

Aus der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H.-G. Schaller)

und dem Institut für Physiologische Chemie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Th. Braun)



**Versuche zu Reifungs- und Mineralisationsvorgängen mit  
anorganischen und organischen Kalziumphosphat-Lösungen  
an Zahnhartgeweben**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Stephan Werner Koch  
geboren am 02.09.1976 in Erfurt

Betreuer: Prof. Dr. A. Stiefel und PD Dr. C. Beyer

Gutachter: 1. PD Dr. Beyer  
2. Prof. Dr. Glockmann (Jena)  
3. Prof. Dr. Beetke (Rostock)

verteidigt am 15.07.2003

**urn:nbn:de:gbv:3-000005289**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005289>]

Um die Mineralisationsvorgänge an Zahnhartgeweben, insbesondere die posteruptive Schmelzreifung zu studieren, wurde im ersten Versuchsabschnitt ein pH-cycling-Experiment über 4 bzw. 8 Wochen durchgeführt. Im zweiten Versuchsabschnitt fand gepooltes menschliches Blutserum, als von organischen Verbindungen physiologischen Ursprungs dominierte Lösung, Verwendung.

An 55 Zähnen erfolgte im pH-cycling-System der Wechsel zwischen De- und Remineralisation. 40 Zähne dienten den Versuchen im zweiten Abschnitt, der sich in 4 Untergruppen zu jeweils 10 Zähnen mit verschiedenen Lösungsansätzen untergliederte. Die Versuchslösungen setzten sich aus menschlichem Serum, Natriumfluorid und einer synthetischen Kalziumphosphat-Lösung zusammen.

An den Schliffpräparaten der Versuchszähne erfolgten polarisationsmikroskopische und rasterelektronenmikroskopische Auswertungen. Die Mikrohärtigkeit der Zahnhartgewebe und die Tiefe der artifiziellen Läsionen wurden bestimmt. An ausgewählten Präparaten konnten das Ca/P-Verhältnis berechnet und die Raman-Spektren erfasst werden.

Die Bestimmung der Mikrohärtigkeitsprofile erwies sich als sensitive Methode, um Veränderungen im Mineralgehalt der zuvor unbehandelten Versuchsareale festzustellen. Dabei zeigte sich, dass die Lösungsansätze mit Serum und Serum mit Natriumfluorid in der Lage sind, die Einlagerung von Mineralien in unreifen Schmelz zu fördern. Diese Einlagerung konnte im pH-cycling-Versuch nicht beobachtet werden. Daher ist davon auszugehen, dass auch im intraoralen Milieu die proteinogenen Verbindungen einen größeren Anteil an der Schmelzreifung haben, als bisher vermutet wurde.

Im Wurzelbereich konnte keine Reifung der Zahnhartgewebe erreicht werden. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass sowohl das pH-cycling als auch die 4 Lösungsansätze des zweiten Versuchsabschnittes die subfiziellen Läsionen zu remineralisieren vermögen. Es wurde jedoch kein Zusammenhang zwischen der Effektivität der Remineralisation und der Fähigkeit zu Mineraleinlagerungen in nicht demineralisierte Zahnhartgewebe deutlich.

Trotz des schwankenden Ca/P-Verhältnisses konnte eine durch Mineralisationsvorgänge hervorgerufene Umwandlung der Bindungsverhältnisse zwischen Kalzium- und Phosphationen mit Hilfe der Mikro-Raman-Spektroskopie nicht gefunden werden.

Koch, Stephan: Versuche zu Reifungs- und Mineralisationsvorgängen mit anorganischen und organischen Kalziumphosphat-Lösungen an Zahnhartgeweben. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 78 Seiten, 2003

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Zielstellung</b>	<b>2</b>
<b>3. Grundlagen der Mineralisationsvorgänge an Zahnhartgeweben</b>	<b>3</b>
3.1. Anorganische Aspekte der Remineralisation und Maturation	3
3.1.1. Biologisch relevante Kalziumphosphate	3
3.1.2. Remineralisation subfizieller Läsionen	4
3.1.3. Posteruptive Schmelzreifung	6
3.1.4. PH-cycling	8
3.2. Biomineralisation von Zahnschmelz und Dentin	10
3.2.1. Extrazelluläre organische Verbindungen während der Amelogenese	10
3.2.2. Mineralisationsverhalten von nicht kollagenen Dentin-Matrix-Proteinen	13
3.2.3. Kollagen als Gerüst für die Mineralisation	14
3.2.4. Beeinflussung von Mineralisationsvorgängen durch Blutserum	16
<b>4. Material und Methode</b>	<b>19</b>
4.1. Vorbereitung und Demineralisation der Zähne	19
4.2. Experiment im pH-cycling-System	20
4.3. Experimente mit Blutserum	21
4.4. Auswertungsmethoden	22
4.4.1. Polarisationsmikroskopie	22
4.4.2. Läsionstiefenmessung	23
4.4.3. Mikrohärteprüfung	23
4.4.4. Rasterelektronenmikroskopie	24
4.4.5. EDX-Analyse am ESEM	24
4.4.6. Mikro-Raman-Spektroskopie	25
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>27</b>
5.1. Polarisationsmikroskopische Auswertung	27
5.2. Läsionstiefenmessung	34
5.3. Mikrohärteprüfung	35
5.4. Rasterelektronenmikroskopie	42
5.5. EDX-Analyse am ESEM	49
5.6. Mikro-Raman-Spektroskopie	54

	Seite
<b>6. Diskussion</b>	<b>57</b>
6.1. Diskussion der Methodik	57
6.2. Diskussion der Auswertungsverfahren	59
6.3. Diskussion der Ergebnisse	62
<b>7. Schlussfolgerungen</b>	<b>65</b>
<b>8. Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>9. Literaturverzeichnis</b>	<b>68</b>
<b>10. Thesen</b>	<b>77</b>

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACP	amorphes Kalziumphosphat
BSE	Rückstreuielektronen
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
DCPD	Dikalziumphosphatdihydrat
Diagr.	Diagramm
DMP 1	Dentin-Matrix-Protein 1
DSP	Dentin-Sialoprotein
EDX	energiedispersive Röntgenspektrometrie
EMSP 1	Schmelzmatrix-Serinproteinase 1
ESEM	Environmental scanning electron microscope
et al.	et alii
GAG	Glycosaminoglycan
Gla-Proteine	$\gamma$ -Carboxyglutamat-Proteine von Osteocalcin-Typ
HAP	Hydroxylapatit
LTsec	Lifetime-seconds
NCP	nicht kollagene Proteine
OCP	Oktakalziumphosphat
PG	Proteoglycane
PP-H	hochgradig phosphorylierte Proteine
SE	Sekundärelektronen
SPSS	„Statistical Package for the Social Sciences“
TCP	Trikalziumphosphat
Untergr.	Untergruppe
Wo.	Woche
z. B.	zum Beispiel

## 1. Einleitung

Seit nunmehr fast einem Jahrhundert widmet sich die zahnärztliche Forschung den Mineralisationsvorgängen in den Zahnhartgeweben. Prinzipiell zu unterscheiden sind die präeruptiven Vorgänge von den posteruptiv ablaufenden Veränderungen.

Präeruptiv erfolgt die Bildung der Zahnhartgewebe. Ameloblasten und Odontoblasten sind die Schmelz bzw. Dentin bildenden Zellen. Sie sezernieren neben anorganischen Ionen auch organische Verbindungen. Extrazellulär finden dann Interaktionen zwischen anorganischen Kalziumphosphaten und den organischen Verbindungen statt, die zu der geordneten Formierung der mineralischen Kristalle führen. Die präeruptive Entwicklung der Zahnhartgewebe ist noch immer Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen.

In den Blickpunkt der Erforschung der posteruptiven Mineralisationsvorgänge gelangten vor allem die Demineralisation, als der Mineral herauslösende bzw. abbauende Vorgang und die Remineralisation, als umgekehrt ablaufender, Mineral einlagernder Vorgang. Zur Anwendung kamen In-vitro- und In-vivo-Experimente. Die In-vitro-Untersuchungen beleuchteten die Auswirkungen der Versuchslösungen auf die Zahnhartgewebe bezüglich pH-Wert, Einwirkdauer, Zusammensetzung und Ionenkonzentration. In vivo wurde der Einfluss des Mundhöhlenmilieus untersucht.

Die posteruptive Reifung fand hingegen weniger Beachtung. Nach dem Zahndurchbruch ist der oberflächliche Schmelz noch nicht vollständig ausgereift. Er weist Mikroporositäten und kleinste Kanäle auf, die ihn für kariöse Prozesse anfällig machen. Im intraoralen Milieu finden Mineralisationsvorgänge statt, die über 3 bis 5, teilweise bis zu 8 Jahre nach Durchbruch zu einem Verschluss bzw. Einengung der Porositäten im Schmelz führen (Stiefel und Binus 1991). Dieser Vorgang wird als posteruptive Maturation bezeichnet.

Im Gegensatz zur präeruptiven Schmelzreifung, bei der die Ameloblasten ein Kompartiment bilden, in dem der Schmelz gebildet wird, erfolgt die posteruptive Maturation durch die Komponenten des intraoralen Milieus. Das intraorale Milieu ist sehr wechselhaft und häufig exogenen Einflüssen ausgesetzt. Daher stellt sich die Frage, wodurch die Schmelzreifung herbeigeführt wird und welche Bestandteile oder Vorgänge im Mundhöhlenmilieu unverzichtbar für die Maturation sind.

## 2. Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, verschiedene Aspekte der intraoral ablaufenden Vorgänge zu untersuchen. Dafür ist es erforderlich, die Einflussfaktoren auf die Kernabläufe zu reduzieren.

Demineralisierende Prozesse werden durch Säuren hervorgerufen. Das saure Milieu kann sowohl von Bakterien erzeugt werden, als auch säurehaltige Nahrungsmittel den pH-Wert erniedrigen können. Der Speichel puffert den Säureangriff ab und remineralisiert durch anorganische Kalzium- und Phosphationen entkalkte Zahnhartgewebe. Dieser rhythmische Wechsel zwischen De- und Remineralisation soll in einem pH-cycling-Experiment simuliert werden.

Zu den im Speichel enthaltenen organischen Verbindungen gehört zum Beispiel auch Serumalbumin, welches Einfluss auf die Kristallbildung von Kalziumphosphaten nehmen kann. In einem zweiten Versuchsabschnitt sollen daher neben anorganischen auch organische Verbindungen auf ihre Eignung als Kalzium-Donator bei mineralisierenden Reaktionen überprüft werden. Verwendung findet eine durch organische Verbindungen physiologischen Ursprungs dominierte Versuchslösung – menschliches Blutserum.

Neben der Untersuchung der posteruptionen Maturation des Zahnschmelzes sollen auch die Auswirkungen der Versuchslösungen auf die Zahnwurzeln und ihre Fähigkeiten zur Remineralisation von Schmelz- und Wurzelläsionen dargestellt werden.

Folgende Fragestellungen formulieren daher die Ziele dieser Pilotstudie:

1. Fördert der stetige intraorale Wechsel des pH-Wertes die posteruptionen Schmelzreifung?
2. Haben organische Verbindungen (z. B. Serumalbumin), die als hinderlich für die Bildung und das Wachstum von Kalziumphosphatkristallen eingestuft werden, einen Einfluss auf die Maturation von Zahnhartgeweben?
3. Nehmen organische Verbindungen Einfluss auf die Remineralisation von Zahnhartgeweben?
4. Welche Untersuchungsmethoden sind im Rahmen der Erforschung der posteruptionen Schmelzreifung als geeignet einzustufen?

### 3. Grundlagen der Mineralisationsvorgänge an Zahnhartgeweben

#### 3.1. Anorganische Aspekte der Remineralisation und Maturation

##### 3.1.1. Biologisch relevante Kalziumphosphate

Kalziumphosphate sind in der oralen Biologie und Medizin von großem Interesse, da sie sowohl regelhaft in Schmelz, Dentin, Zement und Knochen, als auch pathologisch in Speichelsteinen und Zahnstein auftreten. Zu den wichtigsten Kalziumphosphatverbindungen von biologischer Signifikanz zählen: amorphes Kalziumphosphat (ACP); Brushit oder Dikalziumphosphatdihydrat (DCPD); Oktakalziumphosphat (OCP); Apatit oder Kalziumhydroxylapatit (HAP); Monetit oder Dikalziumphosphatanhydrid; Whitlockit oder Trikalziumphosphat (TCP).

ACP besteht aus Kalzium und Phosphat. Es existiert die Möglichkeit der Substitution durch Karbonat oder Magnesium. Unsubstituiertes ACP verhält sich in Lösungen nicht stabil. Jedoch kann es eine Vorstufe für die Bildung des thermodynamisch stabilen Apatits sein. Im elektronenmikroskopischen Bild ist amorphes Kalziumphosphat durch kugelförmige Aggregate gekennzeichnet (Eanes 1975).

Eine Vorstufe für Apatit stellt ebenfalls Dikalziumphosphatdihydrat dar (Boskey 1985). DCPD bildet charakteristische dünne, dreieckige, plattenförmige Kristalle (LeGeros 1991). Einen Beitrag zur Identifizierung oder Zuordnung von Proben aus Kalziumphosphatverbindungen leistet neben der Kristallmorphologie auch das Ca/P-Verhältnis. Für DCPD beträgt es 1,0.

OCP ist die dritte und wichtigste mögliche Vorstufe für die Bildung von Apatit (Eanes 1985). Eanes zeigte auch die Stabilitätsunterschiede von ACP und OCP bei einem pH-Wert von 7,4 und einer Temperatur von 25°C auf. Die ACP-Phase war nur 20 Minuten, die OCP-Phase aber 2,7 Stunden stabil. Oktakalziumphosphat zeichnet sich in elektronenmikroskopischen Darstellungen durch zwei Morphologietypen aus, deren Kristalle von jeweils einem gemeinsamen Ursprung ausgehen (LeGeros et al. 1984): Aggregate bestehend aus kurzen Plättchen und nadel- bzw. bandförmige Aggregate. Das Ca/P-Verhältnis für OCP beträgt 1,33.

HAP ist der Grundbaustein des mineralisierten Anteils von Schmelz, Dentin und Knochen. Im Gegensatz zum synthetischen HAP mit einem Ca/P-Verhältnis von 1,67 handelt es sich bei biologisch gebildetem Apatit um nicht stöchiometrisches, Kalzium-defizitäres Apatit mit zusätzlich enthaltenem Fluorid, Magnesium, Natrium, Kalium, Carbonat und Chlor (Arends und ten Cate 1981). Daher erfolgt unter biologischen Bedingungen nicht die Ausbildung reiner Apatite. Die Variationen der Konzentrationen dieser Ionen in Schmelz, Dentin und Knochen führen zu unterschiedlichen Dimensionen der a-Achsen der hexagonalen Apatitkristalle und der Ca/P-Verhältnisse (LeGeros 1991).



Die lösungsvermittelte Transformation der beschriebenen Kalziumphosphate zu Apatit und die Dynamik dieser Umwandlungen, aber auch der Rückreaktionen, können durch die Lösungseigenschaften beschleunigt, gehemmt oder unterdrückt werden. Zu diesen Eigenschaften zählen der pH-Wert, die Temperatur, die Zusammensetzung und die Konzentration der Ionen (Nancollas und Mohan 1970; Feagin et al. 1972; Meyer und Nancollas 1972).

### 3.1.2. Remineralisation subfizieller Läsionen

Arends und ten Cate (1981) definierten die Remineralisation als einen Prozess der Ablagerung von Mineralien in Bereiche vorangegangenen Mineralverlustes.

Erste Experimente gehen auf Head (1912) zurück. Er zeigte, dass bei Anwesenheit von Speichel die Säurewirkung am Zahnschmelz herabgesetzt ist und dass partiell erweichter Schmelz in Speichel wieder erhärten kann. In klinischen Beobachtungen wurden von Baker Dirks (1966) und von der Fehr (1964) Schmelzveränderungen als Initialkaries diagnostiziert, die bei Nachuntersuchungen nicht mehr festzustellen waren.

Neben dem Speichel kamen vor allem synthetische kalzifizierende Lösungen verschiedener Zusammensetzung zur Anwendung. Levine (1972) benutzte eine Lösung mit Kalziumphosphatdihydrat und einem Ca/P-Verhältnis von 1,0, während Silverstone et al. (1981) eine Lösung mit Hydroxylapatit verwendeten, die ein Ca/P-Verhältnis von 1,63 besaß. Künstliche Remineralisationslösungen wurden ferner aus verschiedenen Verbindungen, wie z. B. Kalziumchlorid und Kaliumdihydrogenphosphat (ten Cate und Arends 1977) oder Dinatriumhydrogenphosphat (White et al. 1988), hergestellt.

Ten Cate und Arends (1978) hoben im Falle der subfiziellen Läsion die Diffusion der Remineralisationslösung durch die Poren, Lücken und Hohlräume der oberflächlichen Schicht als den geschwindigkeitsbestimmenden und limitierenden Faktor heraus. Bestätigt werden konnte diese Aussage von Silverstone et al. (1981). Die Autoren zeigten die Remineralisationswirkung von zwei Lösungen mit unterschiedlicher Kalziumionenkonzentration. Die Lösung mit 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  remineralisierte die gesamte Läsion und führte in einer quantitativen Imbibitionsstudie zur Verminderung der Hohlräume um 40%, während eine Lösung mit 3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  nur die oberflächliche Schicht remineralisierte. Eine Porenverringerung in der gesamten Läsion erfolgte nur zu 17%. Da die hoch konzentrierte Kalziumlösung sowohl in Bezug auf HAP, OCP und TCP übersättigt war, fielen die leicht löslichen Verbindungen früher als HAP aus und blockierten die Oberflächenschicht. Als weiteren bestimmenden Faktor des Erfolges einer Remineralisation sehen Klinger und Wiedemann (1985) und White et al. (1988) den Grad der vorausgegangenen Demineralisation an. Der kritische Mineralgehalt liegt unter 30%,

denn dann wirkt die verwendete remineralisierende Lösung demineralisierend und löst das Schmelzmineral auf. Über dem kritischen Wert verläuft die Remineralisation von schwach ausgeprägten Läsionen vollständiger und schneller.

Die Verwendung von Fluoridionen stellt den wichtigsten, direkt beeinflussbaren Faktor zur Optimierung und Verbesserung der Remineralisationsrate dar (Arends und ten Cate 1981). Klinger und Wiedemann (1987) erreichten in relativ kurzer Zeit mit fluoridhaltigen Lösungen einen größeren Effekt als lange Inkubation in Lösungen ohne Fluorid. Fluoridzugaben im ppm-Bereich erhöhen die Ablagerungsrate um das 2-3 fache. Levine (1972) beschreibt eine Fluoridkonzentration von 10 ppm als vorteilhaft zur Remineralisation von Dentin. An bovinem und menschlichem Dentin konnte im Gegensatz zu Schmelz sogar eine „Übermineralisation“ erzielt werden (Arends et al. 1989, 1990; Heilman et al. 1997). Diese „Übermineralisation“ erwies sich als eine Mineralablagerung auf der Dentinoberfläche. Die Mineralkristallite erreichten größere Dimensionen als im unbehandelten Dentin. Ten Cate und Arends (1977) fanden keine Unterschiede in den entstandenen Mineralen bei der Verwendung von Lösungen ohne und mit 1 ppm Fluorid. Das Ca/P-Verhältnis stieg in beiden Fällen um 0,2 an. Eine weitere Steigerung der Remineralisationsrate erreichten ten Cate et al. (1985) durch ein kurzes, zwischenzeitliches Eintauchen der Proben in eine Lösung mit 12 ppm F<sup>-</sup> und einem pH-Wert von 6,0. Sie verweisen besonders auf die erhöhte Remineralisation der gesamten Läsion und nicht nur der oberflächlichen Schicht. Der Effekt dieses Eintauchens wird durch den hohen Gehalt an mineralischen Ionen und den niedrigen pH-Wert erzielt. Die initialen Ablagerungen aus löslichen amorphen Formen nahe der Oberfläche werden allmählich durch Diffusion nach innen transportiert (Klinger und Wiedemann 1987) und als unlösliche Form abgelagert (ten Cate und Arends 1980). Im Vergleich zu einer annähernd neutralen Lösung erreichten Takagi et al. (1997) durch Spülung mit zwei Fluoridlösungen im sauren pH-Bereich eine stärkere Remineralisation. Hoppenbrouwers et al. (1988) schlugen eine 2-Schritt-Vorgehensweise zur Erzeugung von fluoridiertem Hydroxylapatit im Wurzelmineral vor. Zuerst erfolgt die Behandlung mit einer sauren DCPD-Lösung, anschließend mit neutraler Fluoridlösung. Koulourides und Cameron (1980) wiesen darauf hin, dass die Formation von fluoridiertem Apatit in Läsionen zu einer höheren Widerstandsfähigkeit gegenüber Säuren führt und damit remineralisierte kariöse Bereiche widerstandsfähiger gegen erneute Demineralisationen sind.

Larsen und Fejerskov (1989) zeigten in ihrem mathematischen Modell zur Ermittlung von Mineralisationsvolumina und Mineralisationszyklen, dass nur geringe Mengen Mineral in den kalzifizierenden Flüssigkeiten gelöst sind und deshalb beträchtliche Mengen Remineralisationslösung benötigt werden. Die Übertragung dieses mathematischen

Modells auf das orale Milieu verneinen letztlich auch die Autoren, da es sich um biologische Gewebe und Vorgänge mit vielen variablen Faktoren handelt. Diese Aussage wird durch die regelmäßig erscheinenden Untersuchungen und Experimente unterstrichen, die zu überraschenden Ergebnissen führen, ungeachtet der großen Varianz in den Versuchsbedingungen. Zum Beispiel erwies sich in den Untersuchungen von Lammers et al. (1990, 1992) eine Fluoridkonzentration von 2 ppm als hinderlich für die Remineralisation von bovinem Schmelz. Allerdings hängt die Art des Einflusses der Fluoride auf die Remineralisation auch vom pH-Wert der verwendeten Lösung ab. Iijima et al. (1999) remineralisierten in vitro sowohl natürlich entstandene initial kariöse als auch in vitro erzeugte subfizielle Läsionen. Für jede Läsion wurde die individuelle Mineralaufnahme bestimmt, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Die natürlich entstandenen Läsionen akkumulierten im gleichen Zeitraum mehr Mineralien als die artifiziell erzeugten Läsionen. Die Autoren begründeten dieses Verhalten mit der unterschiedlichen Entstehungsgeschichte der Läsionen.

Trotz einzelner Berichte über eine zu 100% vollständige Remineralisation subfizieller Läsionen (ten Cate und Arends 1980) ist es bis heute nicht möglich, eben dieses zu erreichen. Aus der Perspektive der anorganischen Reaktionen und Reaktionspartner dürfte das Hauptproblem nicht in der Menge oder Zusammensetzung der Minerale liegen, die auf dem Wege der Diffusion in das Zahnhartgewebe eingebaut werden, sondern eher in der Art und Weise wie die Mineralien sich dort niederschlagen und zu Kristallen und Kristallverbänden formieren. Ten Cate et al. (1981) kamen zu dem Ergebnis, dass remineralisierte Kristalle, im Gegensatz zu demineralisierten Kristallen, eine kompaktere und dickere Form aufweisen, es also zu Mineraleinlagerungen gekommen sein muss. Jedoch erscheint ihre Anordnung und Verteilung mehr zufällig zu sein, während in demineralisierten und unbehandelten Bereichen die Kristalle parallel angeordnet sind.

### 3.1.3. Posteruptive Schmelzreifung

Backer Dirks (1966) bezeichnete die posteruptive Schmelzreifung als einen nötigen Prozess, um den Zahnschmelz an seine neue Umgebung im oralen Milieu anzupassen. Dies geschieht durch organische und anorganische Substanzen. Das anorganische Material befindet sich in ständigem Austausch zwischen dem Schmelz und seiner Umgebung. Beim Menschen erstreckt sich die Schmelzmaturation teilweise über 3 bis 5, mitunter sogar bis zu 8 Jahre nach der Zahneruption (Stiefel und Binus 1991). Im Gegensatz zu speichelfrei durchbrechenden Zähnen hat eine normale Speichelbenetzung der durchbrechenden Zähne einen positiven Einfluss auf deren Kariesanfälligkeit, wie Fanning et al. (1954) zeigen konnten. Schmelzreifung wird durch Speichel gefördert. Nach

Briner et al. (1971) deutet der Begriff Maturation auf die allmähliche Komplettierung der Schmelzmineralisation hin. Kohári und Bóna (1960) beobachteten, dass der Schmelz oberflächennah früher reift, als in der Nähe des Dentins. Kristallwachstum und chemische Veränderungen führten nach von der Fehr (1964) zu einer reduzierten Reaktivität und damit erhöhten Kariesresistenz von oberflächlichem Zahnschmelz. Er sah die Remineralisation und die Maturation als zwei verwandte Vorgänge mit unterschiedlichem Charakter an. Diese Unterscheidung wurde von Lenz und Newesely (1964) bestätigt. Denn während der Maturation von Zahnschmelz werden die winzigen Zwischenräume in unreifem Schmelz durch kristallographisches Wachstum entlang der Seitenflächen der Schmelzkristalle reduziert. Der Prozess der Remineralisation ist hingegen ein Auffüllen der offenen Räume durch präzipitiertes Material.

An Längsschliffen von nicht durchgebrochenen Prämolaren konnte Crabb (1976) in Aufsichtsbetrachtung eine definierte äußere weiße Zone zeigen, die im Polarisationsmikroskop von positiver Doppelbrechung gekennzeichnet war. Die durchschnittliche Breite dieser Zone betrug 180-300  $\mu\text{m}$ , ohne die Übergangszone zur Wurzel zu berücksichtigen. In teilweise durchgebrochenen Zähnen betrug die Breite 95-180  $\mu\text{m}$ . Porositäten im Zahnschmelz sind ursächlich für das Bild dieser oberflächlich gelegenen Zone. Die Reduktion der Breite des porösen Bereiches ist abhängig von der Zeitspanne nach Durchbruch des Zahnes und nicht vom chronologischen Alter. Die Verringerung beginnt okklusal und setzt sich nach zervikal fort. In den Untersuchungen von Binus und Stiefel (1987) war eine diffuse Porositätsverteilung auffällig, die in Richtung Fissurengrund ansteigt. Die poröse Schicht wies an nicht durchgebrochenen Zähnen eine Breite von 180-300  $\mu\text{m}$  und an bis zu 7 Monaten durchgebrochenen eine Breite von 100-180  $\mu\text{m}$  auf. Die posteruptive Schmelzreifung war somit noch nicht beendet, wobei der Übergang zu den lebenslang anhaltenden Austauschvorgängen an der Schmelzoberfläche fließend sein wird.

Die Kristalle unterhalb der Oberfläche von maturiertem Schmelz sind dicker als in der Gesamtheit des Schmelzes. In nicht durchgebrochenen Zähnen ist dieser Unterschied nicht zu finden (Arends et al. 1983 a). Abwechselnde De- und Remineralisation werden für die größeren Kristalle verantwortlich gemacht. Eine Korrelation zwischen Kristalldurchmesser und Fluoridgehalt konnten die Autoren nicht feststellen. Kotsanos und Darling (1991) konnten auch keinen Zusammenhang zwischen der Fluoridkonzentration und der Tiefe von artifiziellen Läsionen erkennen, die an Zähnen mit unterschiedlichem posteruptivem Alter erzeugt wurden. Der Grad der Demineralisation war in jungem und altem Schmelz ähnlich stark, jedoch stieß die Läsionsfront weiter in den jungen Schmelz

vor. Mit fortschreitendem Durchbruchgrad und Verweildauer im oralen Milieu erfolgt eine Senkung der Permeabilität des oberflächlichen Zahnschmelzes (Brudevold et al. 1982; Petzold et al. 1990). Driessens et al. (1985) konnten ein nahezu vollständiges Verschwinden von Natrium und Magnesium bis zu einer Tiefe von 20-30 µm feststellen. Der Grund für den Abfall der Konzentrationen ist, nach Ansicht der Autoren, im kurzzeitig intermittierenden Absinken des pH-Wertes zu sehen. Die Schmelzreifung führt zur oberflächennahen Steigerung des Ca/P-Verhältnisses von 1,59 auf 1,63 (Wöltgens et al. 1981). Dieses liegt vier Jahre nach Eruption aber immer noch signifikant unter dem durchschnittlichen Ca/P-Verhältnis des gesamten Zahnschmelzes von 1,74.

Rasterelektronenmikroskopische Studien von Schmelzoberflächen an noch nicht in die Mundhöhle durchgebrochenen Zähnen (Binus und Stiefel 1987; Fejerskov et al. 1984) zeigten variable Strukturen bestehend aus seichten Gruben, Mikrolücken, irregulären Fissuren und Schmelzüberlappungen. Ungeachtet der Gründe, die zur Entstehung dieser Imperfektionen führen, bilden sie präformierte Diffusionswege zu tieferen Schmelzschichten und Retentionsstellen für Plaque. Fejerskov et al. vermuten, dass die Defekte in vivo Proteine enthalten, die auf die Zahnentwicklung zurückzuführen sind.

Angesichts der zweifellos wichtigen anorganischen Aspekte der posteruptiven Schmelzreifung, wie der durch niedrige Konzentration von Fluoriden geförderten Bildung von widerstandsfähigen Hydroxyl- und Fluorhydroxylapatiten, weisen Stiefel und Binus (1991) auf die nötige Anpassung der organischen Matrix hin. Erst nach dessen Resorption und Ersatz durch Gewebsflüssigkeit wird die Kristallitausfällung möglich.

#### 3.1.4. PH-cycling

Das pH-cycling stellt eine experimentelle Kombination aus De- und Remineralisation dar. Entsprechend den physiologischen intraoralen Vorgängen wechseln häufige Demineralisations- mit länger andauernden Remineralisationsphasen ab.

Ten Cate und Duijsters (1982) haben die Auswirkung des pH-cycling auf artifizielle Schmelzläsionen untersucht. Der pH-Wert der Demineralisationslösung wurde auf 4,7 eingestellt, der der Remineralisationslösung betrug 7,0. Die Experimente wurden bei einer Temperatur von 37°C und unter ständigem Rühren durchgeführt. Das Verhältnis von De- zu Remineralisation pro Tag und der Fluoridgehalt wurden variiert. Das pH-cycling führte in den Gruppen ohne Fluoridzugabe zu einem vermehrten Mineralverlust. Der Zusatz von 2 ppm Fluorid bewirkte nach wenigen Tagen eine Stagnation der Mineralveränderungen, d. h. weder eine Zu- noch Abnahme resultierten aus weiterem pH-cycling. Die Autoren sehen einen Zusammenhang zu Gebieten mit einem hohen Trinkwasserfluoridgehalt. In

solchen Gebieten wurden klinisch Läsionen festgestellt, die inert gegenüber der Reparatur, aber auch einer weiteren Zerstörung sind.

Die Erforschung und Erprobung von verschiedenen Fluoriden, deren Konzentrationen und Anwendungsformen stellt ein wichtiges Einsatzgebiet des pH-cycling dar. Entsprechend der intraoralen Verwendung von fluoridhaltiger Zahnpasta wurden die Fluoride nicht der Remineralisationslösung zugesetzt, sondern es erfolgte eine separate kurzzeitige Applikation der Präparate auf die Schmelz- und Dentinproben. White (1987, 1988) bewegte seine Proben von Hand zwischen der De- und Remineralisationslösung. Als Remineralisationslösung diente menschlicher Speichel mit einem pH-Wert von 7,5. Über eine Testperiode von 12 Tagen wurden die Zahnhartgewebeproben pro Tag viermal den Fluoridzahnpasten ausgesetzt. Ten Cate et al. (1988) zeigten über einen Zeitraum von 15 Tagen an zuvor unbehandeltem menschlichem Schmelz die Auswirkung der Verwendung einer fluoridhaltigen Zahnpasta. Ohne die Fluoridbehandlung entstanden seichte Schmelzläsionen. Die tägliche kurzzeitige Benetzung mit dem Fluoridpräparat (1100 ppm F<sup>-</sup>) verhinderte größtenteils die Ausbildung von Läsionen.

Neben unterschiedlichen Versuchslösungen wurde die Frequenz des Wechsels zwischen der De- und Remineralisationslösung den behandelten Fragestellungen angepasst. Eine sehr niedrige Frequenz, einmal täglich, benutzten Damato et al. (1990). Der Versuch wurde darum über einen Zeitraum von 5 Wochen durchgeführt. Ein als reverses pH-cycling bezeichnetes Verfahren kam bei Nelson et al. (1992) zur Anwendung. Hierzu wurde der Demineralisation ein deutlich stärkeres Gewicht beigemessen und entsprechend das Verhältnis von De- zu Remineralisation umgekehrt.

Robinson et al. (1992) entwickelten ein computergesteuertes System zum pH-cycling bei einer Temperatur von 37°C. Die verwendeten 20 Proben wurden dreimal in 24 Stunden bei einem pH-Wert von 4,8 für 20 Minuten demineralisiert. Während der restlichen Zeit erfolgt die Remineralisation bei pH = 7,0. Das Ergebnis war ein Nettomineralverlust am Schmelz von 0,7% an einem Tag. Dasselbe computergesteuerte System wurde von Kirkham et al. (1994) zur Untersuchung des Einflusses der Frequenz und Dauer der Demineralisation auf den menschlichen Zahnschmelz genutzt. Ein automatisches pH-cycling-System stellten Herkströter et al. (1991) vor, das nach dem Prinzip der Durchflusstechnik arbeitet. Damit war es möglich, zwei Versuchslösungen aus Vorratsbehältern mit jeweils 25 Litern Fassungsvermögen mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 1 l/min, auf die Proben einwirken zu lassen. Mittels einer Pumpe und durch Magnetventile gesteuert, wurde die Versuchslösung wieder in ihren Behälter zurück gepumpt. Zwischenspülgänge konnten mit Leitungswasser durchgeführt werden.

Brandt (1998) entwickelte und baute ein automatisches pH-cycling-System, um eine

große Anzahl von Zähnen oder Zahnschliffen nacheinander zwei verschiedenen Lösungen auszusetzen, und somit initial kariöse Läsionen und Remineralisation zu erzeugen. Mit diesem pH-cycling-Gerät wurde die Voraussetzung geschaffen, die Fragestellung zu untersuchen, ob eine sehr häufig wiederholte De- und Remineralisation von unreifem Zahnschmelz zu dessen Reifung entsprechend der posteruptiven Maturation führen kann.

### 3.2. Biomineralisation von Zahnschmelz und Dentin

#### 3.2.1. Extrazelluläre organische Verbindungen während der Amelogenese

Robinson et al. (1983) unterteilten die Schmelzentwicklung in vier Stufen:

1. Sekretion von teilweise mineralisierter Matrix – Sekretion
2. Selektiver Rückzug von Amelogeninkomponenten – Transition
3. Massiver Verlust von Amelogeninen und Reifung – Maturation
4. Präeruptiv ausgebildeter Zahnschmelz.

Die extrazelluläre Proteinmatrix von sich entwickelndem Zahnschmelz ist charakteristischerweise aus einem Komplex von Prolin-reichen Proteinen und Matrixproteinen, die reich an Serin und sauren Bestandteilen sind, zusammengesetzt. Erstere werden Amelogenine und letztere Enameline genannt. Die Anteile dieser zwei Klassen von Matrixproteinen schwanken mit steigendem Mineralisationsgrad und damit einhergehendem Proteinverlust (Fincham et al. 1982).

Die Amelogenine umfassen ca. 80-90% der im Schmelz vorhandenen Proteine (Fincham und Belcourt 1985) und sind an der Nukleation von Schmelzmineral, der strukturellen Organisation der Schmelzprismen und der Kontrolle des Wachstums und der Größe der Schmelzkristalle durch Bildung eines supramolekularen Aggregats beteiligt (Deutsch et al. 1995). Wen et al. (2001) erklären die Bildung der quartären Strukturaggregate mit der Primärstruktur der intakten Amelogenine. Diese haben einen hydrophoben Charakter, besitzen aber eine hydrophile C-terminale Region. Die bipolare Primärstruktur fördert den Zusammenschluss von ungefähr 100 Amelogeninmonomeren zu Nanospheren. Die äußere Oberfläche dieser kugelförmigen Aggregate ist hydrophil, hervorgerufen durch die kollektiven hydrophilen Strukturanteile. Der hohe Grad an Hydrophobie im Inneren führt zur Destabilisierung der Nanospheren und erhöht damit die Chance einer Fusion oder Zusammenlagerung dieser Moleküle zu größeren Aggregaten. In ihren Untersuchungen zeigten die Autoren, dass unter variierenden Bedingungen die Nanospheren mit einer Größe von 15-20 nm die stabilste Struktur haben. In Untersuchungen von Moradian-Oldak et al. (2002) wird die signifikant niedrigere Affinität von Amelogeninen ohne carboxy-terminale Region zu Apatitkristallen gezeigt. Struktur- und Funktionsanalysen lassen

daher vermuten, dass die hydrophile C-terminale Gruppe eine wichtige funktionelle Rolle in die Mineralisation von Zahnschmelz spielt und dass das Fehlen dieses Segmentes abnormale Mineralisationen verursacht. Eine proteolytische Abspaltung der C-terminalen Sequenz führt zu einer Zerstörung der Nanosphere (Fincham und Simmer 1997). Der Effekt der Amelogenine auf Apatitkristalle besteht in einer Modulation des Wachstums der Kristalle. Es resultiert eine Elongation, da die Amelogenine das laterale Kristallwachstum im Vergleich zum longitudinalen unterdrücken (Warshawsky 1985; Wen et al. 1999). In Studien an OCP-Kristallen (Iijima et al. 2001; Wen et al. 2000) konnte eine Verringerung der Kristallgröße von OCP in der Reihenfolge b-Achse > c-Achse > a-Achse festgestellt werden. Diese Hemmung führt zur Verlängerung der Kristalle. Ferner besteht eine Abhängigkeit der Veränderung in Größe und Morphologie der Kristalle von der Konzentration der Amelogenine. Die Reaktivität der verschiedenen Kristalloberflächen mit Teilen des Amelogeninmoleküls ist nach Meinung der Autoren von der Menge des enthaltenen Wassers und der elektrischen Ladung abhängig, wenn man sie mit den hydrophoben Eigenschaften und Ladungsverhältnissen in Amelogeninmolekülen vergleicht. Nach Fincham und Simmer (1997) führt erst die Anordnung von vielen Nanospheren zwischen den Kristallen und um sie herum zu einer strukturierten Matrix, die eine Formation von geordneten und dünnen Kristallen zulässt.

Die sauren Enameline sind reich an Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin und Glycin und stark phosphoryliert und glucosyliert. Sie sind mit einer wesentlich kleineren Fraktion als die Amelogenine im Zahnschmelz vertreten (Fincham und Belcourt 1985). Da Robinson und Kirkham (1985) durch vorherige Dekalzifikation von Schmelz mehr Enameline extrahieren konnten als ohne, sind diese Proteine vermutlich stärker mit der mineralischen Phase assoziiert als die Amelogenine. Aufgrund des Zeitpunktes ihres Auftretens vor der Mineralisation, der Lokalisation an der Schmelz-Dentin-Grenze, ihres sauren Charakters und der Möglichkeit zur Bindung an Kristalloberflächen fungieren sie wahrscheinlich als Nukleatoren und Regulatoren des Wachstums der Schmelzkristalle (Deutsch et al. 1997). Enameline werden vor dem Mineral und den Amelogeninen von den Ameloblasten sezerniert. Sie bleiben auch während der Sekretions- und Reifungsphase in teilweise abgebauter Form im Schmelz und werden als Teil der Proteine des reifen Schmelzes als Büschelproteine bezeichnet (Deutsch et al. 1995; Robinson et al. 1997). Beispielhaft sei an dieser Stelle das Tuftelin erwähnt, welches zur Familie der Enameline gehört. Da im Tuftelinmolekül eine  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende EF-Hand-Struktur gefunden wurde (Deutsch et al. 1997), die auch in extra- und intrazellulären Verbindungen vorhanden ist (Celio et al. 1996), ist eine spezifische Komplexbindung zu Kalziumionen möglich.



Ein weiteres Schmelzprotein stellt das Ameloblastin, auch abweichend Amelin oder Sheathlin genannt, dar (Bartlett und Simmer 1999). Hu et al. (1997) klassifizierten es als Hüllprotein, da es konzentriert im nahen Umfeld der Kristalle vorkommt und darum ein Teil einer Hüllstruktur bilden soll. Die Autoren sprechen ihm 2 Funktionen zu: das Hineinwachsen von zwischenprismatischen Kristalliten in die Schmelzkristalle wird während der sekretorischen Phase verhindert und ein Kanal wird offengehalten, durch den Proteine aus tieferen Schmelzschichten während der Reifungsphase entfernt werden können.

Die Zunahme des Mineralgehaltes während der präeruptiven Maturation beruht auf dem Wachstum der bereits existierenden Kristalle und nicht weil vermehrt neue Kristalle entstehen. Zur Schmelzreifung führt der Abbau von Proteinen, die einen Mineraleinbau verhindern (Smith 1998). Daher erfolgt kurze Zeit nach ihrer Sekretion die Spaltung durch Proteinasen. Diese proteolytischen Spaltprodukte haben wieder unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Kristallbindung und Löslichkeit. Da gerade die Protein-Kristall-Interaktionen einen wichtigen Aspekt der Schmelzbildung darstellen, werden diese Eigenschaften die Schmelzmaturation beeinflussen (Robinson et al. 1983, 1997). Diese zwei Funktionen, Spaltung und Abbau der Schmelzmatrixproteine, werden durch verschiedene Klassen von Proteinasen ausgeführt.

Enamelysin ist eine Matrix-Metalloproteinase und gehört zur Hauptgruppe der Zink-Metalloproteinasen, die für ihre katalytische Aktivität an das Vorhandensein von Zink gebunden sind. Enamelysin wird bereits während der frühen sekretorischen Phase synthetisiert. Die Serinproteinasen sind die zweite wichtige Gruppe der Proteinasen im Zahnschmelz. Zu ihnen gehört die Schmelzmatrix-Serinproteinase 1 (EMSP 1). Im Gegensatz zum Enamelysin ist die enzymatische Aktivität der EMSP 1 im frühen Stadium der Schmelzentwicklung niedrig und steigt im Verlauf zu den späteren an. Beide Proteinase besitzen Propeptide, die vor ihrer Aktivierung abgespalten werden müssen. Daher ist es möglich, dass separate Aktivierungsenzyme, aber auch gleichzeitig Enzyme zur Inhibition, in der Schmelzmatrix vorhanden sind (Bartlett und Simmer 1999; Robinson et al. 1997).

Neben den Proteinen und Peptiden bestehen 0,6% des gesamten Schmelzes und 35% der organischen Matrix aus Lipiden. Unterschiede finden sich in der Zusammensetzung der Gruppe der Lipide vor und nach einer Demineralisation. Freie Fettsäuren, der größte Teil des Phosphatidylcholin und teilweise Sphingomyelin konnten aus mineralisiertem Zahnschmelz extrahiert werden, wohingegen Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Cardiolipin nur aus zuvor demineralisiertem Schmelz gewonnen werden konnten. Den größten Anteil an den Fettsäuren im Schmelz haben die Palmitin-, Stearin- und

Oleinsäure. Weniger häufig sind die Linol- und Linolensäure vertreten. Daraus ergibt sich, dass einige Phospholipide sehr spezifisch mit Mineralisationsvorgängen assoziiert sein müssen (Goldberg und Boskey 1996).

### 3.2.2. Mineralisationsverhalten von nicht kollagenen Dentin-Matrix-Proteinen

Neben dem Kollagen sind vornehmlich die nicht kollagenen Proteine (NCP) an der Regulation der Mineralisationsprozesse im Dentin beteiligt. Die größte Fraktion der NCP stellen die Phosphoproteine dar. Der Ausdruck Phosphoproteine umfasst speziell den Anteil der hochgradig phosphorylierten Proteine (PP-H) auch als Phosphoryn (DPP) bezeichnet. Neben den PP-H existieren weitere Phosphoproteine mit einem geringeren Grad an Phosphorylierung. Phosphoryn ist ein sehr stark anionisches Protein. Ungefähr 50% der Aminosäuren sind Serin und Phosphoserin und ca. 40% Asparaginsäure. Mehr als 80% der Aminosäurereste tragen negativ geladene Phosphat- und Carboxylgruppen (Linde 1989; Butler 1995). PP-H bindet Kalziumionen mit hoher Affinität, allerdings existieren keine spezifischen Bindungsstellen am Molekül (Butler et al. 1997; Veis 1985). In Prädentin konnte PP-H nicht nachgewiesen werden, da es vermutlich von den Odontoblasten direkt bis an die Mineralisationsfront transportiert wird (Lussi und Linde 1993).

Eine weitere Gruppe der NCP stellen die  $\gamma$ -Carboxyglutamat enthaltenden Proteine dar. Die wichtigste Untergruppe umfasst die Proteine vom Osteocalcin-Typ (Gla-Proteine). Sie werden von den Odontoblasten noch vor beginnender Mineralisation gebildet. Gla-Proteine können eine starke Bindung zu Hydroxylapatit aufbauen, hemmen aber dessen Kristallwachstum und zeigen in Lösung befindlich keinen Effekt auf initiale Mineralablagerungen (Linde et al. 1980; Boskey 1989).

Die Gruppe der Proteoglycane (PG) umfasst mitunter sehr große Moleküle im Knochen- und Knorpelgewebe. Diese Moleküle zählen im eigentlichen Sinne nicht zu den Proteinen, da ihre Eigenschaften durch die Seitenketten und nicht durch den Proteinanteil bestimmt werden. Im mineralisierten Dentin sind aber nur kleine PG mit einem Molekulargewicht weit unter 100 kDa und ein bis zwei Seitenketten vorhanden. Die Seitenketten bestehen aus Glycosaminoglycanen (GAG) und sind kovalent an ein Kernprotein gebunden. Das Merkmal der PG ist ihre hohe negative Ladungsdichte und die relativ hohe hydrodynamische Größe. Ferner sind sie in der Lage mit Kollagenen zu interagieren und die extrazelluläre Formation der Kollagenfibrillen zu beeinflussen (Embery et al. 2001; Fisher 1985).

Schließlich wurde das Vorkommen von Glycoproteinen im Dentin beschrieben. Zu ihnen gehören das Dentin-Sialoprotein (DSP), das Dentin-Matrix-Protein 1 (DMP 1) und das

Osteonectin. Stellvertretend hervorgehoben wird das DSP. Es ist ein an Sialinsäure reiches Glycoprotein, bestehend aus ca. 350 Aminosäureresten mit ungefähr 75 Monosacchariden und einem hohen Gehalt an Glycin, Serin, Asparagin- und Glutaminsäure. Seine Sequenz ist ähnlich der von Osteopontin, einem Sialoprotein des Knochens (Linde 1989; Butler 1995; Butler et al. 1997).

Zur Klärung der Effekte und Eigenschaften der beschriebenen Dentin-Matrix-Proteine auf die Mineralisation wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Boskey et al. (1989) zeigten in ihren In-vitro-Untersuchungen, dass Phosphoryn in niedrigen Konzentrationen als Förderer der Bildung von Hydroxylapatitkristallen agiert. Liegt es in hohen Konzentrationen vor, kehrt sich dieses Verhalten um und es inhibiert die Kristallbildung. Ebenso kann DSP eine Apatitbildung sowohl fördern als auch verhindern (Boskey 1996). Linde und Lussi (1989) immobilisierten PP-H, Gla-Protein und PG auf Agarose-Kügelchen und konnten in vitro Mineralkeime erzeugen. Wenn sich die Moleküle frei beweglich in Lösung befinden, behindern sie Mineralbildung und -wachstum. Nur geringste Mengen der organischen Verbindungen waren zur Mineralinduktion erforderlich. Es wurden ebenfalls nur niedrige  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, vergleichbar denen im Blutserum, benötigt (Linde et al. 1989). Lussi und Linde (1993) bestätigten diese Ergebnisse durch In-vivo-Untersuchungen. Es zeigte sich, dass die Fähigkeit zur Bildung von Apatitkristallen bei Phosphoryn und den Proteoglycanen stärker ausgeprägt ist als bei den Gla-Proteinen.

Das Kollagen, die Hauptproteinkomponente im Dentin, bildet als relativ passive Matrix die stabile Unterstützung für die Dentin-Matrix-Proteine, die elektrostatisch oder kovalent an das Kollagennetzwerk gebunden sind. Den so immobilisierten Proteinen werden folgende Funktionen zugesprochen: Transport der Ionen an der Mineralisationsfront, Steuerung der Kristallbildung an den vorbestimmten Stellen der Oberfläche der Kollagenfibrillen, Interaktion mit den Wachstumsseiten der Kristalle, Stabilisierung der sich formierenden Kristalle, Lenkung des Kristallwachstums, Raumbegrenzung für das Wachstum der mineralischen Phase, Begrenzung der Diffusionsfähigkeit von reaktiven Ionen und Abschirmung gegen Reaktionen mit anderen Ionen (Veis 1985; Linde et al. 1989; Butler et al. 1997; Embury et al. 2001).

### 3.2.3. Kollagen als Gerüst für die Mineralisation

In kalzifizierten Geweben werden zwei Arten der Mineralbildung diskutiert. Die erste Variante geht davon aus, dass die initiale Bildung von Kristallkeimen direkt an den Fibrillen des Kollagens stattfindet. Der zweite mögliche Mechanismus sieht extrazelluläre Matrix-Vesikel im Mittelpunkt der Kristallbildung. Im Dentin scheint die erste Möglichkeit,

angesichts der vorhandenen Menge Kollagen, plausibel zu sein. Boskey (1989) bestätigte die Fähigkeit von Kollagen Typ I als Keimbildner für Hydroxylapatit. Eine endgültige Klärung der Zusammenhänge, die zum mineralisierten Dentin führen, wurde jedoch noch nicht erreicht.

Kollagen Typ I hat den mit Abstand größten Anteil am Gesamtkollagengehalt. Ungefähr 90-95% entfallen auf diesen Typus (Linde 1989). Kollagen Typ V hat einen Anteil von ca. 3%. Das Vorhandensein von Kollagen Typ III ist als nicht gesichert anzusehen, während Kollagen Typ X nicht im Dentin zu finden ist (Butler 1995; Felszeghy et al. 2000). In der Klassifikation der Kollagene von Miller (1985) gehören Typ I, III und V zur Klasse 1 der Kollagenmoleküle. Sie sind aus ca. 300 nm langen rechtsgängigen Tripelhelices als Untereinheiten aufgebaut. Eine Tripelhelix wird von 3 kontinuierlich helikal geformten Polypeptid-Strängen gebildet. Zur zweiten Gruppe zählen Kollagene, deren längliche (> 300 nm), zur Helix geformte Untereinheiten, durch nicht helikale Bereiche unterbrochen sind. Diese Kollagenklasse zeichnet sich durch netzartige Verzweigungen aus, die zum Beispiel im Kollagen Typ IV der Basalmembranen zu finden sind. Zur dritten Klasse gehört das Kollagen Typ X, dessen Moleküle aus relativ kurzen, teilweise helikal geformten Einheiten bestehen, die sich zu hexagonalen Netzwerken zusammensetzen (Felszeghy et al. 2000).

An durch Gendefekte ausgelösten Fehlern und Veränderungen der Struktur der Kollagenmoleküle ist es möglich, Abweichungen von der normalen Mineralisation zu erkennen. Kollagen-Typ I-Defekte führen zu einer Veränderung der Mineralkristalle in Größe und Verteilung sowie einem verringertem Ca/P-Verhältnis. Defekte am Kollagen Typ II verzögern die Mineralisation und am Typ X ergeben sich veränderte Mineraleigenschaften (Boskey 1996).

Die Ursache der Fähigkeit des Kollagens in selektiven Geweben als Gerüst für Mineralbildung und -ablagerung zu fungieren, liegt erstens in der Bindung von mineralisationsfördernden Molekülen an das Kollagen begründet. Endo und Glimcher (1989) zeigten ein signifikant erhöhtes Potential des Kollagens zur Kristallbildung, wenn ein Phosphoprotein am Kollagen komplex gebunden ist. Durch Bindung von Proteoglycan an Kollagen entsteht ein dreidimensionales Netzwerk mit konstanten Gitterparametern, welches die Keimbildung und das Wachstum von Hydroxylapatitkristallen kontrolliert (Gafni et al. 1999). Die Eigenschaften der an das Kollagen gebundenen Moleküle bestimmen den Mechanismus, der zur Initiation einer Kristallbildung führt. Die Quervernetzungen innerhalb der Kollagenmoleküle stellen den zweiten Grund der selektiven Mineralisation dar. Die in nicht mineralisiertem Kollagen vorkommenden multifunktionellen Quervernetzungen halten die Moleküle auf kürzerem Abstand als in

mineralisierten Geweben mit bifunktionellen Querverbindungen. Dadurch werden der Zugang von Ionen und die Formierung von Hydroxylapatitkristallen behindert. Wenn die Kollagenmoleküle mineralisiert sind, können sie sich nicht dicht genug zusammenlagern, um die multifunktionalen Quervernetzungen auszubilden, denn die ersten Apatitkristalle treten in den Spalträumen der Kollagenfibrillen auf (Mechanic et al. 1985; Linde 1989; Butler 1995).

Das Kollagennetzwerk hat im Dentin weniger die Aufgabe eines Initiators der Mineralneubildung als vielmehr die eines Gerüsts, das für die richtige Lenkung des Kristallwachstums sorgt, denn die Struktur der Hydroxylapatitkristalle ist mit ihren c-Achsen parallel zu den Kollagenfibrillen ausgerichtet (Klont und ten Cate 1991; Linde et al. 1989).

Eine mögliche Beteiligung, der durch Matrix-Vesikel vermittelten Mineralisation ist aber nur schwer zu bestreiten, da ähnlich dem Zahnschmelz auch im Dentin Lipide vorhanden sind. Sie sind zu 0,35% am gesamten Dentin und zu 1,75% an der organischen Matrix beteiligt. Auch sind Unterschiede hinsichtlich des Anteils der verschiedenen Komponenten zu erkennen. Aus nicht demineralisiertem Dentin konnten Mono- und Diglyceride, Cardiolipin und der größte Teil des Phosphatidylcholin extrahiert werden. Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin wurden nur nach vorheriger Demineralisation gewonnen (Goldberg und Boskey 1996). Gerade den Phospholipiden wird die Fähigkeit zur Stabilisierung von sich bildenden Apatitkristallen zugesprochen (Boskey 1996).

Eine Gerüstfunktion des Kollagens konnte für den Schmelz nicht bewiesen werden. Felszeghy et al. (2000) fanden Kollagen Typ X, eines der Schlüssel-moleküle der enchondralen Ossifikation, in der fetalen Zahnentwicklung. Seine Anwesenheit wurde in Ameloblasten und nur während der frühen Sekretionsphase im Schmelz bestätigt. Boskey et al. (1989) zeigten, dass Kollagen Typ X allein keinen Effekt auf die Bildung und das Wachstum von Hydroxylapatit hat. Somit muss im Schmelz ein völlig anderer Mineralisationsmechanismus als im Dentin vorliegen (Boskey 1985).

#### 3.2.4. Beeinflussung von Mineralisationsvorgängen durch Blutserum

Albumin stellt mit 55-68% die größte Fraktion der im Blutserum befindlichen Proteine. Die Funktion der Albumine umfasst den Transport von nicht veresterten Fettsäuren, Pharmaka, Vitaminen, Kationen, Spurenelementen sowie Abbau- und toxischen Produkten. Sie besitzen eine hohe Wasserbindungsfähigkeit und sind für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes verantwortlich. Die äußerst heterogene Gruppe der Globuline, unterteilt in  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globuline, ist die zweite große Fraktion der Serumproteine. Sie unterscheiden sich von den Albuminen durch ihre

schlechtere Wasserlöslichkeit und ihr höheres Molekulargewicht (Thomas 1992; Löffler und Petrides 1998).

Natives menschliches Blutserum ist in Bezug auf DCPD nachhaltig untersättigt, auf OCP bezogen schwach und auf HAP bezogen stark übersättigt (Eidelman et al. 1987 a). Kalzifizierungen, die in Serum stattfinden, haben OCP als Vorläufersubstanz, welches in situ zu einem mehr basischen Apatit hydrolysiert. Die Ergebnisse von Eidelman et al. (1987 b) deuten darauf hin, dass sowohl die Umwandlung von OCP zu HAP, als auch die direkte Bildung von HAP im Serum ein relativ langsamer Prozess ist.

Garnett und Dieppe (1990) zeigten in ihren Untersuchungen eine markante Verringerung des Kristallwachstums von HAP, die konzentrationsabhängig von Blutserum verursacht wurde. Zwei Drittel der inhibitorischen Aktivität sind mit Proteinen und anderen Makromolekülen im Serum assoziiert, der Rest der Aktivität steht in Verbindung mit Komponenten von niedrigerem molekularem Gewicht. Die Autoren sehen Albumin allein für die Hälfte der inhibitorischen Aktivität der Proteine und Makromoleküle verantwortlich. Der Mechanismus der Wachstums hemmung begründet sich durch die Adsorption der Serumproteine an wachsende Hydroxylapatitkristalle. Albumin ist möglicherweise ein wichtiger Mediator dieses Prozesses. Auf bioaktivem Material führte bovines Serumalbumin zu nadelförmigen Kristallen mit einem Ca/P-Verhältnis von etwa 1,55 und im Vergleich zu Versuchen mit Amelogenin zu verringerter Größe (Wen et al. 1999). Iijima et al. (2001) stellten eine verstärkte Reduzierung der Präzipitation von OCP fest, wenn die Versuchslösung freies Albumin anstatt Amelogenin enthält. Jedoch führten alle Proteine zu einer Hemmung der Kristallbildung. Albumin hemmt das Kristallwachstum besonders stark entlang ihrer c-Achse, ähnlich den Amelogeninen, die zu einer Wachstumsreduzierung in Richtung der b-Achse führen. Ungeachtet der hervorgerufenen Größendifferenzen ist eine wichtige Erkenntnis der Untersuchungen von Iijima et al. die stärkere Ordnung und Gleichförmigkeit der in Gegenwart von Proteinen gebildeten Kristalle.

Wenn Albumin auf Hydroxylapatitkristallen immobilisiert ist, wird die Formierung von regulären, hexagonalen Kristallen aus Kalziumoxalatmonohydrat gefördert (Nancollas und Wu 2000). Die Zeit bis zur Bildung der Kristalle wird vermindert und die Rate der Kristallbildung erhöht. Die Autoren vermuten, dass die Adsorption von wasserlöslichen Makromolekülen zu einer Verringerung der Grenzflächenspannung führt. Taira et al. (1995) konnten Aggregate aus Hydroxylapatitkristallen in einem System aus Serum von Rindern und Acrylamid erzeugen. Sie gehen davon aus, dass eine kalzifizierbare Matrix in biologischen Systemen aus unlöslichen Makromolekülen und anionischen Polymeren besteht. Ein weiteres Ergebnis ihrer Studien war, dass die alkalische

Phosphatase und  $\beta$ -Glycerophosphat jeweils für sich kaum zu einer Erhöhung der Mineralbildung führten, jedoch gemeinsam verstärkte sich die Mineralbildung beträchtlich. Da die Fähigkeit des Serums zur Kalzifizierung beizutragen in direkter Beziehung zur Konzentration der verfügbaren Ionen steht, wird die gemeinsame Wirkung der alkalischen Phosphatase und des  $\beta$ -Glycerophosphates mit einer lokalen Erhöhung der Phosphatkonzentration erklärt. Einem weiteren Serumbestandteil, dem Immunglobulin G spricht Boskey (1989) keinen Effekt auf Mineralablagerung und Kristallwachstum zu, da es kein Produkt der Zellen der mineralisierten Gewebe ist und damit keine essentielle Rolle in der Mineralisation spielt.

Ob Albumin eine Funktion während der Mineralisation des Zahnschmelzes hat, ist nicht mit Sicherheit zu beantworten. Robinson et al. (1992) zeigten, dass Schmelz im Laufe der präeruptiven Reifungsphase Albumin aufnehmen und das Kristallwachstum hemmen kann. Es konnte keine proteolytische Aktivität im Schmelz gegen Albumin festgestellt werden. Strawich und Glimcher (1990) fanden in Extrakten aus Zahnschmelz, die die Gewinnung von Enamelinen zum Ziel hatten, dass ca. 70-80% der Proteine Serumproteine wie Albumin und  $\gamma$ -Globulin, sind. Als Quelle für die Serumproteine vermuten die Autoren das Blut. Denn durch Änderungen der Morphologie und Funktion der Ameloblasten während der Amelogenese könnte eine Diffusion von Makromolekülen wie Albumin in den Schmelz möglich gemacht werden. Robinson et al. (1998) haben ebenfalls Albumin, wenn auch nur in sehr geringen Mengen, im Zahnschmelz festgestellt. Vermehrt wurde Albumin allerdings in kariösen Läsionen nachgewiesen. Eine Aufnahme von Albumin in artifiziell erzeugte Läsionen nach Inkubation der Schmelzproben für 16 Stunden in bovinem Serum konnten die Autoren nicht bestätigen.

## 4. Material und Methode

### 4.1. Vorbereitung und Demineralisation der Zähne

Die untersuchten Zahnhartgewebe entstammten 95 menschlichen, bleibenden Zähnen. Es handelte sich um Prämolaren und Weisheitszähne, die sowohl extrahiert als auch operativ entfernt wurden. Zwischen dem Durchbruchzeitraum in das orale Milieu und der Extraktion lag ein Zeitraum von maximal vier Jahren. Sofort nach der Extraktion erfolgte eine grobe Reinigung der Zähne unter fließendem Wasser mit einer Zahnbürste. Anschließend wurden sie bis zur weiteren Verwendung in einer bakterizid wirkenden 0,5% Formaldehyd-Lösung gelagert.

Das Untersuchungsmaterial wurde mittels einer Lupe auf Kariesfreiheit geprüft. An der Wurzelspitze erfolgte das Anlegen eines Bohrloches, an dem der Zahn in den Versuchsbehältnissen mit einem Faden befestigt werden konnte. Die gesamte Zahnoberfläche wurde mit einem säurefesten Lack bedeckt.

Dieser Lack wurde an den vestibulären und oralen Flächen des Schmelzes und der Wurzeloberflächen wieder entfernt. Es entstanden rechteckige Fensterungen von 1-2 mm Höhe und ca. 3 mm Breite. Diese frei liegenden Zahnoberflächen entsprachen den Arealen b und c in der Abbildung 1. Der Bereich a wurde mit Lack bedeckt und diente somit zum Vergleich, da er den Ausgangszustand der Zahnhartgewebe dokumentierte.

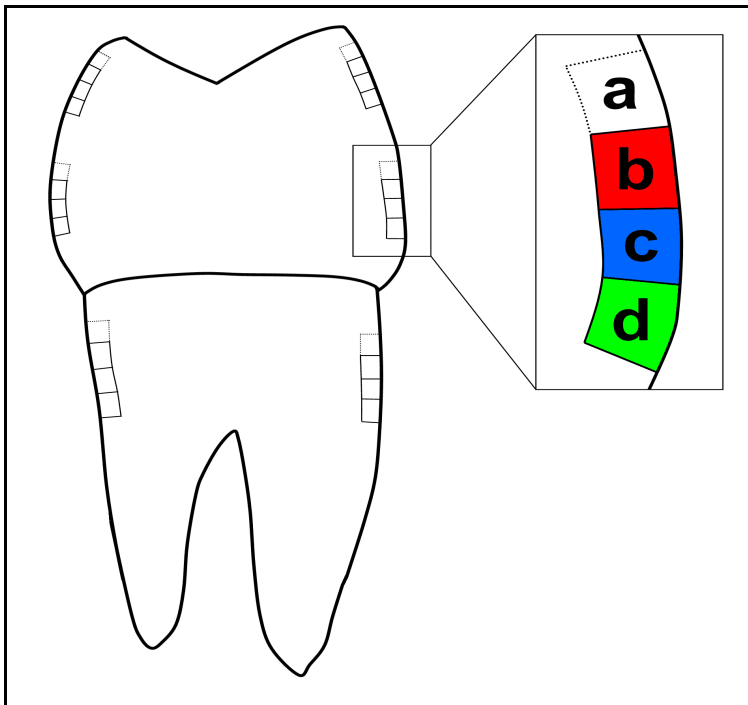


Abb. 1 Lage der Versuchsareale am Zahn  
Bereich a: unbehandelt, nativ  
Bereich b: demineralisiert  
Bereich c: demineralisiert + Versuchslösungen  
Bereich d: unbehandelt + Versuchslösungen



Die Demineralisation der vorbereiteten Zähne erfolgte in 4,5% Hydroxyethylzellulose-Lösung. Zur Einstellung des pH-Wertes dieser Lösung auf 4,5 diente 0,1 M Milchsäure. Die Gesamtdauer der Demineralisation betrug 28 Tage bei einer Raumtemperatur von 22-25°C. Nach jeweils 5 Tagen wurde der pH-Wert der Hydroxyethylzellulose-Lösung mit 0,1 M Milchsäure auf pH = 4,5 eingestellt. Der Zusatz von Thymol verhinderte eine Besiedlung der Versuchslösung mit Mikroorganismen.

Nach Durchführung der Demineralisation wurde die Zahnoberfläche über Bereich b mit säurefestem Lack bedeckt. Dieser Bereich stellt damit den Vergleichszustand der Zahnhartgewebe nach der Demineralisation dar. Im selben Arbeitsgang wurde der Lack über dem nicht demineralisierten Bereich d entfernt, so dass die Bereiche c und d als Versuchsareale dienten.

Anschließend erfolgte die Längsteilung der Zähne mittig durch die Fensterungen. Zum Einsatz kam eine Säge der Gerätepalette nach Donath. Die entstandenen Sägeflächen wurden mit säurefestem Lack abgedeckt.

Die Einteilung der Zähne in die zwei Versuchsabschnitte erfolgte zufällig. Die erste Gruppe bestand aus 55 Zähnen und diente zur Versuchsdurchführung im pH-cycling-System. Zur zweiten Gruppe gehörten 40 Zähne, die wiederum in vier Untergruppen zu je 10 Zähnen zufällig unterteilt wurden. An ihnen erfolgten die Versuche mit menschlichem Blutserum.

#### 4.2. Experiment im pH-cycling-System

Die Versuche wurden an dem pH-cycling-Gerät von Brandt (1998) durchgeführt. Detaillierte Beschreibungen der technischen Merkmale sind seiner Dissertation zu entnehmen.

Mit diesem System ist es möglich, 2 verschiedene Lösungsansätze jeweils zwischen 10 Sekunden und 15 Stunden auf das Untersuchungsmaterial einwirken zu lassen. Das Fassungsvermögen jedes Lösungsbehälters beträgt 6 Liter. Klarspülungen mit Leitungswasser stellen die dritte Möglichkeit der Flüssigkeitszufuhr dar. Die Reihenfolge des Zustroms kann beliebig variiert werden.

Als Demineralisationslösung diente eine synthetische Lösung, die 2 mM  $\text{CaCl}_2$  und 2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  enthielt (Damato et al. 1990). Der pH-Wert wurde mittels 0,1 M Milchsäure auf 4,5 eingestellt. Zur Remineralisation fand eine synthetische Lösung mit jeweils 2 mM  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , einem Zusatz von 1 ppm Fluorid in Form von NaF und einem pH-Wert von 6,8 Verwendung. Diese Lösungen wurden täglich neu angesetzt, um Veränderungen der Konzentrationswerte während der Pumpvorgänge möglichst gering zu halten und die Besiedlung der Versuchsanlage mit Bakterien zu verhindern. Der pH-

Wert der Demineralisationslösung wurde insgesamt zweimal pro Tag kontrolliert und neu eingestellt.

Ein Zyklus während des Versuchs bestand aus:

1. Einwirkung der Demineralisationslösung – Dauer: 2 Minuten
2. Klarspülung mit Leitungswasser – Dauer: 3 Minuten
3. Einwirkung der Remineralisationslösung – Dauer: 9 Minuten und 30 Sekunden
4. Klarspülung mit Leitungswasser – Dauer: 3 Minuten.

Dieser Zyklus benötigte einen Gesamtzeitraum von 17 Minuten 30 Sekunden und wurde während des Versuchszeitraumes von acht Wochen somit mehr als 4500-mal durchlaufen. Darin enthalten sind die Wartungszeiten, die ca. 20 Minuten pro Tag in Anspruch nahmen. Bereits nach der vierten Woche der Versuchsdurchführung wurde eine Hälfte jedes Zahnes dem laufenden Experiment entnommen und ausgewertet. Die zweite Hälfte befand sich bis zum Ende der achten Woche im Versuch, um dann auch der Auswertung zugeführt zu werden.

#### 4.3. Experimente mit Blutserum

Das verwendete Blutserum wurde vom Institut für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um gepooltes Serum, d. h. das Blutserum von mehreren Personen ist in einem Gefäß vermischt worden. Zur Gewinnung von Blutserum lässt man menschliches Vollblut nach Entnahme durch Venenpunktion gerinnen. Dies geschieht durch Abwarten des natürlichen Gerinnungsprozesses. Nach ca. 2 bis 3 Stunden, wenn alle gerinnungsfähigen Blutbestandteile koaguliert sind, wird das entstandene Blutkoagulum zentrifugiert. Danach befindet sich das Blutserum an der Oberfläche, während sich der Blutkuchen am Gefäßboden abgesetzt hat. Der so genannte Blutkuchen enthält neben dem durch die Gerinnungskaskade aktivierten Fibrin auch die zellulären Blutbestandteile in Form von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten. Da nicht das gesamte gewonnene Serum pro Person für Untersuchungszwecke im Institut für Immunologie nötig war, fand der ungenutzte Anteil Eingang in das gepoolte Serum. Bis zur Verwendung wurde das Serum tief gefroren, bei einer Temperatur von  $-18^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die 40 Zähne des zweiten Versuchsabschnittes wurden in vier Untergruppen zu je 10 Zähnen unterteilt, an denen vier verschiedene Lösungsansätze erprobt werden sollten. An der ersten Gruppe kam ausschließlich Blutserum als Untersuchungsmedium zur Anwendung. An den Zähnen der zweiten Gruppe wurde Blutserum mit Zusatz von NaF getestet. Das Fluorid wurde in einer Konzentration von 1 ppm zugegeben. Diese ersten beiden Lösungsansätze hatten einen durchschnittlichen pH-Wert von 7,8. Die verwendete

Lösung der dritten Gruppe setzte sich zusammen aus 8 Teilen einer synthetischen Lösung mit 2 mM CaCl<sub>2</sub> und 2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Damato et al. 1990) und 2 Teilen Blutserum mit einem pH-Wert von 7,3. An der vierten Gruppe kam die synthetische Lösung der dritten Gruppe zum Einsatz. Die Konzentrationen der biologisch aktiven Kalziumionen wurden mit dem Radiometer ABL 505 gemessen. Im Blutserum lag sie bei 1,1 mmol/l und in der Lösung der dritten Gruppe bei 1,8 mmol/l.

Als Reaktionsgefäße dienten verschließbare Gläschen mit einem Fassungsvermögen von 10 ml. Für jeden Zahn wurde ein Gläschen verwendet. Um eine Akkumulation von Reaktionsprodukten zu minimieren, erfolgte nach jeweils 48 Stunden ein Austausch der Reaktionsmedien. Die Gesamtdauer der Versuchsdurchführung belief sich auf 28 Tage. Die Raumtemperatur während dieses Zeitraumes bewegte sich zwischen 22 und 25°C. Um eine Verfälschung der Untersuchungen durch Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukten zu verhindern, wurde Natriumazid in einer Konzentration von 0,02% als Bakteriostatikum zugesetzt.

Für alle Auswertungsmethoden wurde folgende Gruppeneinteilung verwendet:

Tabelle 1 Übersicht der Versuchsgliederung

Versuchsgruppe	Untergruppen
Erster Abschnitt:	1. pH-cycling 4 Wochen 2. pH-cycling 8 Wochen
Zweiter Abschnitt - Lösungsansätze bestehend aus:	1. Serum 2. Serum + Natriumfluorid 3. Kalziumphosphat-Lösung + Serum 4. Kalziumphosphat-Lösung

#### 4.4. Auswertungsmethoden

##### 4.4.1. Polarisationsmikroskopie

Die zu untersuchenden Zahnhälften wurden mit einem azetonlöslichen Kleber auf Objektträgern befestigt. Die Herstellung der Dünnschliffe erfolgte mit einem Schleifgerät der Gerätekette nach Donath. Um im Durchlicht polarisationsoptische Untersuchungen durchführen zu können, wurden Schliffe der unentkalkten Zahnhartgewebe von 80-100 µm Dicke hergestellt. Die Untersuchungen erfolgten bei gekreuzten Polaren in der Polarisationsmikroskopiefunktion des Lichtmikroskops Axioplan 2 der Firma Carl-Zeiss-Jena GmbH. Als Imbibitionsmedium diente vorwiegend Xylol, aber auch Wasser und Ethanol. Ausgewählte Befunde wurden fotografisch dokumentiert.

#### 4.4.2. Läsionstiefenmessung

Die Läsionstiefen der demineralisierten und remineralisierten Bereiche konnten im polarisationsoptischen Bild gemessen werden. Dazu diente ein im Okular des Polarisationsmikroskops angebrachter Maßstab. Zur Messung musste die Tiefenschärfe des Mikroskops soweit heruntergeregelt werden, dass sich nur eine möglichst schmale Schicht des Schliffpräparates im Fokus befand. So wurde vermieden, ein Summenbild aller Schichten zu vermessen.

Als Messpunkte für die Läsionstiefen wurden die Zahnoberfläche und der Farbumschlag zwischen der Läsion und den intakten Zahnhartgeweben gewählt, die einen unterschiedlichen Grad der Doppelbrechung aufweisen. An Läsionen, deren Läsionsfront nicht parallel zur Zahnoberfläche verlief, erfolgte die Messung an den am weitesten in die Zahnhartgewebe vorgedrungenen Stellen, da sie den Ausprägungsgrad einer Läsion bestimmen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm SPSS 10.07. Zur Überprüfung der Mittelwertunterschiede zwischen den Tiefen des de- und remineralisierten Läsionsteils auf Signifikanz diente der gepaarte t-Test. Als maßgebendes Signifikanzniveau wurde die 5%-Marke herangezogen.

#### 4.4.3. Mikrohärteprüfung

Zur Ermittlung der Mikrohärtewerte fand das Prüfgerät MHT-10 der Firma Anton Paar GmbH Verwendung. Der mechanische Teil war an das Lichtmikroskop Axioplan in der Auflichtfunktion gekoppelt. Die auf einem Plastelineblock fixierten Zahnschliffe wurden mit dem Verfahren nach Vickers mit einer Kraft von 10 Pond bei einer Belastungszeit von 10 Sekunden geprüft. Je Messreihe erfolgten insgesamt 13 Mikrohärteprüfungen im Abstand 10-350 µm senkrecht zur Zahnoberfläche. In den Bereichen a bis d der Lackfensterungen wurde jeweils eine Messreihe durchgeführt. Um Überschneidungen und gegenseitige Beeinflussung der Mikrohärteeindrücke zu verhindern, mussten sie gegeneinander versetzt platziert werden.

Von Interesse war dabei der Vergleich zwischen den Bereichen a und d bzw. b und c. Somit wurden Aussagen möglich, ob die unbehandelten Zahnhartgewebe maturiert sind und ob eine Remineralisation der Läsionen stattgefunden hat. Verwendung fand das Statistikprogramm SPSS 10.07. Mit Hilfe des gepaarten t-Tests wurden gruppenweise von insgesamt 30 Schmelz- und 30 Wurzelpräparaten die Messwerte verglichen, die im selben Abstand von der Zahnoberfläche ermittelt werden konnten. Diese Signifikanzprüfungen wurden bis zu einer Tiefe von 100 µm durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag bei 0,05.

#### 4.4.4. Rasterelektronenmikroskopie

Ausgewählte Schliffpräparate wurden zum Zweck der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung auf Metallobjektträgern befestigt und mit einer Goldschicht von 50 nm Stärke besputtert. Zum Einsatz kam das Rasterelektronenmikroskop von Typ Tesla BS 301. Es erfolgte die Begutachtung sowohl der Zahnoberfläche als auch der geschliffenen Flächen. Auf die viel geübte Praktik des vorherigen Anätzens der Zahnhartgewebe wurde zur Vermeidung von Artefakten verzichtet. Dies führt zwar zu einem verringerten Formenreichtum des dokumentierenden Bildmaterials, jedoch auch zu einer Verringerung der durch die Manipulation am Untersuchungsmaterial eintretenden Fehler.

#### 4.4.5. EDX-Analyse am ESEM

Die energiedispersive Röntgenspektrometrie (EDX) erlaubt die Bestimmung der Häufigkeit der verschiedenen Elemente in den untersuchten Zahnhartgeweben, jedoch nicht chemische Verbindungen und Bindungsverhältnisse zu klären. Zur Quantifizierung des Vorkommens von Spurenelementen in Zahnhartgeweben wie Fluor, Magnesium, Natrium oder Chlor, ist die Aussagekraft der energiedispersiven Röntgenspektrometrie begrenzt, da der integrierte Fehler durch das geringe Verhältnis von Nettointensität des nachzuweisenden Elements zur Hintergrundintensität zu groß ist. Die Forderung nach einem großen Wert der Verhältnisse der Intensitäten und damit einem kleinen Fehler, erfüllen die in Zahnhartgeweben häufigen Elemente Kalzium, Phosphor und Sauerstoff. Daher sind quantitative Aussagen möglich. Im Speziellen interessiert das Verhältnis von Kalzium und Phosphor. Diese Verhältniszahl erlaubt es, dann doch eine Aussage zu möglichen Bindungsverhältnissen zu treffen.

Zur Aufnahme der energiedispersiven Röntgenspektren diente ein EDX-Detektor der Firma EDAX, welcher an ein XL 30 ESEM-FEG der Firma Philips montiert, betrieben wurde. Im Gegensatz zum herkömmlichen Rasterelektronenmikroskop, in dessen Probenkammer ein Hochvakuum zu herrschen hat, kann in der Probenkammer des Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) Gas vorhanden sein. Mit Drücken höher als 10 mbar wird der Partialdruck von H<sub>2</sub>O erreicht, so dass die Untersuchung wasserhaltiger Objekte ohne Eintrocknungsartefakte möglich wird. Erforderlich für diese Methodik ist ein Abschluss zum Vakuum des Mikroskops durch eine Blende und durch differentielles Pumpen. Voraussetzung für derartige Mikroskope ist, dass noch ein genügender Bruchteil der Primärelektronen im Gasraum ungestreut bleibt. Die gestreuten Elektronen bestrahlen das Objekt in einer breiten Verteilung (Skirteffekt). Im ESEM-Betrieb wird daher vorzugsweise mit wenigen Millimetern Gasstrecke gearbeitet. Während Rückstreuелеktronen (BSE) mit konventionellen Detektoren erfasst werden, können

Sekundärelektronen (SE) durch Gasstreuung nicht zum Detektor gelangen. Jedoch durch eine oberhalb des Objektes gelegene Elektrode wird die Zahl der SE in einer Ionisationskaskade vervielfacht, so dass der kollektierte Elektrodenstrom als SE-Signal dient. Die Strahlverbreiterung (Skirt) wirkt sich nachteilig auf den Kontrast von BSE- und SE-Bildern aus, da nur die ungestreuten Elektronen einen Bildkontrastbeitrag leisten und die gestreuten zum Untergrund beitragen. Letzteres setzt auch das laterale Auflösungsvermögen bei einer Röntgenmikroanalyse mit energiedispersivem Detektor herab.

Es entfällt der Zwang, die Zahnschliffpräparate zum Zwecke der Untersuchung im ESEM mit einer leitfähigen Schicht aus Gold oder Kohlenstoff zu versehen. Allerdings musste eine leitfähige Verbindung zwischen Objektträger und Präparat realisiert werden. Diese Aufgabe erfüllte eine doppelseitig klebfähige Folie aus Kohlenstoff. Eine Messreihe bestand aus drei Einzelmessungen. Zwei dieser Messungen erfolgten in den Zahnhartgeweben der subfiziellen Läsionen, oberflächennah und oberflächenfern. Die dritte Einzelmessung wurde in einer Entfernung von ca. 170  $\mu\text{m}$  von der Zahnoberfläche durchgeführt. Das jeweils detektierte Areal hatte eine Breite von 40  $\mu\text{m}$  und Höhe von 20  $\mu\text{m}$ . Dadurch konnte über einen größeren Bereich integriert und Einzelfehler minimiert werden. Eine Messreihe erfolgte pro Bereich a, b, c und d einer Lackfensterung. Die Messungen wurden bei einem Druck von 1 Torr, einer Energie des Elektronenstrahls von 20 keV und über einen Zeitraum von 150 LTsec durchgeführt.

#### 4.4.6. Mikro-Raman-Spektroskopie

Die Raman-Spektroskopie beruht auf dem Raman-Effekt. Werden Moleküle mit monochromatischem Licht (Laser) angeregt, so wird außer der Streustrahlung (Rayleigh-Streuung) ein geringer Anteil Strahlung emittiert, die gegenüber der Frequenz der Lichtquelle verschoben ist. Diese Spektrallinien nennt man Raman-Linien. Als Raman-Shift wird die Differenz zwischen Anregungswellenlänge und emittierter Raman-Linie bezeichnet und in relativen Wellenzahlen angegeben. Jedes Molekül oder Festkörper zeigt ein typisches Bandenmuster, das so hochspezifisch ist, dass Isomere und Polymorphe derselben Verbindung signifikant unterschieden werden können. Die Intensitäten der Raman-Banden eines Gemisches korrespondieren mit den Konzentrationen der einzelnen Komponenten im Gemisch. Durch die Einführung des konfokalen Prinzips in der Raman-Mikroskopie lassen sich Raman-Spektren aus einem begrenzten Volumen erhalten, das sich aus der Beugungsgrenze des Laserstrahls ergibt. Man erreicht die konfokale Abbildung durch eine geeignete Lochblende. Der Einfall von

Streulicht und möglicherweise auch von Fluoreszenzstrahlung wird durch die Lochblende verringert.

Verwendung zur Analyse fanden dieselben Präparate und Messregionen, an denen die energiedispersive Röntgenspektrometrie durchgeführt wurde. Um Fehlmessungen auszuschließen, wurde der Messpunkt für die Mikro-Raman-Spektroskopie neben die Messfelder der Röntgenspektrometrie gelegt, da der Elektronenstrahl zu Veränderungen in den Zahnhartgeweben führen konnte. Zur Ermittlung der Raman-Spektren diente das konfokale Mikro-Raman-Spektroskop Labram 1B der Firma Dilor, mit einem Helium-Neon(HeNe)-Laser. Die Datenanalyse erfolgte mit der Software Labspec 4.0. Der HeNe-Laser erzeugte monochromatisches Licht mit einer Wellenlänge von 632,8 nm. Die Akkumulationszeit der Spektren und der Durchmesser der Lochblende (Hole) mussten im Gegensatz zur idealen Konstellation, bei der sowohl die Aufnahmezeit als auch das Hole bei allen Messungen gleiche Werte aufweisen sollten, den lokalen Bedingungen angepasst werden. Die Zeit variierte zwischen 60 und 120 Sekunden und das Hole zwischen 200 und 400 Mikrometern. Veränderungen dieser Werte führten vor allem zu relativen Intensitätsschwankungen der Spektren. Da jedoch keine quantitative Auswertung erfolgen sollte, dafür wäre die Registrierung der Intensitäten der Raman-Spektren in einer Vergleichsstudie erforderlich gewesen, ist es dennoch möglich, die Ergebnisse der Analyse der Mikro-Raman-Spektroskopie im Kontext mit den Ergebnissen der zuvor erläuterten Auswertungsmethoden zu bewerten und ein Urteil hinsichtlich der Eignung dieser Form der Analyse für die vorliegende Fragestellung zu fällen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Polarisationsmikroskopische Auswertung

An allen 190 Zahnschliffen, die aus den 95 Versuchszähnen hergestellt wurden, erfolgte eine polarisationsmikroskopische Begutachtung der artifiziellen Läsionen der Zahnhartgewebe. Dies entspricht den Bereichen b und c der Lackfensterungen. Da Zahnhartgewebe biologischen Ursprungs sind und diese individuelle Varianzen aufweisen, sowohl bedingt durch genetisch determinierte Parameter, als auch durch einzigartige Lebensumstände und -gewohnheiten der Individuen, muss der Bereich, auf den die Versuchslösungen eingewirkt haben, mit dem jeweils dazugehörigen Bereich, der nach der Demineralisation mit Lack bedeckt wurde, verglichen werden. Zur Dokumentation der Beobachtungen sind für jeden Versuchsansatz ausgewählte, als typisch zu erachtende Präparate, dargestellt. Als Imbibitionsmedium diente bei allen Mikrographien Xylol.

Während der Begutachtung aller Präparate zeigte sich, dass im Zuge des Versuchsablaufs die maturierte Zone, entsprechend Bereich d der Lackfensterung, keine erkennbaren und klar auf das Versuchsareal abzugrenzenden Veränderungen hervorbrachte und darum bei der Auswahl des dokumentierten Materials in den Hintergrund trat.

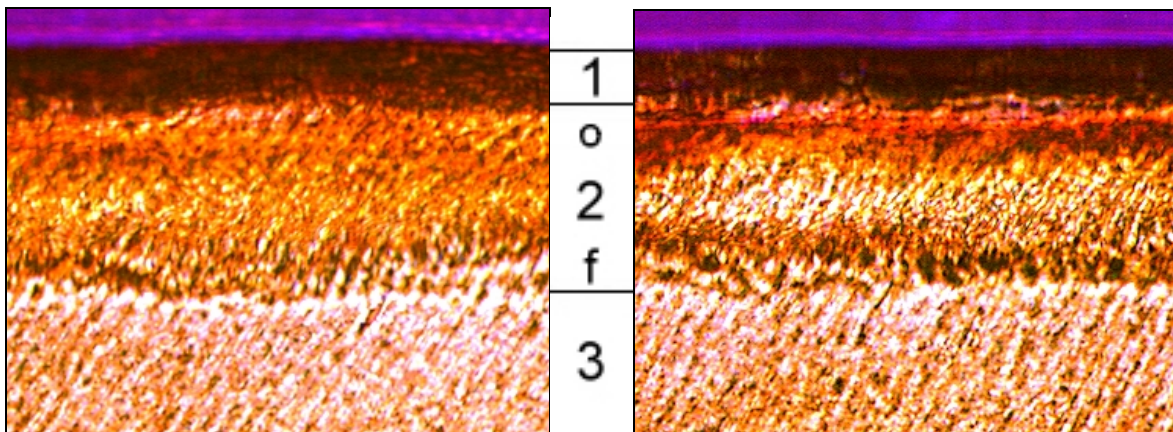


Abb. 2a Artificielle Schmelzläsion

Abb. 2b Remineralisation der Schmelzläsion

- Abb. 2 Schmelzpräparat nach 4 Wochen im pH-cycling-System (pol x, Rot I, 580:1)
- Zone 1: Zahnoberfläche außerhalb der Fokusebene (die Breite dieser Zone ist abhängig vom Winkel der Zahnoberfläche zur Schliifffläche)
  - Zone 2: subfizielle Zahnhartgewebsläsion
    - o: oberflächlicher Läsionsteil
    - f: Läsionsfront
  - Zone 3: nicht kariöses Zahnhartgewebe
  - Zone 2+3: Schliifffläche



Die Abbildung 2 zeigt ein Schmelzpräparat, das nach Erzeugung einer artifiziellen Läsion 4 Wochen lang dem pH-cycling unterzogen wurde. Verglichen mit der Abbildung 2a, dem Ausgangszustand der Schmelzläsion, offenbart Abbildung 2b eine deutliche Steigerung der Strukturzeichnung im mittleren Läsionsbereich, welches auf eine stattgefundene Remineralisation schließen lässt. Im oberflächlichen Bereich und an der Läsionsfront ist eine Zunahme der schwarzen Strukturen zu verzeichnen. Diese entstehen durch luftgefüllte Hohlräume. Im demineralisierten Schmelz sind diese Hohlräume und Spalten groß genug, um das Imbibitionsmedium Xylol eindringen zu lassen. Durch die Mineraleinlagerungen im Rahmen der Remineralisation verengen sich die Hohlräume bis zu einem Grad, ab dem es Xylol nicht mehr gelingt, in die Spalträume einzudringen. Die verbleibende Luft führt zu einer Totalreflexion des durchstrahlenden Lichtes.

Ein Schmelzpräparat, das 8 Wochen im pH-cycling-System behandelt wurde, ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Demineralisation führte am Präparat zu einem Umschlag der negativen (gelb/ orange) in die positive (blau) Doppelbrechung entlang der Retziuslinien (Abbildung 3a). Die Remineralisation ist durch die Verringerung des Ausmaßes der positiven Doppelbrechung gekennzeichnet (Abbildung 3b).

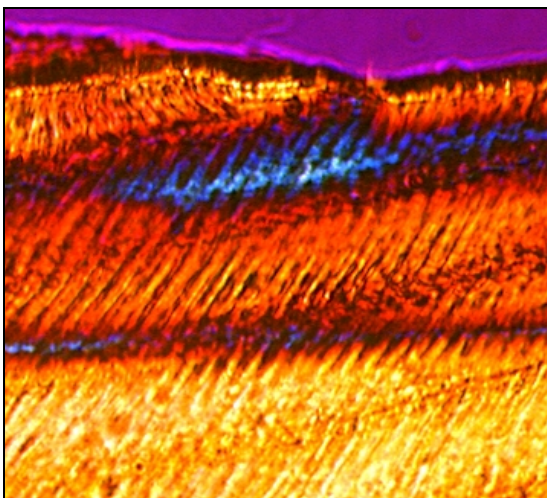


Abb. 3a Artifizielle Schmelzläsion

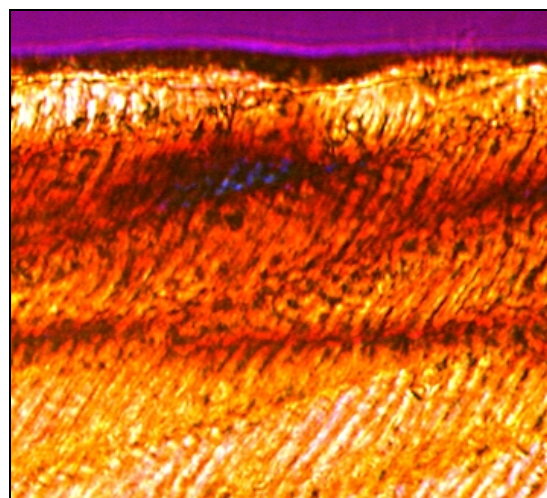


Abb. 3b Remineralisation der Schmelzläsion

Abb. 3 Schmelzpräparat nach 8 Wochen im pH-cycling-System (pol x, Rot I, 760:1)

Die Abbildung 4 zeigt eine Schmelzläsion, die 4 Wochen mit Serum behandelt wurde. Oberflächlich kann eine Remineralisation festgestellt werden. Dort erfolgte eine Verstärkung der negativen Doppelbrechung. Im Bereich der Läsionsfront ist eine Farbverschiebung zum Roten zu erkennen, was auf eine Verringerung der negativen Doppelbrechung und Abnahme des Mineralgehaltes deutet.

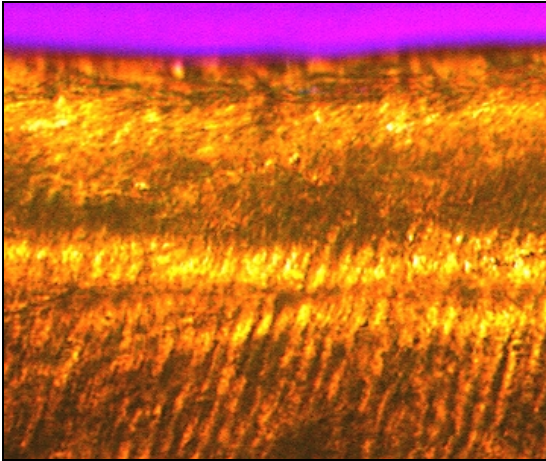


Abb. 4a Artificielle Schmelzläsion

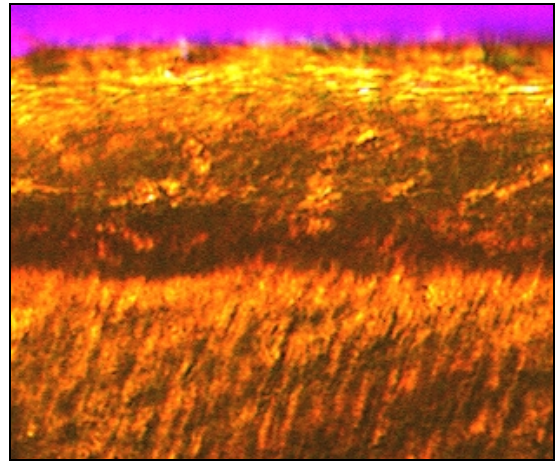


Abb. 4b Schmelzläsion nach Versuchsdurchführung

Abb. 4 Schmelzpräparat mit Serum als Versuchslösung (pol x, Rot I, 540:1)

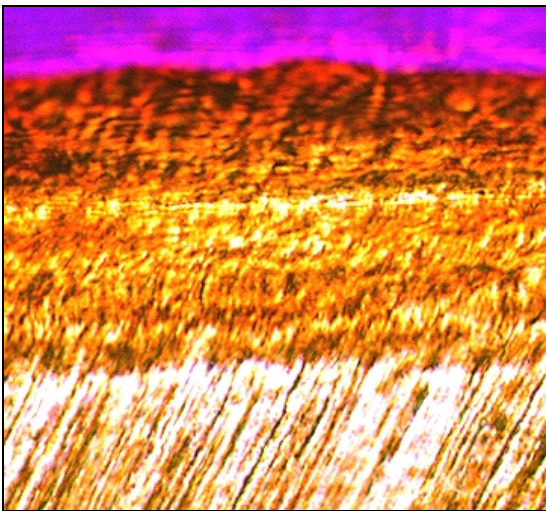


Abb. 5a Artificielle Schmelzläsion

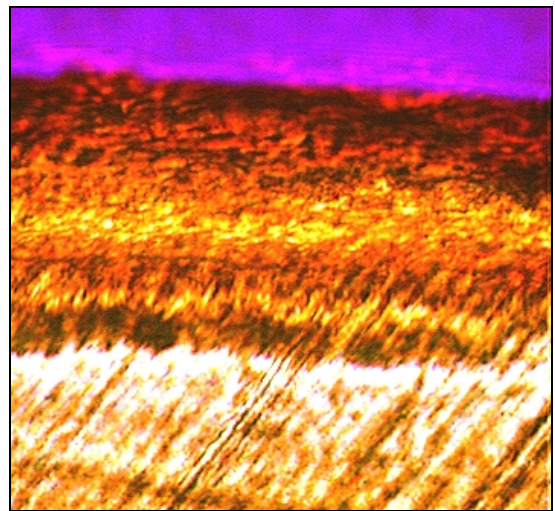


Abb. 5b Schmelzläsion nach Versuchsdurchführung

Abb. 5 Schmelzpräparat mit Serum und Natriumfluorid als Versuchslösung (pol x, Rot I, 540:1)

Ein Präparat der Serum-Untergruppe, der Serum und Natriumfluorid als Versuchslösung diente, ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Veränderungen im behandelten Läsionsbereich lassen im Vergleich zum unbehandelten Läsionsteil eine Remineralisation vorwiegend im oberflächenfernen Läsionsareal erkennen. Dies wird durch die Zunahme luftgefüllter Hohlräume und damit vermehrter Totalreflexion gestützt. Im oberflächennahen Läsionsteil sind keine Veränderungen bezüglich der Doppelbrechung und Struktur festzustellen.

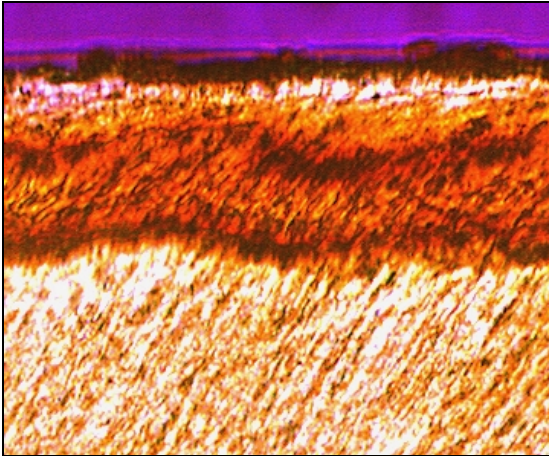


Abb. 6a Artificielle Schmelzläsion

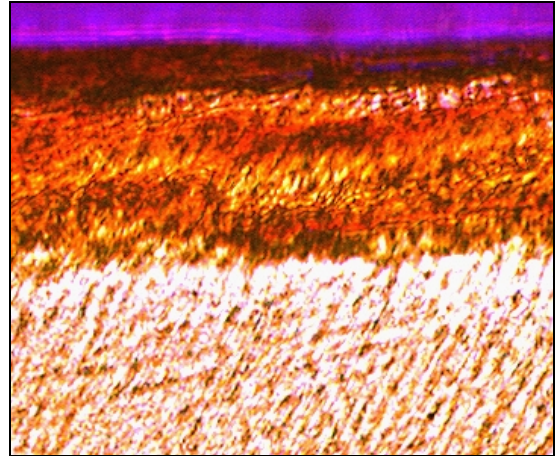


Abb.6b Schmelzläsion nach Versuchsdurchführung

Abb. 6 Schmelzpräparat mit Kalziumphosphat-Lösung und Serum als Versuchslösung (pol x, Rot I, 480:1)

Die Unterschiede im Läsionsbereich eines Schmelzpräparates der 3. Untergruppe des zweiten Versuchsabschnittes zeigt Abbildung 6. Die Veränderung ist als sehr gering zu erachten und besteht vorwiegend in einer Verringerung der luftgefüllten Hohlräume. Der Effekt eines remineralisierenden Materialeinbaus ist daher trotz der geringen Ausprägung vorhanden.

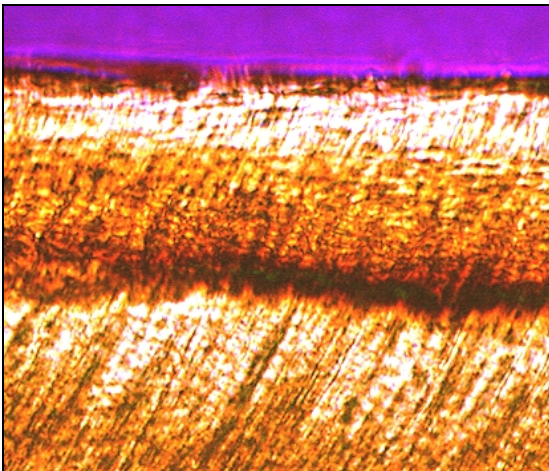


Abb. 7a Artificielle Schmelzläsion

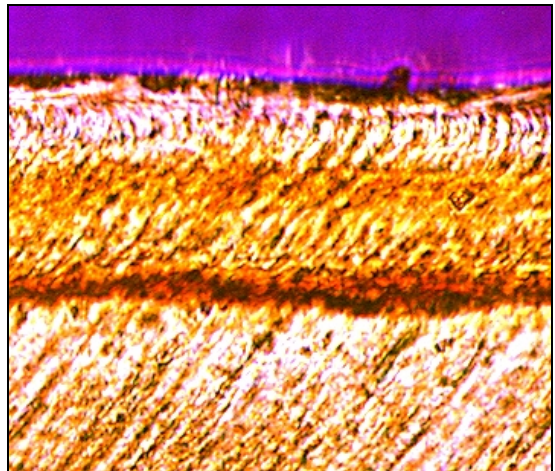


Abb. 7b Remineralisation der Schmelzläsion

Abb. 7 Schmelzpräparat mit Kalziumphosphat-Lösung als Versuchslösung (pol x, Rot I, 500:1)

In den Abbildungen 7a und 7b verdeutlicht die Gegenüberstellung der Bereiche einer Schmelzläsion, an der eine synthetische Kalziumphosphat-Lösung zur Anwendung kam, die erreichte Remineralisation. Vorwiegend wurden die nach der Demineralisation mit Luft gefüllten Hohlräume durch den Mineraleinbau verkleinert. Die Läsionsfront erscheint nach Verwendung der Versuchslösung besser mineralisiert.

Nach 4 Wochen pH-cycling sind die Veränderungen an einer Wurzelläsion in Abbildung 8 zu erkennen. Auf eine Remineralisation deutet die verstärkte Strukturierung der Läsion, insbesondere im Bereich der Läsionsfront, im Vergleich zur homogenen, deutlich vom nicht demineralisierten Wurzelentin abgegrenzten Läsion vor Versuchsdurchführung, hin. Die Wurzeloberfläche zeigt einen durch die Demineralisation bedingten, erosiven Substanzverlust.

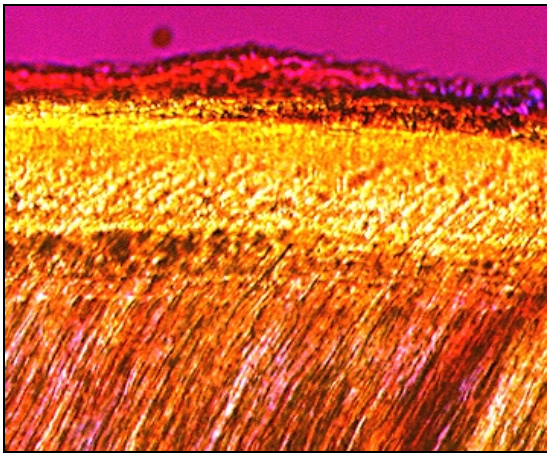


Abb. 8a Artificielle Wurzelläsion

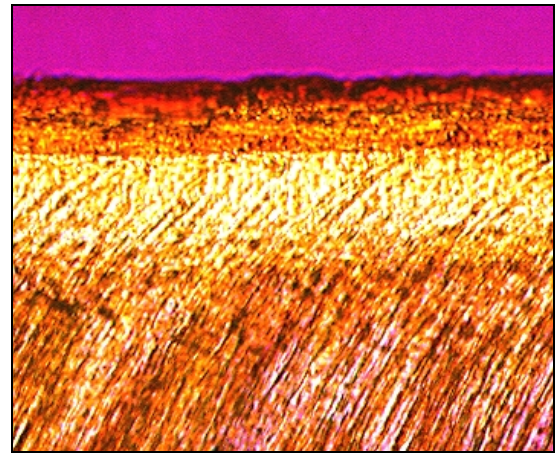


Abb. 8b Remineralisation der Wurzelläsion

Abb. 8 Wurzelpräparat nach 4 Wochen im pH-cycling-System (pol x, Rot I, 300:1)

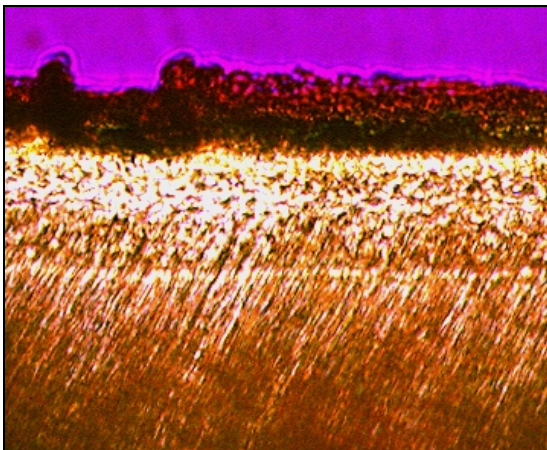


Abb. 9a Artificielle Wurzelläsion

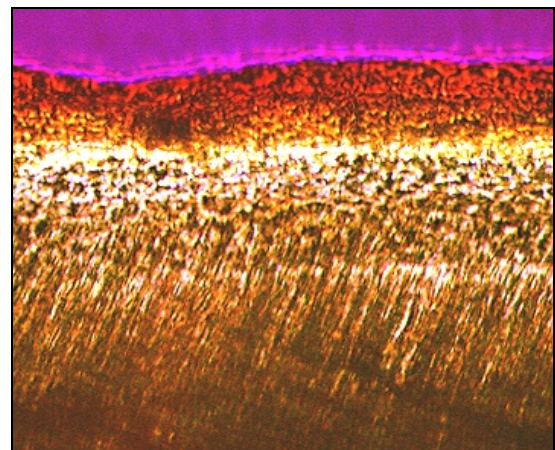


Abb. 9b Wurzelläsion nach Versuchsdurchführung

Abb. 9 Wurzelpräparat nach 8 Wochen im pH-cycling-System (pol x, Rot I, 300:1)

Das Wurzelpräparat der Abbildung 9 wurde 8 Wochen dem pH-cycling unterzogen und zeigt ähnlich der Abbildung 8 eine Verstärkung der Strukturierung innerhalb der Läsion, welche auf eine Mineraleinlagerung weist. Sowohl nach 4 als auch nach 8 Wochen pH-cycling ist der Grad der erzielten Remineralisation als gering einzustufen. Teilweise ist eine Nivellierung der durch Erosion veränderten Wurzeloberfläche zu erkennen, die in erster Linie durch einen weiteren erosiven Substanzverlust verursacht wird.

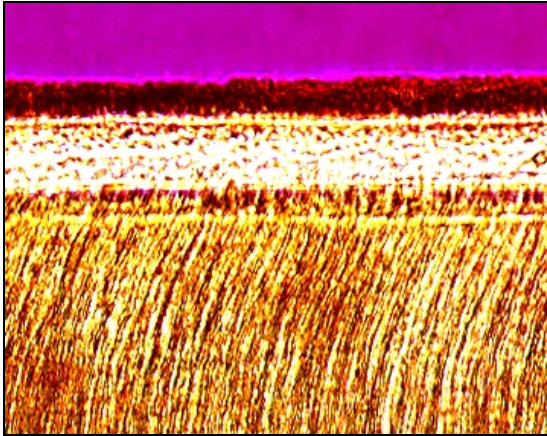


Abb. 10a Künstliche Wurzelläsion

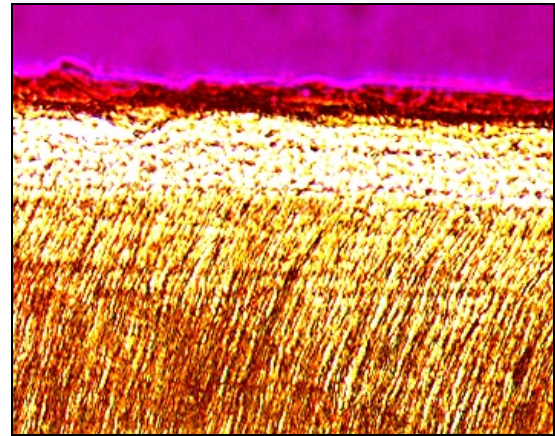


Abb. 10b Remineralisation der Wurzelläsion

Abb. 10 Wurzelpräparat mit Serum als Versuchslösung (pol x, Rot I, 300:1)

In der Abbildung 10 ist die Wurzelläsion eines Präparates dargestellt, dem Serum als Versuchslösung diente. An der Läsionsfront ist die Remineralisation gekennzeichnet durch eine Verdichtung des Minerals, was zu einer verringerten Totalreflexion des Lichtes und Schwarzfärbung in diesem Bereich führt.

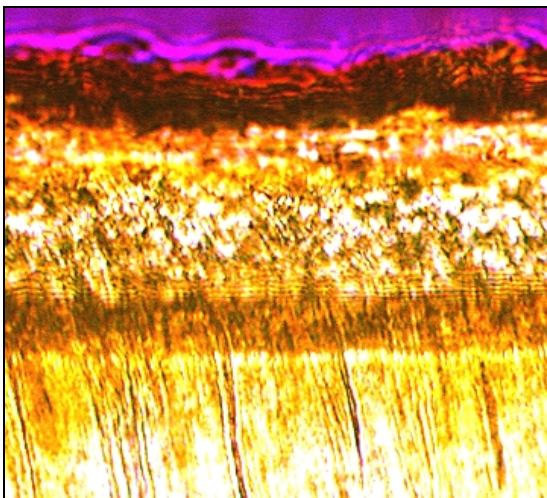


Abb. 11a Künstliche Wurzelläsion

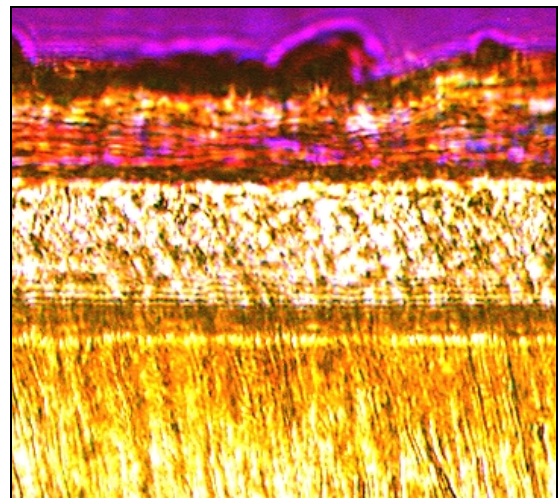


Abb. 11b Wurzelläsion nach Versuchsdurchführung

Abb. 11 Wurzelpräparat mit Serum und Natriumfluorid als Versuchslösung (pol x, Rot I, 460:1)

Die Abbildungen 11a und 11b dokumentieren die durch Serum und Natriumfluorid als Versuchslösung hervorgerufene Remineralisation eines Wurzelpräparates. Im Vergleich zur Abbildung 10 ist die Remineralisation im Bereich der Läsionsfront sehr schwach ausgeprägt, während im oberflächlichen Läsionsteil die Mineraleinlagerungen deutlich zu beurteilen sind. Auf der Wurzeloberfläche deuten die Farbnuancen (blau/ violett) hingegen auf einen Wechsel zur positiven Doppelbrechung und damit auf einen Mineralverlust hin, der aber auf die Oberfläche beschränkt ist.

Eine ausgeprägte Remineralisation zeigt sich an dem in Abbildung 12 dargestellten Wurzelpräparat der Untergruppe, an denen eine Versuchslösung aus synthetischer Kalziumphosphat-Lösung und Serum verwendet wurde. Mineraleinlagerungen fanden an der Läsionsfront und verstärkt in den oberflächlichen Läsionsschichten (Farbwechsel von blau zu orange) statt. Zusätzlich zu den subfiziellen Einlagerungen sind superfizielle Auflagerungen festzustellen.

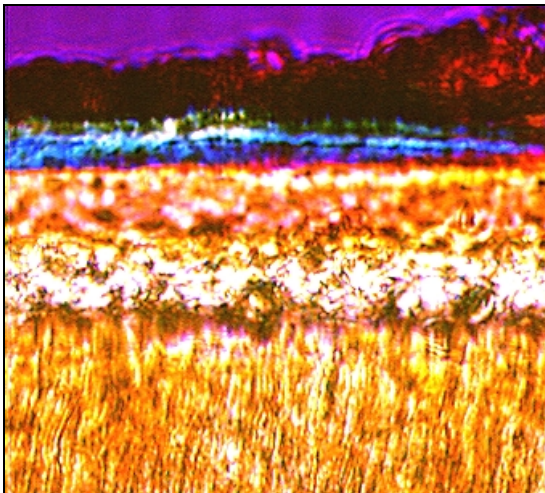


Abb. 12a Artificielle Wurzelläsion

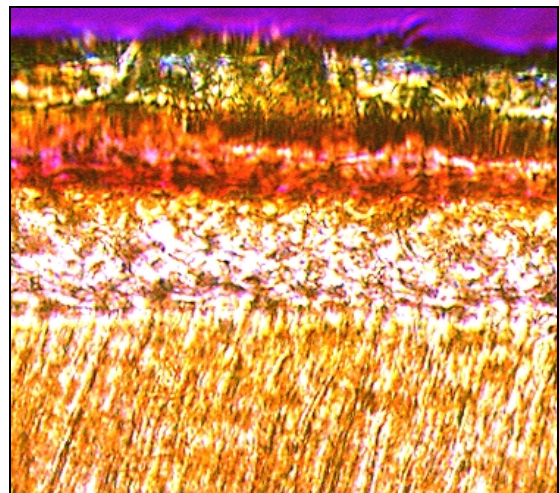


Abb. 12b Remineralisation der Wurzelläsion

Abb. 12 Wurzelpräparat mit Kalziumphosphat-Lösung und Serum als Versuchslösung (pol x, Rot I, 390:1)

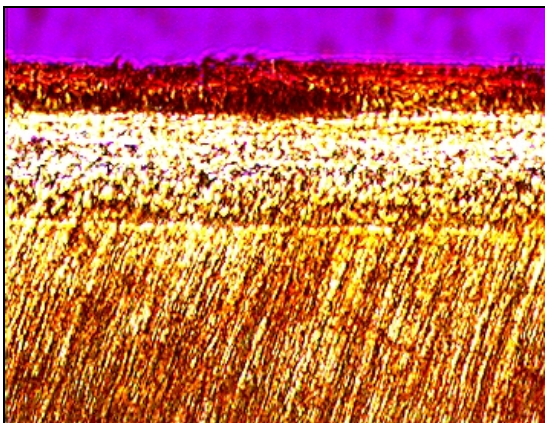


Abb. 13a Artificielle Wurzelläsion

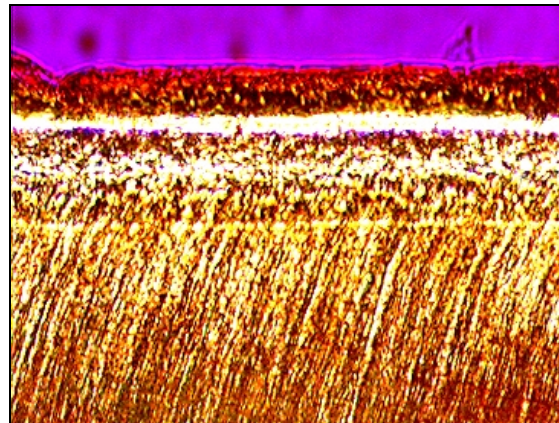


Abb. 13b Wurzelläsion nach Versuchsdurchführung

Abb. 13 Wurzelpräparat mit Kalziumphosphat-Lösung als Versuchslösung (pol x, Rot I, 280:1)

Die Abbildung 13 zeigt eine Wurzelläsion ohne (Abbildung 13a) und nach Behandlung mit einer synthetischen Kalziumphosphat-Lösung (Abbildung 13b). Die Veränderungen im Sinne einer Remineralisation betreffen die oberflächlich gelegene Läsionshälfte. Im tieferen Teil an der Läsionsfront hat keine mit dem Polarisationsmikroskop erkennbare Remineralisation stattgefunden.

## 5.2. Läsionstiefenmessung

Die Ermittlung der Läsionstiefen diente nur zur Feststellung des Einflusses der Versuchslösungen auf die Läsionen. Ein Effekt bezüglich der Maturation der Zahnhartgewebe kann mit dieser Auswertungsmethode somit nicht getroffen werden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen aller Läsionen sind nach den Versuchsansätzen geordnet, in den Diagrammen 1 bis 3 aufgeführt.

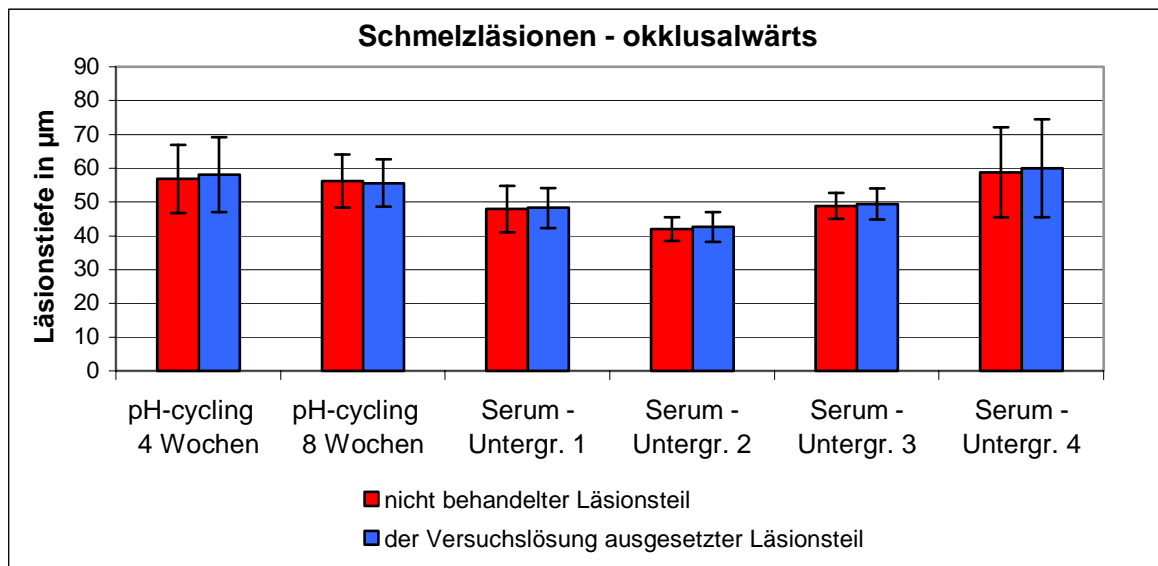


Diagramm 1 Veränderungen der Tiefe der okklusalwärts gelegenen Schmelzläsionen im Gruppenvergleich.  
Es konnten keine signifikanten Veränderungen der Läsionstiefen statistisch ermittelt werden ( $p > 0,05$ ).

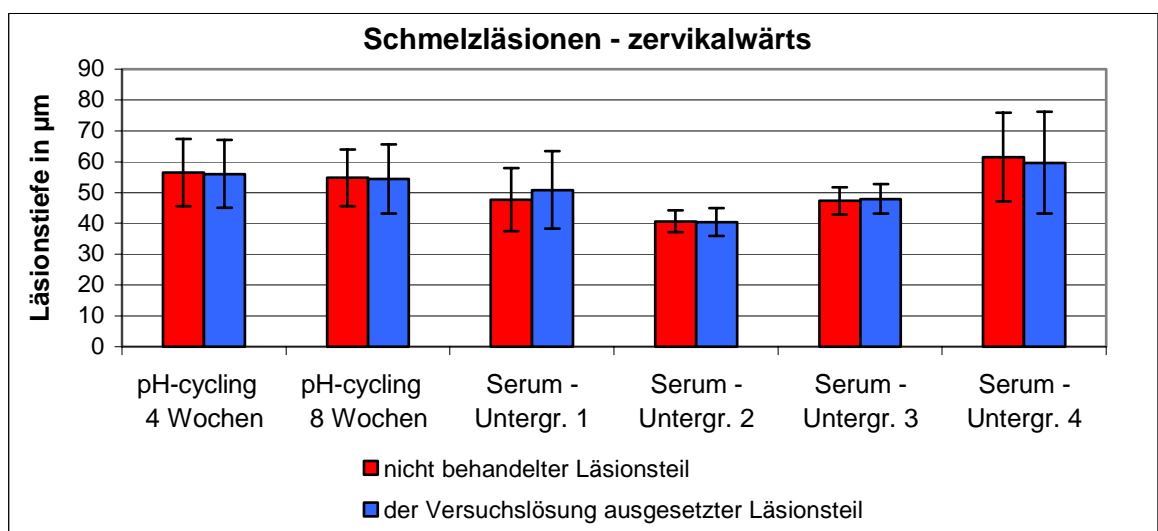


Diagramm 2 Veränderungen der Tiefe der zervikalwärts gelegenen Schmelzläsionen im Gruppenvergleich.  
Statistisch konnten keine signifikanten Veränderungen der Läsionstiefen festgestellt werden ( $p > 0,05$ ).

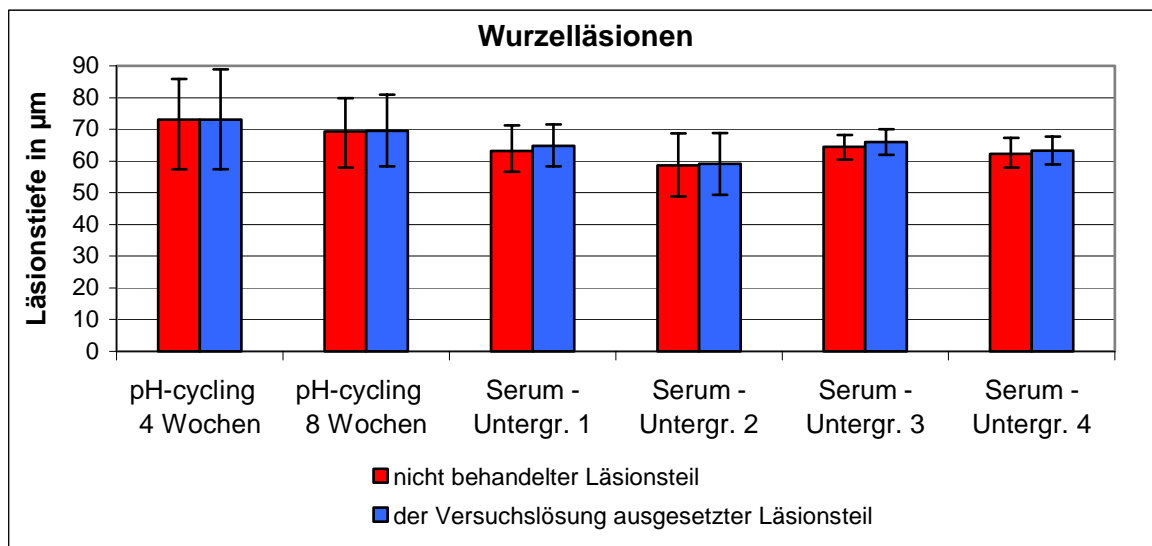


Diagramm 3 Veränderungen der Tiefe der Läsionen des Wurzelzements im Gruppenvergleich.

Für die Serum-Untergruppe 3 konnte eine signifikante Zunahme der Läsionstiefen ( $p = 0,034$ ) statistisch ermittelt werden. Die anderen Gruppen zeigten keine signifikanten Veränderungen der Läsionstiefen ( $p > 0,05$ ).

Die Veränderungen der Läsionstiefen durch die verschiedenen Versuchslösungen sind als sehr gering oder nicht vorhanden zu beschreiben. Lediglich in der Gruppe mit synthetischer Kalziumphosphat-Lösung und Serum als Versuchslösung nahm die Tiefe der Wurzelläsionen signifikant zu ( $p = 0,034$ ). Eine Bewertung dieser Ergebnisse muss im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Polarisationsmikroskopie getroffen werden. Die signifikante Zunahme der Läsionsausdehnung in der dritten Serum-Untergruppe ist weniger durch ein Vordringen der Läsionsfront ins Wurzelzement gekennzeichnet, sondern erscheint durch oberflächliche Auflagerungen bedingt.

Trotz nachweislich stattgefundener Remineralisation konnten weder das pH-cycling noch die Lösungsansätze des zweiten Versuchsabschnittes die Läsionstiefen signifikant verringern.

### 5.3. Mikrohärteprüfung

Mit dieser Auswertungsmethode ist es möglich, auch einen Vergleich der unbehandelten Zahnhartgewebe (Bereich a der Lackfensterungen) mit den Arealen, die den Versuchslösungen ohne vorherige Demineralisation ausgesetzt wurden (Bereich d der Lackfensterungen) vorzunehmen. Folglich können die Auswirkungen der De- und Remineralisation und der Maturation auf die Mikrohärtewerte studiert werden, die mit dem Mineralgehalt der Zahnhartgewebe direkt korrelieren.



Die Mikrohärtigkeit wurde an 30 Schmelz- und 30 Wurzelpräparaten in insgesamt 3120 Messungen festgestellt. Getrennt nach Schmelz und Dentin erfolgt die Darstellung der aus jeweils 5 Einzelmessungen gemittelten Werte der Mikrohärtigkeitsprofile für jede Untergruppe separat in den Diagrammen 4 bis 15. Die Standardfehler wurden zur Übersichtlichkeit jeweils nur in eine Richtung eingezeichnet. Die blaue Verbindungslinie zeigt in den Diagrammen die Remineralisation und die grüne Linie die Maturation an. Die ermittelten Mikrohärtigkeitswerte aller geprüften Präparate bestätigen die Läsionsausdehnung und lassen erkennen, dass die Versuche zu Veränderungen der Werte bis zu einer Tiefe von ca. 100 µm geführt haben. Bis zu dieser Tiefe wurden die Veränderungen der Mikrohärtigkeit auf statistische Signifikanz geprüft.

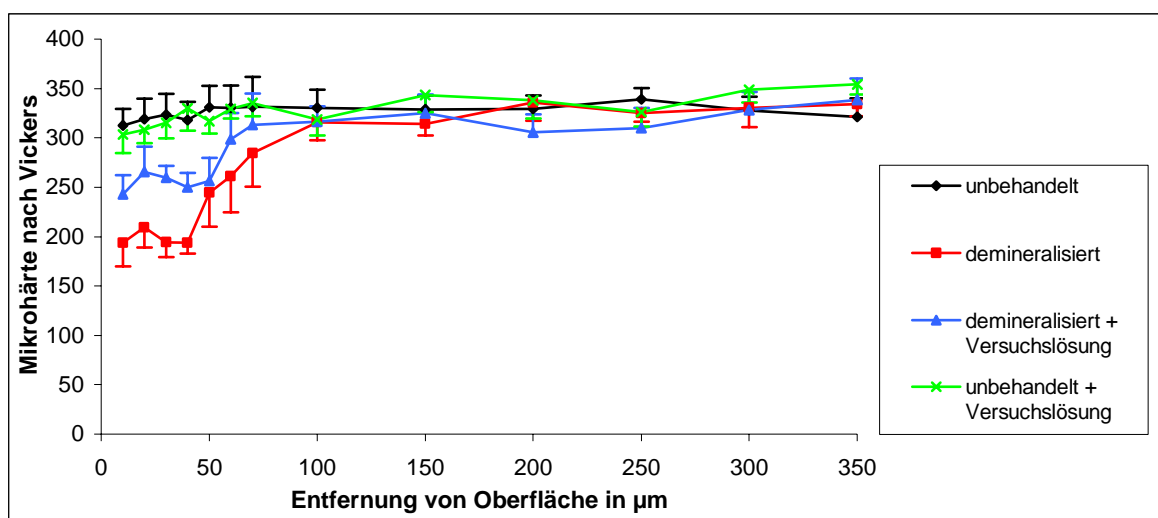


Diagramm 4 Mikrohärtigkeit der Schmelzproben nach 4 Wochen pH-cycling.  
Signifikante Remineralisation bei 30 und 40 µm ( $p < 0,05$ ).  
Keine signifikante Maturation ( $p > 0,05$ ).

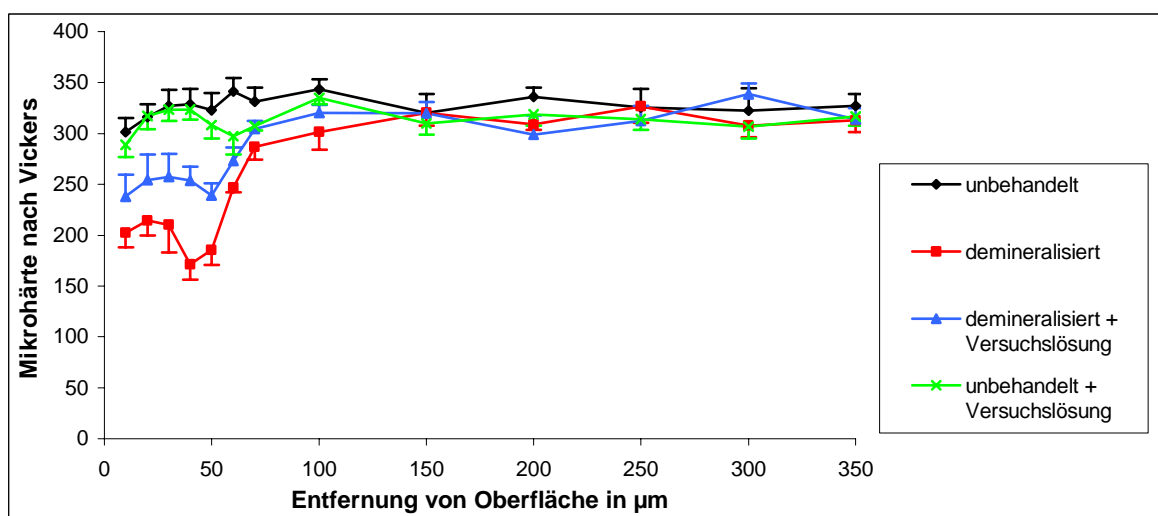


Diagramm 5 Mikrohärtigkeit der Schmelzproben nach 8 Wochen pH-cycling.  
Signifikante Remineralisation bei 10, 20, 30, 40, 50, 70 µm ( $p < 0,05$ ).  
Keine signifikante Maturation ( $p > 0,05$ ).

Nach 4 und 8 Wochen führte das pH-cycling zu einer signifikanten Erhärtung der artifiziellen Läsionen. Dies lässt auf eine Mineraleinlagerung, also eine Remineralisation schließen. Jedoch konnten die Ausgangswerte nicht wieder erreicht werden. Das pH-cycling hatte keinen signifikant ausgeprägten Einfluss auf die Mikrohärtة des nicht demineralisierten Schmelzes. Eine Mineraleinlagerung im Sinne der posteruptiven Maturation konnte daher selbst nach einer so beträchtlichen Anzahl von Wechseln des pH-Wertes nicht erzielt werden.

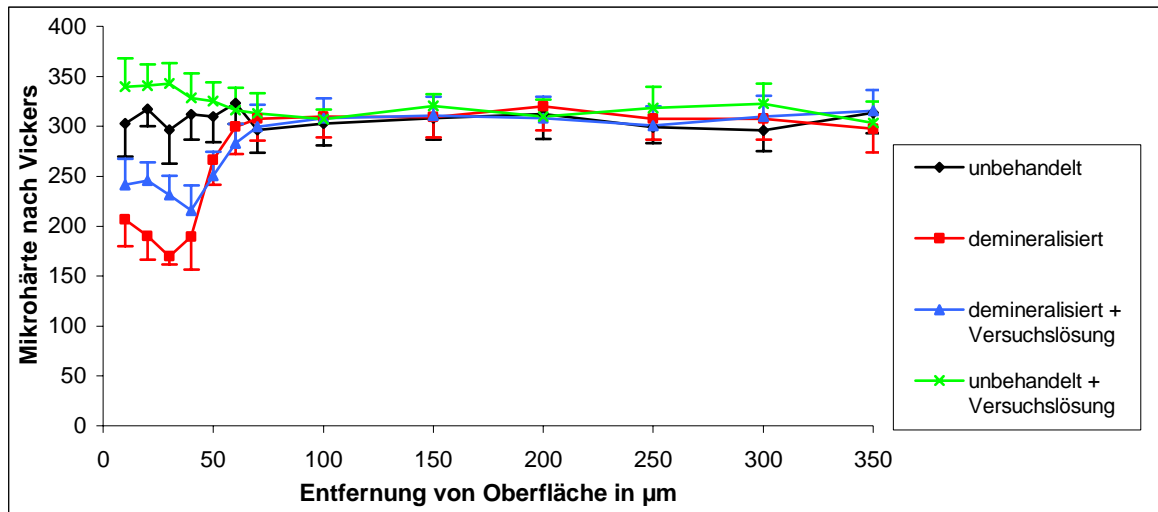


Diagramm 6 Mikrohärtة der Schmelzproben mit Serum als Versuchslösung.  
Signifikante Maturation bei 10, 20, 30 µm ( $p < 0,05$ ).  
Signifikante Remineralisation bei 20 und 30 µm ( $p < 0,05$ ).

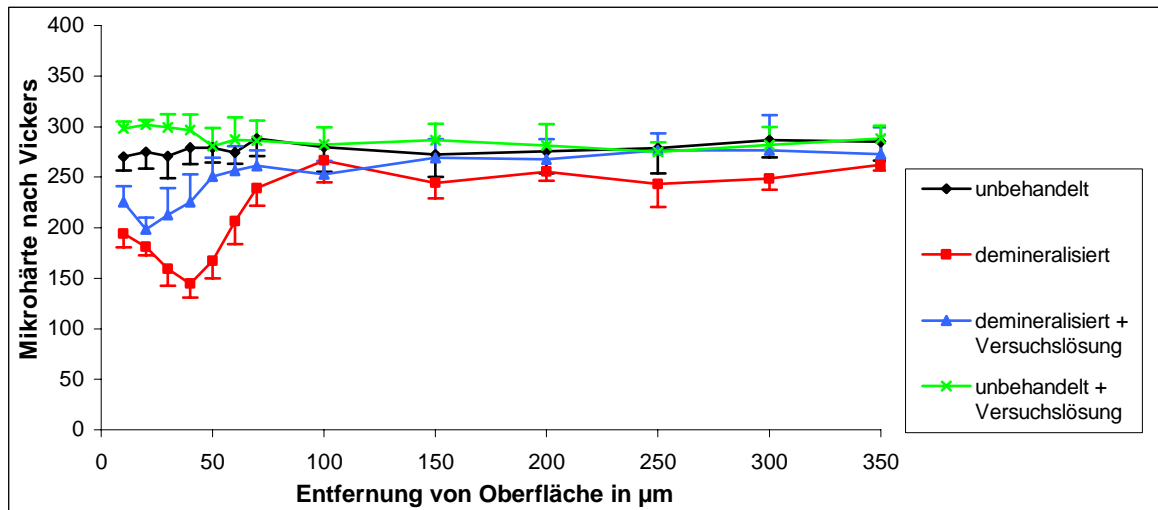


Diagramm 7 Mikrohärtة der Schmelzproben mit Serum und Natriumfluorid als Versuchslösung.  
Signifikante Maturation bei 20 und 30 µm ( $p < 0,05$ ).  
Signifikante Remineralisation bei 30, 40, 50 µm ( $p < 0,05$ ).

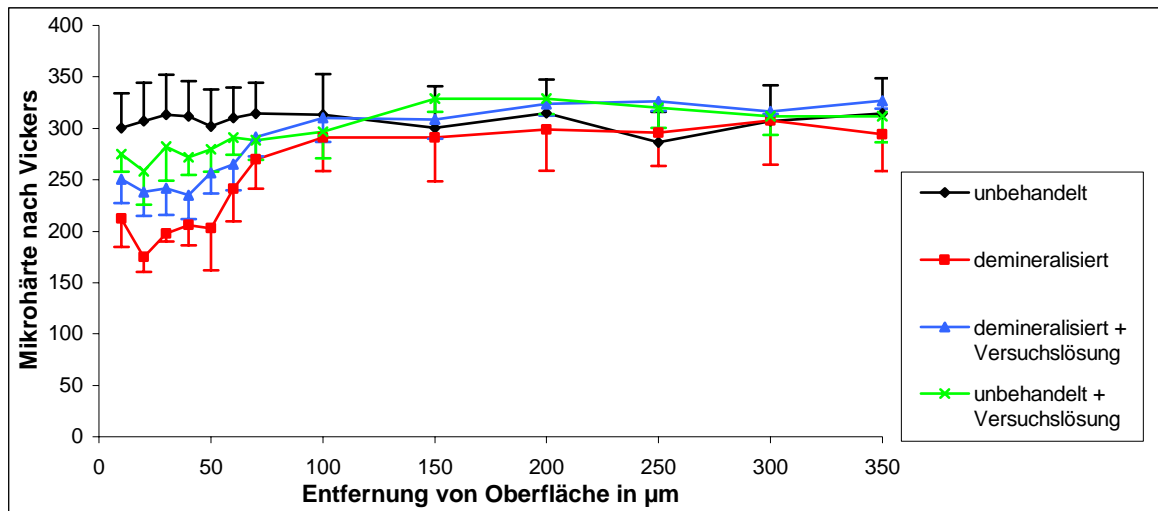


Diagramm 8 Mikrohärte der Schmelzproben mit Kalziumphosphat-Lösung und Serum als Versuchslösung.  
 Signifikante Remineralisation bei 10, 20, 40, 50 µm ( $p < 0,05$ ).  
 Signifikante Verringerung der Mikrohärte des zuvor unbehandelten Schmelzes bei 30 µm ( $p < 0,05$ ).

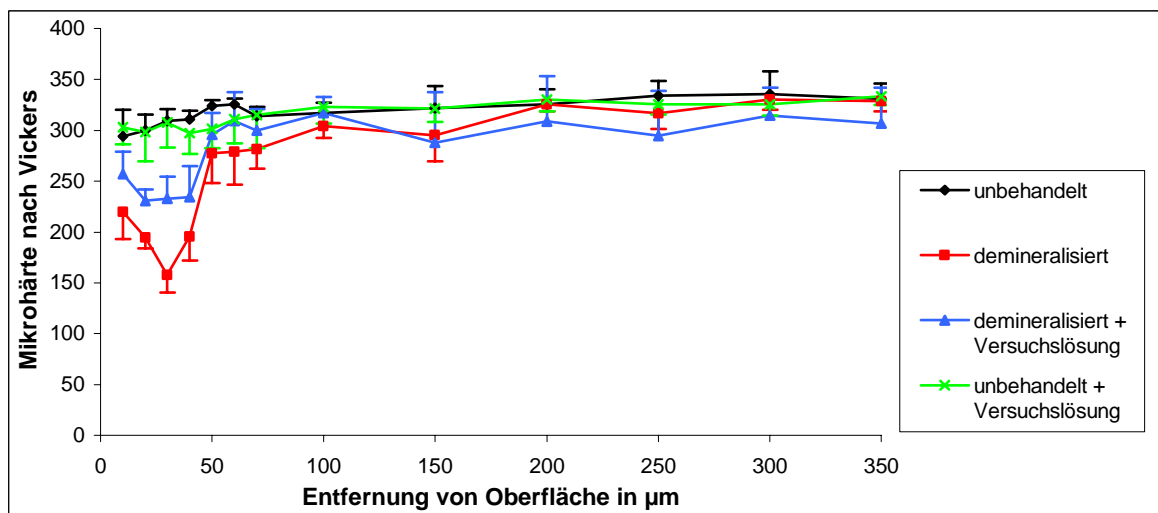


Diagramm 9 Mikrohärte der Schmelzproben mit Kalziumphosphat-Lösung als Versuchslösung.  
 Signifikante Remineralisation bei 10, 20, 30, 40, 60 µm ( $p < 0,05$ ).  
 Keine signifikante Maturation ( $p > 0,05$ ).

Die Versuche des zweiten Versuchsabschnittes offenbarten ebenfalls eine Erhöhung der Mikrohärtewerte nach vorangegangener Demineralisation. Die Ausprägung der Remineralisation ist in den 4 Untergruppen unterschiedlich. Während das Blutserum ohne Zusatz zu oberflächennahen Härtesteigerungen führte, erhöhte sich der Mineraleinbau unter Verwendung von Serum mit Natriumfluorid vorwiegend in tiefer gelegenen Läsionsschichten. Dieses Verhalten wird durch den erhöhten Fluoridanteil an der Versuchslösung begründet. Die Versuchslösungen der dritten und vierten Untergruppe vermochten sowohl oberflächliche, wie auch tiefere Schichten zu remineralisieren.

Hervorzuheben ist die signifikante Erhöhung der Mikrohärtigkeit der nicht demineralisierten Versuchsareale in der ersten und zweiten Untergruppe. Diese zusätzlichen Mineraleinlagerungen können als Reifung des Zahnschmelzes interpretiert werden. Die Versuchslösungen der dritten Untergruppe führten hingegen zu einer Verringerung der Mikrohärtigkeit, so dass von einem Mineralverlust ausgegangen werden muss. Die vierte Untergruppen zeigte, ähnlich dem pH-cycling, keine Veränderung des Mineralgehaltes der zuvor unbehandelten Versuchsareale.

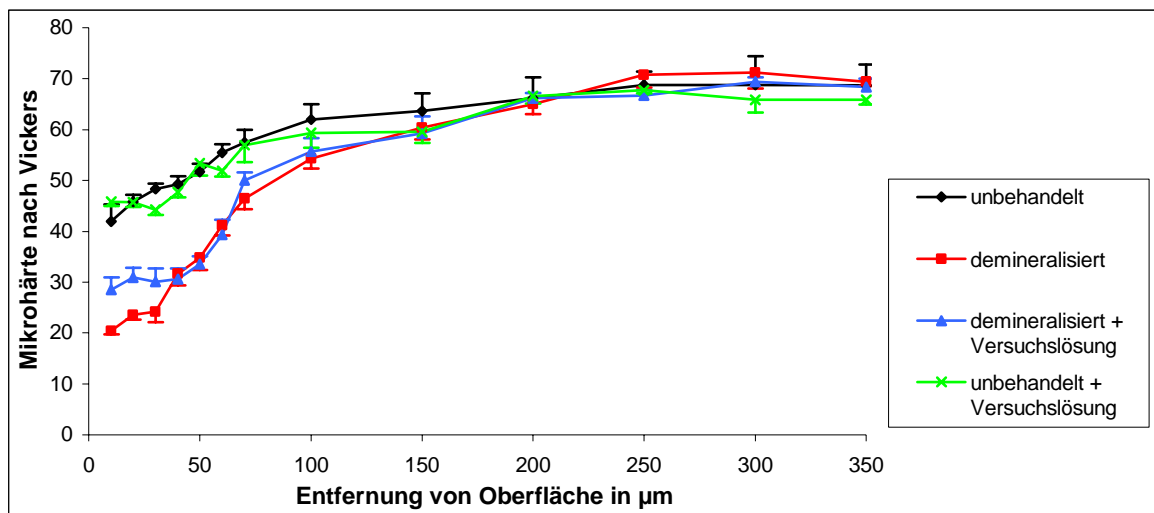


Diagramm 10 Mikrohärtigkeit des Wurzelzementins nach 4 Wochen pH-cycling.  
 Signifikante Remineralisation bei 10, 20, 30, 70 µm ( $p < 0,05$ ).  
 Signifikante Verringerung der Mikrohärtigkeit des zuvor unbehandelten Wurzelzementins bei 30, 60, 100 µm ( $p < 0,05$ ).

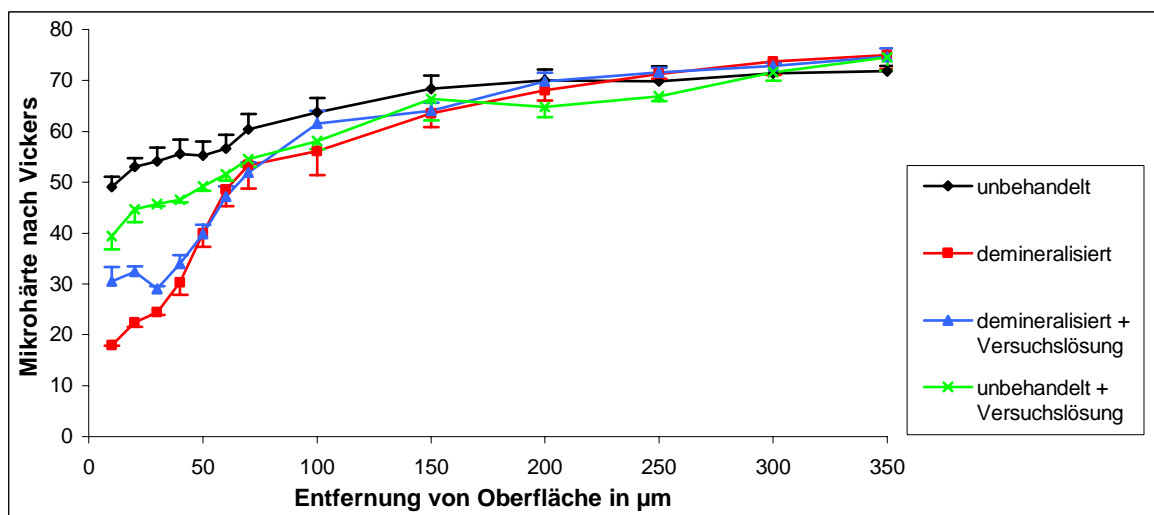


Diagramm 11 Mikrohärtigkeit des Wurzelzementins nach 8 Wochen pH-cycling.  
 Signifikante Remineralisation bei 10, 20, 30 µm ( $p < 0,05$ ).  
 Signifikante Verringerung der Mikrohärtigkeit des zuvor unbehandelten Wurzelzementins bei 10, 20, 30, 40, 50, 70, 100 µm ( $p < 0,05$ ).

Während der vier- bzw. achtwöchigen Dauer des pH-cycling kam es zu einer Remineralisation der artifiziiell erzeugten Läsionen im Wurzelbereich. Die Einlagerung von Mineralien erfolgte allerdings nur oberflächennah. Teilweise nach vierwöchiger und ausgeprägt nach achtwöchiger Versuchsdauer ist eine signifikante Abnahme der Mikrohärtewerte der zuvor nicht demineralisierten Versuchsareale festzustellen.

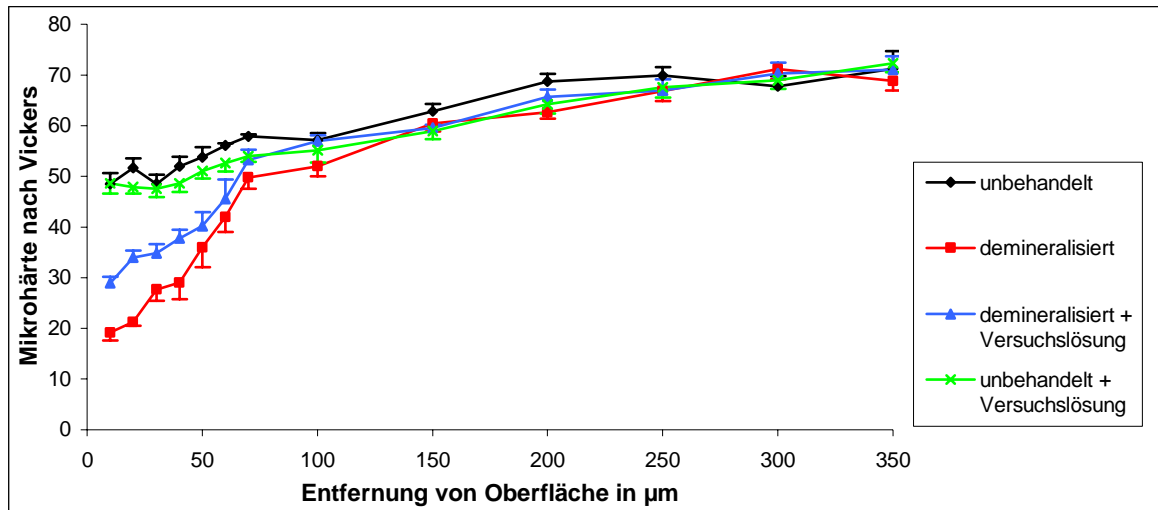


Diagramm 12 Mikrohärtigkeit des Wurzelzements mit Serum als Versuchslösung.  
 Signifikante Remineralisation bei 10, 20, 30, 40, 70  $\mu\text{m}$  ( $p < 0,05$ ).  
 Signifikante Verringerung der Mikrohärtigkeit des zuvor unmineralisierten Wurzelzements bei 50 und 70  $\mu\text{m}$  ( $p < 0,05$ ).

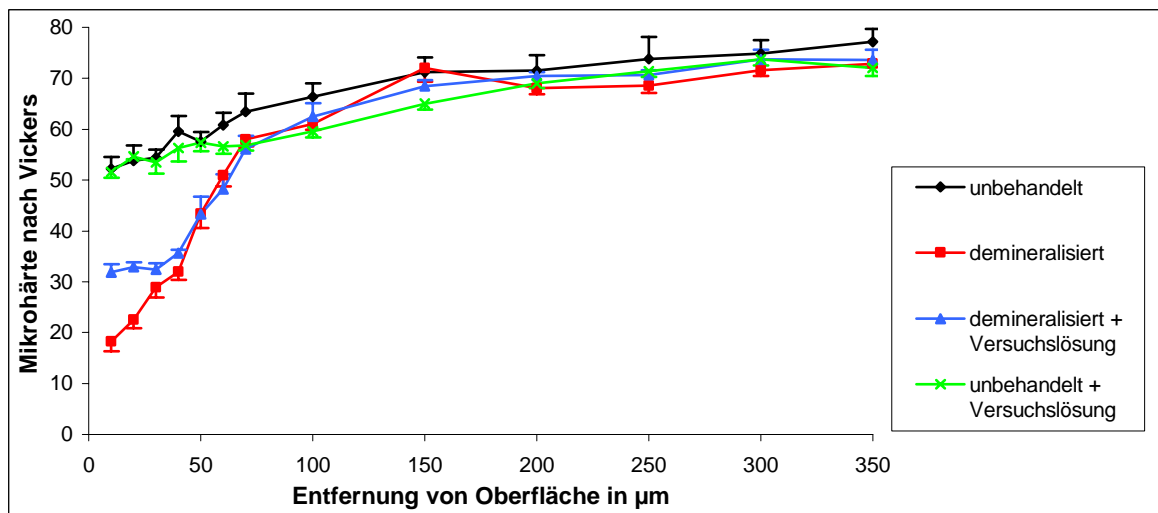


Diagramm 13 Mikrohärtigkeit des Wurzelzements mit Serum und Natriumfluorid als Versuchslösung.  
 Signifikante Remineralisation bei 10 und 20  $\mu\text{m}$  ( $p < 0,05$ ).  
 Keine signifikante Maturation ( $p > 0,05$ ).

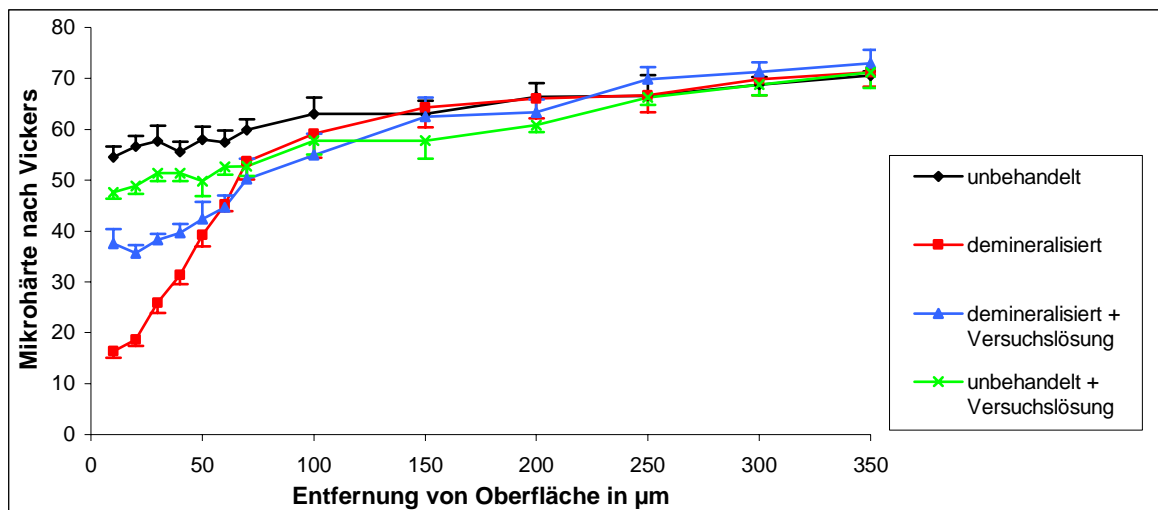


Diagramm 14 Mikrohärte des Wurzelzements mit Kalziumphosphat-Lösung und Serum als Versuchslösung.  
 Signifikante Remineralisation bei 10, 20, 30, 40  $\mu\text{m}$  ( $p < 0,05$ ).  
 Signifikante Verringerung der Mikrohärte des zuvor unbehandelten Wurzelzements bei 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100  $\mu\text{m}$  ( $p < 0,05$ ).

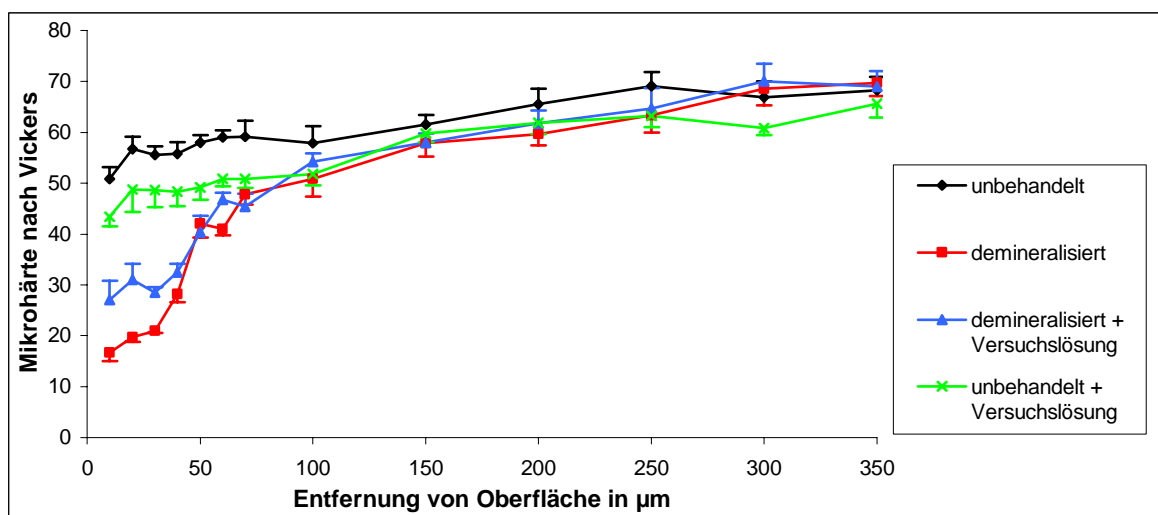


Diagramm 15 Mikrohärte des Wurzelzements mit Kalziumphosphat-Lösung als Versuchslösung.  
 Signifikante Remineralisation bei 10, 20, 30, 60  $\mu\text{m}$  ( $p < 0,05$ ).  
 Signifikante Verringerung der Mikrohärte des zuvor unbehandelten Wurzelzements bei 10, 30, 40, 50, 60, 70, 100  $\mu\text{m}$  ( $p < 0,05$ ).

In allen Untergruppen des zweiten Versuchsabschnittes führten die Versuchslösungen zu einer Remineralisation der Wurzelzementinläsionen. Besonders ausgeprägt ist diese Mineralaufnahme an den Präparaten der dritten Untergruppe. Die stärkste Zunahme der Mikrohärte ist, ähnlich wie nach dem pH-cycling, oberflächenwärts zu erkennen. Die zuvor unbehandelten Versuchsareale der ersten (Signifikanz bei 50 und 70  $\mu\text{m}$ ) und zweiten Untergruppe (keine statistische Signifikanz) zeigen nur geringe Veränderungen der Mikrohärte, wohingegen die Wurzelpräparate der dritten und vierten Untergruppe aber eine deutlich ausgeprägte Verringerung ihrer Mikrohärte verzeichnen.

#### 5.4. Rasterelektronenmikroskopie

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden an ausgewählten Präparaten jedes Versuchsansatzes durchgeführt. Um amorphe oder schwach gebundene Auflagerungen nicht zu entfernen, erfolgte kein Anätzen der Zahnhartgewebe. Die Examination der Präparate umfasste sowohl die eigentliche Zahnoberfläche als auch die Schliffflächen.

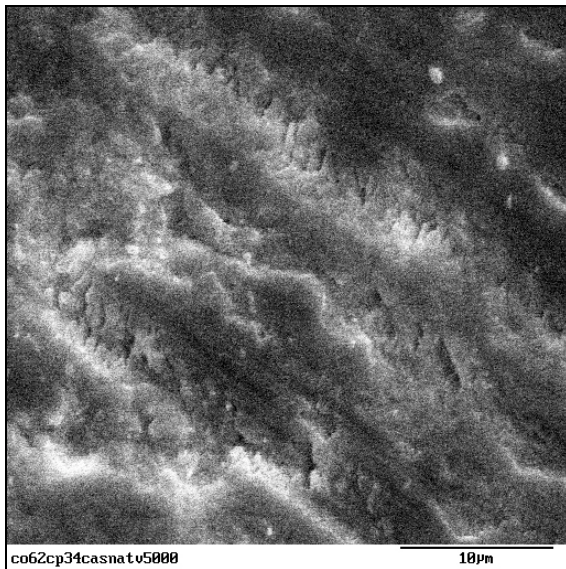


Abb. 14a Unreifer Zahnschmelz

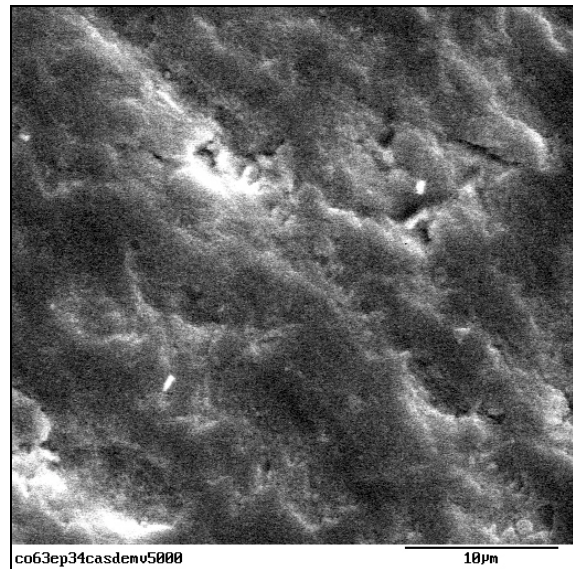


Abb. 14b Demineralisierter Schmelz

Abb. 14 Gegenüberstellung der Morphologie der Schliffflächen eines nativen und demineralisierten Schmelzpräparates.

Abbildung 14a zeigt die Schlifffläche von nativem, oberflächennahem Zahnschmelz. Deutlich erkennbar sind die häufigen Mikroporositäten und Mikrokanäle zwischen den Prismen, dem Kennzeichen von unreifem Schmelz. In Abbildung 14b ist dasselbe Präparat nach durchgeführter Demineralisation dargestellt. Größere Kanäle und Lücken haben sich durch die Auflösung von Schmelzmineral gebildet und bestimmen das Bild der sich in den Schmelz vorbewegenden kariösen Läsion.

Am Beispiel einer Schmelzprobe der Versuchsreihe, in der nur Serum als Versuchslösung benutzt wurde, zeigen sich die geringen Unterschiede der Versuchsareale zu den Vergleichsarealen. Die Schmelzbereiche, an denen eine artifizielle Läsion erzeugt wurde (Abbildung 15c und 15d), offenbarten deutliche Unterschiede, im Sinne von Hohlräumen und Kanälen, zu den nicht demineralisierten Bereichen (Abbildung 15a und 15b). Die Veränderungen an den Zahnhartgeweben, die durch die Versuchslösungen hervorgerufen wurden, sind speziell in der Aufsicht auf die Schliffflächen der Präparate nur gering ausgeprägt. An diesem Präparat sind in Ansätzen sowohl die Maturation wie auch die

Remineralisation in Form einer Verringerung der Mikroporositäten und Mikrokanäle erkennbar. In der Mehrzahl der Präparate gestaltete sich die Unterscheidung zwischen den Ergebnissen von Mineralisationsvorgängen und Artefakten der Schliffherstellung überraschend schwierig. Daher wurde vom Vergleich der einzelnen Untergruppen mit dem Rasterelektronenmikroskop hinsichtlich des Erfolges der Reifung und Remineralisation Abstand genommen, denn ein Informationsgewinn in Bezug auf die Ergebnisse der Polarisationsmikroskopie konnte nicht erzielt werden.

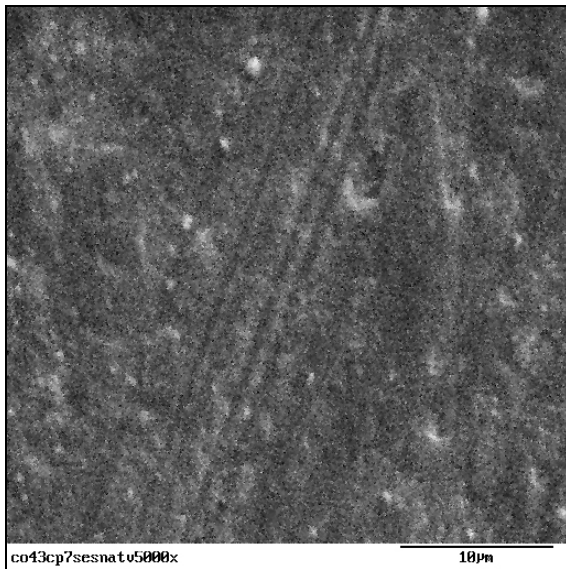


Abb. 15a Unbehandelter Schmelz

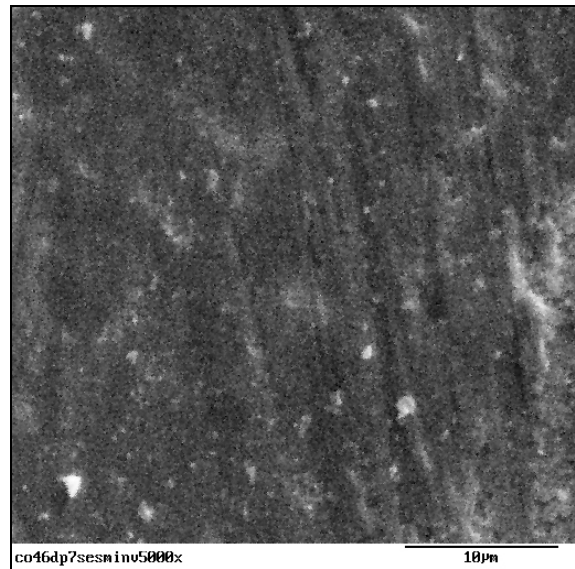


Abb. 15b Unbehandelter Schmelz +  
Versuchslösung

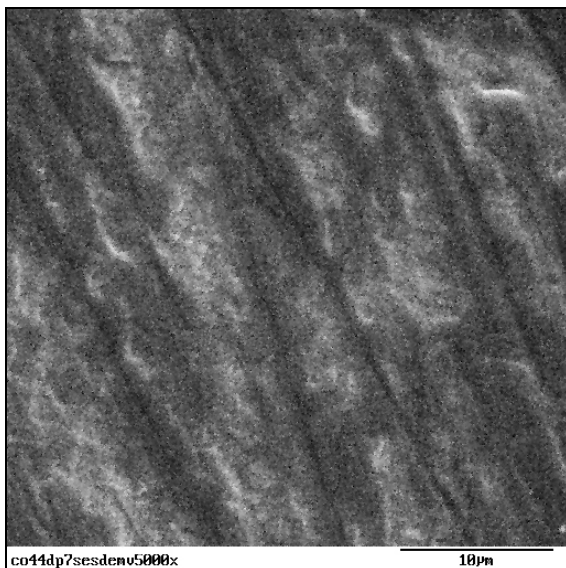


Abb. 15c Demineralisierter Schmelz

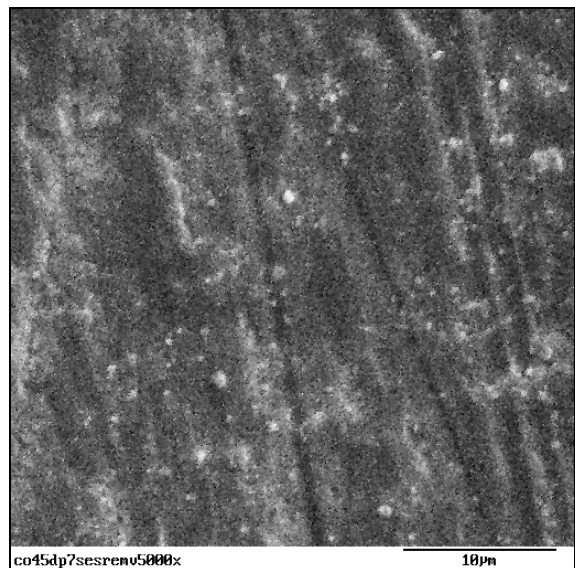


Abb. 15d Demineralisierter Schmelz +  
Versuchslösung

Abb. 15 Schliffflächen eines Schmelzpräparates, dem Serum als Versuchslösung diente. Durch das Bild verlaufende schmale Kratzer und kleine weiße Auflagerungen sind Schleifartefakte.



Vorteilhafter als die Beobachtung der Schliiffflächen stellte sich die Begutachtung der Zahnoberflächen an den Schmelzproben dar. Sie erbrachte ein über alle Gruppen hinweg ähnliches, wenn auch unterschiedlich stark ausgeprägtes Bild, so dass stellvertretend die Befunde von zwei Präparaten in Abbildung 16 und 17 dargestellt sind.

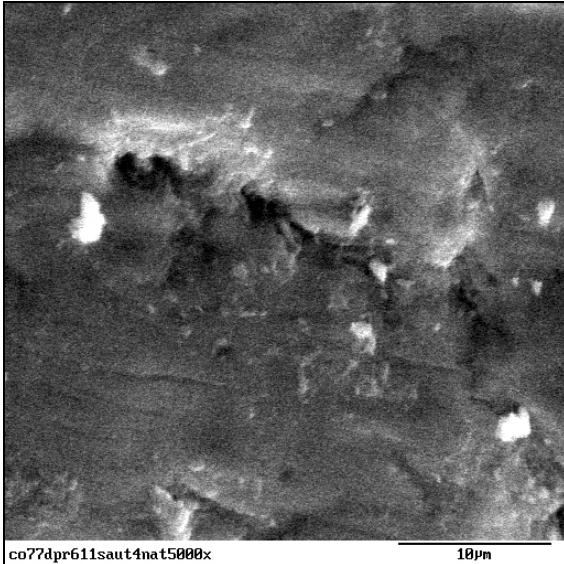


Abb. 16a Unbehandelter Schmelz

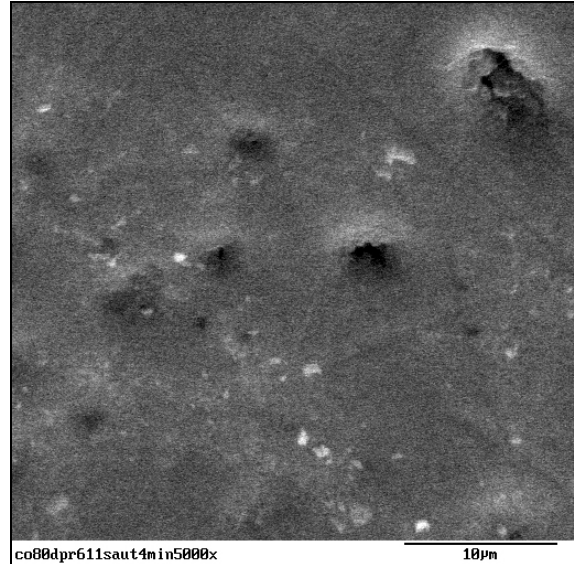


Abb. 16b Unbehandelter Schmelz + Versuchslösungen

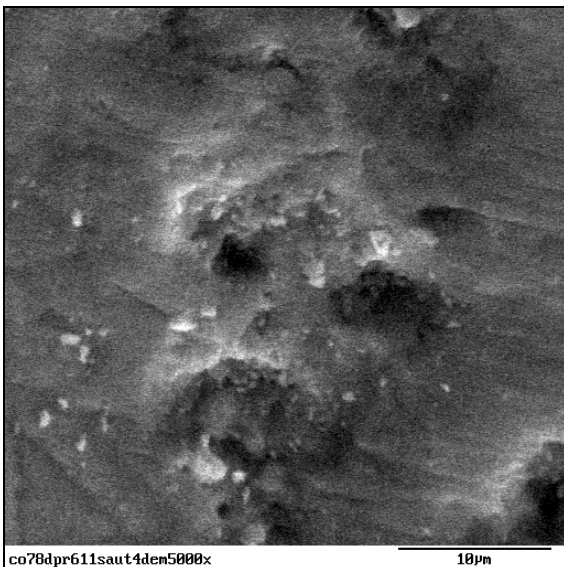


Abb. 16c Demineralisierter Schmelz

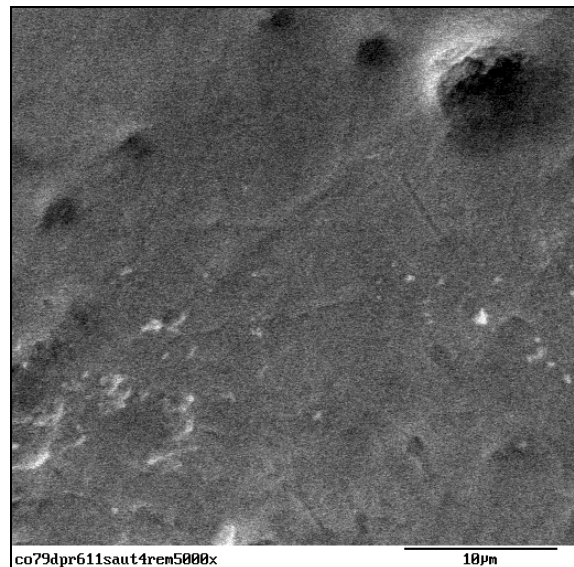


Abb. 16d Demineralisierter Schmelz + Versuchslösungen

Abb. 16 Zahnschmelzoberflächen eines Präparates, an dem pH-cycling 4 Wochen durchgeführt wurde.

Abbildung 16a gibt den rasterelektronenmikroskopischen Blick auf die unbehandelte Schmelzoberfläche wieder. Kennzeichnend für die Oberflächenstruktur von unreifem Zahnschmelz sind unregelmäßige Einstülpungen, Furchen und Mikrokrater. Sie stellen den Zugang zu den tieferen Schmelzschichten her. In Abbildung 16b ist eine deutliche

Nivellierung dieser Strukturen zu erkennen. Die Vergrößerung und Aufweitung der Öffnungen und Mikrokrater, hervorgerufen durch eine Demineralisation des Schmelzes, ist in Abbildung 16c dargestellt. Die Versuchslösungen führten auch an den demineralisierten Bereichen zu einer Verringerung und Einebnung der Oberflächenstrukturen (Abbildung 16d).

Im Gegensatz zu den synthetischen Kalziumphosphat-Lösungen der pH-cycling-Versuche und der vierten Untergruppe des zweiten Versuchsabschnittes vermochten die Versuchslösungen, die Serum enthielten, die Oberflächenstrukturen nicht so ausgeprägt zu nivellieren. Dennoch konnte auch bei diesen Versuchslösungen ein „Auffülleffekt“ festgestellt werden (Abbildung 17).

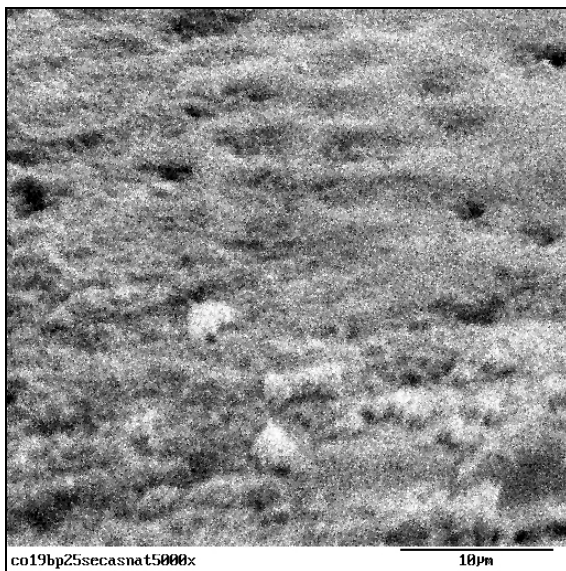


Abb. 17a Unbehandelter Schmelz

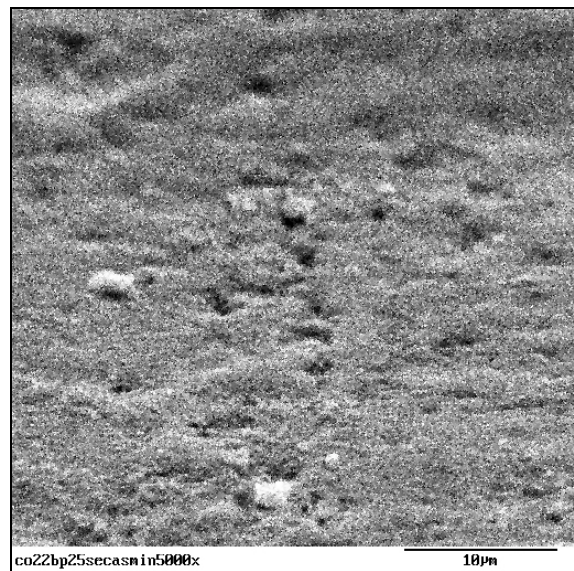


Abb. 17b Unbehandelter Schmelz +  
Versuchslösung

Abb. 17 Zahnschmelzoberflächen eines Präparates, dem Kalziumphosphat-Lösung und Serum als Versuchslösung diente.

Im Vergleich zur Schmelzoberfläche stellt sich die Wurzeloberfläche wesentlich heterogener und stärker strukturiert dar. Abbildung 18 zeigt ein Präparat, an dem das pH-cycling vier Wochen lang durchgeführt wurde. Im Gegensatz zur unbehandelten Wurzeloberfläche (Abbildung 18a) ist der oberflächliche Materialverlust am demineralisierten Areal (Abbildung 18c) deutlich erkennbar. Die Struktur ist durch grobe, tiefe Furchen und Substanzdefekte geprägt. Das pH-cycling führte am unbehandelten Wurzelbereich zu einer stärker strukturierten Oberfläche mit tiefen Einkerbungen und spitzwinkligen Vorsprüngen (Abbildung 18b). Dafür sind sowohl Mineralverluste als auch Mineralablagerungen verantwortlich. Auch wenn damit noch kein oder nur ein geringer

Nettomaterialverlust verbunden ist, entstehen doch oberflächlich Diffusionswege zu tieferen Schichten. Die Auswirkungen des pH-cycling auf den demineralisierten Bereich bestehen in einem, gemessen am Nativzustand geringen, jedoch eindeutigen Auffülleffekt und damit einer remineralisierenden Mineraleinlagerung (Abbildung 18d).

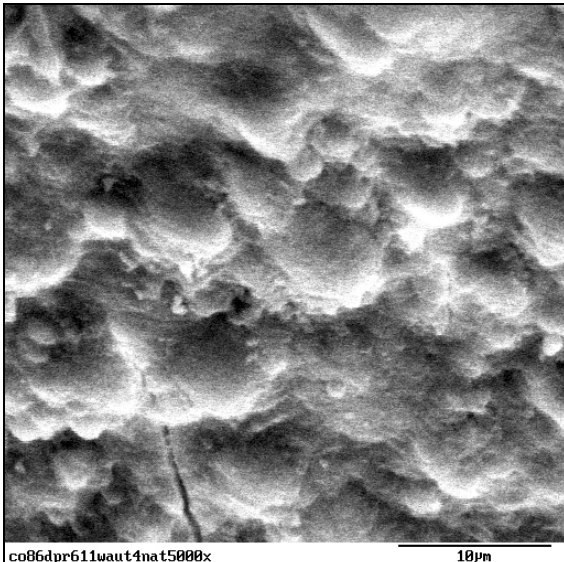


Abb. 18a Unbehandelte Zahnwurzel

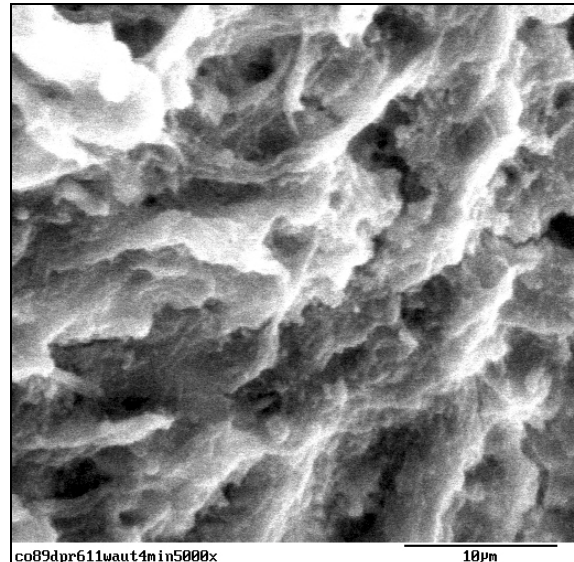


Abb. 18b Unbehandelte Zahnwurzel + Versuchslösungen

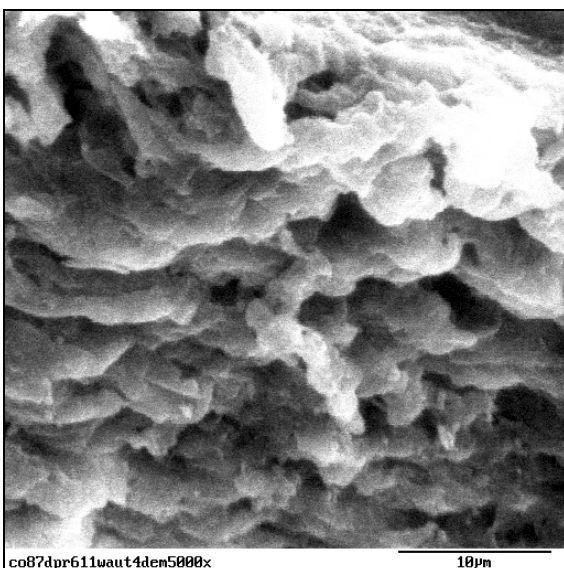


Abb. 18c Demineralisierte Zahnwurzel

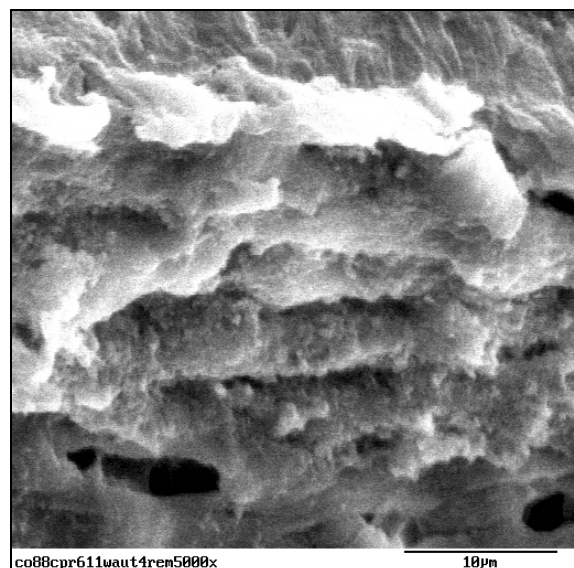


Abb. 18d Demineralisierte Zahnwurzel + Versuchslösungen

Abb. 18 Zahnwurzeloberflächen eines Präparates, an dem pH-cycling 4 Wochen durchgeführt wurde.

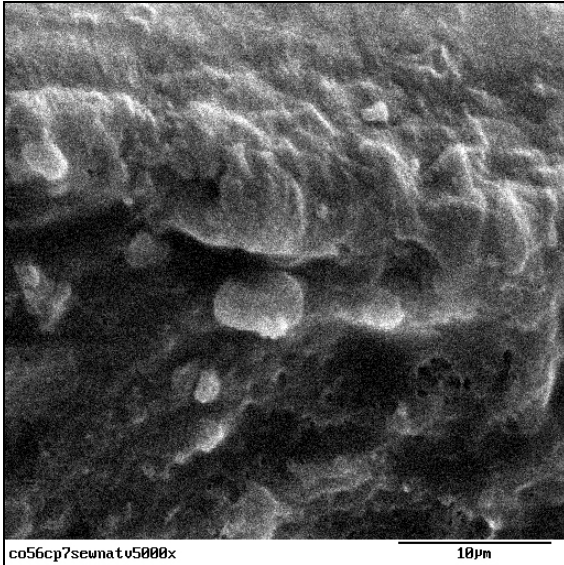


Abb. 19a Unbehandelte Zahnwurzel

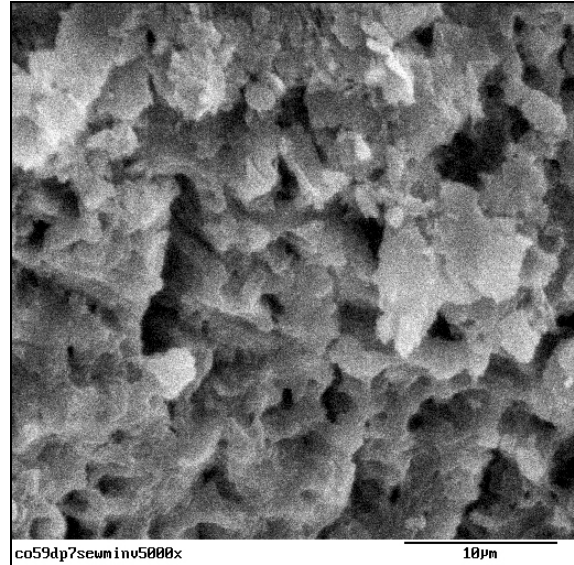


Abb. 19b Unbehandelte Zahnwurzel + Versuchslösung

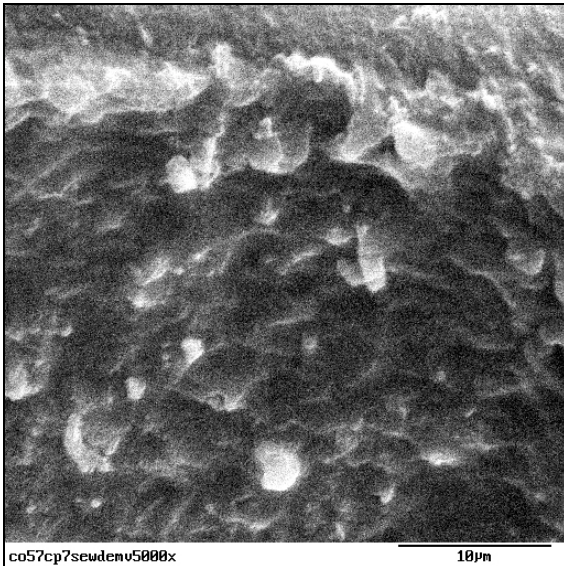


Abb. 19c Demineralisierte Zahnwurzel

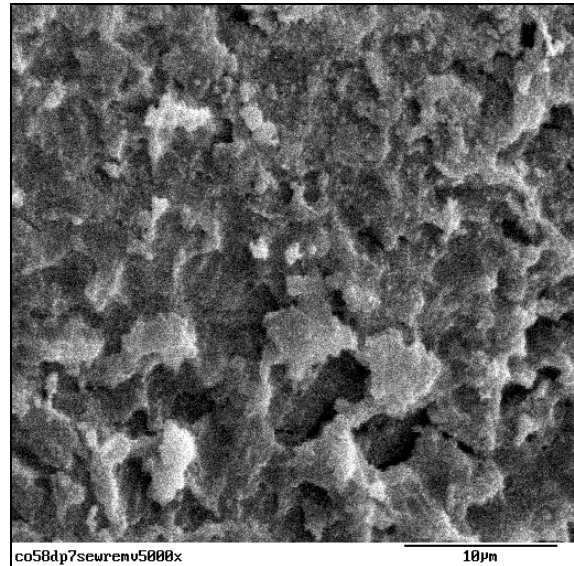


Abb. 19d Demineralisierte Zahnwurzel + Versuchslösung

Abb. 19 Zahnwurzeloberflächen eines Präparates, mit Serum als Versuchslösung

Serum führt auf unbehauelter und demineralisierter Wurzeloberfläche (Abbildung 19a und 19c) zu grobscholligen Auflagerungen (Abbildung 19b und 19d). Die Auflagerungen weisen Ähnlichkeiten mit plättchenförmigen OCP-Kristallen auf. Die Dichte der Auflagerungen ist auf der Wurzeloberfläche des zuvor demineralisierten Bereiches geringer als auf zuvor unbehauetem Areal.

Die Versuchslösung der dritten Untergruppe des zweiten Versuchsabschnittes, bestehend aus Kalziumphosphat-Lösung und Serum, vermochte die demineralisierten Bereiche (Abbildung 20c) der Wurzeloberfläche des Präparates zu remineralisieren (Abbildung

20d). Die remineralisierte Oberfläche weist Übereinstimmungen zum unbehandelten Areal auf (Abbildung 20a). An zuvor unbehandelter Wurzeloberfläche sind einerseits Auflagerungen, andererseits aber auch tiefe Spalten festzustellen (Abbildung 20b). Trotz der Ähnlichkeiten der Oberflächenmorphologie zum demineralisierten Bereich muss von Mineralanlagerungen ausgegangen werden, denn die Oberfläche in Abbildung 20b weist kleinste Vorsprünge und Kanten auf, welche auf die Bildung und Ausfällung von Mineralkristallen deuten.

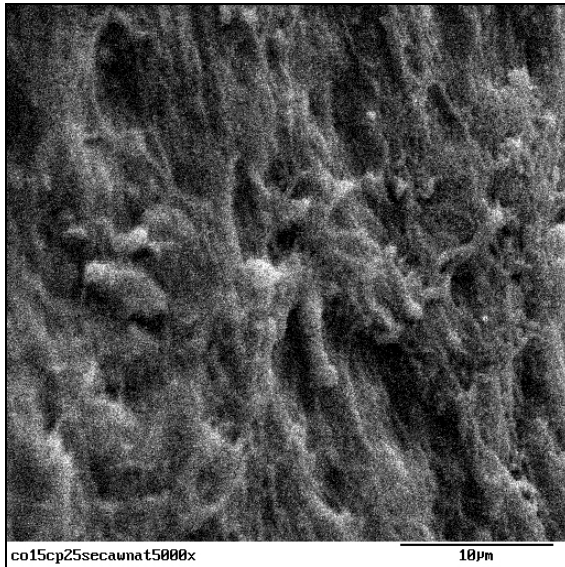


Abb. 20a Unbehandelte Zahnwurzel

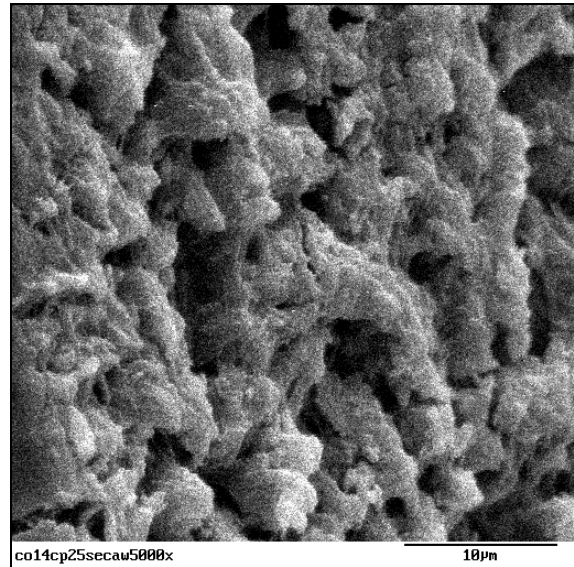


Abb. 20b Unbehandelte Zahnwurzel + Versuchslösung

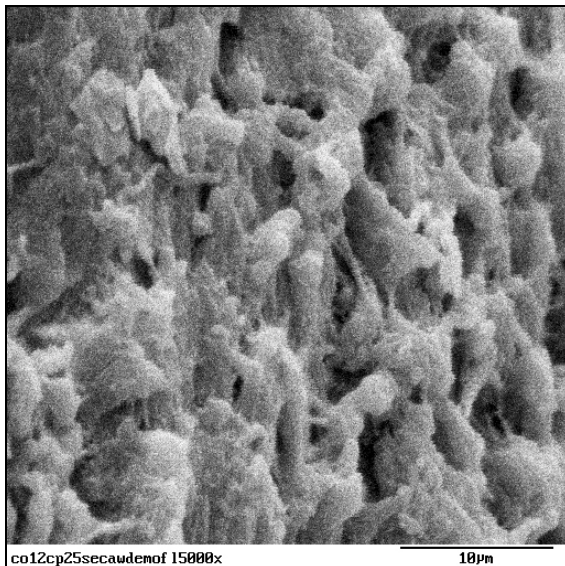


Abb. 20c Demineralisierte Zahnwurzel

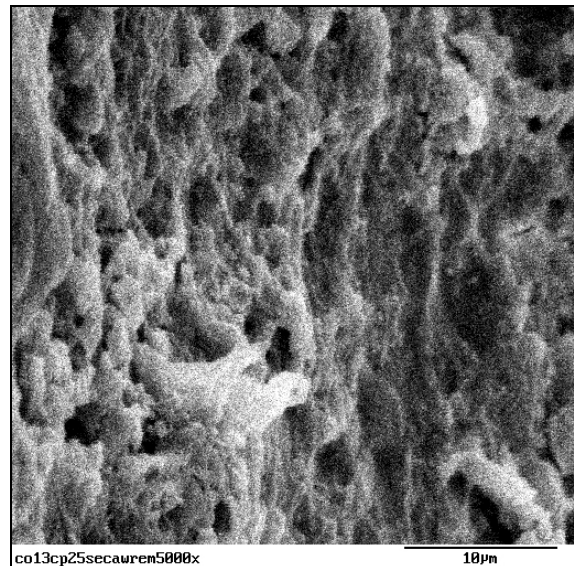


Abb. 20d Demineralisierte Zahnwurzel + Versuchslösung

Abb. 20 Zahnwurzeloberflächen eines Präparates, dem Kalziumphosphat-Lösung und Serum als Versuchslösung diente.

### 5.5. EDX-Analyse am ESEM

Die Abbildung 21 zeigt stellvertretend die Lage der analysierten Bereiche entlang der Schliefflächen. Es erfolgten pro Messreihe zwei oberflächenwärts gelegene Messungen mit ca. 10  $\mu\text{m}$  und ca. 40  $\mu\text{m}$  Abstand zur natürlichen Zahnoberfläche und eine weitere Messung, ca. 170  $\mu\text{m}$  von der Oberfläche entfernt.

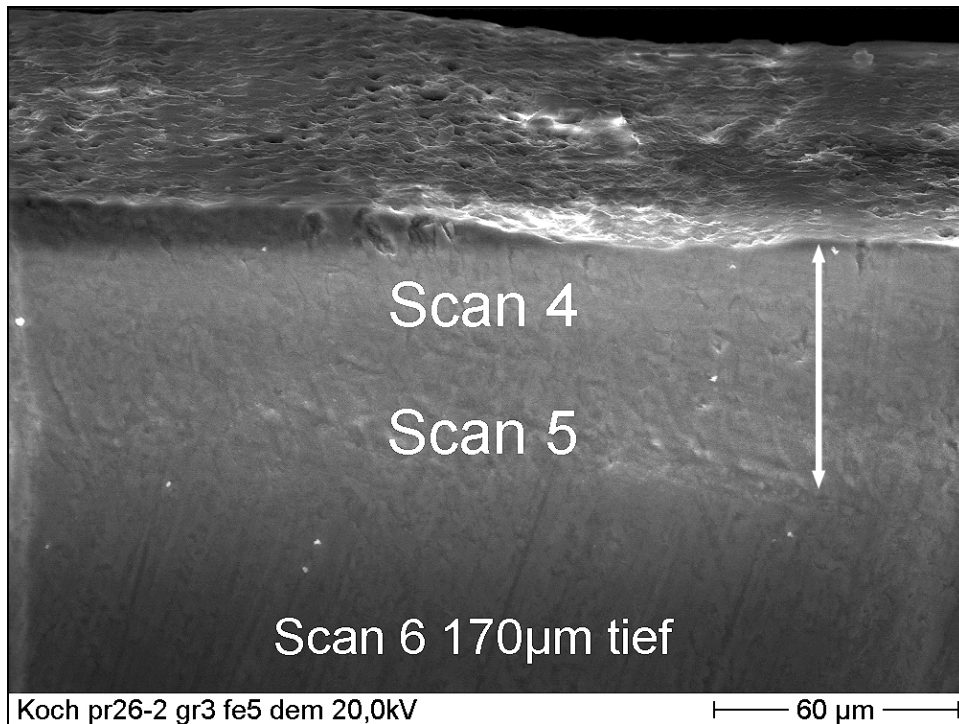


Abb. 21 Lage der EDX-Scan-Areale auf den Schliefflächen.  
Im oberen Bilddrittel ist die Zahnoberfläche zu erkennen. Der Doppelpfeil auf der rechten Seite verdeutlicht die Ausdehnung der artifiziellen Läsion.

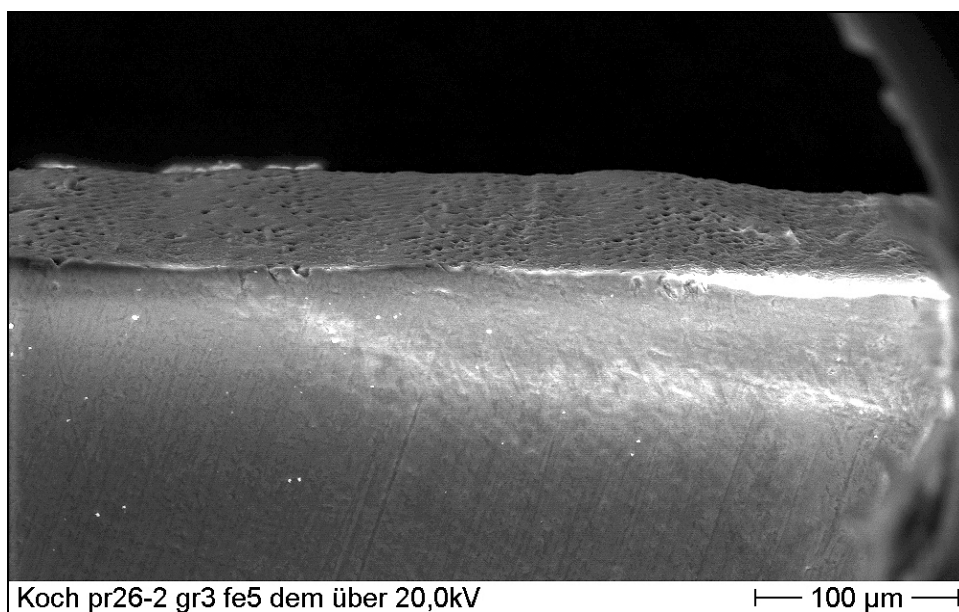


Abb. 22 Anfang einer subfiziellen Schmelzläsion.  
Links: nativer Schmelz; rechter Bildrand: finale Lochblende.

Die künstlichen Läsionen heben sich von den nicht demineralisierten Zahnhartsubstanzen durch stärkere Aufladung ab (Abbildung 22). Daher wurden das Auffinden und die Bestimmung der Läsionsgrenzen zweifelsfrei möglich. Die stärkeren Aufladungen zwangen zur Arbeit bei niedrigen Gasdrücken. Dieses führte zur Reduzierung des Skirteffektes, der das laterale Auflösungsvermögen des mittels EDX untersuchten Areals limitiert.

Die Diagramme 16 und 17 veranschaulichen beispielhaft die für Schmelz und Wurzelzementin ermittelten Intensitäten der verschiedenen Elemente. Die Nettointensität, die einem einzelnen Element zugeordnet wird, errechnet sich durch Integration der Fläche des zugehörigen Areals im Diagramm, abzüglich der Untergrundintensität. Mit Hilfe von Korrekturfaktoren, die die unterschiedlichen Kernladungszahlen, Absorption und Fluoreszenz der Elemente und deren gegenseitige Beeinflussung korrigieren, wird der Anteil der Nettointensität des einzelnen Elements an der Gesamtintensität und damit der prozentuale Anteil des Elements am untersuchten Objekt errechnet. Die Anteile von Kalzium und Phosphor werden zur Bestimmung des Ca/P-Quotienten ins Verhältnis gesetzt.

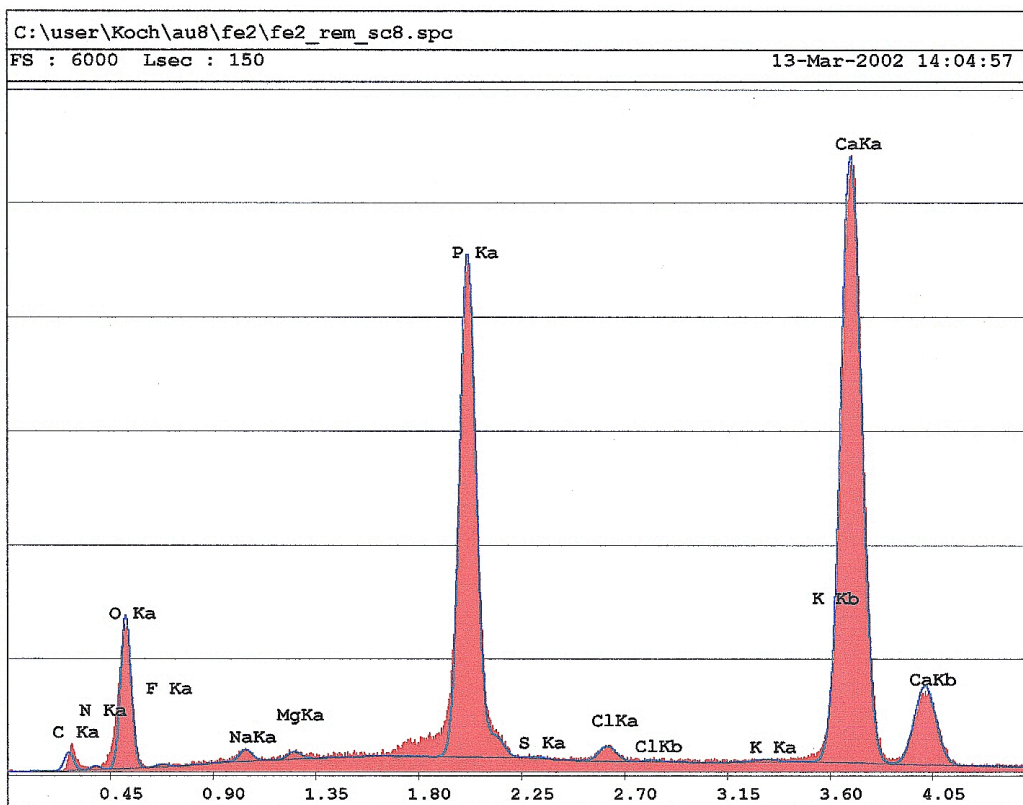


Diagramm 16 EDX-Spektrum der Elemente einer zuvor demineralisierten Schmelzprobe nach 8 Wochen pH-cycling

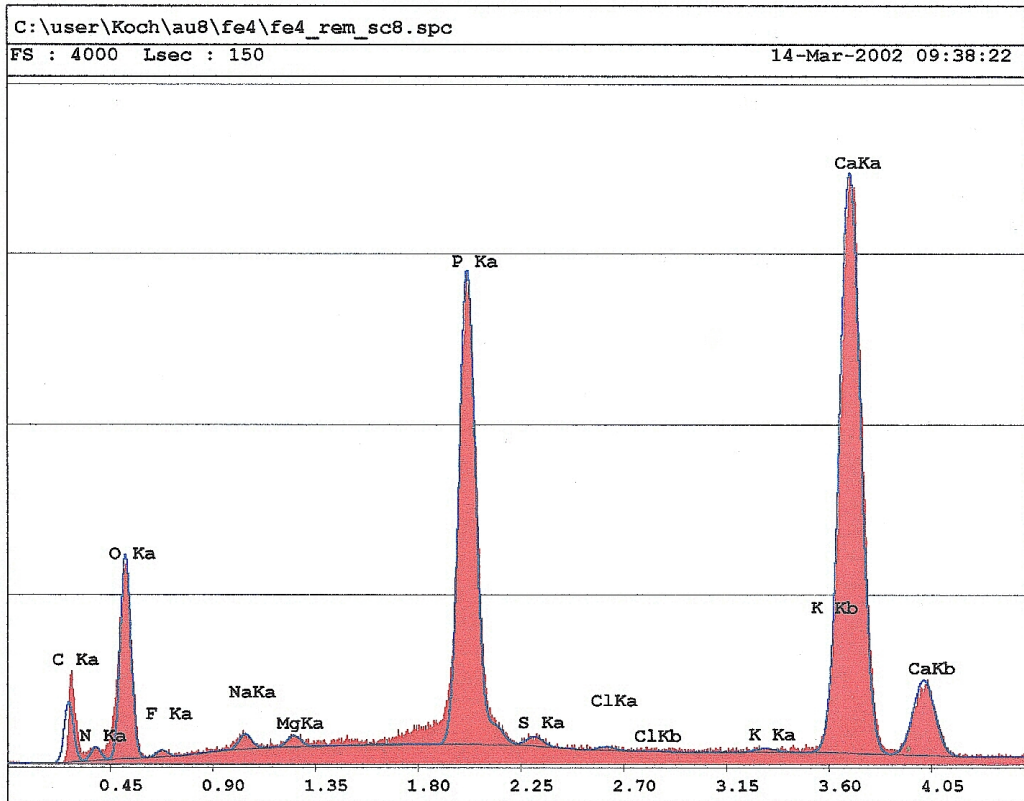


Diagramm 17 EDX-Spektrum der Elemente einer zuvor demineralisierten Wurzelzahnprobe nach 8 Wochen pH-cycling.

Geordnet nach Lokalisation der Läsionen sind die Messreihen der Ca/P-Verhältnisse in den Diagrammen 18, 19 und 20 dargestellt. Die Bezeichnungen a, b, c und d entsprechen den Bereichen a bis d der Lackfensterungen.

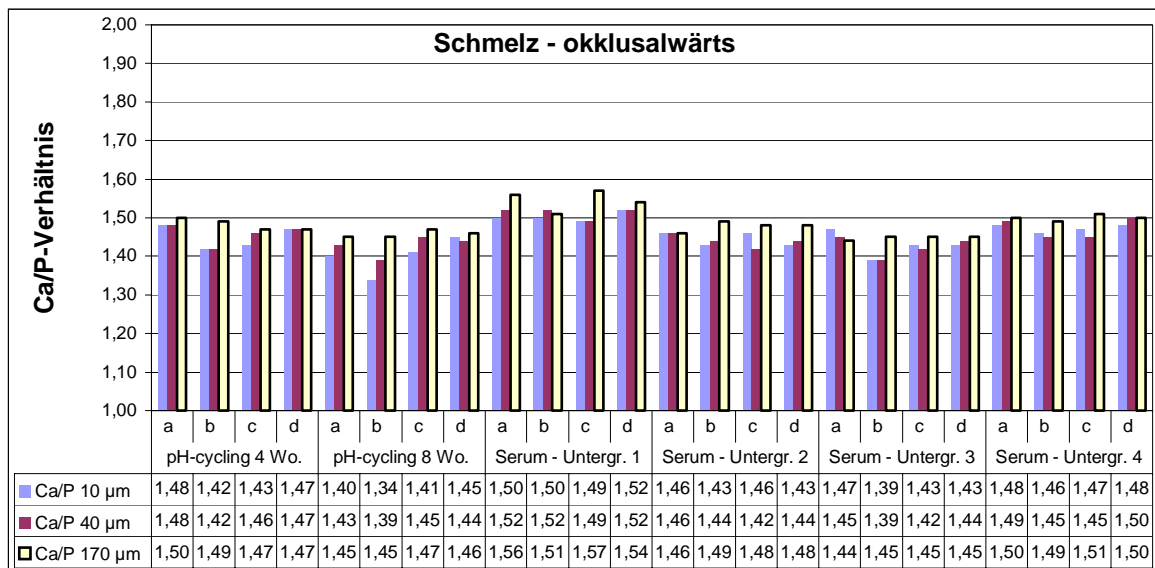


Diagramm 18 Ca/P-Verhältnisse der okklusalwärts gelegenen Schmelzbereiche



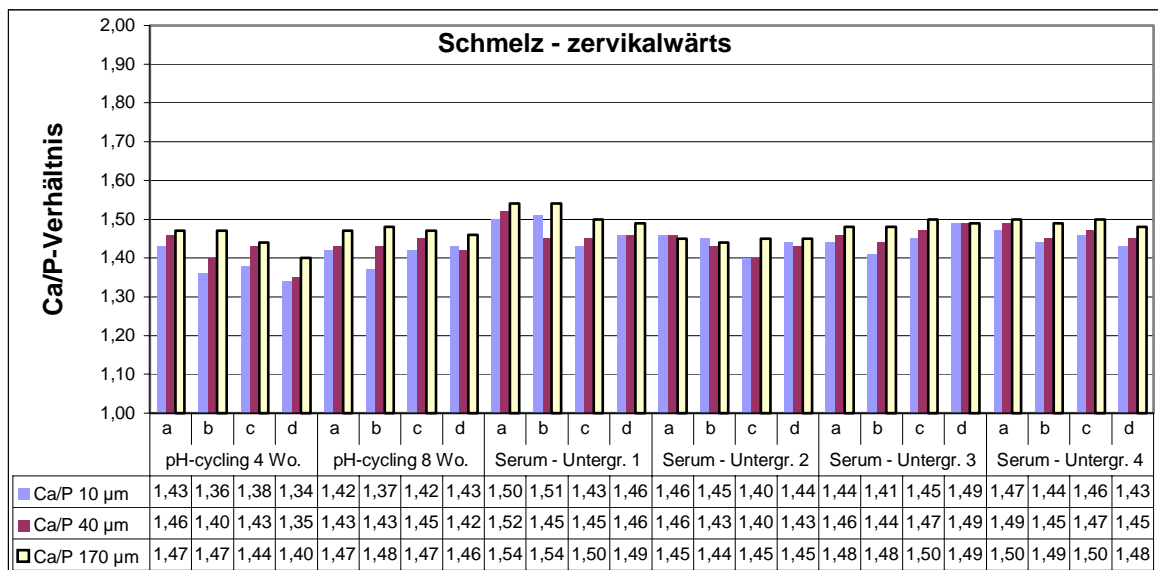


Diagramm 19 Ca/P-Verhältnisse der zervikalwärts gelegenen Schmelzbereiche

Das durchschnittliche Ca/P-Verhältnis der Proben des unbehandelten Schmelzes von 1,48 ( $\pm 0,03$ ) deutet auf Ca-defizitäres Apatit hin. Tendenziell liegen die oberflächlichen Ca/P-Verhältnisse unter denen der tieferen Schmelzschichten (ca. 170 µm von der Oberfläche entfernt) und eine Demineralisation führt zu einem Absinken der Verhältnisse. Da sich die ermittelten Ca/P-Quotienten zwischen den theoretischen Werten für HAP und OCP bewegen, ist eine Zuordnung der Bindungsverhältnisse nicht eindeutig möglich. Jedoch scheint aufgrund der geringeren, oberflächlich gelegenen Werte die intermediäre Bildung von HAP-Vorstufen, wie OCP oder DCPD, möglich.

Die Veränderungen, die durch die Versuchslösungen hervorgerufen wurden, sind gering und uneinheitlich ausgefallen. Insbesondere im gereiften Schmelzbereich der ersten und zweiten Untergruppe des zweiten Versuchsabschnittes ist keine Erhöhung der Ca/P-Verhältnisse festzustellen, so dass aufgrund der erzielten Härtesteigerungen von Mineraleinlagerungen auszugehen ist, nicht aber von einer qualitativ in Richtung Hydroxylapatit verlaufenden Umwandlung der Kalziumphosphate. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass in den Schmelz eingelagerte organische Verbindungen einen Anstieg des Ca/P-Quotienten maskieren.

Im unbehandelten Wurzeldentin wurde ein durchschnittliches Ca/P-Verhältnis von 1,39 ( $\pm 0,03$ ) festgestellt. Der erhöhte Phosphor-Anteil wird vor allem durch den organischen Anteil des Dentins bestimmt. Da die organischen Moleküle im Wesentlichen kein Kalzium, dafür aber Phosphatgruppen enthalten, verschiebt sich das Ca/P-Verhältnis zu Gunsten des Phosphors. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass in stärkerem Maße als im Schmelz, ein Absinken des Quotienten nach der Demineralisation stattfindet.

Zurückbleibende organische Moleküle führen nach einem Mineralverlust zu einem gegenüber Kalzium erhöhten Phosphor-Anteil.

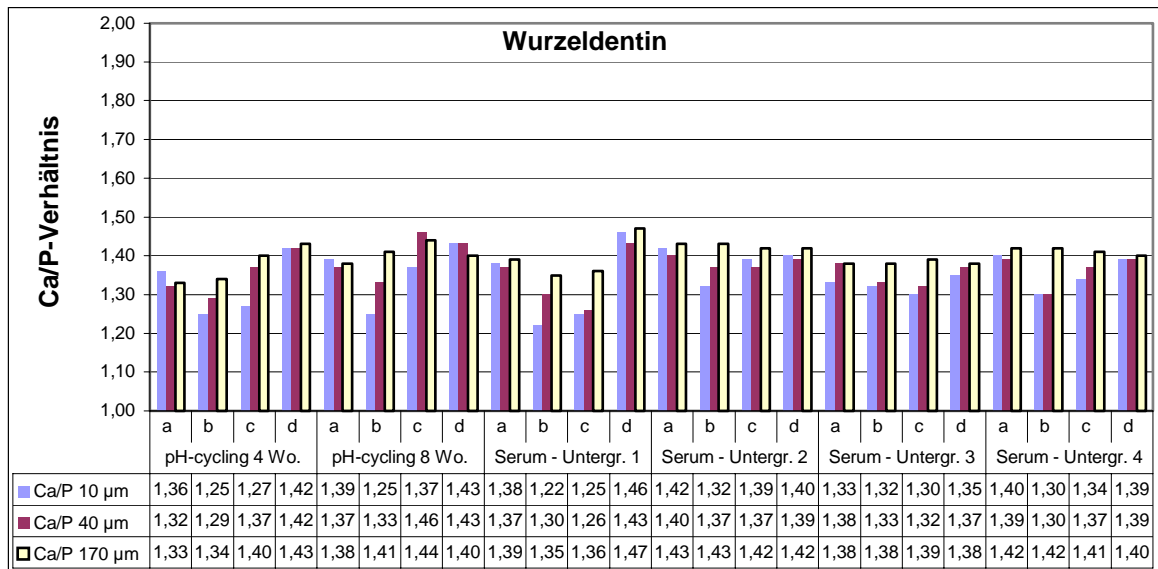


Diagramm 20 Ca/P-Verhältnisse der Bereiche im Wurzeldentin

Die elektronenoptische Begutachtung der Präparate im ESEM unterstützt die Ergebnisse der konventionellen Rasterelektronenmikroskopie hinsichtlich der Nivellierung der oberflächlichen Schmelzstrukturen. Die Abbildung 23 zeigt ein Präparat, dessen Versuchslösung aus einer synthetischen Kalziumphosphat-Lösung bestand.

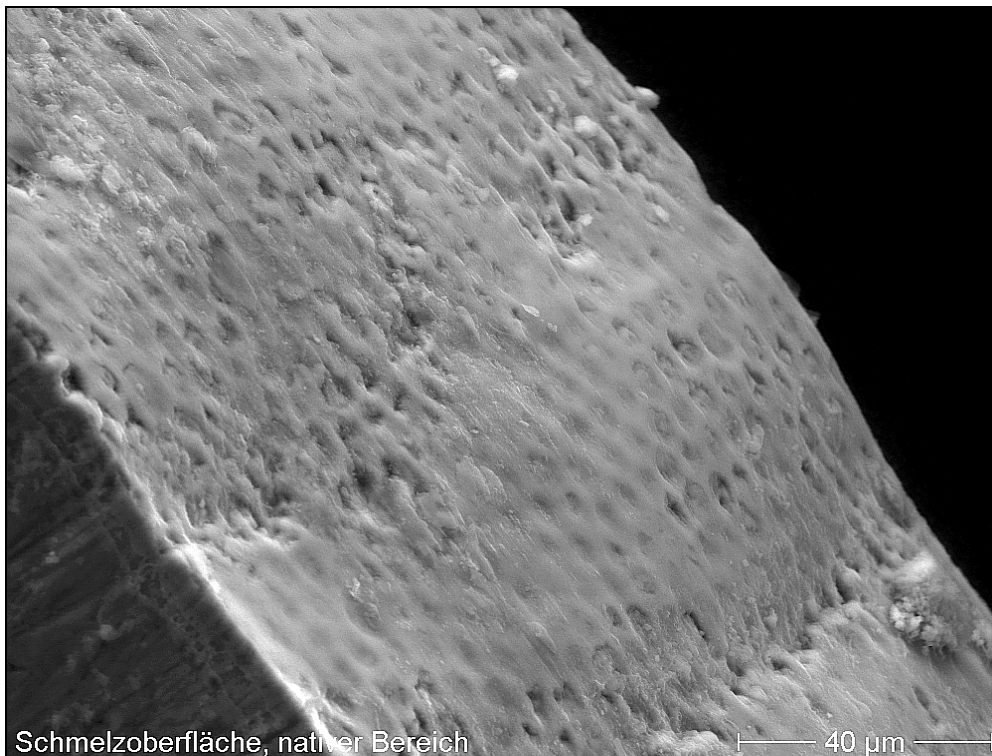


Abb. 23a Unbehandelte Schmelzoberfläche

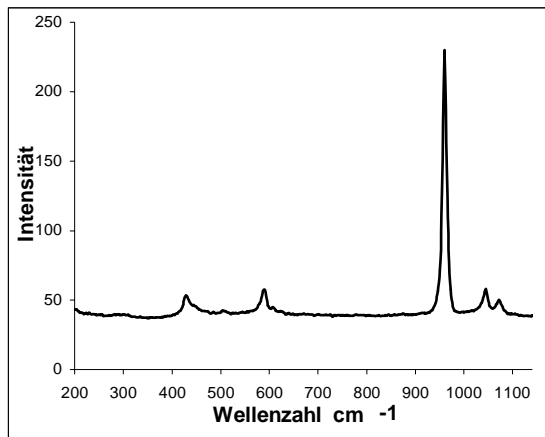


Abb. 23b Schmelzoberfläche nach Versuchsteilnahme in der 4. Untergruppe

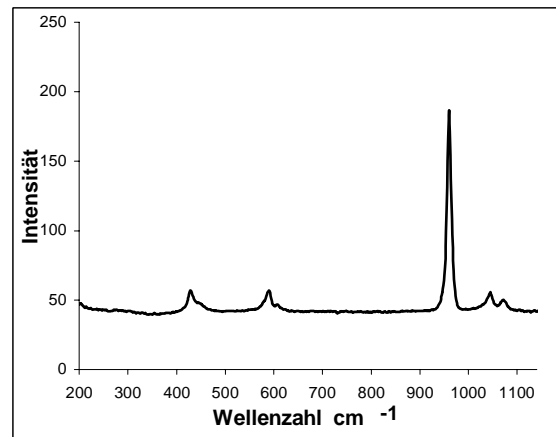
Abb. 23 Gegenüberstellung der nativen und maturierten Oberflächenmorphologie eines Schmelzpräparates.

#### 5.6. Mikro-Raman-Spektroskopie

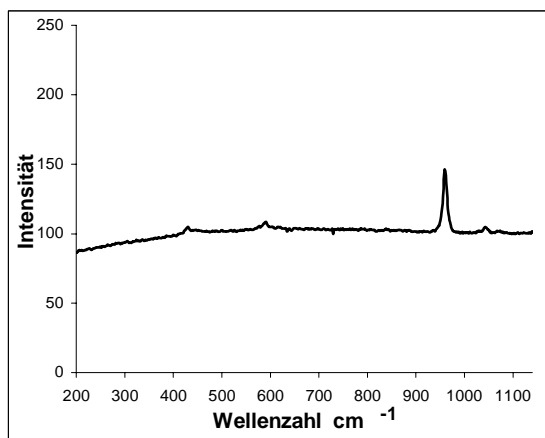
Die Raman-Spektren der untersuchten Präparate erbrachten das für Zahnschmelz und Dentin typische Bandenmuster (Diagramm 21a und 22a). Als Referenzarbeiten zur Identifikation der Raman-Spektren dienten die Arbeiten von Tsuda und Arends (1993) und von Tramini et al. (2000). Für solche Spektren ist der mineralische Hauptbestandteil, das Hydroxylapatit, verantwortlich. Diese charakteristischen Bandenmuster werden von den Phosphatgruppen hervorgerufen. Die Phosphat- $\nu_1$ -Bande liegt bei  $962\text{ cm}^{-1}$  und ist am dominantesten ausgeprägt. Des Weiteren befinden sich die Phosphat- $\nu_2$ - und - $\nu_4$ -Bande bei Position  $432\text{ cm}^{-1}$  bzw.  $585\text{ cm}^{-1}$ . Die nur im Schmelz sichtbare Doppelbande bei  $1046\text{ cm}^{-1}$  und  $1075\text{ cm}^{-1}$  ist ebenfalls den Phosphat-Gruppen ( $\nu_3$ ) zuzuschreiben. Im Raman-Spektrum des Wurzeldentins wird sie durch die Karbonat-Bande bei Position  $1073\text{ cm}^{-1}$  maskiert.



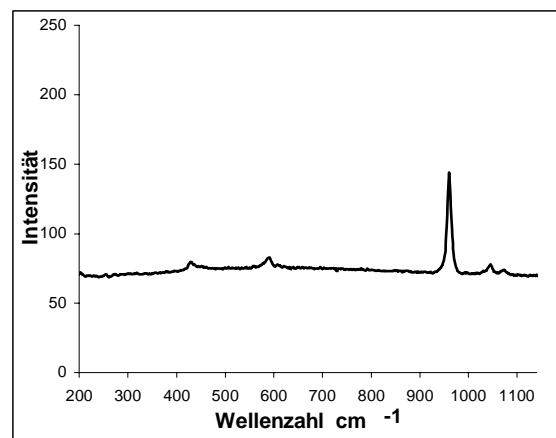
Diagr. 21a Unbehandelter Schmelz



Diagr. 21b Unbehandelter Schmelz  
+ Versuchslösung



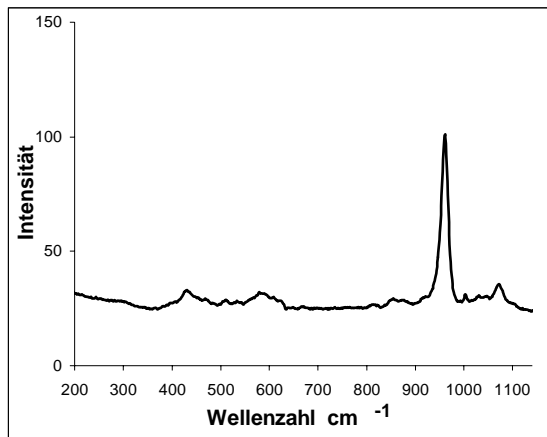
Diagr. 21c Demineralisierter Schmelz



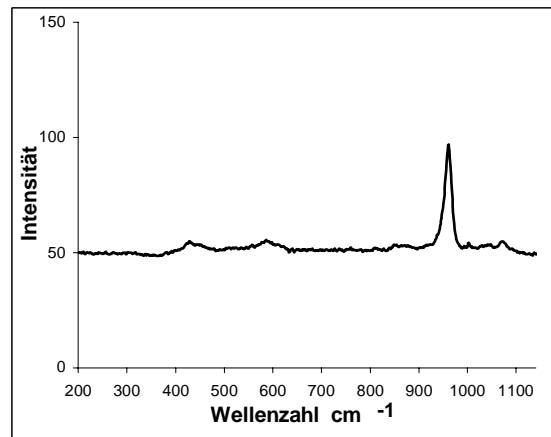
Diagr. 21d Demineralisierter Schmelz  
+ Versuchslösung

Diagramm 21 Raman-Spektren eines Schmelzpräparates, dem Kalziumphosphat-Lösung und Serum als Versuchslösung diente.

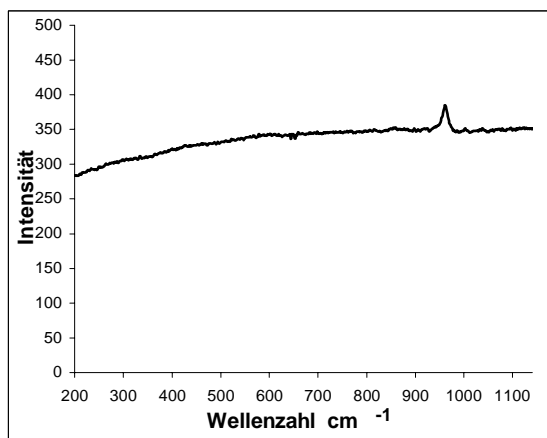
Nach einer Demineralisation der Zahnhartgewebe sind die Intensitäten der Bandenmuster im Vergleich zur Untergrundintensität verringert. Demzufolge korrelieren die Intensitäten mit der Konzentration der Verbindungen, die für das Raman-Spektrum verantwortlich sind. Organische Moleküle in Zahnhartgeweben zeigen, vergleichbar mit organischen Verbindungen in anderen biologischen Geweben, nach Anregung durch einen Laser Fluoreszenz. Die Fluoreszenz führt zu einer Überlagerung der Raman-Spektren und somit zu einer Steigerung der Grundintensität, wie aus Diagramm 22c ersichtlich. Aufgrund des höheren organischen Anteils am Dentin ist die Fluoreszenz stärker ausgeprägt als im Zahnschmelz (Diagramm 21c).



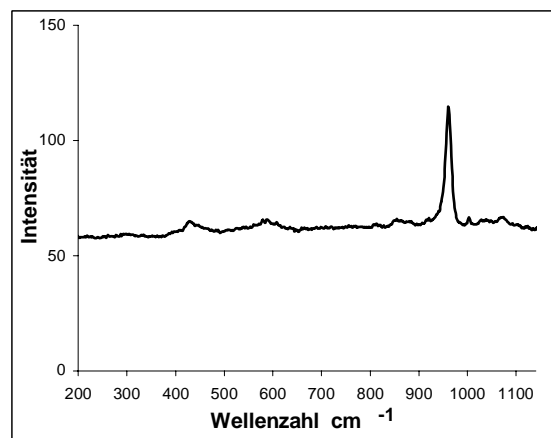
Diagr. 22a Unbehandeltes Wurzelzementin



Diagr. 22b Unbehandeltes Wurzelzementin + Versuchslösung



Diagr. 22c Demineralisiertes Wurzelzementin



Diagr. 22d Demineralisiertes Wurzelzementin + Versuchslösung

Diagramm 22 Raman-Spektren eines Wurzelzementinpräparates, dem Kalziumphosphat-Lösung und Serum als Versuchslösung diente.

Mineraleinlagerungen in die Zahnhartgewebe, im Sinne einer Remineralisation, verringern die Fluoreszenz und lassen die Raman-Spektren wieder deutlich hervortreten (Diagramm 21d und 22d), jedoch nicht so ausgeprägt wie in unbehandeltem Schmelz bzw. Wurzelzementin. Sowohl nach De- und Remineralisation, als auch nach Einwirkung der Versuchslösungen auf die unbehandelten Zahnhartgewebe (Diagramm 21b und 22b), ist keine Veränderung der Position der Banden in den Raman-Spektren zu erkennen. Dafür gibt es 2 mögliche Erklärungen: 1. Die Bindungsverhältnisse haben keine Änderung erfahren, also hat keine Umwandlung in andere Kalziumphosphate stattgefunden. 2. Wahrscheinlicher ist, dass Veränderungen stattgefunden haben, aber ein methodenbedingter Mangel an Sensitivität diese Umwandlungen nicht erkennen lässt.

## 6. Diskussion

### 6.1. Diskussion der Methodik

Die vorgestellte Pilotstudie erhebt keinen Anspruch darauf, die physiologischen Vorgänge innerhalb der Mundhöhle, die die posteruptive Schmelzreifung herbeiführen, in einer künstlichen Versuchsanordnung detailliert und originalgetreu wiederzugeben. Vielmehr werden einzelne Aspekte in den Vordergrund gestellt, um deren Anteil am Gesamtkonzept der Auswirkungen des oralen Milieus auf die Zahnhartgewebe zu studieren.

Dem Gedanken, dass der über Jahre hinweg stattfindende stetige Wechsel von De- und Remineralisation zur Schmelzreifung führt, wird durch die Versuche im pH-cycling-System Rechnung getragen. Die annähernd 4500 Zyklen entsprechen bei einer angenommenen intraoralen Demineralisationshäufigkeit von viermal pro Tag, einer simulierten Zeitspanne von ca. 3 Jahren. Der im Verhältnis zur intraoralen Situation häufige Wechsel und damit einhergehenden kurzen Dauer von De- bzw. Remineralisation erreicht tiefere Zahnhartgewebsschichten nicht. Ten Cate und Arends (1980) beschreiben die Abhängigkeit der Mineralisationsvorgänge von der Oberflächenkonfiguration und der Diffusionsfähigkeit. Da in tieferen Schichten ( $> 150 \mu\text{m}$  Entfernung von der Oberfläche) die Diffusion das ausschlaggebende Moment darstellt und durch die kurze Dauer der De- und Remineralisation der pH-Gradient nicht weit vordringen kann, haben Veränderungen nur innerhalb der oberflächlichen Schichten ( $< 100 \mu\text{m}$  Entfernung von der Oberfläche) stattgefunden. Ten Cate und Arends (1980) konnten nachweisen, dass innerhalb der oberflächlichen Zahnhartgewebe sehr schnell eine Remineralisation erfolgt. Daher können trotz der kurzen Einwirkzeit Mineralisationsvorgänge ablaufen.

Von den intraoralen Gegebenheiten abgekoppelt ist der Faktor Temperatur. Durch das Konstruktionsprinzip des pH-cycling-Systems vorgegeben, wurden die Versuche bei einer Raumtemperatur durchgeführt, die unterhalb der physiologischen Körpertemperatur lag. Verschiedene Untersuchungen konnten nachweisen, dass zwar die Rate, mit der die Zahnhartsubstanzen de- oder remineralisiert werden bei einer Temperaturverringerung von  $37^\circ \text{C}$  auf  $25^\circ \text{C}$  leicht absinkt, etwa um den Faktor 1,5, aber keine Veränderung in der Zusammensetzung des durch die Remineralisationslösung gebildeten Materials stattfindet (Meyer und Nancollas 1972; Eanes 1975; Arends und ten Cate 1981). Diese Ergebnisse stammen aus Untersuchungen über kürzere Zeiträume (1-10 Tage). Da die in der vorliegenden Studie gewählten Versuchszeiträume mit 4 bzw. 8 Wochen darüber hinausgehen, wird der Faktor Temperatur in seinen Auswirkungen verringert. Die ermittelten Mineralisationsveränderungen sind daher in ihrer Quantität geringgradiger

ausgeprägt, die Qualität erfährt aber keine Beeinflussung hinsichtlich der Aussagekraft der Ergebnisse.

Im Vordergrund des ersten Versuchsabschnittes steht der Aspekt der anorganisch beeinflussten Veränderungen auf das Mineralisations- und Reifungsverhalten von Zahnhartgeweben. Der zweite Versuchsabschnitt hebt die organischen Gesichtspunkte hervor. Die Wahl der Versuchslösung fiel auf menschliches Blutserum. Serum ist in seiner Zusammensetzung konstanter als Speichel, der starken tagesaktuellen Schwankungen unterliegt. Aufgrund der Muzine weist Speichel eine höhere Viskosität als Serum auf. Die Diffusion wird im Serum somit weniger behindert. Buddecke (1981) stellte die Konzentrationen der Ionen im Speichel und Serum gegenüber (Tabelle 2).

Tabelle 2 Vergleich der Durchschnittswerte der anorganischen Bestandteile des Gesamtspeichels und des Blutserums (Buddecke 1981)

Kation bzw. Anion	Speichel (mmol/l)	Serum (mmol/l)
Kalium	20	5
Natrium	15	130
Kalzium	1,5	2,5
Chlorid	18	100
Phosphor (als Phosphat)	1,5	1,0
Hydrogenkarbonat	20-60	24
Fluorid*	$2 \cdot 10^{-3} - 7,5 \cdot 10^{-3}$	$4,2 \cdot 10^{-3} - 6,8 \cdot 10^{-3}$

\* Fluoridwerte im Serum nach Irlweck und Sorantin (1977)

Den Gesamteiweißgehalt von Gesamtspeichel gibt Thomas (1992) mit 1,1-6,4 g/l an, der für Serum liegt bei 66-87 g/l. Daraus ist ersichtlich, dass der Proteingehalt im Serum um mindestens eine Zehnerpotenz höher ist als im Speichel. Die Zusammensetzung der Proteinfraction differiert ebenfalls zwischen Speichel und Serum. Im Speichel sind fast 50 Proteine und Glycoproteine beschrieben worden, deren Funktionen teilweise noch nicht geklärt werden konnte (Schiffner 1997). Neben den Glycoproteinen, die den größten Anteil bilden, sind im Speichel Enzyme wie Lysozym, Laktoferrin, Amylase, Peroxidasen, saure Phosphatasen und Esterasen vorhanden. Ferner enthält der Speichel Serumproteine. Dazu zählen Albumin, Lipoproteine und Immunglobuline. Das Albumin liegt in einer Konzentration von 0,246-0,344 g/l vor. Im Serum beträgt seine Konzentration 33,1-52,5 g/l (Thomas 1992). VandenBos et al. (1999) untersuchten zwar das Vorkommen von Osteopontin in Zahnhartgeweben, gehen aber davon aus, dass neben Osteopontin auch andere, nicht kollagene Proteine und Albumin mit dem Serum herangebracht werden und ihren Weg über Speichel und Krevikularfluid zu den Geweben

fortsetzen können. Zusammenfassend ist festzustellen, dass Speichel und Serum Gemeinsamkeiten in ihrer Zusammensetzung aufweisen. Andererseits führten die deutlichen Unterschiede zwischen den beiden zur Favorisierung des Serums als Versuchslösung, da es den Anforderungen an den organisch dominierten Versuchsabschnitt dieser Pilotstudie in höherem Maße gerecht wird.

Während der Lagerung des Serums bei  $-18^{\circ}\text{C}$  kommt es nach Eidelman et al. (1987 a) zu einer Verringerung des  $\text{CO}_2$ -Gehaltes und einer Erhöhung des pH-Wertes. Nach Auftauen des Serums wurde eine geringfügige Abnahme der Kalzium- und Phosphatkonzentration nachgewiesen. Jedoch war das Serum noch immer in Bezug auf OCP und HAP übersättigt. Eine signifikante Beeinflussung der Bildung von Kalziumphosphaten konnten die Autoren nicht konstatieren. Somit ist der tief gefrorenen Lagerung des Serums kein verfälschender Effekt auf die Ergebnisse zuzuschreiben. Eidelman et al. (1987 b) stellten ebenfalls keinen qualitativen Einfluss der Temperatur des Serums ( $25^{\circ}\text{C}$  und  $37^{\circ}\text{C}$ ) auf die Bildung und Umwandlung von Kalziumphosphaten fest. Ähnlich dem Einfluss der Temperatur auf das pH-cycling ist die Umsatzrate bei  $25^{\circ}\text{C}$  erniedrigt.

Dem Zusatz von 0,02% Natriumazid als antibakteriell wirkende Verbindung zu den Versuchsansätzen des zweiten Versuchsabschnittes konnte in zurückliegenden Untersuchungen keine Verfälschung der Eigenschaften der Versuchslösungen oder der Ergebnisse zugesprochen werden (Zahradnik et al. 1976; Reynolds 1997; Wen et al. 2000).

Hoppenbrouwers et al. (1987) sehen es als gerechtfertigt an, Dentin und Zement in ihrem Verhalten gegenüber De- und Remineralisationslösungen zusammen zu studieren, da sie radiographisch und in dem Löslichkeitsverhalten ihrer anorganischen Phase nicht zu unterscheiden sind.

## 6.2. Diskussion der Auswertungsverfahren

Ein Ziel dieser Pilotstudie war es, mehrere Auswertungsverfahren gegenüberzustellen und eine Aussage bezüglich ihrer Eignung für die vorliegenden Fragestellungen zu treffen.

Die Polarisationsmikroskopie eignet sich vornehmlich dazu, die Grenzen der subfiziellen Läsionen zu bestimmen und Veränderungen innerhalb der Läsionen zu verdeutlichen. Die Reifung der Zahnhartgewebe, insbesondere des Schmelzes, ist mit dem Polarisationsmikroskop nur bedingt darstellbar. Dies begründet sich darin, dass die posteruptive Schmelzreifung in vivo ein sehr langsam fortschreitender Prozess ist und eine in vitro Simulation über 4 bzw. 8 Wochen trotz gleich bleibender Versuchsbedingungen nur schwach ausgeprägte Veränderungen hervorruft. Heilman et



al. (1997) beschreiben sogar, dass die mittels Mikroradiographie sichtbar gemachte deutliche Remineralisation von Dentin polarisationsmikroskopisch kaum als solche auszumachen ist. Auch aus den Ergebnissen dieser Studie lässt sich folgern, dass die Polarisationmikroskopie zur übersichtlichen Darstellung dient, jedoch die diffizilen Veränderungen der Reifungsmineralisation des Schmelzes im Gruppenvergleich nicht befriedigend darzustellen sind.

Die Messungen der Läsionstiefen konnten keinen Aufschluss über das Maß der durch die Versuchslösungen herbeigeführten Remineralisation der artifiziellen Läsionen geben. Dieses Auswertungsverfahren erweist sich in dieser Studie als unbrauchbar, da die Versuchslösungen nicht zum Zwecke einer größtmöglichen Remineralisation optimiert wurden und die erzielten Mineraleinlagerungen nicht durch die Ermittlung der Läsionstiefen quantifiziert werden konnten. Diese Beobachtungen gehen mit Silverstone et al. (1981) konform, die keine signifikante Verringerung der Läsionstiefen feststellten, während die Läsionen nachweislich remineralisiert wurden.

Nach Klinger und Wiedemann (1987) ist die Mikrohärtigkeit ein Maß für die irreversible Verformung einer Präparatoberfläche durch eine Diamantpyramide, die mit definierter Kraft aufgedrückt wird. Die Mikrohärtewerte nehmen mit vermehrtem Porenanteil ab. White (1987) konnte statistisch unterlegt zeigen, dass die Mikrohärtigkeit mit dem Mineralgehalt, welcher durch Mikroradiographie ermittelt wurde, linear korreliert. Dies gilt sowohl für Schmelz als auch für Dentin. Somit können Mikrohärtigkeitsprofile von Zahnhartgeweben nicht nur als vergleichende Messungen der Mikrohärtigkeitsveränderungen, sondern auch als direkte Bestimmung des Mineralzugewinns oder -verlustes, resultierend aus einer De- und/ oder Remineralisation, herangezogen werden (Featherstone et al. 1983). Die Erhöhung der Mikrohärtigkeit im Rahmen einer Remineralisation konnte ebenfalls von ten Cate et al. (1985) durch die Mikroradiographie als Mineraleinlagerung identifiziert werden. Dieser mehrfach nachgewiesene Zusammenhang stellt die Grundlage dar, weshalb die Bestimmung der Mikrohärtigkeit auf einer longitudinal durch den Zahn verlaufenden Schlißfläche eine gute Übereinstimmung mit den tatsächlich erzeugten Läsionen und deren Veränderung durch Versuchslösungen erbringt (Nelson et al. 1992). White (1987) betont die Nutzung dieser sensitiven Analyse, um Unterschiede zwischen Versuchsgruppen herauszufinden. Die Feststellung der Mikrohärtigkeit ist somit sehr gut als Auswertungsverfahren für die teilweise geringgradigen Veränderungen in den vorliegenden Untersuchungen geeignet.

Die Domäne der Rasterelektronenmikroskopie ist die Betrachtung und Auswertung von strukturierten Oberflächen. Da die Schlißflächen nicht angeätzt wurden, waren einerseits weniger Strukturen als vielmehr Kontrastunterschiede erkennbar, andererseits stellten ten

Cate et al. (1981) fest, dass durch das Anätzen der Zahnhartgewebe amorphes oder leicht gebundenes Mineral herausgelöst wird, was zu einer Verfälschung der Ergebnisse führt. Ein Informationsgewinn im Bereich der subfiziellen Läsionen war bezüglich der Polarisationsmikroskopie durch die konventionelle Rasterelektronenmikroskopie nicht zu erreichen.

Ähnliches gilt auch für das ESEM. Es bietet jedoch den Vorteil, dass das Untersuchungsobjekt ohne Vorbehandlung direkt begutachtet werden kann. Versuchsobjekte können sowohl vor als auch nach den Versuchen unter den exakt gleichen Bedingungen betrachtet werden. Aufgrund dessen könnten auch rasterelektronenmikroskopisch zweifelsfrei die Auswirkungen von Versuchslösungen in einem Bereich eines Präparates studiert werden. Cowan et al. (1996) sehen die Einsatzgebiete des ESEM nicht nur in der Erforschung der De- und Remineralisation, sondern auch in der Vertiefung der Erkenntnisse über die Interaktionen zwischen restaurativen Materialien und den Zahnhartgeweben.

Für die Ermittlung der Ca/P-Verhältnisse waren die absoluten Nettointensitäten der Elemente von untergeordneter Bedeutung, doch stellten sich während der Aufnahme der EDX-Spektren ortsabhängige Schwankungen dieser Intensitäten heraus. Die Schwankungen betrafen das gesamte Spektrum, so dass die Verhältnisse nicht beeinflusst wurden. Die Nettointensitäten konnten darum nicht separat als Bewertungsgröße zum Vergleich der Präparate herangezogen werden.

Die Vorteile der Raman-Spektroskopie liegen nach Tsuda und Arends (1997) in der einfachen, nicht destruktiven Probenpräparation und der linearen Korrelation zwischen den Intensitäten und den Konzentrationen der Verbindungen, die für die Raman-Spektren charakteristisch sind. Den Grund für die recht überschaubare Anzahl von Arbeiten über Raman-Spektroskopie im zahnärztlichen Forschungsbereich und der nicht häufigeren Anwendung dieses Analyseverfahrens sehen die Autoren im Problem der Fluoreszenz verwurzelt. In Übereinstimmung mit Tsuda und Arends ist die Fortführung der Raman-Technik gerade im Dentin durch den im Vergleich zum Zahnschmelz höheren organischen Anteil limitiert. Die Eignung der Mikro-Raman-Spektroskopie zur differenzierten qualitativen und quantitativen Analyse im Rahmen der Erforschung der posteruptionen Schmelzreifung kann anhand der vorliegenden Untersuchung nicht abschließend bewertet werden und bedarf weiterer grundlegender Aufklärung.

### 6.3. Diskussion der Ergebnisse

Die Vermutungen von einigen Autoren (ten Cate und Duijsters 1982; Arends et al. 1983 b; Driessens et al. 1985), dass der stetige Wechsel des pH-Wertes innerhalb der Mundhöhle über einen längeren Zeitraum der Hauptgrund für die Reifung des porösen Zahnschmelzes ist, können durch die Ergebnisse dieser Pilotstudie nicht bestätigt werden.

Das pH-cycling erbrachte, übereinstimmend durch Polarisationsmikroskopie und Mikrohärteprüfung nachgewiesen, eine begrenzte Remineralisation der artifiziellen Läsionen sowohl im Schmelz wie auch im Wurzelbereich. Dafür ist, den Arbeiten von ten Cate und Duijsters (1982), ten Cate et al. (1988), Herkströter et al. (1991), Robinson et al. (1992) und Kirkham et al. (1994) folgernd, die Zugabe von Fluoridionen verantwortlich. Silverstone (1983) gibt eine Fluoridkonzentration von 1 ppm als besonders effektiv zur Verstärkung der Remineralisation durch eine synthetische Rekalzifizierungslösung an. Für diese Konzentration beziffern ten Cate und Arends (1981) die Steigerung der Einlagerungsrate von Mineral um das 2-3 fache. Ohne Fluoridzugabe hätte in nativem Zahnhartgewebe ein Nettomineralverlust zur Ausbildung einer Läsion geführt (ten Cate et al. 1988; Herkströter et al. 1991). Abweichend von diesen Erkenntnissen stellt sich lediglich das Mikrohärteprofil der Präparate nach 8 Wochen pH-cycling dar. Trotz der Zugabe resultierte ein Mineralverlust. Somit wird der Vermutung von Arends et al. (1983) und Kotsanos und Darling (1991) zugestimmt, dass keine Korrelation zwischen der Fluoridkonzentration und dem Durchmesser der Apatitkristalle besteht und der Fluoridgehalt im Schmelz nicht für die abnehmende Kariesanfälligkeit bei zunehmendem posteruptivem Alter verantwortlich ist.

Da der Wechsel zwischen De- und Remineralisation zu keiner Steigerung der Mikrohärte führte, konnten keine Anzeichen einer posteruptiven Schmelzreifung festgestellt werden. Kritisch muss allerdings beachtet werden, dass die quantitative und qualitative Zunahme hochwertiger Minerale nicht zwingend in einer Härtesteigerung mündet. Nach den Erkenntnissen der vorliegenden Untersuchung gebührt den organischen Komponenten im intraoralen Milieu eine essentielle Bedeutung, ohne dass die Rolle der anorganischen Faktoren in den Hintergrund tritt. Aber nicht zuletzt sind es Proteine und proteinogene Verbindungen, die die Ausbildung der Zahnhartgewebe in ihrer kompakten, geordneten und sehr stabilen Konsistenz ermöglichen.

Die Auswertung der Läsionen durch die polarisationsmikroskopische Begutachtung zeigte in jedem der 4 Lösungsansätze des zweiten Versuchsabschnittes, dass sowohl im Schmelz als auch in den Wurzelläsionen eine Remineralisation stattgefunden hat. Bestätigt werden konnten diese Ergebnisse mit Hilfe der Bestimmung der Mikrohärte. Der

Vergleich zwischen den Mikrohärtewerten der nativen Areale und den zuvor unbehandelten Arealen, die den Versuchslösungen ausgesetzt waren, führte im Schmelz zu einem heterogenen Bild. Während die Versuche mit Serum und Serum mit Natriumfluorid eine Erhöhung der Mikrohärtigkeit und damit des Mineralgehaltes erbrachten, verringerten sich die Werte mit der Versuchslösung, welche aus einer synthetischen Kalziumphosphat-Lösung und Serum bestand. Nach Verwendung der synthetischen Lösung ohne organischen Zusatz waren keine Veränderungen der Mikrohärtigkeit festzustellen. Somit konnte das Serum, dessen Hauptbestandteil Albumin nachweislich das Wachstum von Apatitkristallen hemmt (Boskey 1996), einen positiven Effekt auf die Schmelzmaturierung erzielen. Ob das Albumin letztendlich für die Härtesteigerung verantwortlich ist, bleibt spekulativ. Kritisch hervorzuheben ist die geringe Anzahl der untersuchten Präparate. Trotzdem verdeutlichen diese Ergebnisse, dass die organischen Verbindungen postoperativ ein wichtiger Faktor für die Reifung des Zahnschmelzes sind.

Die Auswirkungen von Speichelproteinen auf die Bildung und das Wachstum von Apatitkristallen wurden von Moreno et al. (1979) untersucht. Demzufolge verursachen Statherin, ein Tyrosin-reiches Peptid und 2 Prolin-reiche Speichelproteine ebenfalls eine signifikante Reduktion der Wachstumsrate von Apatit. Die Anwendung der Versuchslösungen an den unbehandelten Wurzelarealen erbrachte ein zum Schmelz differierendes Ergebnis. In beiden Versuchsgruppen, in denen Serum den Hauptbestandteil der Versuchslösungen ausmachte, war keine Veränderung der Mikrohärtigkeit festzustellen, während in den Gruppen, deren Hauptanteil eine synthetische Kalziumphosphat-Lösung bildete, eine Abnahme des Mineralgehaltes zu verzeichnen war. Daher kann dem Serum durchaus ein protektiver Effekt zugesprochen werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse für Schmelz, auf der einen und Dentin und Wurzelzement auf der anderen Seite verdeutlichen die Unterschiede in der Entwicklung und im Aufbau der Zahnhartsubstanzen und daraus folgend in der Wirkung, die organische Verbindungen auf sie haben.

Der deutliche Schwankungsbereich der Läsionstiefen der Präparate ist im nicht identischen postoperativen Alter und damit auch im nicht identischen Maturationsgrad und Mineralgehalt begründet. Der in den nativen Zahnhartgeweben vorhandene Mineralgehalt bestimmt direkt den Mineralgehalt der Läsionen und die maximal mögliche Wiedererhärtung (Groeneveld et al. 1975; White et al. 1988). Dass die Stagnation der Läsionstiefen nach einem Remineralisationsversuch Mineraleinlagerungen nicht ausschließt, stellten Klinger und Wiedemann (1985) fest, die keine signifikante Veränderung der Tiefe von artifiziellen Läsionen vor und nach einer nachweislich stattgefundenen Remineralisation fanden.

Die Begutachtung der Präparate mit dem konventionellen Rasterelektronenmikroskop und dem ESEM führten zu übereinstimmenden Beobachtungen. Diese stellten sich als Hohlräume und Kanäle innerhalb des Schmelzes und einer stark unregelmäßigen Oberflächenmorphologie dar und sind konform zu den Untersuchungen von Goldberg et al. (1983) und Fejerskov et al. (1984).

Die Bestimmung des Ca/P-Verhältnisses ist ein häufig geübtes Verfahren, um aus den relativen Anteilen der Kalzium- und Phosphationen Rückschlüsse auf die Bindungsverhältnisse zu ziehen. Im Gegensatz dazu fand die Raman-Spektroskopie trotz der Entdeckung des Raman-Effektes im Jahre 1928, in der zahnärztlichen Forschung keine weite Verbreitung. Ten Cate und Arends (1981) ermittelten im oberflächlichen Schmelz ein Ca/P-Verhältnis von 1,40-1,45. In tieferen Schichten steigt das Verhältnis auf 1,6 an. Damit bewegen sich die Ergebnisse dieser Studie im Einklang mit den Werten von Ten Cate und Arends. Mit einem EDX-Detektor bestimmten Kodaka et al. (1991) den Ca/P-Quotienten von ausgereiftem Schmelz nahe der Schmelz-Dentin-Grenze. Das Verhältnis der Elemente bewegte sich zwischen 1,56 und 1,60. In verschiedenen Untersuchungen, sowohl mit anorganischen als auch organischen Versuchslösungen, wurden die Ca/P-Verhältnisse vor und nach den Versuchen berechnet (Kraft und Gängler 1984; Rentsch et al. 1990; Reynolds 1997). Dabei stellte sich heraus, dass die Demineralisation zu einem Absinken des Verhältnisses führt. Eine anschließende Remineralisation ist in der Lage, den Ca/P-Quotienten wieder zu erhöhen. Der Ausgangswert konnte allerdings nicht erreicht werden. Daher liegt der Verdacht nahe, dass zumindest eine teilweise Umwandlung der Kalziumphosphate von Apatit zu OCP durchlaufen wird. Wöltgens et al. (1981) äußerten ebenfalls die Vermutung über eine durch De- und Remineralisation herbeigeführte Veränderung der Schmelzzusammensetzung. Diese Vorgänge können durch die Gegenüberstellung mit den Raman-Spektren jedoch nicht bestätigt werden, denn die Mineralabgabe bzw. Mineralaufnahme der Zahnhartgewebe führen zu keiner Verschiebung der Raman-Spektren, sondern lediglich der Intensitäten. Nicht erforscht ist allerdings, ob die Sensitivität der Mikro-Raman-Spektroskopie ausreicht, um auch einzelne Änderungen in den Bindungsverhältnissen der Kristalle darzustellen, die durch Umwandlung von Apatit zu OCP oder DCPD und umgekehrt entstehen. Testreihen haben einen Fokusdurchmesser von 5 µm für die verwendeten Einstellungen am Mikro-Raman-Spektroskop ergeben. Somit sind Messungen innerhalb der Läsionsbereiche mit hoher Ortsauflösung möglich und eine Maskierung der Signale durch unbehandelte Zahnhartgewebe ist ausgeschlossen.

## 7. Schlussfolgerungen

Zur Vorstellung, dass der stetige Wechsel zwischen De- und Remineralisation die treibende Kraft für die posteruptive Schmelzreifung darstellt, muss ein weiterer Faktor, wahrscheinlich der Entscheidende, hinzugefügt werden. Dabei handelt es sich um organische Verbindungen, die in der Lage sind, mit Kristallen zu interagieren, gezielt ihr Wachstum zu unterbinden und damit zu steuern, ähnlich den Mechanismen während der Entstehung des Zahnschmelzes. Die Hoffnung mittels organischer Verbindungen kariöse Läsionen vollständig zu remineralisieren, konnte nicht erfüllt werden.

Die Kombination der energiedispersiven Röntgenspektrometrie am ESEM und der Mikro-Raman-Spektroskopie ermöglicht vergleichende Bestimmungen der Zusammensetzung und der Bindungsverhältnisse. Vorteile sind jedoch eher bei der Analyse von Schmelz- als bei Dentinproben zu erwarten. Weitere grundlegende Untersuchungen sind jedoch nötig, um das Potential der Mikro-Raman-Spektroskopie auszuloten.

Die Mikrohärteprüfung stellt ein probates Mittel zur Auswertung dar, mit dem auch geringgradige Unterschiede im Mineralgehalt festgestellt werden können. Große Varianzen treten im Mineralgehalt der Proben auf, die zu Reifungsversuchen benutzt werden, da es sich um möglichst unreife Zähne handeln muss. Um dennoch vergleichbare Aussagen treffen zu können, müssen die Messungen und Analysen an einer Probe in einem eng umschriebenen Bezirk erfolgen. Diese natürlich bedingte Ungleichheit der untersuchten Zähne bedingt die Einschränkungen hinsichtlich der quantitativen Aussagefähigkeit. Nichtsdestotrotz sind klare Tendenzen in den Ergebnissen dieser Studie abzulesen, die, folgend dem Charakter einer Pilotarbeit, wegweisend für weiterführende Untersuchungen sind.

## 8. Zusammenfassung

Die Schmelzreifung ist ein posteruptiv ablaufender Mineralisationsvorgang, der durch das intraorale Milieu herbeigeführt wird. Bislang bestand jedoch ein Informationsdefizit bezüglich des Herganges und der beteiligten Komponenten des intraoralen Milieus. Vermutungen wurden geäußert, dass der stetige Wechsel von De- und Remineralisation diese Ausreifung ermöglicht.

Zu diesem Zweck wurde im ersten Versuchsabschnitt dieser Studie ein pH-cycling-Experiment über 4 bzw. 8 Wochen durchgeführt, welches in kurzen Intervallen diese Wechsel zwischen Säureangriff und Mineraleinlagerung simulieren sollte. Im zweiten Versuchsabschnitt wurde der Vielzahl von organischen Verbindungen innerhalb des oralen Milieus Rechnung getragen. Dafür fand gepooltes menschliches Blutserum, als von organischen Verbindungen physiologischen Ursprungs dominierte Lösung, Verwendung. Um einen umfassenden Eindruck bezüglich der Auswirkungen der Versuchslösungen auf die Zahnhartgewebe zu gewinnen, wurden ebenfalls Versuchsareale im Zahnwurzelbereich ausgewertet und gleichzeitig an artifiziell erzeugten, subfiziellen Läsionen im Schmelz und der Wurzel geprüft, ob die Versuchslösungen auch eine rekalkifizierende Wirkung aufweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 95 kariesfreie, unreife Prämolaren und Weisheitszähne verwendet. An 55 Zähnen erfolgte im pH-cycling-System der Wechsel zwischen De- und Remineralisation. 40 Zähne dienten den Versuchen im zweiten Abschnitt, der sich in 4 Untergruppen zu jeweils 10 Zähnen mit verschiedenen Lösungsansätzen untergliederte.

Die subfiziellen Läsionen wurden mit 4,5% Hydroxyethylzellulose-Lösung (pH-Wert = 4,5) erzeugt. Die Gesamtdauer der Demineralisation betrug 28 Tage. Während des pH-cycling diente eine synthetische Lösung mit 2 mM  $\text{CaCl}_2$  und 2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  als Stammlösung. Um mit demineralisierendem Charakter zu agieren, erfolgte mit 0,1 M Milchsäure die Einstellung des pH-Wertes auf 4,5. Der remineralisierenden Lösung wurde 1 ppm Fluorid in Form von Natriumfluorid zugesetzt. Im ersten Lösungsansatz des zweiten Versuchsabschnittes diente nur Serum als Versuchslösung. Im zweiten Ansatz wurde dem Serum 1 ppm Fluorid als NaF beigefügt. Der dritte Lösungsansatz bestand aus 2 Teilen Serum und 8 Teilen der synthetischen Lösung mit 2 mM  $\text{CaCl}_2$  und 2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Im vierten Ansatz kam nur die synthetische Lösung zum Einsatz. Die Einwirkdauer auf Schmelz und Wurzel betrug 4 Wochen.

An den 190 Schliffpräparaten der Versuchszähne erfolgten polarisationsmikroskopische und rasterelektronenmikroskopische Auswertungen. Die Mikrohärtigkeit der Zahnhartgewebe und die Tiefe der artifiziellen Läsionen wurden bestimmt. An ausgewählten Präparaten konnten das Ca/P-Verhältnis berechnet und die Raman-Spektren erfasst werden.

Die Bestimmung der Mikrohärteprofile erwies sich als sensitive und damit geeignete Methode, um Veränderungen im Mineralgehalt der zuvor unbehandelten Versuchsareale festzustellen. Dabei wurde die Erkenntnis gewonnen, dass die Lösungsansätze mit Serum und Serum mit Natriumfluorid in der Lage sind, die Einlagerung von Mineralien in unreifen Schmelz zu fördern. Diese Einlagerung konnte im pH-cycling-Versuch nicht beobachtet werden. Daher ist den proteinogenen Verbindungen auch im intraoralen Milieu ein entscheidender Anteil an der Schmelzreifung zuzusprechen. Der Wechsel zwischen De- und Remineralisation mit Lösungen, die Kalzium- und Phosphationen enthalten, ist als alleiniger Faktor offenbar nicht für die Maturation verantwortlich. Im Wurzelbereich konnte keine Reifung der Zahnhartgewebe erreicht werden.

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass sowohl das pH-cycling als auch die 4 Lösungsansätze des zweiten Versuchsabschnittes die subfiziellen Läsionen zu remineralisieren vermögen. Es wurde jedoch keine Übereinstimmung zwischen der Effektivität der Remineralisation und der Fähigkeit zu Mineraleinlagerungen in nicht demineralisierte Zahnhartgewebe deutlich. Dass die Versuche teilweise unterschiedliche Auswirkungen an Zahnschmelz und Zahnwurzel hatten, liegt in ihrer Entstehung und dem Aufbau begründet.

Vermutungen über eine durch De- und Remineralisation herbeigeführte Umwandlung der Bindungsverhältnisse zwischen Kalzium- und Phosphationen, wie durch das schwankende Ca/P-Verhältnis impliziert, konnten mit Hilfe der Mikro-Raman-Spektroskopie nicht bestätigt werden, jedoch bedarf es weiterer Klärung, ob sich die Mikro-Raman-Spektroskopie für die Bestimmung von Bindungsverhältnissen in Zahnhartgeweben als routinemäßiges Analyseverfahren eignet.



## 9. Literaturverzeichnis

1. Arends J, Cate JM ten: Tooth enamel remineralization. *J Crystal Growth* 53 (1981) 135-147
2. Arends J, Christoffersen J, Ruben J, Jongebloed WL: Remineralization of bovine dentine in vitro. The influence of the F content in solution on mineral distribution. *Caries Res* 23 (1989) 309-314
3. Arends J, Jongebloed WL, Schluthof J: Crystallite diameters of enamel near the anatomical surface. An investigation of mature, deciduous and non-erupted human enamel. *Caries Res* 17 (1983 a) 97-105
4. Arends J, Jongebloed WL, Schluthof J: The ultrastructure of surface enamel in relation to de- and remineralisation. In: Leach SA, Edgar WM (Eds): *Demineralisation and Remineralisation of the Teeth*. IRL Press Ltd., Oxford, 1983 b, S. 155-163
5. Backer Dirks O: Post-eruptive changes in dental enamel. *J Dent Res* 45 (1966) 503-511
6. Bartlett JD, Simmer JP: Proteinases in developing dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med* 10 (1999) 425-441
7. Binus W, Stiefel A: Besonderheiten der Mikromorphologie durchbrechender Zähne als Kofaktor ihrer Kariesgefährdung. *Zahn- Mund- Kieferheilkd* 75 (1987) 125-131
8. Boskey AL: Matrix proteins and mineralization: an overview. *Connect Tissue Res* 35 (1996) 357-363
9. Boskey AL: Noncollagenous matrix proteins and their role in mineralization. *Bone Mineral* 6 (1989) 111-123
10. Boskey AL: Overview of cellular elements and macromolecules implicated in the initiation of mineralization. In: Butler WT (Ed): *The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*. Ebsco Media, Birmingham, 1985, S. 335-343
11. Boskey AL, Maresca M, Appel J: The effect of noncollagenous matrix proteins on hydroxyapatite formation and proliferation in a collagen gel system. *Connect Tissue Res* 21 (1989) 171-178
12. Brandt M: Entwicklung, Bau und Erprobung eines automatischen pH-cycling-Systems. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 1998
13. Briner WW, Francis MD, Widder JS: Factors affecting the rate of post-eruptive maturation of dental enamel. *Calcif Tissue Res* 7 (1971) 249-256
14. Brudevold F, Aasenden R, Bakhos Y: A preliminary study of post-eruptive maturation of teeth in situ. *Caries Res* 16 (1982) 243-248

15. Buddecke E: Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin. De Gruyter, Berlin, New York, 1981
16. Butler WT: Dentin matrix proteins and dentinogenesis. *Connect Tissue Res* 33 (1995) 59-65
17. Butler WT, Ritchie HH, Bronckers ALJJ: Extracellular matrix proteins of dentine. In: Chadwick DJ, Cardew G (Eds): *Ciba Foundation Symposium 205: Dental Enamel*. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Weinheim (usw.), 1997, S. 107-117
18. Cate JM ten, Arends J: Remineralization of artificial enamel lesions in vitro. *Caries Res* 11 (1977) 277-286
19. Cate JM ten, Arends J: Remineralization of artificial enamel lesions in vitro. II. Determination of activation energy and reaction order. *Caries Res* 12 (1978) 213-222
20. Cate JM ten, Arends J: Remineralization of artificial enamel lesions in vitro. III. A study of the deposition mechanism. *Caries Res* 14 (1980) 351-358
21. Cate JM ten, Duijsters PPE: Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res* 16 (1982) 201-210
22. Cate JM ten, Jongebloed WL, Arends J: Remineralization of artificial enamel lesions in vitro. IV. Influence of fluorides and diphosphonates on short- and long-term remineralization. *Caries Res* 15 (1981) 60-69
23. Cate JM ten, Shariati M, Featherstone JDB: Enhancement of (salivary) remineralization by "dipping" solutions. *Caries Res* 19 (1985) 335-341
24. Cate JM ten, Timmer K, Shariati M, Featherstone JDB: Effect of timing of fluoride treatment on enamel de- and remineralization in vitro: a pH-cycling study. *Caries Res* 22 (1988) 20-26
25. Celio MR, Pauls TL, Schwaller B: *Guidebook to the Calcium-Binding Proteins*. A Sambrook & Tooze Publication at Oxford University Press, Oxford, New York, Athens (usw.), 1996
26. Cowan AJ, Wilson NHF, Wilson MA, Watts DC: The application of ESEM in dental materials research. *J Dent* 24 (1996) 375-377
27. Crabb HSM: The porous outer enamel of unerupted human premolars. *Caries Res* 10 (1976) 1-7
28. Damato FA, Strang R, Stephen KW: Effect of fluoride concentration on remineralization of carious enamel: an in vitro pH-cycling study. *Caries Res* 24 (1990) 174-180
29. Deutsch D, Catalano-Sherman J, Dafni L, David S, Palmon A: Enamel matrix proteins and ameloblast biology. *Connect Tissue Res* 32 (1995) 97-107

30. Deutsch D, Dafni L, Palmon A, Hekmati M, Young MF, Fisher LW: Tuftelin: enamel mineralization and amelogenesis imperfecta. In: Chadwick DJ, Cardew G (Eds): Ciba Foundation Symposium 205: Dental Enamel. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Weinheim (usw.), 1997, S. 135-155
31. Driessens FCM, Heijligers HJM, Borggreven JMPM, Wöltgens JHM: Posteruptive maturation of tooth enamel studied with the electron microprobe. *Caries Res* 19 (1985) 390-395
32. Eanes ED: Dynamic aspects of apatite phases of mineralized tissues. Model studies. In: Butler WT (Ed): *The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*. Ebsco Media, Birmingham, 1985, S. 213-220
33. Eanes ED: The interaction of supersaturated calcium phosphate solutions with apatitic substrates. *Calcif Tissue Res* 20 (1975) 75-89
34. Eidelman N, Chow LC, Brown WE: Calcium phosphate phase transformations in serum. *Calcif Tissue Int* 41 (1987 b) 18-26
35. Eidelman N, Chow LC, Brown WE: Calcium phosphate saturation levels in ultrafiltered serum. *Calcif Tissue Int* 40 (1987 a) 71-78
36. Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M: Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 12 (2001) 331-349
37. Endo A, Glimcher MJ: The effect of complexing phosphoproteins to decalcified collagen on in vitro calcification. *Connect Tissue Res* 21 (1989) 179-196
38. Fanning RJ, Shaw JH, Sognnaes RF: Salivary contribution to enamel maturation and caries resistance. *J Am Dent Ass Dent Cosmos* 49 (1954) 668-671
39. Feagin FF, Gonzales M, Jeansonne BG: Kinetic reactions of calcium, phosphate and fluoride ions at the enamel surface-solution interface. *Calcif Tissue Res* 10 (1972) 113-127
40. Featherstone JDB, Cate JM ten, Shariati M, Arends J: Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res* 17 (1983) 385-391
41. Fehr FR von der: Maturation and remineralization of enamel. *Adv Fluor Res Dent Caries Prevent* 3 (1964) 83-95
42. Fejerskov O, Josephsen K, Nyvad B: Surface ultrastructure of unerupted mature human enamel. *Caries Res* 18 (1984) 302-314
43. Felszeghy S, Hollo K, Modis L, Lammi MJ: Type X collagen in human enamel development: a possible role in mineralization. *Acta Odontol Scand* 58 (2000) 171-176

44. Fincham AG, Belcourt AB: Amelogenin biochemistry: current concepts. In: Butler WT (Ed): *The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*. Ebsco Media, Birmingham, 1985, S. 240-247
45. Fincham AG, Belcourt AB, Lyarnn DM, Termine JD: Comparative protein biochemistry of developing dental enamel matrix from five mammalian species. *Calcif Tissue Int* 34 (1982) 182-189
46. Fincham AG, Simmer JP: Amelogenin proteins of developing dental enamel. In: Chadwick DJ, Cardew G (Eds): *Ciba Foundation Symposium 205: Dental Enamel*. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Weinheim (usw.), 1997, S. 118-134
47. Fisher LW: The nature of the proteoglycans of bone. In: Butler WT (Ed): *The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*. Ebsco Media, Birmingham, 1985, S. 188-196
48. Gafni G, Septier D, Goldberg M: Effect of chondroitin sulfate and biglycan on the crystallization of hydroxyapatite under physiological conditions. *J Crystal Growth* 205 (1999) 618-623
49. Garnett J, Dieppe P: The effects of serum and human albumin on calcium hydroxyapatite crystal growth. *Biochem J* 266 (1990) 863-868
50. Goldberg M, Boskey AL: *Progress in Histochemistry and Cytochemistry Volume 31 No 2: Lipids and Biomineralizations*. Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, Lübeck (usw.), 1996
51. Groeneveld A, Purdell-Lewis DJ, Arends J: Influence of the mineral content of enamel on caries-like lesions produced in hydroxyethyl cellulose buffer solutions. *Caries Res* 9 (1975) 127-138
52. Head J: A study of saliva and its action on tooth enamel in reference to its hardening and softening. *J Am Med Ass* 59 (1912) 2118-2122
53. Heilman JR, Jordan TH, Warwick R, Wefel JS: Remineralization of root surfaces demineralized in solutions of differing fluoride levels. *Caries Res* 31 (1997) 423-428
54. Herkströter FM, Witjes M, Arends J: Demineralization of human dentine compared with enamel in a pH-cycling apparatus with a constant composition during de- and remineralization periods. *Caries Res* 25 (1991) 317-322
55. Hoppenbrouwers PMM, Groenendijk E, Ramlochan Tewarie N, Driessens FCM: Improvement of the caries resistance of human dental roots by a two-step conversion of the root mineral into fluoridated hydroxyapatite. *J Dent Res* 67 (1988) 1254-1256
56. Hu CC, Fukae M, Uchida T, Qian Q, Zang CH, Ryu OH, Tanabe T, Yamakoshi Y, Murakami C, Dohi N, Shimizu M, Simmer JP: Sheathlin: cloning, cDNA/ polypeptide

- sequences and immunolocalization of porcine enamel sheath proteins. *J Dent Res* 76 (1997) 648-657
57. Iijima Y, Moriwaki Y, Takagi T, Moradian-Oldak J: Effect of bovine amelogenins on the crystal morphology of octacalcium phosphate in a model system of tooth enamel formation. *J Crystal Growth* 222 ( 2001) 615-625
  58. Iijima Y, Takagi O, Ruben J, Arends J: In vitro remineralization of in vivo and in vitro formed enamel lesions. *Caries Res* 33 (1999) 206-213
  59. Irlweck K, Sorantin H: Die Bestimmung des Fluoridgehaltes in Harn- und Serumproben sowie in Knochenmaterial mit Hilfe einer fluorspezifischen Elektrode. *Mikrochimica Acta* (1977) 25-31
  60. Kirkham J, Robinson C, Strong M, Shore RC: Effects of frequency and duration of acid exposure on demineralization/ remineralization behaviour of human enamel in vitro. *Caries Res* 28 (1994) 9-13
  61. Klinger HG, Wiedemann W: Grenzen der Remineralisierbarkeit initialer Karies. *Dtsch Zahnärztl Z* 40 (1985) 16-22
  62. Klinger HG, Wiedemann W: Remineralisation, Theorie und Methoden. *Dtsch Zahnärztl Z* 42 (1987) 85-90
  63. Klont B, Cate JM ten: Remineralization of bovine incisor root lesions in vitro: the role of the collagenous matrix. *Caries Res* 25 (1991) 39-45
  64. Kodaka T, Debari K, Kuroiwa M: Mineral content of the innermost enamel in erupted human teeth. *J Electron Microsc* 40 (1991) 19-23
  65. Kohári S, Bóna K: Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen von Zahnschmelz und Dentin bei Individuen verschiedenen Alters. *Dtsch Zahnärztl Z* 15 (1960) 1009-1020
  66. Kotsanos N, Darling AI: Influence of post-eruptive age of enamel on its susceptibility to artificial caries. *Caries Res* 25 (1991) 241-250
  67. Koulourides T, Cameron B: Enamel remineralization as a factor in the pathogenesis of dental caries. *J Oral Pathol* 9 (1980) 255-269
  68. Kraft U, Gängler P: Die mikroanalytische Bestimmung des Ca/P-Verhältnisses bei der De- und Remineralisation des menschlichen Zahnschmelzes. *Zahn- Mund- Kieferheilkd* 72 (1984) 305-310
  69. Lammers PC, Borggreven JMPM, Driessens FCM: Influence of fluoride and pH on in vitro remineralization of bovine enamel. *Caries Res* 26 (1992) 8-13
  70. Lammers PC, Borggreven JMPM, Driessens FCM: Influence of fluoride on in vitro remineralization of artificial subsurface lesions determined with a sandwich technique. *Caries Res* 24 (1990) 81-85

71. Larsen MJ, Fejerskov O: Chemical and structural challenges in remineralization of dental enamel lesions. *Scand J Dent Res* 97 (1989) 285-296
72. LeGeros RZ: *Monographs in Oral Science Vol. 15: Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*. Karger, Basel, München, Paris (usw.), 1991
73. LeGeros RZ, Kijkowska R, LeGeros JP: Formation and transformation of octacalcium phosphate, OCP: a preliminary report. *Scan Electron Microsc* 4 (1984) 1771-1777
74. Lenz H, Newesely H: Maturation and remineralization of enamel. *Adv Fluor Res Dent Caries Prevent* 3 (1964) 95-98
75. Levine RS: Remineralization of human carious dentine in vitro. *Archs Oral Biol* 17 (1972) 1005-1008
76. Linde A: Dentin matrix proteins: composition and possible function in calcification. *Anat Rec* 224 (1989) 154-166
77. Linde A, Bhowm M, Butler WT: Noncollagenous proteins of dentin. *J Biol Chem* 255 (1980) 5931- 5942
78. Linde A, Lussi A: Mineral induction by polyanionic dentin and bone proteins at physiological ionic conditions. *Connect Tissue Res* 21 (1989) 197-203
79. Linde A, Lussi A, Crenshaw MA: Mineral induction by immobilized polyanionic proteins. *Calcif Tissue Int* 44 (1989) 286-295
80. Löffler G, Petrides PE: *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York (usw.), 1998
81. Lussi A, Linde A: Mineral induction in vivo by dentine proteins. *Caries Res* 27 (1993) 241-248
82. Mechanic GL, Banes AJ, Henmi M, Yamauchi M: Possible collagen structural control of mineralization. In: Butler WT (Ed): *The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*. Ebsco Media, Birmingham, 1985, S. 98-102
83. Meyer JL, Nancollas GH: The effect of pH and temperature on the crystal growth of hydroxyapatite. *Archs Oral Biol* 17 (1972) 1623-1627
84. Miller EJ: Recent information on the chemistry of the collagens. In: Butler WT (Ed): *The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*. Ebsco Media, Birmingham, 1985, S. 80-93
85. Moradian-Oldak J, Bouropoulos N, Wang L, Gharakhanian N: Analysis of self-assembly and apatite binding properties of amelogenin proteins lacking the hydrophil C-terminal. *Matrix Biol* 21 (2002) 197-205
86. Moreno EC, Varughese K, Hay DJ: Effect of human salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium phosphate. *Calcif Tissue Int* 28 (1979) 7-16

87. Nancollas GH, Mohan MS: The growth of hydroxyapatite crystals. *Archs Oral Biol* 15 (1970) 731-745
88. Nancollas GH, Wu W: Biomineralization mechanisms: a kinetics and interfacial energy approach. *J Crystal Growth* 211 (2000) 137-142
89. Nelson DGA, Coote GE, Shariati M, Featherstone JDB: High resolution fluoride profiles of artificial in vitro lesions treated with fluoride dentifrices and mouthrinses during pH cycling conditions. *Caries Res* 26 (1992) 254-262
90. Petzold C, Kolesnik AG, Petzold G: Demineralisationsverhalten, Schmelzpermeabilität und morphologische Besonderheiten in Abhängigkeit vom Durchbruchsstadium permanenter Zähne. *Zahn- Mund- Kieferheilkd* 78 (1990) 211-216
91. Reimer L: Springer series in optical sciences vol. 45: Scanning electron microscopy. Physics of image formation and microanalysis. 2. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York (usw.), 1998
92. Rentsch H, Merte K, Zschau HE, Plier F, Otto G, Vogt J: Fluoride and mineral redeposition in outermost layers of bovine enamel during surface softening. *Caries Res* 24 (1990) 97-100
93. Reynolds EC: Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J Dent Res* 76 (1997) 1587-1595
94. Robinson C, Briggs HD, Kirkham J, Atkinson PJ: Changes in the protein components of rat incisor enamel during tooth development. *Archs Oral Biol* 28 (1983) 993-1000
95. Robinson C, Brookes SJ, Bonass WA, Shore RC, Kirkham J: Enamel maturation. In: Chadwick DJ, Cardew G (Eds): *Ciba Foundation Symposium 205: Dental Enamel*. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Weinheim (usw.), 1997, S. 156-174
96. Robinson C, Kirkham J: Dynamics of amelogenesis as revealed by protein compositional studies. In: Butler WT (Ed): *The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*. Ebsco Media, Birmingham, 1985, S. 248-263
97. Robinson C, Kirkham J, Baverstock AC, Shore RC: A flexible and rapid pH cycling procedure for investigations into the remineralization and demineralization behaviour of human enamel. *Caries Res* 26 (1992) 14-17
98. Robinson C, Kirkham J, Brookes SJ, Shore RC: The role of albumin in developing rodent dental enamel: a possible explanation for white spot hypoplasia. *J Dent Res* 71 (1992) 1270-1274

99. Robinson C, Shore RC, Bonass WA, Brookes SJ, Boteva E, Kirkham J: Identification of human serum albumin in human caries lesions of enamel: the role of putative inhibitors of remineralization. *Caries Res* 32 (1998) 193-199
100. Schiffner U: Der Einfluß von Speichelproteinen auf die Demineralisation von Zahnschmelz: Untersuchungen in einer künstlichen Mundhöhle. Carl Hanser Verlag, München, Wien, 1997
101. Silverstone LM: Remineralisation and enamel caries: significance of fluoride and effect on crystal diameters. In: Leach SA, Edgar WM (Eds): *Demineralisation and Remineralisation of the Teeth*. IRL Press Ltd., Oxford, 1983, S. 185-205
102. Silverstone LM, Wefel JS, Zimmermann BF, Clarkson BH, Featherstone MJ: Remineralization of natural and artificial lesions in human dental enamel in vitro. Effect of calcium concentration of the calcifying fluid. *Caries Res* 15 (1981) 138-157
103. Smith CE: Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med* 9 (1998) 128-161
104. Stiefel A, Binus W: Schmelzreifung und Zahndurchbruch. *Dtsch Stomatol* 41 (1991) 337-340
105. Strawich E, Glimcher MJ: Tooth enamelin identified mainly as serum proteins. Major enamelin is albumin. *Eur J Biochem* 191 (1990) 47-56
106. Taira T, Iijima M, Moriwaki Y, Kuboki Y: A new method for in vitro calcification using acrylamid gel and bovine serum. *Connect Tissue Res* 33 (1995) 185-192
107. Takagi S, Chow LC, Shih S, Sieck BA: Effect of a two-solution fluoride mouth rinse on deposition of loosely bound fluoride on sound root tissue and remineralization of root lesions in vitro. *Caries Res* 31 (1997) 206-211
108. Thomas L: Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 4. Aufl., Die Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg, 1992
109. Tramini P, Pélissier B, Valcarcel J, Bonnet B, Maury L: A raman spectroscopic investigation of dentin and enamel structures modified by lactic acid. *Caries Res* 34 (2000) 233-240
110. Tsuda H, Arends J: Detection and quantification of calcium fluoride using micro-raman-spectroscopy. *Caries Res* 27 (1993) 249-257
111. Tsuda H, Arends J: Raman spectroscopy in dental research: a short review of recent studies. *Adv Dent Res* 11 (1997) 539-547
112. VandenBos T, Bronckers ALJJ, Goldberg HA, Beertsen W: Blood circulation as source for osteopontin in acellular extrinsic fiber cementum and other mineralizing tissues. *J Dent Res* 78 (1999) 1688-1695



113. Veis A: Phosphoprotein of dentin and bone: do they have a role in matrix mineralization? In: Butler WT (Ed): The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues. Ebsco Media, Birmingham, 1985, S. 170-176
114. Warshawsky H: Ultrastructural studies on amelogenesis. In: Butler WT (Ed): The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues. Ebsco Media, Birmingham, 1985, S. 33-45
115. Wen HB, Fincham AG, Moradian-Oldak J: Progressive accretion of amelogenin molecules during Nanosphere assembly revealed by atomic force microscopy. *Matrix Biol* 20 (2001) 387-395
116. Wen HB, Moradian-Oldak J, Fincham AG: Dose-dependent modulation of octacalcium phosphate crystal habit by amelogenins. *J Dent Res* 79 (2000) 1902-1906
117. Wen HB, Moradian-Oldak J, Fincham AG: Modulation of apatite crystal growth on Bioglass<sup>®</sup> by recombinant amelogenin. *Biomaterials* 20 (1999) 1717-1725
118. White DJ: Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries I. Effects on early lesions: F uptake, surface hardening and remineralization. *Caries Res* 21 (1987) 126-140
119. White DJ: Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries II. Effects on subsurface lesions: F uptake, F distribution, surface hardening and remineralization. *Caries Res* 22 (1988) 27-36
120. White DJ, Chen WC, Nancollas GH: Kinetic and physical aspects of enamel remineralization – a constant composition study. *Caries Res* 22 (1988) 11-19
121. Wöltgens JHM, Bervoets TJM, Witjes F, Driessens FCM: Changes in the composition of the enamel of human teeth shortly after eruption. *Archs Oral Biol* 26 (1981) 717-719
122. Zahradnik RT, Moreno EC, Burke EJ: Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. *J Dent Res* 55 (1976) 664-670

## 10. Thesen

1. Die posteruptive Schmelzreifung ist ein Mineralisationsvorgang, der im intraoralen Milieu stattfindet. Sie dauert ungefähr 3-5, teilweise bis zu 8 Jahre nach dem Zahndurchbruch und hat zum Ziel, die im unreifen Zahnschmelz vorhandenen Mikroporositäten und Mikrokanäle zu verschließen.
2. Mit einem pH-cycling-System ist es möglich den intraoral stattfindenden Wechsel zwischen De- und Remineralisation in einem In-vitro-Versuch nachzuvollziehen. Es kann untersucht werden, ob das An- bzw. Auflösen der Kristalle während der Demineralisation und die anschließende Remineralisation zu einer Schmelzverdichtung führt.
3. Während der Schmelzentwicklung steuern von den Ameloblasten abgegebene organische Verbindungen das Kristallwachstum der Kalziumphosphate. Zu ihnen werden in der Literatur Enameline, Amelogenine und Ameloblastin gezählt. Für den Abbau dieser Verbindungen sind Proteinasen wie Enamelysin und die Schmelzmatrix-Serinproteinase 1 verantwortlich.
4. Die Dentinentwicklung ist in wesentlichen Merkmalen unterschiedlich zur Schmelzentstehung. Kollagen übt im Dentin eine Gerüstfunktion aus und ist für die Lenkung des Kristallwachstums verantwortlich. An dieses Kollagennetzwerk sind Phosphoproteine,  $\gamma$ -Carboxyglutamat-Proteine und Proteoglycane elektrostatisch oder kovalent gebunden und forcieren die Mineralbildung.
5. Die größte im menschlichen Blutserum befindliche Proteinfraction stellt das Albumin. Es kann, ähnlich den Amelogeninen, zu einer Reduzierung und damit Steuerung des Kristallwachstums der Kalziumphosphate führen.
6. Ziel der Arbeit war die Untersuchung, ob der Wechsel des pH-Wertes zu einer Reifung der Zahnhartgewebe führt und die Eignung von organischen Verbindungen als Kalzium-Donator bei mineralisierenden Reaktionen zu überprüfen.

7. In einem pH-cycling-Experiment wurden 55 Zähne abwechselnd de- und remineralisierenden Lösungen ausgesetzt. Während der Versuchsdauer von 8 Wochen wurden mehr als 4500 Zyklen mit abwechselndem Säureangriff und nachfolgender Mineraleinlagerung durchlaufen.
8. An 40 Zähnen, gleichmäßig verteilt auf 4 verschiedene Lösungsansätze, kamen in einem zweiten Versuchsabschnitt als Versuchslösungen gepooltes menschliches Blutserum, Natriumfluorid und eine synthetische Kalziumphosphat-Lösung zur Anwendung.
9. Die Bestimmung der Mikrohärtete offenbarte keinen Härtezugewinn an den zuvor unbehandelten Zahnhartgeweben aus dem pH-cycling-Versuch. Hingegen vermochten die Lösungsansätze mit Serum und Serum mit Zusatz von Natriumfluorid die Mikrohärtete der nativen Schmelzproben statistisch signifikant zu steigern.
10. Angesichts der nachgewiesenen Korrelation zwischen Mikrohärtete und Mineralgehalt von Schmelzproben kann in den von organischen Verbindungen dominierten Versuchsgruppen von Mineraleinlagerungen ausgegangen werden, die schlussfolgernd den Schmelz haben reifen lassen. Im pH-cycling-Experiment mit anorganischen Lösungen hat keine Reifung des Schmelzes stattgefunden.
11. Die polarisationsmikroskopische Auswertung der Präparate zeigte, dass sowohl im pH-cycling-Versuch wie auch in den Lösungsansätzen des zweiten Versuchsabschnittes eine mehr oder weniger deutlich ausgeprägte Remineralisation der zuvor erzeugten subfiziellen Schmelz- und Wurzelläsionen stattgefunden hatte. Die Tiefe der artifiziellen Läsionen verringerte sich jedoch nicht signifikant.
12. Veränderungen in den Bindungsverhältnissen der Kalziumphosphate konnten mit Hilfe der Mikro-Raman-Spektroskopie nicht dokumentiert werden. Limitierend auf die Analyse von Zahnhartgeweben wirkt aber die Fluoreszenz, welche die Raman-Spektren überdeckt. Daher erscheint weitere Aufklärung hinsichtlich der Methodik der Mikro-Raman-Spektroskopie an Zahnhartgeweben erforderlich.

## Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Koch  
Vorname: Stephan  
Geburtsdatum/ -ort: 02.09.1976/ Erfurt  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

1983 – 1984 Polytechnische Oberschule in Erfurt  
1984 – 1991 Polytechnische Oberschule in Dähre  
1991 – 1995 „Käthe-Kollwitz-Gymnasium“ in Salzwedel/ Dähre  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Wehrdienst

1995 – 1996 Grundwehrdienst in Hildesheim und Munster

### Hochschulbildung

1996 – 2001 Studium der Zahnmedizin an der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
1997 Naturwissenschaftliche Vorprüfung  
1999 Zahnärztliche Vorprüfung  
2001 Zahnärztliche Prüfung  
2001 Approbation als Zahnarzt

### Berufstätigkeit

Seit 2002 Assistent in der Praxis von Frau Dr. Koch in Dähre

Dähre, den 12.01.2003

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Dähre, den 12.01.2003

Stephan Koch

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher keine Promotionsversuche unternommen habe. Weder diese noch eine andere Dissertation wurde von mir an anderer Stelle zu Promotionszwecken eingereicht.

Dähre, den 12.01.2003

Stephan Koch

## **Danksagung**

Es ist mir ein besonderes Anliegen an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. A. Stiefel und Herrn PD Dr. C. Beyer für die Überlassung des Themas, ihren fachkundigen Rat und die Unterstützung, die sie mir in vielerlei Hinsicht bei der Durchführung der Arbeit jederzeit gewährt haben, zu danken.

Herrn Dr. M. Brandt möchte ich danken für die Einweisung und technische Hilfe am pH-cycling-Gerät und die Beratung bei der Ausarbeitung der Methodik.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-R. Höche für die Möglichkeit, im Interdisziplinären Zentrum für Materialwissenschaften der Martin-Luther-Universität die Raman-Analysen und Untersuchungen am ESEM durchführen zu dürfen, sowie Herrn Dr. F. Heyroth und Herrn S. Bohmann für die Unterstützung und Hilfestellung bei der Durchführung.

Bei Herrn Dipl.-Ing. H. Mähl bedanke ich mich für die hervorragende technische Betreuung während der Arbeiten am Rasterelektronenmikroskop.

Ganz herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. J. Haerting für die Hilfe bei der statistischen Bearbeitung des Materials.