nach diversen Demineralisationsperioden darstellt und welchen Einfluss Erhalt, Fixierung oder Entfernung dieser organischen Matrix auf den Erosionsprozess haben. Als unspezifisches Verfahren zur Degradation von Proteinen diente NaOCl (Natriumhypochlorid), als Proteinfixierer GDA (Glutaraldehyd) und als

Negativkontrolle DIW (entionisiertes Wasser). Nach Behandlung der Proben mit den jeweiligen Testlösungen wurden diese mit Zitronensäure für 5 x 30 Minuten demineralisiert. Nach jeder Behandlung wurden der Mineralverlust und die Läsionstiefe mit der transversalen Mikroradiographie (TMR) bestimmt. Die mit NaOCl behandelte Gruppe zeigte höhere Mineralverluste und Läsionstiefen als die GDA- und DIW-Gruppe. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass es in der NaOCl-Gruppe nach nur 60 Minuten Erosion zu ausgeprägten Substanzverlusten gekommen war. Dies lässt darauf schließen, dass NaOCl in der Lage war die organische Matrix zu entfernen, nachdem diese durch die erosive Demineralisation exponiert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben allerdings nicht ultrastrukturell mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Es erfolgte demzufolge keine visuelle Kontrolle um die Oberflächenbeschaffenheit der Versuchsfläche genau zu überprüfen.

Wie in der Studie von Ahmed et al. [2008] jedoch gezeigt werden konnte, entfernt Natriumhypochlorid nicht nur vollständig demineralisiertes Dentin, sondern auch teilweise demineralisiertes Dentin. In dieser Studie galt es zu untersuchen, ob und wie Enzyme und Proteasen in der Lage sind denaturiertes und/oder demineralisiertes Dentin zu entfernen. Zur Entfernung des organischen Materials wurden Pepsin, Trypsin und Kollagenase verwendet. NaOCl diente als Kontrollgruppe. Die Demineralisation erfolgte entweder mit Milch- oder Essigsäure für 3, 7 oder 14 Tage. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass bei Verwendung von Milchsäure zur Demineralisation, Trypsin und Pepsin in der Lage waren, denaturierte Kollagenfasern abzubauen. Die Kollagenase degradierte denaturiertes und demineralisiertes Dentin, wobei NaOCl nicht nur das demineralisierte sondern auch das partiell entmineralisierte Dentin entfernte.

Im vorliegenden Versuch konnte ebenfalls durch die rasterelektronischen Bilder gezeigt werden, dass durch die Enzymbehandlung nur das vollständig demineralisierte Kollagen entfernt wurde (Abb. 9).

Zum bisherigen Kenntnisstand scheint Natriumhypochlorid (NaOCl) nicht ausreichend, um vollständig demineralisiertes Dentin trennscharf von teilweise demineralisiertem Dentin abzubauen, sodass gegenwärtig die Entfernung der organischen Matrix mit Kollagenase die geeignetste Methode zu sein scheint.

Da dieses Verfahren jedoch sehr teuer ist, erscheint es interessant, weitere Verfahren zu entwickeln.

## **5.2 Betrachtung der Methoden und Ergebnisse**

Wie bereits zuvor erwähnt handelt es sich in der vorliegenden Untersuchung um eine geteilte Methodenarbeit. Da zum Vergleich die Profilometrie als zusätzliches in der vorliegenden Studie ebenfalls untersuchtes Messverfahren herangezogen wurde, wird an dieser Stelle auf die Publikation verwiesen [Ganss et al., 2009b].

Bislang steht eine große Auswahl an validierten Messverfahren zur Quantifizierung erosiver Substanzverluste im Schmelz zur Verfügung [Barbour und Rees, 2004; Ganss et al., 2005; Hannig et al., 2008]. Dies trifft jedoch für Dentin nicht zu. Nicht jede Messmethode, die für Schmelz geeignet ist, ist ohne weiteres auch für Dentin einsetzbar. Der Grund dafür ist die spezielle histologische Struktur von erodiertem Dentin. Dentin besteht im Gegensatz zu Schmelz zu 20 Gew% aus organischem Material und zu 10 Gew% aus Wasser, was wiederum Einfluss auf das Verhalten während der Demineralisation nimmt. Bei einer Demineralisation wird das Mineral aus der Zahnhartsubstanz herausgelöst, während die organische Komponente auf der Oberfläche zurückbleibt [Meurman et al., 1991]. Ein alleiniger Säureangriff führt nicht zu einem Abbau der organischen Oberflächenschicht [Ganss et al., 2007; Ganss et al., 2009a]. Diese organische Deckschicht kann aufgrund dessen mit diversen Messmethoden interferieren und somit das Messergebnis beeinflussen.

In der vorliegenden Studie wurden daher verschiedene Messmethoden wie die Kalziumanalyse sowie die longitudinale Mikroradiographie miteinander verglichen.

Hervorzuheben sei hier, dass es sich bei der Kalziumanalyse als auch bei der longitudinalen Mikroradiographie jeweils um Messverfahren handelt, die eine vorherige Entfernung der organischen Matrix nicht erforderlich machen.

## Kalziumanalyse

Die Kalziumanalyse zählt zu den quantitativen Messmethoden. Das Messprinzip der Kalziumanalyse besteht in der Bestimmung der in Lösung gegangenen Ionen (Kalzium) als Konzentration. Der Messwert bezieht sich auf das, was von der Zahnhartsubstanz entfernt wurde und bleibt als Konzentrationsangabe abstrakt und ohne klinischen Bezug. Die in Lösung gegangene Menge an Kalzium kann je nach Mineralisationsgrad der Zahnhartsubstanz durchaus einem unterschiedlichen räumlichen Substanzverlust entsprechen [Ganss, 2005]. Die Bestimmung von Kalzium kann dabei mit Ionen-sensitiven Elektroden, mit der Atomabsorptionsspektroskopie [Willis, 1961] oder mit der Spektrophotometrie erfolgen. Dabei sind die beiden letzteren Verfahren sehr sensitiv und genau [Arends und ten Bosch, 1992; Attin et al., 2005b; Attin et al., 2005a]. Auch in der Studie von Hjortsjö et al. [2009] erwies sich die Kalziumanalyse als ein zuverlässiges Messverfahren. Die Spektrophotometrie erlaubt die Bestimmung sehr geringer Mengen an Demineralisationslösung (10 µl) als auch an Ionen innerhalb einer Lösung. Die Nachweisgrenze zur Quantifizierung von Kalzium (Arsenazo III Methode) in einem sauren Agens beträgt 12,4 µl [Attin et al., 2005a]. Desweiteren kann dieses Verfahren auch für in vivo Versuche eingesetzt werden, auch wenn hier eher mildere Demineralisationsmodelle Anwendung finden [Hjortsjö et al., 2009]. Die in Lösung gegangene Menge an Kalzium in der Erosionslösung kann so für konsekutive Messungen mit extraoralen oder intraoralen Demineralisationsbehandlungen eingesetzt werden. Da man zur Bestimmung der in Lösung gegangenen Menge an Kalzium die Demineralisationslösung zur Analyse benötigt, ist ein solches in vivo Modell mit einem großen Aufwand verbunden.

Auch wenn dieses Verfahren in der vorliegenden Studie den Mineralverlust zuverlässig erfasst hat, bringt es hinsichtlich der Anwendbarkeit einige Einschränkungen mit sich. Ein Nachteil ist, dass man keinerlei Informationen über einen möglichen Mineralgewinn erhalten kann und dass man ebenfalls keine Aussagen bezüglich struktureller Veränderungen von erodiertem Zahnhartgewebe treffen kann. Um strukturelle Veränderungen visuell darzustellen sind andere Verfahren, wie zum Beispiel die

Rasterelektronenmikroskopie unumgänglich. Um einen gemessen Mineralverlust in einen räumlichen Substanzverlust umzurechnen, muss zuvor davon ausgegangen werden, dass Dentin einen bestimmten Mineralgehalt aufweist. Dies wiederum kann zu einem systematischen Fehler führen. Im Gegensatz zu Schmelz ist Dentin kein einheitlich strukturiertes Gewebe, sondern enthält Dentintubuli, durch die die Säure diffundieren kann. Auf diese Weise kann so das Mineral aus diesen Strukturen der Zahnhartsubstanz herausgelöst werden, was zu einer Vergrößerung der Dentintubuli führt. Als Konsequenz kann es so zu einer leichten Überschätzung des räumlichen Verlustes an mineralisiertem Gewebe kommen.

Bei der Kalziumanalyse kam es in allen vier Gruppen durch die Behandlung der Proben mit Zitronensäure zu messbaren Substanzverlusten. Ein interessanter Befund war, dass der Substanzverlust zwischen den ersten drei Messzeitpunkten nahezu linear zugenommen hatte, es jedoch zwischen den letzten beiden Messzeitpunkten zu keinem signifikanten Anstieg des Substanzverlustes gekommen war. Eine ähnliche Dynamik konnte auch in anderen Studien mit ähnlichen Demineralisationszeiten beobachtet werden [Ganss et al., 2004; Hara et al., 2005]. Die im anderen Teil der Arbeit gefundenen Ergebnisse für die profilometrischen Abtastungen stimmten nach der Kollagenasebehandlung gut mit den Werten der Kalziumanalyse überein. Im Vergleich zur Kalziumanalyse erbrachte die mechanische Profilometrie einen im Schnitt 10% geringeren Wert pro Messzeitpunkt. Da es sich bei den profilometrischen Messungen um ein reines Abtasten der Oberfläche handelt, können Veränderungen im Mineralgehalt in Strukturen wie zum Beispiel dem intertubulären Dentin nicht quantifiziert werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Einsatz der Kalziumanalyse je nach Fragestellung eine sensitive Methode ist, da es sich als zuverlässiges und aussagekräftiges Messverfahren sowohl für kurze [Hjortsjö et al., 2009] als auch für längere [Hara et al., 2005] Demineralisationszeiten erwiesen hat.

## Longitudinale Mikroradiographie

Die zur Bestimmung des Mineralgehaltes der Dentinproben eingesetzte Mikroradiographie ist eine der am Besten eingeführten Methoden in der Kariologie [Arends und ten Bosch, 1992]. Prinzipiell werden zwei Arten der Mikroradiographie unterschieden. Die transversale Mikroradiographie (TMR) und die longitudinale Mikroradiographie (LMR). Dabei wurde jedoch hauptsächlich die transversale Mikroradiographie (TMR) zur Bestimmung von Art und Tiefe der Läsion eingesetzt.

Bei der transversalen Mikroradiographie (TMR) erfolgt die Präparation der Proben senkrecht zur Zahnoberfläche und planparallel. Die Probendicke beträgt zwischen 50 und 200  $\mu\text{m}$ . Der Mineralgehalt wird als Funktion der Tiefe dargestellt, so dass De- und Remineralisationsvorgänge in Initialläsionen beurteilt werden können. Die Quantifizierung oberflächlicher Mineralverluste ist dagegen nur eingeschränkt möglich. Die Methode ist destruktiv und für in vitro und in situ Versuche geeignet [Amaechi et al., 1998a; Amaechi et al., 1999]. Eine Modifikation der transversalen Mikroradiographie wird von Hall et al. [1997] und Amaechi et al. [1998b] beschrieben. Bei der ersten Variante werden transversale Probenquerschnitte mit einer Dicke von 100-150  $\mu\text{m}$  angefertigt und so präpariert, dass ein zentrales Versuchsfenster mit einem Referenzgebiet resultiert. Nach dem Scannen der Probe lässt sich der Mineralverlust bestimmen. Diese Methode ist nicht destruktiv und sowohl für in situ als auch in vitro Versuche geeignet [Hall et al., 1999]. Amaechi et al. beschreibt eine weitere Modifikation. Hierbei werden Probenquerschnitte mit einer Dicke von 50 bis 200  $\mu\text{m}$  angefertigt. Die Messung erfolgt dann senkrecht zur Oberfläche. Mit einer speziellen Software wird zuerst auf der Referenzfläche das Niveau der ursprünglichen Probenoberfläche bestimmt. Als nächstes wird das Mineralprofil auf die Versuchsfläche übertragen. Aus der Differenz ergibt sich dann der Betrag des Mineralverlusts. Die Methode lässt sich ebenfalls für in vitro [Amaechi et al., 1998a] und für in situ Versuche [Amaechi et al., 1999] anwenden. Diese Methode ist hingegen destruktiv, zeitaufwendig und nicht auf natürlichen Zahnoberflächen anwendbar. Da bei der TMR dünnere Proben als bei der LMR verwendet werden, ist diese Methode hinsichtlich kleinerer Veränderungen sensitiver.

Die longitudinale Mikroradiographie (LMR) ist eine nicht destruktive Methode, mit der Veränderungen im Mineralgehalt bei De- und Remineralisationsprozessen quantifiziert werden können. Es handelt sich dabei um ein aufwendiges Verfahren, bei dem der Mineralgehalt der Probe mit einem Densitometer ermittelt wird. Dazu wird die Röntgenabsorption der Probe mit der Röntgenabsorption der Aluminium-Kalibriereinrichtung verglichen. Bei der longitudinalen Mikroradiographie werden für Schmelz 300 bis 400  $\mu\text{m}$  und für Dentin 750 bis 800  $\mu\text{m}$  dicke Proben parallel zur Zahnoberfläche präpariert und in entsprechende Probenhalter fixiert. Auf hintereinander folgenden Mikroradiogrammen wird ein zuvor festgelegtes Probenareal einer Probe gescannt und der Gesamtmineralgehalt der Probe ermittelt. Die Differenz zum Ausgangsmineralgehalt wird dann entweder als Mineralverlust oder -gewinn bestimmt. Diese Methode ist nicht destruktiv und eignet sich für in vitro und in situ Versuche sowie für planparallele Proben und natürliche Oberflächen. Fasst man die oben genannten Charakteristika zusammen so wird deutlich, dass die longitudinale Mikroradiographie an sich viele positive Eigenschaften mit sich bringt.

Da es sich bei der longitudinalen Mikroradiographie um ein aufwendiges Messverfahren handelt, sollten einige Punkte besonders berücksichtigt werden. Die Zahnschnitte sollten möglichst gleichmäßig sein, da zu große Unterschiede hinsichtlich des Mineralisationsgrades und der Probendicke nicht mehr von der Aluminium-Kalibriereinrichtung dargestellt werden können. Nach Angaben von Josselin de Jong et al. sollte bei der Verwendung von Schmelzproben eine Dicke von 450  $\mu\text{m}$  nicht überschritten werden. Werden natürliche Zahnoberflächen verwendet, so sollten die Unterschiede hinsichtlich der Probendicke um maximal 200  $\mu\text{m}$  voneinander abweichen. Da in der vorliegenden Studie jedoch Dentinschnitte verwendet wurden, und diese Angaben für Dentin mit einem geringeren Mineralgehalt als Schmelz nicht zutreffen, wurden Dentinproben mit einer Schichtdicke von 800  $\mu\text{m}$  verwendet. Die Belichtungszeit sollte so gewählt werden, dass die Werte für die optische Filmtransmission zwischen 5 und 50% liegen, da andere Werte zu Fehlern bei der Zuordnung der Kalibrierkurve zu den entsprechenden Punkten auf der Kalibriereinrichtung führen können. Bei einer Probendicke von 400  $\mu\text{m}$  sollte die

Belichtungszeit zwischen 1 und 4 Minuten (20 kV, 50 mA) liegen [de Josselin de Jong et al., 1987].

Bei den mikroradiographischen Verfahren wird angenommen, dass das Zahnhartgewebe nur aus Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ ) besteht und die einzige Komponente ist, die Röntgenstrahlen absorbiert. Desweiteren wird angenommen, dass die Röntgenstrahlung monochromatisch ist. Diese Annahmen führen zu einem systematischen Fehler, der sich aus der Inhomogenität und Polychromasie der Röntgenstrahlung und aus Abweichungen in der Zusammensetzung der Zahnhartsubstanz von der stöchiometrischen Formel zusammensetzt. Der systematische Fehler beläuft sich auf etwa 6,5% [de Josselin de Jong, 1986].

Zufällige Fehler ergeben sich aus dem Rauschen des Ausgangssignals des Densitometers, durch Filminhomogenitäten aufgrund der Körnung, sowie durch Fehler beim Scannen der Aluminium-Kalibriereinrichtung. Die Größenordnung dieser Fehler kann jedoch außer Acht gelassen werden. Nicht zu vernachlässigen ist jedoch eine fehlerhafte Filmentwicklung, die zu Streifen oder Flecken auf dem Mikroradiogramm führt und so das Ergebnis negativ beeinflusst.

Unter besonderer Berücksichtigung dieser Aspekte lag die Standardabweichung einer auf mehrere Filme projizierten Dentinprobe bei 11,4  $\mu\text{m}$ . Bei der Auswertung verschiedener Mikroradiogramme derselben Probe lag die Standardabweichung bei 3,19  $\mu\text{m}$  und bei der Auswertung desselben Mikroradiogramms bei 0,3  $\mu\text{m}$ .

Aus den unterschiedlichen Dimensionen der Standardabweichung wird deutlich, dass die Hauptfehlerquelle bei den Filminhomogenitäten liegt. Einerseits können Filminhomogenitäten eine Rolle spielen, andererseits ist bekannt, dass die Filme feuchtigkeitsempfindlich sind. Da die Proben jedoch sorgfältig getrocknet wurden, dürfte dieser Aspekt eine untergeordnete Rolle gespielt haben. Ließe sich jedoch das Problem der Filminhomogenitäten eliminieren und dadurch ein besseres Ergebnis erzielen, würde die Methode so geeigneter erscheinen. Wenn man bedenkt, dass bei einer Probendicke von 400  $\mu\text{m}$  (in Bezug auf Mineral) die Standardabweichung etwa 10  $\mu\text{m}$  beträgt, kommt so lediglich ein zufälliger Fehler der Größenordnung von 2,5% zustande.

Hinsichtlich der Ergebnisse war die longitudinale Mikroradiographie jedoch nicht in der Lage, Veränderungen im Mineralgehalt weder vor noch nach der Kollagenasebehandlung zuverlässig zu erfassen. So verringerte sich sogar der Mineralverlust vor der Kollagenasebehandlung vom ersten Messzeitpunkt bis zum dritten Messzeitpunkt, wenn auch nicht statistisch signifikant, um am letzten Messzeitpunkt wieder zuzunehmen. Nach der Kollagenasebehandlung waren die Unterschiede hinsichtlich des Mineralverlustes zu keinem Messzeitpunkt signifikant. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen den mikroradiographisch ermittelten Werten und den Werten von Kalziumanalyse und Profilometrie.

Dentin weist einen geringeren Mineralgehalt als Schmelz auf. Unter der Annahme, dass der Mineralgehalt im Dentin etwa 50 Vol.-% beträgt, entspricht ein räumlicher Substanzverlust von 50  $\mu\text{m}$  einem tatsächlichen Mineralverlust von 25  $\mu\text{m}$ . Wenn man bedenkt, dass in einer vorangegangenen Studie von Ganss et al. [2005] die Nachweisgrenze für einen mit der longitudinalen Mikroradiographie erfassten Mineralverlust bei 20  $\mu\text{m}$  lag, so lässt sich daraus schließen, dass die kalkulierten Substanzverluste bzw. tatsächlichen Mineralverluste in dieser Studie unterhalb der Nachweisgrenze der longitudinalen Mikroradiographie lagen. Die errechneten Substanzverluste variierten in der Größenordnung von 26,8 bis 38,4  $\mu\text{m}$ .

Es kann gefolgert werden, dass die longitudinale Mikroradiographie bei Mineralverlusten dieser Größenordnung kein zuverlässiges Testverfahren ist. Für höhere Substanzverluste könnte es durchaus ein adäquates Messverfahren darstellen. Klinisch können erosive Substanzverluste durchaus rasch fortschreiten und bis zu 200  $\mu\text{m}$  im Jahr erreichen. Die longitudinale Mikroradiographie kann in Versuchsaufbauten, die solche Dimensionen simulieren sollen, durchaus ihre Berechtigung haben.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Ahmed AA, García-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: The influence of xylitol and fluoride on dental erosion in vitro. *Arch Oral Biol* 1998a;43:157-161.
3. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM: Use of transverse microradiography to quantify mineral loss by erosion in bovine enamel. *Caries Res* 1998b;32:351-356.
4. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM: Influence of abrasion in clinical manifestation of human dental erosion. *J Oral Rehab* 2003;30:407-413.
5. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM, Milosevic A: Thickness of Acquired Salivary Pellicle as the Determinant of the Sites of Dental Erosion. *J Dent Res* 1999;32:1821-1828.
6. 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.
7. Arends J, ten Bosch JJ: Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res* 1992;71:924-928.
8. 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.
9. Attin T, Becker K, Hannig C, Buchalla W, Wiegand A: *Clin Oral Invest* 2005b;9:203-207.
10. Attin T, Hilgers RD, Hellwig E: Einfluß von Muzin im Speichel auf die Entstehung von Schmelzerosionen. *Dtsch Zahnärztl Z* 1996;51:506-510.
11. Attin T, Koidl U, Buchalla W, Schaller HG, Kielbassa AM, Hellwig E: Correlation of microhardness and wear in differently eroded bovine dental enamel. *Arch Oral Biol* 1997;42:243-250.
12. Attin T, Meyer K, Hellwig E, Buchalla W, Lennon MA: Effect of mineral supplements to citric acid on enamel erosion. *Arch Oral Biol* 2003;48:753-759.
13. Attin T, Zirkel C, Hellwig E: Brushing abrasion of eroded dentin after application of sodium fluoride solutions. *Caries Res* 1998;32:344-350.
14. Banerjee A, Boyde A: Autofluorescence and Mineral Content of Carious Dentine: Scanning Optical and Backscattered Electron Microscopic Studies. *Caries Res* 1998 1998;219-226.
15. Barbour ME, Rees JS: The laboratory assessment of enamel erosion: a review. *J Dent* 2004;32:591-601.
16. Bartlett D: The implication of laboratory research on tooth wear and erosion. *Oral Diseases* 2005;11:3-6.

17. Baykov AA, Evtushenko OA, Avaeva SM: A Malachite Green Procedure for Orthophosphate Determination and its Use in Alkaline Phosphatase-Based Enzyme Immunoassay. *Anal Biochem* 1988;171:266-270.
18. Bland JM, Altman DG: Applying the right statistics: analyses of measurement studies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003;22:85-93.
19. Brosowsky A: Die Wirkung von organischen und Mineralsäuren auf die Zahnhartsubstanz bei verschiedenen pH-Werten. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 1966;21:1139-1147.
20. Brown CJ, Smith G, Shaw L, Parry J, Smith AJ: The erosive potential of flavoured sparkling water drinks. *Int J Paediatr Dent* 2007;17:86-91.
21. Büyükyılmaz T, Ogaard B, Rolla G: The resistance of titanium tetrafluoride-treated human enamel to strong hydrochloric acid. *Eur J Oral Sci* 1997;105:473-477.
22. Chen PS, Toribara TV, Warner H: Microdetermination of phosphorous. *Anal Chem* 1956;28:1756-1758.
23. Davis WB, Winter PJ: Dietary erosion of adult dentine and enamel. Protection with a fluoride toothpaste. *Br Dent J* 1977;143:116-119.
24. de Carvalho FG, de Fucio SB, Sinhoreti MA, Correr-Sobrinho L, Puppim-Rontani RM: Confocal laser scanning microscopic analysis of the depth of dentin caries-like lesions in primary and permanent teeth. *Braz Dent J* 2008;139-144.
25. de Josselin de Jong E: Comparison of methods in caries research. Thesis, Groningen 1986.
26. de Josselin de Jong E, van der Linden AH, ten Bosch JJ: Longitudinal microradiography: a non-destructive automated quantitative method to follow mineral changes in mineralised tissue slices. *Phys Med Biol* 1987;32:1209-1220.
27. 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.
28. Dugmore CR, Rock WP: The progression of tooth erosion in a cohort of adolescents of mixed ethnicity. *Int J Paediatr Dent* 2003;13:295-303.
29. Eccles JD: Dental erosion of nonindustrial origin. A clinical survey and classification. *J Prosthet Dent* 1979;42:649-653.
30. Edwards M, Ashwood RA, Littlewood SJ, Brocklebank LM, Fung DE: A videofluoroscopic comparison of straw and cup drinking: the potential influence on dental erosion. *Br Dent J* 1998;185:244-249.
31. Eisenburger M, Hughes J, West NX, Jandt KD, Addy M: Ultrasonication as a method to study enamel demineralisation during acid erosion. *Caries Res* 2000;34:289-294.

32. Eisenburger M, Shellis RP, Addy M: Comparative study of wear of enamel induced by alternating and simultaneous combinations of abrasion and erosion in vitro. *Caries Res* 2003;37:450-455.
33. Ericsson SG: Quantitative microradiography of cementum and abraded dentine. *Acta Radiol* 1965;246:1-137.
34. Ganss C: Studien zur symptomatischen Therapie von säurebedingten Zahnhartsubstanzverlusten (Erosionen). Marburg, Tectum Verlag, 2005.
35. Ganss C, Hardt M, Blazek D, Klimek J, Schlueter N: Effects on toothbrushing force on the mineral content and demineralized organic matrix of eroded dentine. *Eur J Oral Sci* 2009a;117:255-260.
36. Ganss C, Hardt M, Lussi A, Cocks A-K, 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* 2010;118:376-384.
37. Ganss C, Klimek J, Giese K: Dental erosion in children and adolescents - a cross-sectional and longitudinal investigation using study models. *Community Dent Oral Epidemiol* 2001a;29:264-271.
38. Ganss C, Klimek J, Schäffer U, Spall T: Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in vitro. *Caries Res* 2001b;35:325-330.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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;422-429.
43. Ganss C, Lussi AS, Klimek J: Comparison of calcium analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosive demineralisation. *Caries Res* 2001c;35:296 (Abstr.).
44. Ganss C, Schleichriemen M, Klimek J: Dental erosions in subjects living on a raw food diet. *Caries Res* 1999;33:74-80.
45. Ganss C, Schlueter N, Hardt M, Schattenberg P, Klimek J: Effect of fluoride compounds on enamel erosion in vitro- a comparison of amine, sodium and stannous fluoride. *Caries Res* 2008;42:2-7.
46. 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.

47. Gedalia I, Ionat BD, Ben Mosheh S, Shapira L: Tooth enamel softening with a cola type drink and rehardening with hard cheese or stimulated saliva in situ. *J Oral Rehabil* 1991;18:501-506.
48. Gerrard WA, Winter PJ: Evaluation of toothpastes by their ability to assist rehardening of enamel in vitro. *Caries Res* 1986;20:209-216.
49. Grando LJ, Tames DR, Cardoso AC, Gabilan NH: In vitro study of enamel erosion caused by soft drinks and lemon juice in deciduous teeth analysed by stereomicroscopy and scanning electron microscopy. *Caries Res* 1996;30:373-378.
50. Grenby TH: Methods of assessing erosion and erosive potential. *Eur J Oral Sci* 1996;104:207-214.
51. Hall AF, Buchanan CA, Millett DT, Creanor SL, Strang R, Foye RH: The effect of saliva on enamel and dentine erosion. *J Dent* 1999;27:333-339.
52. 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.
53. 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;accepted.
54. Hannig M, Albers H-K: Die erosive Wirkung von Acetylsalicylsäure an Zahnschmelz und Dentin in vitro. *Dtsch Zahnärztl Z* 1993;48:298-302.
55. Hara AT, Ando M, Cury JA, Serra MC, González-Cabezas C, Zero D: Influence of the organic matrix on root dentine erosion by citric acid. *Caries Res* 2005;39:134-138.
56. Hellwig E, Klimek J, Attin T: Einführung in die Zahnerhaltung. München, Jena, Urban und Fischer, 1999.
57. 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.
58. Hickel R: Das Problem der koronalen Abrasion und Erosion; in Geurtsen WD, Heidemann D (eds): *Zahnerhaltung beim älteren Menschen*. München, Hanser, 1993 pp 40-72.
59. Hjortsjö C, Jonski G, Thrane PS, Saxegaard E, Young A: Effect of Stannous Fluoride and Dilute Hydrofluoric Acid on Early Enamel Erosion over Time in vivo. *Caries Res* 2009;43:449-454.
60. Hooper S, West NX, Pickles MJ, Joiner A, Newcombe RG, Addy M: Investigation of erosion and abrasion on enamel and dentine: a model in situ using toothpastes of different abrasivity. *J Clin Periodontol* 2003;30:802-808.
61. Hughes JA, West NX, Parker DM, Newcombe RG, Addy M: Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink 3. Final drink and concentrate, formulae comparisons in situ and overview of the concept. *J Dent* 1999a;27:345-350.

62. Hughes JA, West NX, Parker DM, Newcombe RG, Addy M: Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink in vitro and in situ - 1. Comparison with orange juice. *J Dent* 1999b;27:285-289.
63. Imfeld T: Dental erosion. Definition, classification and links. *Eur J Oral Sci* 1996;104:151-155.
64. Imfeld TN: Identification of low caries risk dietary components. Basel, Karger, 1983.
65. Jaeggi T, Schaffner M, Bürgin W, Lussi A: Erosionen und keilförmige Defekte bei Rekruten der Schweizer Armee. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 1999;109:1171-1178.
66. Järvinen V, Meurman JH, Hyvarinen H, Rytömaa I, Murtomaa H: Dental erosion and upper gastrointestinal disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988;65:298-303.
67. Järvinen VK, Rytömaa I, Heinonen OP: Risk factors in dental erosion. *J Dent Res* 1991;70:942-947.
68. Jones RR, Cleaton-Jones P: Depth and area of dental erosions, and dental caries, in bulimic women. *J Dent Res* 1989;68:1275-1278.
69. Kargul B, Caglar E, Lussi A: Erosive and buffering capacities of yogurt. *Quintessence Int* 2007;38:381-385.
70. 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.
71. 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.
72. Linkosalo E, Markkanen H: Dental erosions in relation to lactovegetarian diet. *Scand J Dent Res* 1985;93:436-441.
73. Ludbrook J: Statistical Techniques For Comparing Measures And Methods Of Methods: A Critical Review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2002;29:527-536.
74. Lussi A: Dental erosion clinical diagnosis and case history taking. *Eur J Oral Sci* 1996;104:191-198.
75. Lussi A: Erosive Tooth Wear- A Multifactorial Condition of Growing Concern and Increasing Knowledge; in Lussi A (ed): *Dental Erosion: from diagnosis to therapie*. Basel, Karger, 2006 pp 1-8.
76. Lussi A, Jaeggi T: Erosion—diagnosis and risk factors. *Clin Oral Invest* 2008;12:S5-S13.
77. Lussi A, Jaeggi T, Jaeggi-Schärer S: Prediction of the erosive potential of some beverages. *Caries Res* 1995;29:349-354.
78. Lussi A, Jaggi T, Schärer S: The influence of different factors on in vitro enamel erosion. *Caries Res* 1993;27:387-393.

79. Lussi A, Kohler N, Zero D, Schaffner M, Mergert B: A comparison of the erosive potential of different beverages in primary and permanent teeth using an in vitro model. *Eur J Oral Sci* 2000;108:110-114.
80. Lussi A, Megert B, Eggenberger D, Jaeggi T: Impact of Different Toothpastes on the Prevention of Erosion. *Caries Res* 2008;42:62-67.
81. Lussi A, Portmann P, Burhop B: Erosion on abraded dental hard tissues by acid lozenges: an in situ study. *Clin Oral Invest* 1997;1:191-194.
82. Lussi A, Schaffner M: Progression of and risk factors for dental erosion and wedge-shaped defects over a 6-year period. *Caries Res* 2000;34:182-187.
83. Lussi A, Schaffner M, Hotz P, Suter P: Dental erosion in a population of Swiss adults. *Community Dent Oral Epidemiol* 1991;19:286-290.
84. Lussi A, Schaffner M, Hotz P, Suter P: Erosion der Zahnhartsubstanz. Epidemiologie, klinisches Erscheinungsbild, Risikofaktoren und Verhaltensregeln. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 1992;102:320-329.
85. Maupome G, Aguilar AM, Medrano UH, Borges YA: In vitro quantitative microhardness assessment of enamel with early salivary pellicles after exposure to an eroding cola drink. *Caries Res* 1999;33:140-147.
86. Maupome G, Diez-de-Bonilla J, Torres-Villasenor G, Andrade-Delgado LC, Castano VM: In vitro quantitative assessment of enamel microhardness after exposure to eroding immersion in a cola drink. *Caries Res* 1998;32:148-153.
87. McClure F, Ruzicka SJ: The destructive effect of citrate vs. lactate ions on rat's molar tooth surfaces in vivo. *J Dent Res* 1946;25:1-12.
88. Meurman JH, Drysdale T, Frank RM: Experimental erosion of dentin. *Scand J Dent Res* 1991;99:457-462.
89. Meurman JH, Frank RM: Progression and surface ultrastructure of in vitro caused erosive lesions in human and bovine enamel. *Caries Res* 1991;25:81-87.
90. Meurman JH, Härkönen M, Näveri H, Koskinen J, Torkko H, Rytömaa I, Järvinen V, Turunen R: Experimental sports drinks with minimal dental erosion effect. *Scand J Dent Res* 1990;98:120-128.
91. Meurman JH, tenCate JM: Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *Eur J Oral Sci* 1996;104:199-206.
92. Meurman JH, Toskala J, Nuutinen P, Klemetti E: Oral and dental manifestations in gastroesophageal reflux disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78:583-589.
93. Milosevic A, Young PJ, Lennon MA: The prevalence of tooth wear in 14-year-old school children in Liverpool. *Community Dent Health* 1994;11:83-86.
94. Mistry M, Grenby TH: Erosion by soft drinks of rat molar teeth assessed by digital image analysis. *Caries Res* 1993;27:21-25.

95. Moazzez R, Anggiansah A, Bartlett DW: The association of acidic reflux above the upper oesophageal sphincter with palatal tooth wear. *Caries Res* 2005;39:475-478.
96. Nelson DGA, Jongebloed WL, Arends J: Morphology of enamel surfaces treated with topical fluoride agents: SEM considerations. *J Dent Res* 1983;62:1201-1208.
97. Nikiforuk G: *Understanding dental caries*. Basel, New York, Karger, 1985.
98. Noack MJ: REM-Untersuchungen an Erosionen der Zahnhartsubstanzen in vivo. *Dtsch Zahnärztl Z* 1989;44:517-520.
99. Nunn JH, Gordon PH, Morris AJ, Pine CM, Walker A: Dental erosion -- changing prevalence? A review of British National childrens' surveys. *Int J Paediatr Dent* 2003;13:98-105.
100. Öhrn R, Enzell K, Angmar-Månsson B: Oral status of 81 subjects with eating disorders. *Eur J Oral Sci* 1999;107:157-163.
101. Parry J, Shaw L, Arnaud MJ, Smith AJ: Investigation of mineral waters and soft drinks in relation to dental erosion. *J Oral Rehab* 2001;28:766-772.
102. Petersen PE, Gormsen C: Oral conditions among German battery factory workers. *Community Dent Oral Epidemiol* 1991;19:104-106.
103. Petzold M: The influence of different fluoride compounds and treatment conditions on dental enamel: a descriptive in vitro study of the CaF<sub>2</sub> precipitation and microstructure. *Caries Res* 2001;35:45-51.
104. Rytömaa I, Järvinen V, Kanerva R, Heinonen OP: Bulimia and tooth erosion. *Acta Odontol Scand* 1998;56:36-40.
105. Rytömaa I, Meurman JH, Koskinen J, Laakso T, Gharazi L, Turunen R: In vitro erosion of bovine enamel caused by acidic drinks and other foodstuffs. *Scand J Dent Res* 1988;96:324-333.
106. Scheutzel P: Etiology of dental erosion- intrinsic factors. *Eur J Oral Sci* 1996;104:178-190.
107. Schiffner U, Micheelis W, Reich E: Erosionen und keilförmige Zahnhalsdefekte bei deutschen Erwachsenen und Senioren. *Dtsch Zahnärztl Z* 2002;57:102-106.
108. 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.
109. Schlueter N, Ganss C, Mueller U, Klimek J: Effect of titanium tetrafluoride and sodium fluoride on erosion progression in enamel and dentine in vitro. *Caries Res* 2007;41:141-145.
110. Schlueter N, Hardt M, Lussi A, Engelmann F, Klimek J, Ganss C: Tin-containing fluoride solution as anti-erosive agents in enamel: an in vitro tin-uptake, tissue-loss, and scanning electron micrograph study. *Eur J Oral Sci* 2009a;117:427-434.

111. Schlueter N, Klimek J, Ganss C: Effect of stannous and fluoride concentration in a mouth rinse on erosive tissue loss in enamel in vitro. *Arch Oral Biol* 2009b;54:432-436.
112. Sorvari R, Meurman JH, Alakuijala P, Frank RM: Effect of fluoride varnish and solution on enamel erosion in vitro. *Caries Res* 1994;28:227-232.
113. Sorvari R, Peltari A, Meurman JH: Surface ultrastructure of rat molar teeth after experimentally induced erosion and attrition. *Caries Res* 1996;30:163-168.
114. Stösser L, Nekrashevych Y: Erosion of dental enamel in vitro and rehardening by saliva in vivo. *Caries Res* 1998;32:310 (Abstract).
115. Thylstrup A, Fejerskov O: Clinical and pathological features of dental caries; in Thylstrup A, Fejerskov O (eds): *Textbook of clinical cariology*. Copenhagen, Munksgaard, 1994 pp 111-157.
116. 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.
117. 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.
118. Wiegand A, Müller J, Werner C, Attin T: Prevalence of erosive tooth wear and associated risk factors in 2-7-year-old German kindergarten children. *Oral Diseases* 2006;12:117-124.
119. 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.
120. Wiktorsson AM, Zimmerman M, Angmar-Månsson B: Erosive tooth wear: prevalence and severity in Swedish winetasters. *Eur J Oral Sci* 1997;105:544-550.
121. Willis JB: Determination of calcium and magnesium in urine by atomic absorption spectroscopy. *Anal Chem* 1961;33:556-559.
122. Yoshiyama M, Carvalho RM, Sano H, Horner JA, Brewer PD, Pashley DH: Regional bond strengths of resins to human root dentine. *J Dent* 1996;24:435-442.
123. Zentner A, Duschner H: Structural changes of acid etched enamel examined under confocal laser scanning microscope. *J Orofac Orthop* 1996;57:202-209.
124. Zero DT: Etiology of dental erosion- extrinsic factors. *Eur J Oral Sci* 1996;104:162-177.
125. Zipkin J, McClure F: Salivary citrate and dental erosion. *J Dent Res* 1949;28:613-626.

## 7. Zusammenfassung

Durch eine Säureeinwirkung werden im Dentin die mineralischen Bestandteile herausgelöst, während die organischen Strukturen zunehmend freigelegt werden und auf der Oberfläche zurückbleiben. Durch diese organische Matrix wird die Quantifizierung von Mineralverlusten erschwert. Um einen Mineralverlust im Dentin auf geeignete Weise zu erfassen, ist es bei einigen Messverfahren daher notwendig die organische Matrix zu entfernen. Da die Entfernung der organischen Matrix mit Kollagenase sehr zeitaufwendig und zudem destruktiv ist, wäre ein Messverfahren wünschenswert, welches eine solche Behandlung nicht erforderlich macht. Sowohl die Kalziumanalyse als auch die longitudinale Mikroradiographie stellen jeweils ein solches Testverfahren dar.

Ziel dieser in vitro Studie war es, den erosiven Mineralverlust von Dentin mit Hilfe von longitudinaler Mikroradiographie (LMR) und Kalziumanalyse (KA) vergleichend zu quantifizieren. Die LMR wurde jeweils vor und nach der enzymatischen Entfernung der organischen Matrix eingesetzt. Die Ergebnisse wurden hinsichtlich der Histologie von Dentinerosionen diskutiert.

Aus menschlichen dritten Molaren wurden 800 µm dicke longitudinale Dentinschnitte hergestellt, die bis auf ein definiertes Versuchsfeld von 2 mm × 2 mm mit lichthärtendem Kunststoff abgedeckt wurden. Die erosive Demineralisation wurde mit 0,05 M Zitronensäure (pH 2,5) in Einzelgefäßen durchgeführt und erfolgte je nach Gruppe für 30, 60, 90 oder 120 Minuten. Der Mineralverlust wurde zum einen als Kalziumkonzentration in der Erosionslösung mit der Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt. Die Menge an gelöstem Kalzium wurde als Zahnhartsubstanzverlust in µm umgerechnet. Zum anderen erfolgte die Bestimmung des Gesamtmineralgehaltes der Proben mit der longitudinalen Mikroradiographie und wurde als Substanzverlust in µm angegeben.

Zu Beginn des Versuches wurden mikroradiographische Aufnahmen angefertigt um den Ausgangsmineralgehalt der jeweiligen Probe zu quantifizieren. Nach der erosiven Demineralisation sowie nach der abschließenden Behandlung mit

Kollagenase wurden weitere mikroradiographische Aufnahmen angefertigt. Es wurden jeweils die Veränderungen im Mineralgehalt bestimmt und als Differenz zum Ausgangswert in  $\mu\text{m}$  ausgedrückt. Zusätzlich wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von zufällig ausgewählten Proben angefertigt.

Bei dem Vergleich der Messmethoden wurden zum Teil erhebliche Unterschiede deutlich. Mit der Kalziumanalyse zeigte sich von Messzeitpunkt zu Messzeitpunkt ein deutlicher Anstieg im Mineralverlust. So betrug der durchschnittliche Substanzverlust mit der Kalziumanalyse nach 30 Minuten Erosion  $15,9 \pm 4,6 \mu\text{m}$ , nach 60 Minuten  $30,3 \pm 10,8 \mu\text{m}$ , nach 90 Minuten  $49,3 \pm 13,7 \mu\text{m}$  und nach 120 Minuten  $55,4 \pm 11,5 \mu\text{m}$ .

Im Gegensatz dazu zeigten die mit der longitudinalen Mikroradiographie (LMR) ermittelten Werte weder vor noch nach der enzymatischen Entfernung der organischen Matrix einen Anstieg des Mineralverlustes. Die Werte lagen nach 30 Minuten Erosion bei  $29,8 \pm 7,5 \mu\text{m}$ , nach 60 Minuten bei  $27,0 \pm 12,4 \mu\text{m}$ , nach 90 Minuten bei  $26,8 \pm 14,0 \mu\text{m}$  und nach 120 Minuten bei  $38,4 \pm 13,3 \mu\text{m}$ . Nach der Kollagenasebehandlung betrug der ermittelte Substanzverlust nach 30 Minuten  $27,8 \pm 14,2 \mu\text{m}$ , nach 60 Minuten  $31,0 \pm 20,6 \mu\text{m}$ , nach 90 Minuten  $36,7 \pm 15,2 \mu\text{m}$  und nach 120 Minuten  $36,5 \pm 12,2 \mu\text{m}$ .

Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Kalziumanalyse zur Bestimmung des Mineralverlustes sensitiv genug war und somit ein geeignetes Verfahren hinsichtlich dieser Fragestellung zu sein scheint.

Im Gegensatz dazu stellte die longitudinale Mikroradiographie bezüglich der Quantifizierung von Mineralverlusten dieser Größenordnung kein zuverlässiges Testverfahren dar. Mit diesem Messverfahren war es nicht möglich, Veränderungen im Mineralgehalt zu erfassen.

## 8. Summary

An acid impact on dentine leads to a dissolution of mineral and to an exposure of the organic fraction, which remains on the surface, whilst the demineralisation progresses. The organic matrix can interfere with measuring methods possibly influencing the quantification of tissue loss. To quantify mineral loss adequately, the removal of the organic fraction prior to measurement is required by some methods. The removal of the organic fraction by collagenase is quite time consuming and destructive, therefore, a method would be desirable that does not require such a pre-treatment. Both calcium analysis and longitudinal microradiography, are methods, which fulfil this requirement.

Aim of the present study was to compare two methods, longitudinal microradiography and calcium analysis, for the quantification of erosive mineral loss. Mineral loss was determined after various periods of erosive demineralisation and additionally after enzymatic removal of the organic matrix. The results are discussed in the light of the histology of dentine erosion.

From human third molars a total of 100 longitudinal coplanar dentine slices with a thickness of 800  $\mu\text{m}$  were prepared. The specimens were covered with light curing acrylate except for a defined experimental area of 2 mm  $\times$  2 mm. Erosive demineralization was performed with 0.05 M citric acid (pH 2.5) in scintillation vessels (10 ml each) for 30, 60, 90 and 120 minutes, respectively.

Erosive mineral loss was firstly determined as calcium concentration in the erosion solution by atomic absorption spectroscopy. Spatial tissue loss was calculated from the measured values of the dissolved calcium and expressed in  $\mu\text{m}$ . Total mineral content was also determined by longitudinal microradiography at baseline, after erosive demineralisation and after enzymatic removal of the organic surface layer. Mineral loss was calculated as the difference between the mineral content at the various exposure time points and expressed in  $\mu\text{m}$ . Additionally, scanning electron microscopy was performed on randomly selected specimens.

The comparison of the measuring methods showed gross differences. Calcium analysis revealed a considerable linear increase of mineral loss with increasing erosion time. The average mineral loss determined by calcium-analysis was  $15.9 \pm 4.6 \mu\text{m}$ ,  $30.3 \pm 10.8 \mu\text{m}$ ,  $49.3 \pm 13.7 \mu\text{m}$  and  $55.4 \pm 11.5 \mu\text{m}$  at 30, 60, 90 and 120 minutes erosion time.

In contrast, mineral loss determined by longitudinal microradiography showed no increase, neither before nor after the enzymatic removal of the organic fraction. The average mineral loss prior to collagenase treatment was  $29.8 \pm 7.5 \mu\text{m}$ ,  $27.0 \pm 12.4 \mu\text{m}$ ,  $31.0 \pm 20.6 \mu\text{m}$  and  $38.4 \pm 13.3 \mu\text{m}$  at 30, 60, 90 and 120 minutes erosion time. After matrix digestion mineral loss was  $27.8 \pm 14.2 \mu\text{m}$ ,  $31.0 \pm 20.6 \mu\text{m}$ ,  $36.7 \pm 15.2 \mu\text{m}$  and  $36.5 \pm 12.2 \mu\text{m}$  at 30, 60, 90 and 120 minutes erosion time.

The results indicate that the calcium-analysis is supposed to be a method, which is sensitive enough to determine the loss of mineral and which is applicable regarding the question under study.

Longitudinal microradiography, however, was not a reliable method regarding the quantification of mineral loss in the dimension produced by the erosive protocol. This method was not able to detect changes in mineral content, neither before nor after collagenase treatment.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen und der gedruckten Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the electronic and printed version of the paper.**

## 9.2 Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Carolina Ganß, Oberärztin der Poliklinik für Zahnerhaltungskunde und Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des Universitätsklinikums Gießen für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, ebenso wie die überaus nette und kompetente Betreuung und Unterstützung sowie für die Motivation in allen Abschnitten der Dissertation.

Auch Herrn Dr. Martin Hardt und Frau Birgit Meier danke ich, für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Geräte.

Herrn Prof. Dr. Adrian Lussi, Direktor der Klinik für Zahnerhaltung, Präventiv- und Kinderzahnmedizin an den Zahnmedizinischen Kliniken der Universität Bern, danke ich sehr für die Bestimmung der Kalziumkonzentration.

Ein ganz besonderer Dank gilt dennoch Frau Dr. Nadine Schlüter für ihre unermüdliche Unterstützung in wissenschaftlichen, praktischen und formalen Fragen. Für die unterstützenden Worte, die zahlreichen wertvollen Anregungen und die große Hilfe werde ich immer dankbar sein.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir das Studium ermöglicht und mich auf meinem Lebensweg immer unterstützt und ermutigt hat.

Zuletzt einen liebevollen Dank an meinen Mann Christoph, der mir seit Anbeginn meines Zahnmedizinstudiums mit allen Höhen und Tiefen stets zur Seite stand.

### **9.3 Publikation**

Ganss C, Lussi A, Scharmann I, Weigelt T, Hardt M, Klimek J, Schlueter N.

Caries Res. 2009;43(6):422-9

Comparison of calcium analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosion in dentine.

# Comparison of Calcium Analysis, Longitudinal Microradiography and Profilometry for the Quantitative Assessment of Erosion in Dentine

C. Ganss<sup>a</sup> A. Lussi<sup>c</sup> I. Scharmann<sup>a</sup> T. Weigelt<sup>a</sup> M. Hardt<sup>b</sup> J. Klimek<sup>a</sup>  
N. Schlueter<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Conservative and Preventive Dentistry, Dental Clinic, and <sup>b</sup>Central Biotechnology Unit, Electron Microscopy Laboratory, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany; <sup>c</sup>Department of Preventive, Restorative and Paediatric Dentistry, School of Dental Medicine, University of Bern, Bern, Switzerland

## Key Words

Calcium analysis · Erosion, dentine · Longitudinal microradiography · Profilometry

## Abstract

Erosion of dentine causes mineral dissolution, while the organic compounds remain at the surface. Therefore, a determination of tissue loss is complicated. Established quantitative methods for the evaluation of enamel have also been used for dentine, but the suitability of these techniques in this field has not been systematically determined. Therefore, this study aimed to compare longitudinal microradiography (LMR), contacting (cPM) and non-contacting profilometry (ncPM), and analysis of dissolved calcium (Ca analysis) in the erosion solution. Results are discussed in the light of the histology of dentine erosion. Erosion was performed with 0.05 M citric acid (pH 2.5) for 30, 60, 90 or 120 min, and erosive loss was determined by each method. LMR, cPM and ncPM were performed before and after collagenase digestion of the demineralised organic surface layer, with an emphasis on moisture control. Scanning electron microscopy was performed on randomly selected specimens. All measurements were converted into micrometres. Profilometry was not suitable to adequately quantify mineral loss prior to collagenase digestion. After 120 min of erosion, values of  $5.4 \pm 1.9 \mu\text{m}$  (ncPM) and  $27.8 \pm 4.6 \mu\text{m}$  (cPM) were determined. Ca analysis revealed a mineral loss of  $55.4 \pm 11.5 \mu\text{m}$ . The values for

profilometry after matrix digestion were  $43.0 \pm 5.5 \mu\text{m}$  (ncPM) and  $46.9 \pm 6.2$  (cPM). Relative and proportional biases were detected for all method comparisons. The mineral loss values were below the detection limit for LMR. The study revealed gross differences between methods, particularly when demineralised organic surface tissue was present. These results indicate that the choice of method is critical and depends on the parameter under study.

Copyright © 2009 S. Karger AG, Basel

Various methods have been used for the quantification of erosive mineral loss [Barbour and Rees, 2004; Atin, 2006], and these have different strengths and weaknesses. A widely used procedure is profilometry, which mirrors the bulk tissue loss occurring after erosive impacts and is the most illustrative method when the clinical appearance of erosive defects is considered. Profilometry is easy to perform and can assess both initial surface changes and advanced tissue loss. This method is appropriate for the evaluation of enamel since the subsurface changes in mineral content are relatively small. In contrast, dentine erosion has a complex histology that is characterised by centripetal mineral loss beginning in the peritubular areas and followed by intertubular demineralisation. Finally, a zone of fully demineralised dentine develops that can be relatively thick and is stable while hydrated [Kinney et al., 1995]. This histological fea-

ture indicates that there is no bulk tissue loss. Instead, there is a demineralised organic surface layer, on the outer aspect continuous with the original surface and on the inner aspect separated from the underlying fully mineralised tissue by a thin partly demineralised band. Therefore, profilometry is difficult to utilize for the quantification of the mineral status due to the presence of this organic material on the specimen surface and the inability to detect mineral loss or uptake in the tubular structure of the tissue. Longitudinal microradiography (LMR) [de Josselin de Jong et al., 1988] may be suitable as it is not subject to these limitations. However, this method was primarily established and validated for enamel and has rarely been used for dentine. In principle, microradiography reflects the change in the X-ray absorption properties of the tissue under study and yields information on the total mineral content of a given specimen. With LMR, a defined specimen area can be repeatedly and non-destructively analysed to determine the total mineral content per unit tooth area, and the mineral loss or gain can be compared with baseline values. However, LMR gives no information about the mineral content as a function of depth, which could be of particular importance in dentine. Modifications of transversal microradiography have been applied for the analysis of erosion [Hall et al., 1997; Amaechi et al., 1998], but both approaches require relatively thin sections that are not suitable for combined erosion/abrasion experiments and necessitate prolonged radiation times. A further established method is the quantification of mineral loss by analysis of calcium or phosphate released into the dissolving solution. Like LMR, this method yields no information regarding the structure of the remaining tissue, but has the advantage of being highly sensitive.

These methodology issues have not been systematically evaluated for dentine. In particular, the role of the organic portion of the tissue has not been adequately studied.

The present study sought to compare the quantitative results of tissue loss after various erosive challenges in dentine obtained by the following methods: (1) profilometry with both a contacting (cPM) and a non-contacting (ncPM) device, (2) LMR and (3) the chemical analysis of calcium in the dissolving solution. Profilometry and microradiography were performed before and after the enzymic removal of the demineralised organic surface layer. Scanning electron microscopy (SEM) was performed in randomly selected specimens in order to visualise the histological structures and to verify that the organic matrix was completely removed by enzymic digestion.

## Materials and Methods

### *Preparation of Dentine Specimens*

From previously impacted human third molars, plane-parallel longitudinal slices of coronal dentine were prepared (thickness: 800  $\mu\text{m}$ ; Exact Trennschleifsystem and Exact Mikroschleifsystem, Exakt-Apparatebau, Norderstedt, Germany) and polished with P4000 (nominal grain diameter: 5  $\mu\text{m}$ ; Leco, St. Joseph, Mich., USA). All grinding and polishing procedures were performed with a water-cooled grinding machine (Exact Mikroschleifsystem; Exakt-Apparatebau). The experimental area was covered with a square piece of tape (2  $\times$  2 mm), and the 4 edges of this area were marked with small holes (diamond bur ISO No. 806 314 540534009; Komet, Lemgo, Germany) for identification in the microradiography system. The specimens were then completely covered with a light curing acrylate (Technovit 7230 VLC; Kulzer-Exakt, Wehrheim, Germany). Afterwards, the tape was carefully removed with a scalpel to achieve precise margins of the experimental area, which was inspected with a stereomicroscope (magnification:  $\times 10$ ; SMZ-1 stereomicroscope; Nikon, Düsseldorf, Germany) to ensure that the surface was clean. The acrylic protected the reference area during erosion and was completely removed with a scalpel after the erosion treatment. Finally, the experimental and reference areas were thoroughly checked with a stereomicroscope for any remnants. The specimens were maintained at 100% humidity and room temperature until they were submitted to further measurement procedures.

### *Erosive Demineralisation*

Each specimen was immersed in 10 ml of 0.05 M citric acid (pH 2.5), in 20-ml plastic scintillation vials (Massanalytische Glas- und Laborgeräte Vertriebsgesellschaft, Rabenau, Germany) at 37°C and under constant agitation on a shaker (horizontal movement; frequency: 35/min). Erosion times were 30, 60, 90 or 120 min, and the group size was 25 each (total  $n = 100$ ). Immediately after immersion in acid, the plastic tubes were thoroughly sealed and stored at room temperature until chemical analysis. In the following, the erosive loss of each individual specimen was quantified by each of the 4 methods. Four groups of 5 additional specimens (total  $n = 20$ ) were eroded for time periods of 30, 60, 90 and 120 min, respectively, for SEM.

### *Longitudinal Microradiography*

LMR was performed as described by de Josselin de Jong et al. [1988]. X-ray projections (CuK $\alpha$  X-ray radiation operated at 20 kV and 50 mA; exposure time: 2.5 min) were performed on a high-resolution film (high-speed holographic film, Fuji positive, purchased via Inspector Research Systems BV, Amsterdam, The Netherlands) at baseline and after erosive demineralisation. The films were developed under standard conditions, in accordance with the recommendations of the manufacturer. From the resulting images, the mineral content was calculated using a computer-controlled microdensitometer (scan area: 1  $\times$  1 mm; Leitz MPV Compact Ortholux II; Leitz, Wetzlar, Germany). The holes, which could be easily identified on the images, assured that the scan area was situated within the experimental area. The erosive mineral loss was automatically calculated by the LMR software and expressed in micrometres. A repeated analysis of X-ray projections of the same specimen on different films ( $n = 15$ ) yielded a standard deviation of 11.4  $\mu\text{m}$ .

The software calculates under the assumption that the specimen consists of 100% mineral and that the mineral consists of stoichiometric hydroxyapatite (HA). To convert this value to spatial tissue loss based on the portion of mineral in dentine, the thickness of all individual specimens ( $d_{\text{micro}}$ ) was determined with a micrometre screw (Mitutoyo, Tokyo, Japan) and related to the value of specimen thickness obtained by the LMR software ( $d_{\text{LMR}}$ ). The mean  $d_{\text{micro}}/d_{\text{LMR}}$  ratio was  $1.98 \pm 0.06$  indicating a mineral content of  $50.6 \pm 1.6$  vol%. This value corresponds with values given in the literature [Nikiforuk, 1985; Frank and Nalbandian, 1989].

#### Contacting and Non-Contacting Profilometry

The profilometric procedure utilized was previously described [Ganss et al., 2005]. A Perthometer S8P (Perthen-Mahr, Göttingen, Germany) was equipped with a contacting (FRW-750) or non-contacting (Focodyn, Rodenstock, Germany) pick-up. Three tracings were performed in the following standardised manner: the stylus was first inserted into the hole, marking the edge of the experimental area, then positioned 0.7 mm away from the hole in the reference area and finally moved 0.75 mm along the lesion border. Three tracings, 250  $\mu\text{m}$  apart, were performed. The specimen surface was covered with distilled water for 30 s prior to each tracing. The water was removed with absorbent tissue without contacting the experimental area, and the surfaces were immediately traced. The tracings were interpreted with special software (Perthometer Concept 4.0; Perthen-Mahr). The vertical distance of the regression lines constructed in the reference and experimental areas was defined as tissue loss (in micrometres), and the loss of a given specimen was reported as the mean of the 3 tracings. For a specimen with a loss in the order of 20  $\mu\text{m}$ , 10 repeated analyses with the non-contacting device yielded a standard deviation of 0.8  $\mu\text{m}$ , and with the contacting device of 0.6  $\mu\text{m}$ . The respective values for a specimen with a loss in the order of 40  $\mu\text{m}$  were 0.7 and 1.1  $\mu\text{m}$ . With the organic matrix present, the standard deviation was 1.1  $\mu\text{m}$  for the non-contacting, and 1.9  $\mu\text{m}$  for the contacting device.

#### Chemical Analysis

The calcium concentration in the erosion solution was determined by atomic absorption spectroscopy (Instrumentation Laboratory AA/AE Spectrophotometer IL 157), performed in the presence of lanthanum (0.1%) to suppress interference by phosphate. Repeated measurements yielded a standard deviation of 2%. Mineral loss was calculated from the calcium concentration under the assumption that dentine mineral consists of stoichiometric HA:

$$\text{Mineral loss } (\mu\text{g}) = \frac{\text{Ca concentration (mmol/l)} \times \text{volume of erosion solution} \times \text{relative atomic mass}}{\text{Mass fraction of Ca in HA}}$$

where volume of erosion solution = 10 ml and mass fraction of calcium in HA = 0.399 [Nikiforuk, 1985]. Erosive loss was then determined as:

$$\text{Erosive loss } (\mu\text{m}) = \frac{\text{Mineral loss } (\mu\text{g})}{\text{Density of dentine (g/cm}^3) \times \text{Experimental area (mm}^2)}$$

where density of dentine = 2.35  $\text{g/cm}^3$  [Nikiforuk, 1985]. The experimental area was measured with a microscope (Leica M420; Leitz) connected to a measuring device (Mitutoyo).

#### Removal of Organic Matrix

Collagenase obtained from *Clostridium histolyticum* type VII (100 units/ml; Sigma Aldrich, St. Louis, Mo., USA), with a collagen digestion activity of 1,680 units/ $\mu\text{g}$  solid at 25°C and a pH of 7.5 in the presence of calcium ions, was dissolved in a mineral solution consisting of 4.08 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 20.10 mM KCl, 11.90 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  and 1.98 mM  $\text{CaCl}_2$  (chemicals from Merck) with a pH of 6.7 [Gerrard and Winter, 1986]. Specimens were immersed in the solution for 96 h at 37°C under constant agitation.

#### Scanning Electron Microscopy

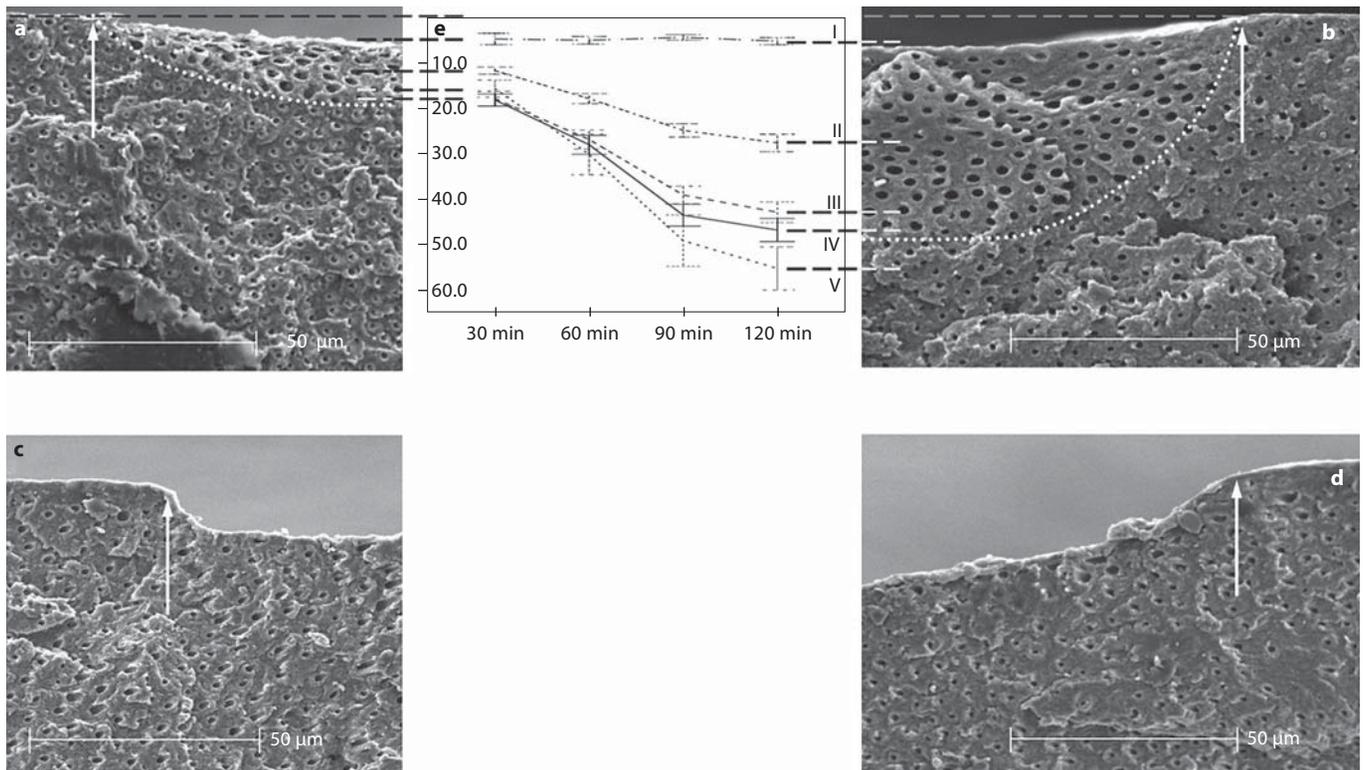
From all groups, 5 specimens were randomly selected after matrix digestion, and the 5 additional specimens that had been submitted to 30, 60, 90 and 120 min of erosion, each without matrix digestion, were used for SEM. Specimens were fractured into halves, critical-point dried (Critical Point Dryer CPD 030; Baltec, Witten, Germany) and lightly gold sputtered. Cross-sections were inspected by the use of a SEM (type XL20; Philips Electron Optics, Eindhoven, The Netherlands) equipped with an  $\text{LaB}_6$  cathode. The acceleration voltage was set to 10 kV. Images were recorded using a secondary electron detector, with the voltage of the collector grid biased to +300 V in order to improve the signal-to-noise ratio and to reveal optimal topographical contrast. The settings of the SEM for tilt angle, spot size and scanning mode were constant. The magnification was set at 500-fold.

#### Statistical Methods

Statistical procedures were performed with SPSS 17.0 statistics software (SPSS GmbH, Munich, Germany). The Shapiro-Wilk test revealed no significant deviation from the gaussian distribution. Differences between erosion times within the methods were analysed with ANOVA. Tamhane's post hoc test was used since there was a significant deviation from homogeneity of variance (Levene's test). The methods were compared with Bland-Altman plots, in which the x-axis represents the mean of the results obtained by the methods on comparison, and the y-axis represents the absolute difference between the 2 methods [Bland and Altman, 2003]. A relative bias is indicated when the difference of the means ( $\delta$ ) significantly differs from 0 by the one-sample t test, a proportional bias is indicated when the ordinary least squares regression line fitted to the plot has a slope that differs significantly from 0 [Ludbrook, 2002]. In all analyses, the significance level was set at  $p = 0.05$ .

## Results

For the evaluation of tissue loss over time (table 1; fig. 1e), all methods revealed significantly increasing tissue loss from 30 to 60 and 60 to 90 min of erosion time ( $p \leq 0.001$  for all methods), with the exception of LMR and ncPM before matrix digestion. Importantly, there was no further increase from 90 to 120 min of erosion time ( $p > 0.05$  for all methods, except LMR before matrix di-



**Fig. 1.** SEM images of specimens after erosion for 30 min (**a, c**) and 120 min (**b, d**) before (**a, b**) and after (**c, d**) removal of the demineralised surface layer by digestion with collagenase. Dotted white lines in **a** and **b** indicate the boundary between demineralised organic material and sound tissue. Arrows in **a–d** indicate the boundary between reference and experimental area. **e** Results obtained by ncPM before (I) and after (III) collagenase, by cPM be-

fore (II) and after (IV) collagenase and by Ca analysis (V) over time. All loss values are shown in micrometres as mean and 95% confidence interval. Hatched lines connecting the graph (**e**) and the SEM pictures (**a, b**) represent the means of I–V and demonstrate the relation of the loss values after 30 and 120 min erosion time to the histological structure of the respective specimens. The scale of the graph corresponds to that of the SEM pictures.

**Table 1.** Erosive loss values obtained by ncPM, cPM, LMR and Ca analysis

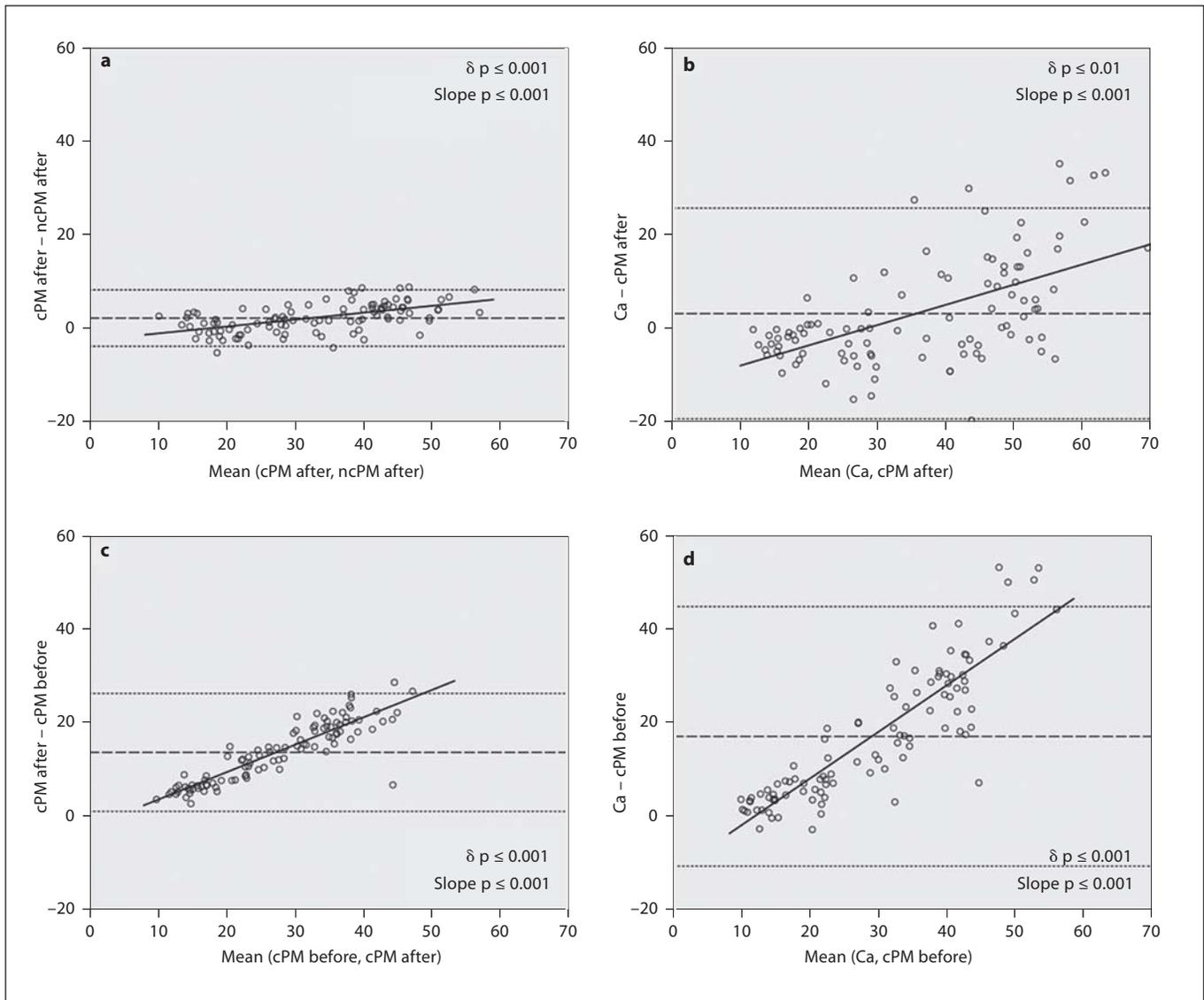
Erosion time	Before matrix digestion, $\mu\text{m}$			After matrix digestion, $\mu\text{m}$			Ca analysis, $\mu\text{m}$
	ncPM	cPM	LMR	ncPM	cPM	LMR	
30 min	$5.0 \pm 3.0^a$	$11.9 \pm 1.9^a$	$29.8 \pm 7.5^{a,b}$	$18.1 \pm 3.9^a$	$18.3 \pm 3.2^a$	$27.8 \pm 14.2^a$	$15.9 \pm 4.6^a$
60 min	$5.3 \pm 2.0^a$	$18.1 \pm 2.7^b$	$27.0 \pm 12.4^a$	$27.1 \pm 5.0^b$	$28.2 \pm 5.0^b$	$31.0 \pm 20.6^a$	$30.3 \pm 10.8^b$
90 min	$4.6 \pm 5.8^a$	$25.1 \pm 3.5^c$	$26.8 \pm 14.0^a$	$39.2 \pm 4.7^c$	$43.7 \pm 5.8^c$	$36.7 \pm 15.2^a$	$49.3 \pm 13.7^c$
120 min	$5.4 \pm 1.9^a$	$27.8 \pm 4.6^c$	$38.4 \pm 13.3^b$	$43.0 \pm 5.5^c$	$46.9 \pm 6.2^c$	$36.5 \pm 12.2^a$	$55.4 \pm 11.5^c$

Values denote means  $\pm$  SD. Within columns (between time points), means sharing the same superscript letter are not significantly different.

gestion). LMR did not detect changes in mineral content over time and ncPM prior to matrix digestion did not reveal a noticeable spatial tissue loss.

The most distinct differences between the methods were observed prior to matrix digestion. Losses obtained

by ncPM were much lower than those by cPM, and neither method reached the range of values obtained by Ca analysis. After collagenase treatment, the loss values for both cPM and ncPM increased. The values from both profilometric procedures were similar. In particular, the



**Fig. 2.** Bland-Altman plots. Differences between ncPM and cPM (a), Ca analysis (Ca) and cPM after matrix digestion (cPM after) (b), cPM before matrix digestion (cPM before) and cPM after (c), and Ca and cPM before (d). Dashed lines = mean difference ( $\delta$ ); dotted lines = 95% confidence interval; solid lines = ordinary least squares regressions.

values from cPM were in accordance with those obtained by Ca analysis. The loss values obtained by ncPM were somewhat lower than those obtained by Ca analysis following 90 and 120 min of erosion.

Significant relative and proportional biases were found for all methods when agreement was estimated by Bland-Altman plots (fig. 2a–d), particularly when cPM before matrix digestion was compared to cPM after matrix digestion and to Ca analysis (fig. 2c, d). By cPM before matrix digestion, 95% of all measurements were between

10.6 units higher and 44.6 units lower than those obtained by Ca analysis, and 95% of all measurements were between 1.0 and 26.1 units lower than those obtained by cPM after matrix digestion.

After the removal of the matrix, cPM and ncPM revealed only a small, albeit significant, relative bias. However, a significant proportional bias was present, indicating lower values for ncPM at higher loss values (fig. 2a). A small relative bias was also detected when cPM was compared to Ca analysis (fig. 2b), but with a greater con-

fidence interval; 95% of the values from cPM would be 19.2 units higher and 25.9 units lower than those obtained by Ca analysis. The proportional bias indicated that Ca analysis yielded higher values than cPM at higher loss values.

#### *Scanning Electron Microscopy*

A distinct zone of demineralisation was found in all specimens prior to matrix digestion, which was demarcated from the sound tissue by slight surface shrinkage and by increased tubule diameter, and increased in thickness with increasing erosion times. The surface level of the demineralised tissue almost reached the level of the reference area (fig. 1a, b). After matrix digestion, a clear step was visible between the untreated reference area and the experimental area (fig. 1c, d). The demineralised tissue was completely removed. Minor signs of the demineralisation of the remaining mineralised tissue were present, and small remnants of organic material persisted on the surface of some specimens.

#### **Discussion**

The quantification of dentine erosion is challenging since these lesions have a complex histology that is primarily characterised by a completely demineralised surface zone, which can be of significant thickness and is resistant to physicochemical impacts [Ganss et al., 2009]. The presence of this layer not only interferes with the determination of the underlying mineralised tissue, but also indicates a considerable susceptibility to dimensional changes under ambient air [Ruben and Arends, 1993; Ganss et al., 2007].

The present study aimed to address both these aspects by analysing the specimens in the stage in which these characteristics appear after the erosive demineralisation, both with the demineralised organic material remaining on the specimen surface and after the enzymic digestion of these structures to expose the demineralisation front. The collagenase used for this purpose consists of at least seven distinct collagenases, which differ in their mode of attack on native collagen. Therefore, these collective enzymes degrade collagen non-specifically. Previous studies have demonstrated that collagenase digestion selectively removes the demineralised tissue [Ganss et al., 2007]. In the present study, this result was confirmed by SEM visualisation. Further, particular attention was paid to moisture control. The specimens were permanently stored in humidity and were re-wetted during profilom-

etry prior to each tracing. Earlier experiments have shown that a re-wetting time of 30 s is sufficient to achieve a complete recovery of dehydrated demineralised surface structures [Ganss et al., 2007]. The erosion times were chosen to display 4 progressive stages of erosion to cover a range of commonly used experimental settings, according to the literature, and to permit comparison with the results of other publications [Ganss et al., 2005; Hara et al., 2005].

For the purpose of comparison, the results of calcium analysis and LMR were converted to a loss of mineralised dentine tissue in micrometres. When doing so, for instance, assumptions about density or mineral content, on which varying data exist, are necessary, and the results should be interpreted accordingly. When using these methodologies for describing a study, it is of course more appropriate to use the inherent units.

When analysing eroded dentine, the question under study must be carefully regarded. Considering its histology, tissue loss is not easy to be defined because both mineral and spatial tissue loss are possible target variables. The latter would include the demineralised organic part of the tissue. There is only little knowledge about the relevance of these structures, for instance, with respect to their capability to remineralise [Klont and ten Cate, 1991a; Hara et al., 2008]. Further, it is unknown to which extent such a matrix layer would occur in vivo. Therefore, and also when the focus of the current literature is considered, it appears reasonable to define dentine loss as the loss of mineralised tissue, ignoring the persisting organic fraction. The methods are discussed in the following, under the assumption that loss of mineral is the parameter under study.

Under the erosive conditions chosen here, a loss of mineral over time occurred, but LMR was not able to detect changes in mineral status either before or after treatment with collagenase. Dentine is less mineralised than enamel. Loss values of up to 50  $\mu\text{m}$  in the present study would mean a mineral equivalent of 25  $\mu\text{m}$ , under the assumption that the mineral fraction in dentine is 50 vol%. Given that mineral loss in enamel in the order of 20  $\mu\text{m}$  was not reliably detected by LMR [Ganss et al., 2005], the mineral loss obtained under the experimental conditions chosen here was most likely below the detection limit of the method. This finding leads to the conclusion that LMR has limited application in studies of dentine erosion.

ncPM was also unable to detect changes in mineral status unless the organic matrix was removed. This result can be explained by the hydration of the matrix under the

chosen conditions, which thus nearly represents the original specimen surface (fig. 1e). The small values for loss are most likely due to dimensional changes in the matrix during the time needed for focusing the system and performing the tracing. cPM revealed significantly higher values than the non-contact approach. Importantly, these values did not reach the order of values obtained after collagenase treatment, which indicates that the mechanical stylus had not penetrated the matrix deeply enough to reach the demineralisation front even by the shortest erosion time (fig. 1a, b, e). The Bland-Altman plot clearly demonstrated that there was a distinct bias towards lower loss values with increasing mineral loss for values obtained before matrix digestion. The stylus most likely carves into the matrix to a certain extent, regardless of its thickness. The recession of the mineral front is therefore not proportionally mirrored, which could be particularly important for experiments with wide ranges of mineral loss.

Both ncPM and cPM revealed comparable results after matrix digestion even if a small significant relative bias was detected. It must, however, be considered that, particularly in the presence of a proportional bias, the method of plotting differences against means, as with the Bland-Altman plot, is at risk of overdiagnosing relative bias [Ludbrook, 2002], and also that the conclusion that methods agree sufficiently is not a statistical decision. In addition to the small relative bias, there was a tendency towards relatively lower values at higher mineral loss for the non-contacting device. This finding is most likely due to small remnants of organic material retained on the specimen surface, which occur more often with a thicker matrix. These remnants are pushed aside by the mechanical stylus, resulting in a more valid value for the mineral loss.

The results of both ncPM and cPM for erosion times of 30 and 60 min were in good accordance with the values obtained by calcium analysis. For more advanced stages

of mineral loss, the loss values obtained by calcium analysis were somewhat higher than those obtained by profilometry. The calcium in the demineralisation solution also includes mineral dissolved by acid diffusion along the tubular structures of the tissue. This is supported by the SEM findings; in figure 1d, enlarged tubules are visible near the surface, indicating peritubular demineralisation, which was not determined by profilometry.

As mentioned above, information regarding the demineralised organic matrix could also be of interest. The difference between the values obtained by ncPM before and cPM after matrix digestion could be calculated to determine the thickness of the demineralised layer. In the present experiment, the thickness of this layer would have been estimated as 13, 23, 39 and 42  $\mu\text{m}$  after 30, 60, 90 and 120 min of erosion, respectively.

The determination of the demineralised tissue thickness could be important, for instance, in studies on the effects of intraoral proteolytic enzymes on eroding dentine. Until now, enzyme effects have mostly been verified by measuring the degradation products in the enzyme solution [Klont and ten Cate, 1991b; Schlueter et al., 2007], which provides information regarding the amount of collagen digested, but not about the demineralised structures remaining in the specimen.

In conclusion, gross differences between microradiography, profilometry and chemical analyses of a dissolved mineral were observed, particularly in the presence of demineralised surface tissue. Therefore, an adequate selection and operation of methods according to the parameter under study is essential.

## Acknowledgement

B. Megert from the Department of Preventive, Restorative and Paediatric Dentistry, School of Dental Medicine, University of Bern, Bern, Switzerland, performed the calcium analysis. We gratefully thank her for her excellent work.

## References

- 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.
- Attin T: Methods for assessment of dental erosion. *Monogr Oral Sci* 2006;20:152–172.
- Barbour ME, Rees JS: The laboratory assessment of enamel erosion: a review. *J Dent* 2004;32: 591–602.
- Bland JM, Altman DG: Applying the right statistics: analyses of measurement studies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003;22:85–93.
- de Josselin de Jong E, van der Linden AH, Borsboom PC, 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.
- Frank RM, Nalbandian J: Structure and ultrastructure of dentine; in Berkovitz BK, Boyde A, Frank RM, Höhling HJ, Moxham BJ, Nalbandian J, Tonge CH (eds): *Handbook of Microscopic Anatomy*. Berlin, Springer, 1989, vol 6: Teeth, pp 173–247.
- Ganss C, Hardt M, Blazek D, Klimek J, Schlueter N: Effects of tooth brushing force on the mineral content and demineralised organic matrix of eroded dentine. *Eur J Oral Sci* 2009;117:255–260.

- 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.
- 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.
- Gerrard WA, Winter PJ: Evaluation of tooth-pastes by their ability to assist rehardening of enamel in vitro. *Caries Res* 1986;20:209–216.
- Hall AF, Sadler JP, Strang R, de Josselin de Jong E, Foye RH, Creanor SL: Application of transverse microradiography for measurement of mineral loss by acid erosion. *Adv Dent Res* 1997;11:420–425.
- Hara AT, Ando M, Cury JA, Serra MC, Gonzalez-Cabezas C, Zero D: Influence of the organic matrix on root dentine erosion by citric acid. *Caries Res* 2005;39:134–138.
- Hara AT, Karlinsey RL, Zero DT: Dentine remineralization by simulated saliva formulations with different Ca and P<sub>i</sub> contents. *Caries Res* 2008;42:51–56.
- 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.
- Klont B, ten Cate JM: Remineralisation of bovine incisor root lesions in vitro: the role of the collagenous matrix. *Caries Res* 1991a;25:39–45.
- Klont B, ten Cate JM: Susceptibility of the collagenous matrix from bovine incisor roots to proteolysis after in vitro lesion formation. *Caries Res* 1991b;25:46–50.
- Ludbrook J: Statistical techniques for comparing measurers and methods of measurement: a critical review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29:527–536.
- Nikiforuk G: *Understanding Dental Caries*. Basel, Karger, 1985.
- Ruben J, Arends J: Shrinkage of sound and demineralized human coronal dentine slabs. *Caries Res* 1993;27:266–270.
- Schlueter N, Ganss C, Hardt M, Schegietz D, Klimek J: Effect of pepsin on erosive tissue loss and the efficacy of fluoridation measures in dentine in vitro. *Acta Odontol Scand* 2007;65:298–305.