

**Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der
Universität Würzburg**

Direktor: Prof. Dr. med. dent. B. Klaiber

**Vergleichende experimentelle und klinische Untersuchungen
über den Einfluss einer calciumhaltigen Salzhydratschmelze
in Fruchtgummis auf die Remineralisation von porösem,
künstlichem Zahnschmelz**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Julia Staebler
aus Rothenburg ob der Tauber**

Würzburg, Oktober 2008

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. dent. W. Wiedemann Zahnerhaltung
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Th. Holste Zahnheilkunde, insbes.
Zahnärztliche Prothetik
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06.03.2009

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Meiner lieben Oma Christa Holzammer († 18.09.2008)

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| 1. EINLEITUNG | 3 |
| 1.1. Das Prinzip der forcierten dynamischen Remineralisation | 7 |
| 1.2. Die Salzhydratschmelze | 10 |
| 2. IN-VITRO UNTERSUCHUNGEN ZUR REMINERALISATION MIT CALCIUMHALTIGER FRUCHTGUMMIMASSE | 12 |
| 2.1. Material | 12 |
| 2.1.1. Die Produkte | 12 |
| 2.1.2. Künstlicher Speichel und Fruchtgummilösung | 12 |
| 2.1.3. Die Proben | 13 |
| 2.1.4. Behandlung der Proben vor der Messung | 14 |
| 2.2. Methodik | 14 |
| 2.2.1. Versuchsablauf der Online-Messung der De- und Remineralisation | 14 |
| 2.2.2. Bestimmung des Mineralgehaltes..... | 15 |
| 2.2.2.1. Physikalischer Hintergrund | 16 |
| 2.2.2.2. Beschreibung der Schaltung..... | 17 |
| 2.2.2.3. Reproduzierbarkeit der Messungen | 18 |
| 2.2.2.4. Genauigkeit | 19 |
| 2.2.3. Zeitliches Messprotokoll..... | 19 |
| 2.3. Messergebnisse | 20 |
| 2.3.1. Allgemeine Beschreibung der Messkurven | 20 |
| 2.3.1.1. Die Achsen | 20 |
| 2.3.1.2. Bedeutung der einzelnen Kurvenabschnitte | 22 |
| 2.3.2. Vergleich der Massenbilanzen von Placebo- und Verum-Fruchtgummi | 22 |
| 2.3.2.1. Einfluss des Zeitregimes auf die Mineralbilanz..... | 24 |
| 2.3.2.2. Einfluss der Zusammensetzung der Fruchtgummimasse auf die Mineralbilanz | 25 |
| 2.3.3. Auswertung der Ergebnisse..... | 26 |

| | |
|--|-----------|
| 3. IN-SITU UNTERSUCHUNGEN ZUR REMINERALISATION MIT CALCIUMHALTIGER FRUCHTGUMMIMASSE | 28 |
| 3.1. Material | 28 |
| 3.1.1. Produkte..... | 28 |
| 3.1.2. Probanden | 28 |
| 3.1.3. Die Proben | 29 |
| 3.1.4. Behandlung der Proben vor den Messungen | 30 |
| 3.1.5. Applikationsgerät für die Proben..... | 30 |
| 3.2. Methodik..... | 31 |
| 3.2.1. Versuchsablauf | 31 |
| 3.2.2. Instruktion der Probanden..... | 33 |
| 3.2.3. Versuchsplan | 34 |
| 3.2.4. Messung der Mineralzunahme | 34 |
| 3.2.4.1. Gewichtsbestimmung..... | 34 |
| 3.2.4.2. Radiographische Bestimmung der Mineralzunahme | 35 |
| 3.3. Ergebnisse | 36 |
| 3.3.1. Die statistische Analyse des in-situ Experimentes | 41 |
| 3.3.2. Allgemeine Beschreibung der Messkurven | 41 |
| 3.3.2.1. Die Achsen | 41 |
| 3.3.2.2. Bedeutung der Kurven | 42 |
| 3.3.3. Vergleich der Massenbilanzen von Placebo- und Verum-Fruchtgummimasse..... | 42 |
| 3.3.4. Auswertung der Ergebnisse..... | 44 |
| 4. DISKUSSION | 46 |
| 5. LITERATURVERZEICHNIS | 54 |
| 6. ZUSAMMENFASSUNG | 61 |

1. Einleitung

Bis heute gilt die Anwendung von Fluoriden als Prophylaxemethode der Wahl, da andere Möglichkeiten wie Mundhygiene oder Ernährungslenkung zumeist wegen der Nachlässigkeit der Menschen scheitern [60, 41, 46, 62].

Dennoch sind Fluoride nur bedingt für die Gesunderhaltung der Zähne brauchbar. In Perioden, in denen der Zahnschmelz durch die von den Mikroorganismen in der Mundhöhle produzierten Säuren entkalkt wird, bilden sich an seiner Oberfläche kleine Poren. Aus diesen wandern die Kalksalze aus der Tiefe des Schmelzes in den Zahnbelag und anschließend in die Mundhöhle. Zurück bleiben folglich tiefe Poren, in denen die Mineralien Calcium und Phosphat fehlen. Wird diese Entkalkung nicht gestoppt, brechen diese Poren dann später bei der eigentlichen Kariesbildung ein [40].

Die Ausformung einer kariösen Läsion ist eng mit der Struktur des Schmelzes sowie mit der speziellen Chemie der Orthophosphate verknüpft. Hierbei spielen insbesondere der Pufferübergang $\text{H}_2\text{PO}_4^- \rightleftharpoons \text{HPO}_4^{2-}$ und die starke pH-Wert-Abhängigkeit der Sättigungskonzentrationen der Calciumphosphate eine Rolle [40]. Die Eigenheiten des Kariesprozesses sowie seiner Umkehrung, der Remineralisation, sind durch das spezielle Ineinandergreifen der physikalischen Prozesse Diffusion und Stoffabscheidung (Kristallwachstum) bedingt [22].

Schon ein sehr einfaches Modell kann die wesentlichen Eigenheiten des Kariesprozesses und die Schwierigkeiten seiner Umkehrung klar machen:

Materielle Voraussetzung für die Ausbildung einer Kariesläsion ist ein poröses oder ein porös korrodierendes Calciumphosphat. Zahnschmelz erfüllt infolge seiner Einschlüsse aus organischem, hydrophilem Material diese Voraussetzung. Bei einer Absenkung des pH-Wertes im Außenmedium dringen die H^+ -Ionen aufgrund des Konzentrationsgradienten in diese Poren ein. Nach experimentellen Ergebnissen ist es berechtigt, sich die Poren als mit wässriger Lösung gefüllt vorzustellen [15]. Die H^+ -Ionen sind in wässrigem Medium an Wassermoleküle gebunden und könne ohne echte Wanderung des ursprünglichen Teilchens über die durch Wasserstoffbrücken

verzahnten Wassermoleküle durch Umorientierung der Bindung über eine lange Kette „weitergereicht“ werden. Daher ist ihr Vordringen sehr schnell. Sie werden nur gebremst durch die Forderung nach Ladungsneutralität im Medium.

Letztere Bedingung verlangt ein Wandern von anderen Ionen. Anionen werden mitgezogen, Kationen werden durch die zusätzliche elektrostatische Kraft im Diffusionsfeld aus den Poren des Festkörpers heraus forciert; insbesondere werden also die Calciumionen zum schnelleren Verlassen des Schmelzes veranlasst. Die Konzentration an freiem H^+ , also der pH-Wert, wird sich in der Porenflüssigkeit aufgrund der Pufferwirkung des Phosphats, das dort und an der Porenwand vorhanden ist, nur wenig verschieben. Thermodynamisches Gleichgewicht bezüglich der chemischen Reaktion vorausgesetzt, dürfte sich der pH-Wert in den Poren von $pH = 7$ nur wenig unterscheiden. Unendliche Reaktionsgeschwindigkeit für die Auflösung der Porenwände vorausgesetzt, wäre die Eindringtiefe für die H^+ -Ionen gleich Null. Damit bleibt ein großer Konzentrationsgradient für H^+ -Ionen an der Oberfläche über lange Zeit erhalten. Er führt zu einem kontinuierlichen Mineralverlust [7].

Das spezielle Ineinandergreifen der chemischen Stoffumsetzungen in die Diffusionsvorgänge führt zu einem besonderen histologischen Erscheinungsbild der initialen Karies, der Subsurface-Läsion [40]. Beginnend mit einer Demineralisierung der Oberfläche lagert sich im weiteren Verlauf des Kariesprozesses ein Teil des ausströmenden Minerals wieder in der Oberfläche ab [56]. Zusätzlich helfen die natürlicherweise im Speichel im Überfluss vorhandenen Calcium- und Phosphationen, solche Poren nahe des Neutralpunktes sehr schnell wieder zu verschließen. Tiefer gelegene Schmelzschichten bleiben dabei aber mineralarm, sodass bei der Initialläsion die Zone des größten Mineralsverlusts im Inneren des Schmelzes stets durch die besser mineralisierte Oberfläche des Zahnes, die sog. Deckschicht, vom Milieu der Mundhöhle getrennt ist. Die direkte, formale Umkehrung des Kariesprozesses macht die Schwierigkeiten, die bei der Remineralisation von Initialkaries auftreten, augenfällig [57].

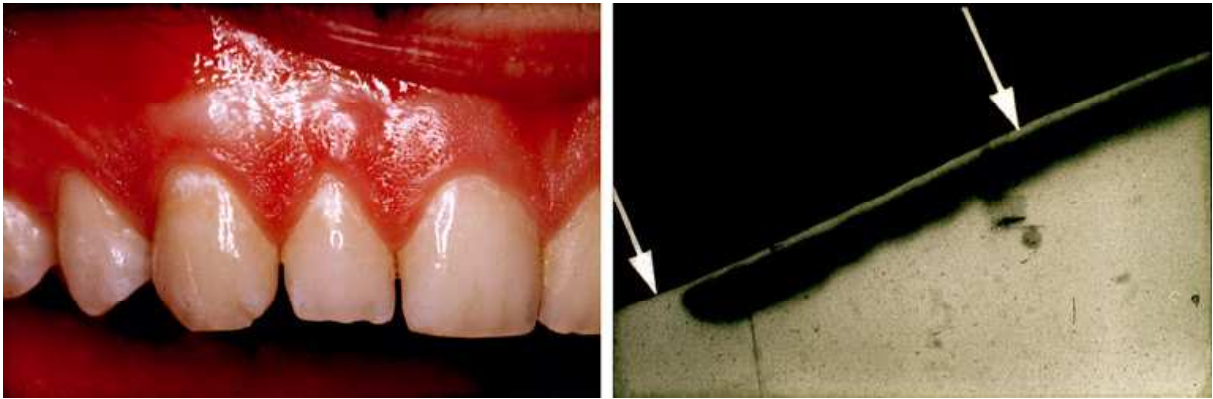


Abb. 1: Initialkaries (sog. weißer Fleck) als Ausdruck der porösen Zahnoberfläche oberhalb einer demineralisierten Schmelzschicht. Rechts eine Röntgenaufnahme der scheinbar intakten Oberfläche und der Zone des Mineralverlustes. Die Pfeile weisen auf die sog. Deckschicht hin.

Wenn, pauschal formuliert, für die Randbedingungen im Außenmedium bei der Demineralisation gilt:

1. niedrige Mineralkonzentration,
2. hohe H^+ -Konzentration, also niedriger pH-Wert ,

erhält man als deren formale Umkehrung als Randbedingungen im Außenmedium für die optimale Remineralisation:

1. hohe Mineralkonzentration und
2. niedrige H^+ -Konzentration, also hoher pH-Wert.

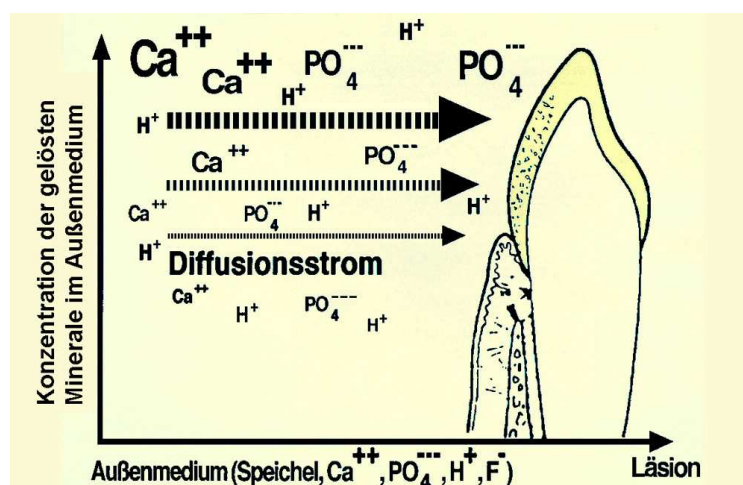


Abb. 2: Theoretische optimale Randbedingungen für eine Remineralisation: hohe Mineralkonzentration und niedrige Wasserstoffionen-Konzentration. Nur zu erreichen durch übersättigte Lösungen (s. Text).

Die beiden Forderungen für die Remineralisation schließen sich aber aus; bei hohem pH-Wert kann also nur wenig Mineral in Lösung gehalten werden. Nimmt man im Inneren der Poren thermodynamisches Gleichgewicht an, so erwartet man dort $\text{pH} = 7$ und eine Lösung, die Sättigung bezüglich des Mineralsubstrats aufweist [63]. Die Forderung der direkten Umkehrung der Demineralisation ergibt also: mehr Mineral und höherer pH-Wert im Außenmedium. Das bedeutet stark übersättigte Lösung. Da die Abscheidungsrate proportional zur Übersättigung der Lösung ist [19], muss mit einer vermehrten Mineralabscheidung an der Oberfläche gerechnet werden, da die Konzentration entlang des Konzentrationsgradienten in Richtung auf das Innere der Läsion hin abnimmt. Aufgrund dieses Sachverhaltes wird bei vielen Remineralisationsexperimenten in übersättigten Lösungen nur ein Deckschichtverschluss beobachtet.

Bei der eben angestellten Betrachtung wurde nicht berücksichtigt, dass die verschiedenen Calciumphosphate unterschiedliche Löslichkeitsprodukte besitzen. Diese Gegebenheit ließe sich ausnutzen, um einen Mineraleinbau auch bei stationären Bedingungen im Außenmedium zu erreichen. Da aber eine effektive Remineralisation, wie soeben ausgeführt wurde, in quasistationären Zuständen (Gleichgewichtssystemen) nicht möglich ist, muss hierzu deshalb auf nichtstationäre, also zeitlich veränderliche Außenbedingungen zurückgegriffen werden, wie es Almqvist et al. bereits gefordert hatten [2].

Der Verzehr von Fruchtgummi führt grundsätzlich zu zeitlich veränderlichen Außenbedingungen. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob ein handelsübliches Fruchtgummiprodukt, das mit einer neuartigen, an Calcium hochkonzentrierten Salzhydratschmelze angereichert wurde, nicht nur die Demineralisation von Zahnschmelz hemmt, sondern sogar eine remineralisierende Wirkung aufweist. Dies wurde vergleichend in-vitro und in-situ untersucht. Verglichen wurden je ein handelsübliches zuckerhaltiges Fruchtgummiprodukt mit bzw. ohne Zusatz der zu testenden calciumhaltigen Salzhydratschmelze sowie je ein zuckerreduziertes Fruchtgummiprodukt mit bzw. ebenfalls ohne Zusatz der zu testenden Schmelze.

1.1. Das Prinzip der forcierten dynamischen Remineralisation

Eine remineralisierende Wirkung der an Calciumionen hochkonzentrierten Salzhydratschmelze wurde erwartet, da diese aufgrund des hohen Gehaltes an freien Calciumionen nach dem Prinzip der forcierten dynamischen Remineralisation arbeiten müsste. Diese unterscheidet sich grundlegend von der remineralisationsfördernden Wirkung von Fluorionen. Die wesentlichen Überlegungen zur forcierten dynamischen Remineralisation seien im Folgenden kurz skizziert.

Bei der Remineralisation mit zeitlich veränderlichem Außenmedium darf das System nicht ins chemische Gleichgewicht kommen, es muss stetig zyklisch dynamisch verändert werden [61].

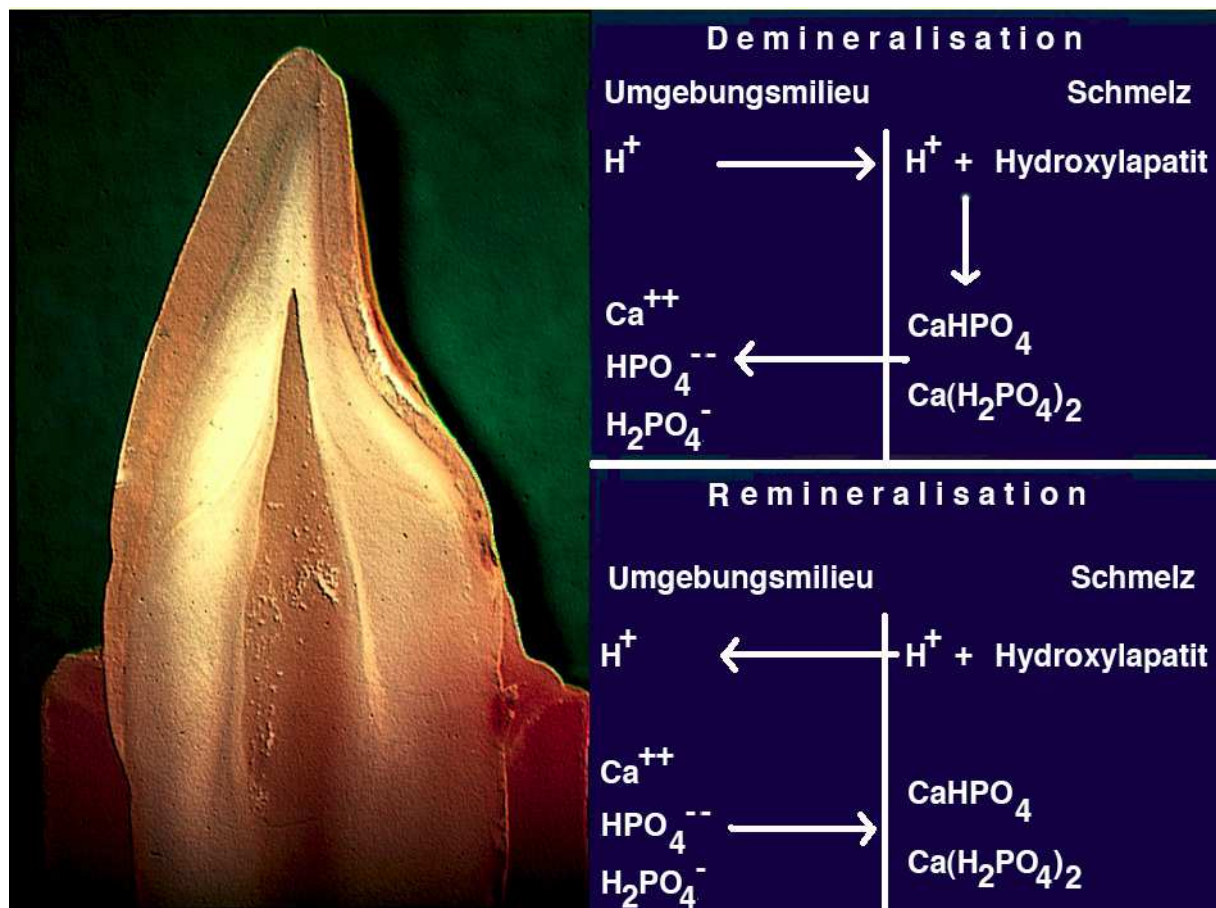


Abb. 3: Prinzip der chemischen Vorgänge bei der De- und Remineralisation von Zahnschmelz.

Durch ein Absenken des pH-Wertes in der Remineralisationslösung kann in dieser die Konzentration an Mineral um ein Vielfaches erhöht werden, ohne dass die Sättigungsgrenze wesentlich überschritten wird [11, 40].

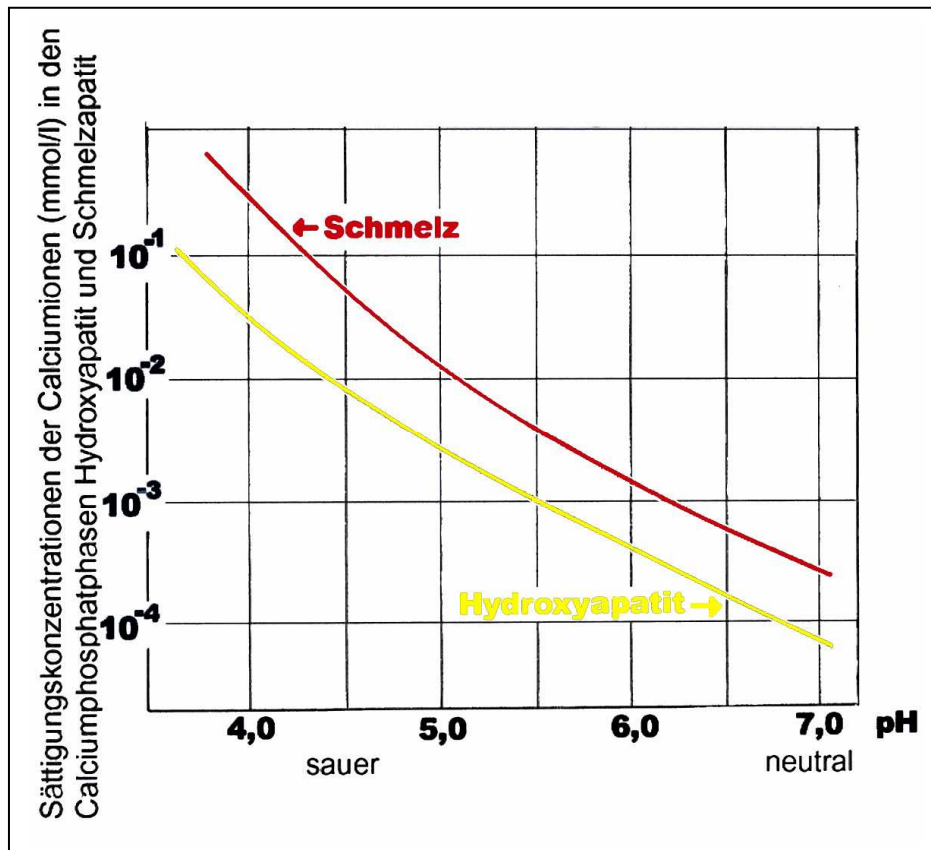


Abb. 4 [40]: Calcium-Löslichkeitsisothermen. Beim pH-Wert 4,5 lassen sich aus HAP ca. 100mal mehr Calcium- und Phosphationen lösen als beim pH-Wert 6,8 ($C_{\text{HAP}} 10^{-2}$ gegenüber 10^{-4}).

Dadurch wird am Zahn ein saures, an Mineral gesättigtes Umgebungsmilieu erzeugt. Die H^+ -Ionen diffundieren, wie bereits erwähnt wurde, schneller als alle anderen Komponenten in die Poren des Schmelzes. Eine solche Remineralisationslösung kann den porösen, entkalkten Zahnschmelz gleichsam wie einen Schwamm durchtränken und eine große Menge gelösten Minerals in alle Bereiche der Läsion, also auch in die tiefer gelegenen Schichten, transportieren.

Die H^+ -Ionen werden zum Teil durch das gelöste Phosphat weggepuffert, senken aber, wenn das Puffervermögen der Lösung erschöpft ist, den pH-Wert ab und ermöglichen so, eine höhere Konzentration an Mineral in Lösung zu halten. Diese höhere Konzentration an Mineral wird zu einem Teil durch Diffusion, zum anderen Teil durch Auflösen der Wände erreicht [14].

Nach dem Sättigungsausgleich während der sauren Phase folgt der zweite Schritt, die Mineralabscheidung. Hierzu wird im Außenmedium der pH-Wert erhöht, bei gleichzeitiger automatischer Reduktion des Mineralgehalts auf Werte unterhalb der Sättigung. Aufgrund des Konzentrationsgradienten für Protonen vom Inneren der Läsion nach außen strömen diese aus den Poren der Läsion in das Außenmedium. Das Wandern der positiven Ladungsträger von der Läsion ins Remineralisationsmedium hat den umgekehrten Effekt wie bei der im ersten Abschnitt beschriebenen Demineralisation zur Folge: Es bringt zusätzliche Kationen, u. a. die gewünschten Calciumionen in die Läsion und führt zu einer Abnahme der Konzentration an Säureresten, u. a. Phosphat. Mit abnehmender Mineralkonzentration im Außenmedium kommt es zu einem Konzentrationsausgleich an Mineral zwischen Innen- und Außenmedium. Dabei wird sich in Abhängigkeit von der Änderungsrate des pH-Wertes im Außenmedium und des Sättigungsgrades in bestimmter Tiefe der Läsion eine Zone mit maximaler Mineralabscheidung ausbilden [16].

Die Effektivität des Verfahrens der forcierten dynamischen Remineralisation ist durch ein optimales, zeitliches Konzentrationsprofil der Lösungskomponenten festgelegt. Seine Form wird durch die lokalen Auflösungs- und Abscheidungsraten der mineralischen Komponenten während des Durchlaufes des Zyklus bestimmt [8,18, 36, 38].

Nach Verzehr des Mediums „gelöster Fruchtgummi“, der mit einer an reagiblen Calciumionen hochkonzentrierten Salzhydratschmelze angereichert ist, steigt durch die Speichelclearance der pH-Wert im Umgebungsmilieu des Zahnes an, gleichzeitig sinkt die Konzentration an freien reagiblen Ionen drastisch ab. Dadurch baut sich ein Konzentrationsgradient zwischen der Läsion und dem Außenmedium des Zahnes auf. Folglich diffundieren aus dem porösen Schmelzbereich sowohl Protonen als auch ein Teil des während der Applikation der Spüllösung eingeschleusten Minerals in die Mundhöhle zurück. Wegen der sehr großen Beweglichkeit der H^+ -Ionen und des nichtlinearen Zusammenhangs zwischen Diffusionszeit und -strecke verarmt der oberflächennahe Bereich schneller an Mineral als die tiefer gelegenen Schichten. Darin ist das Mineral nach Abzug der H^+ -Ionen gefangen und wird zum Niederschlag an den Porenwänden gezwungen (forcierte Remineralisation). Auf diese Weise

werden durch das zeitliche Konzentrationsprofil, das durch die Applikation vorgegeben ist, sowohl der Ort als auch die Menge des Mineraleinbaus beeinflusst.

1.2. Die Salzhydratschmelze

Zentrales Thema der vorliegenden Studie war festzustellen, ob sich die grundlegenden Erkenntnisse zum Thema „forcierte Remineralisation von Zahnschmelz“ in vitro bestätigen lassen und ggf. in vivo in Süßigkeiten, z. B. Fruchtgummiprodukten umgesetzt werden können.

Zu diesem Zweck musste der Süßware eine ausreichende Menge an Calciumsalz zugesetzt werden. Die Konzentration von erstrebenswerten 200 mmol/kg Calcium in dem Fruchtgummi konnte durch eine bislang in diesem Zusammenhang nicht beschriebene anorganische Salzhydratschmelze erreicht werden. Diese unterscheidet sich grundlegend von herkömmlichen Salzen bzw. Salzhydraten [20].

Der Begriff amorphe Salzhydratschmelze bezeichnet nach Peters [52] die flüssige Schmelze eines bei Raumtemperatur festen, kristallinen Salzhydrates. Es handelt sich dabei um die geschmolzene Mischung eines bestimmten Salz-Wasser-Verhältnisses, die auch als unterkühlte Schmelze glasartig und damit nicht kristallin existieren kann. Wegen ihrer besonderen Eigenschaften bilden diese Salzhydratschmelzen innerhalb der Salz-Wasser-Systeme mit steigender Salzkonzentration eine eigenständige Stoffklasse [23]. Die wesentlichen Unterschiede zwischen Salzhydratschmelzen und üblicherweise verwendeten Salzen bzw. Salzhydraten sind hierin zu sehen:

- Salze sind kristallin (d.h. ihre Ionen sind im Gitter „gebunden“ und nicht reagibel)
- Erstarrte Salzhydratschmelzen sind nicht kristallin, sondern amorph (d. h. ihre Ionen sind nicht im Ionengitter „gebunden“, sondern frei)
- Salze sind somit weniger leicht löslich und damit schlechter homogen zu verteilen als Salzhydratschmelzen
- Salzhydratschmelzen sind hochkonzentriert und im Vergleich zu Salzlösungen wasserarm, was bei der Herstellung von Lebensmitteln von großer Bedeutung sein kann.

Die Zugabe von Calcium zur Fruchtgummimasse erfolgte deshalb nicht als kristallines Salz, sondern in Form einer speziell zusammengesetzten amorphen Salzhydratschmelze. Diese Schmelze kann Lebensmitteln entweder bei erhöhter Temperatur direkt als nichtkristalline aufgeschmolzene Flüssigkeit oder bei Raumtemperatur als glasartige erstarrte, ebenfalls nicht kristalline unterkühlte Schmelze zugegeben werden.

Der besondere Vorteil der verwendeten Salzhydratschmelze liegt darin, dass sie sich in der Lebensmittelzubereitung auch in hoher Konzentration leicht löslich homogen vermischt, ohne Ausbildung kristalliner Aggregate. Sie unterscheidet sich damit grundlegend von den üblicherweise zugegebenen Salzen, Salzhydraten bzw. deren Lösungen, deren Kristalle in höher konzentrierten Lösungen als Impfkristalle für ein vorzeitiges unerwünschtes Ausfällen weiterer Kristalle dienen können.

Diese Eigenschaften der Salzhydratschmelzen ermöglichten in den im Folgenden dargestellten Testreihen in besonderer Weise die Remineralisation von Zahnschmelz, da darin dessen wesentlicher Baustein, das Calcium, in einer hohen Konzentration enthalten war.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es vergleichend in-vitro und in-situ zu untersuchen, welchen Einfluss eine calciumhaltige Salzhydratschmelze, die einem herkömmlichen, gelatinehaltigen Fruchtgummi zugefügt worden war, auf die Remineralisation von Zahnschmelz nimmt.

2. In-vitro Untersuchungen zur Remineralisation mit calciumhaltiger Fruchtgummimasse

Der Mineralisationseffekt von Fruchtgummi-Schmelze-Mischungen wurde zunächst in-vitro an Proben von künstlichem, porösem Hydroxylapatit untersucht. Dieser verhält sich wie echter, poröser Zahnschmelz [4, 48, 53]. Die Mineralbilanz der Proben wurde nach Diskussion gängiger Methoden [5] mikroradiographisch (vgl. 2.2.1.f) online mit Hilfe der Absorption von Röntgenstrahlen bestimmt.

2.1. Material

2.1.1. Die Produkte

In dieser Testreihe wurde die Wirkung von Produkten mit folgender Zusammensetzung untersucht:

1. Fruchtgummi P: mit den wesentlichen Bestandteilen Glukosesirup, Zucker, Gelatine, natürlichem Aroma, Frucht und Pflanzenextrakten, Feuchthalte- und Säuerungsmitteln, (im Folgenden als **P (Placebo)** bezeichnet)

2. Fruchtgummi V: die gleichen Fruchtgummiprodukte (im Folgenden als **V (Verum)** bezeichnet), angereichert mit 200 mmol Calcium/kg. Die Calciumionen wurden in einer Salzhydratschmelze zugeführt, die 2,57 mol Calcium/kg enthielt

2.1.2. Künstlicher Speichel und Fruchtgummilösung

Als künstlicher Speichel diente bei diesem Versuch eine REM-Lösung mit 1 mmol Ca^{++} und 1 mmol PO_4^{3-} .

Um 1 l dieses künstlichen Speichels herzustellen wurden 5 ml 200 mmolare NaH_2PO_4 mit einem Molekulargewicht von 137,99 g/mol, in einen 1 l Kolben pipettiert.

Anschließend wurden 0,3084 g Ca-Lactat und 3,92 g kristallwasserfreies Na-Acetat mit Milchsäure bei 30°C auf einen pH von 6,5 eingestellt. Mit aqua bidest. wurde die Vorlage zu einem Volumen von 1 l aufgefüllt.

Anschließend konnte der Lösung bei Bedarf noch 2 g Thymol für längere Haltbarkeit beigemischt werden.

Zur Herstellung der Fruchtgummilösung wurden 65 g Fruchtgummi zerkleinert und mit 97,5 g REM-Lösung in einem 250 ml Becherglas mit einem Magnetrührer im Wasserbad zum Schmelzen gebracht.

2.1.3. Die Proben

Als Proben für den Mineraleinbau wurden künstlich hergestellte poröse Keramikkörper aus Hydroxylapatit verwendet. Ausgangsmaterial für diese stellte ein käufliches Hydroxylapatit-Pulver der Firma Budenheim Typ C13-08 dar. Je 145 mg dieses Pulvers wurden axial bei 2200 kp/cm^2 zu zylindrischen Grünkörpern von 8 mm Durchmesser gepresst. Die Grünkörperdichte betrug $1,45 \text{ g/cm}^3$. Anschließend wurden die Grünkörper innerhalb von 90 min auf 900°C aufgeheizt. Die Temperatur wurde 1 Stunde aufrechterhalten. Die Abkühlphase betrug 24 Stunden. Die fertigen Proben hatten eine Dichte von $1,65 \text{ g/cm}^3$ mit einer Streuung von $\pm 0,02 \text{ g/cm}^3$, d.h. die Dichte von mehr als 2/3 der Proben unterschied sich um weniger als 1% vom Sollwert. Die Porosität betrug 40%.



Abb. 5: Künstlicher schmelzähnlicher Hydroxylapatit als Probenkörper für standardisierte Untersuchungen über De- und Remineralisation von Zahnschmelz. Der Probenkörper ist nicht nur äußerlich mit dem Zahnschmelz vergleichbar, sondern auch in seinen wesentlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften [53].

2.1.4. Behandlung der Proben vor der Messung

Eine Seite der Probenkörper wurde nass auf Siliziumkarbid-Papier (600 grid) geschliffen, bis die Proben eine Dicke von 0,8 mm erhielten. Anschließend wurden sie in destilliertem Wasser 15 min gewässert und danach mit fluoridfreier Zahnpasta beidseitig je 15 sec mit einer weichen Zahnbürste gereinigt, um in den Poren eventuell vorhandene schnell- und leichtlösliche Anteile sowie den Schleifstaub zu entfernen. Nach dieser Zeit änderte sich das Gewicht auch bei längerer Behandlung mit destilliertem Wasser nicht mehr wesentlich. Rückseite und Rand des Probenkörpers wurden mit Nagellack lackiert, um Einwirkungen der Remineralisationslösung auf die Oberseite der Tablette zu beschränken, und bei Raumluft getrocknet. Um die Proben zu identifizieren, wurden sie mit einem schwarzen Filzstift auf der Mantelfläche der zylindrischen Probe durchnummeriert.

2.2. Methodik

2.2.1. Versuchsablauf der Online-Messung der De- und Remineralisation

Im Folgenden sind die wesentlichen Arbeitsschritte für eine Online-Messung skizziert:

Nach der Präparation wurden die Proben zunächst in destilliertem Wasser eluiert. Nach Abspülen und Trocknen wurden sie direkt vor Versuchsbeginn in eine kleine Menge frisch angesetzter Remineralisationslösung eingebracht und im Exsikkator einem Unterdruck ausgesetzt, um die in den Poren eingeschlossene Luft zu entfernen. Anschließend wurde die nasse Probe in die geöffnete Mikroküvette montiert, die einen Durchmesser von 10 mm und eine Höhe von 3 mm aufwies.

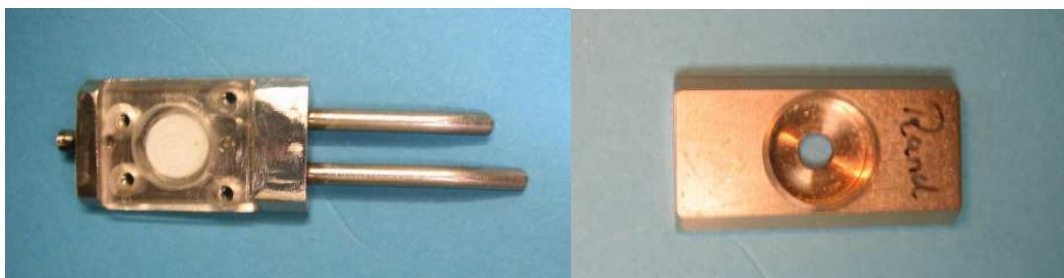


Abb. 6: Links eine Mikroküvette für Online-Messungen der De- und Remineralisation mit Zu- und Ableitungsröhrchen sowie Plexiglasabdeckung und einer eingelegten Apatittablette.

2. In-vitro Untersuchungen zur Remineralisation mit calciumhaltiger Fruchtgummimasse

Rechts eine Mikroküvette ohne eingelegte Probe. Der Messstrahl geht durch die kreisrunde Öffnung direkt durch die Mitte der Tablette.

Ein- und Austrittsfenster der Küvette bestehen aus ca. 0,2 mm dicken Plexiglasscheiben. Die Küvette und die Zuleitungsschläuche waren vorher sorgfältig mit Mineralisationslösung durchspült worden, sodass sich im System keine Luftblasen mehr befanden. Auch beim Schließen der Küvette wurde sorgfältig darauf geachtet, dass keine Luftblasen in das Küvettenvolumen eingeschlossen wurden. Die Probe in der Küvette (Absorber im Messstrahl) sowie ein Referenzkörper aus Aluminium mit annähernd gleicher Extinktion (Absorber im Referenzstrahl) wurden in einen Röntgenstrahl (Bremspektrum einer W-Röhre mit 17 kV Anodenspannung) gebracht. Die durchgelassene Strahlung wurde mit zwei Photodioden alle 2 min gemessen und die Messwerte wurden festgehalten und graphisch dargestellt. Die Mineralzunahme konnte so direkt auf dem Monitor verfolgt werden, wodurch Störungen, z. B. durch mikroskopisch feine Gasbläschen, sofort zu erkennen waren. Traten solche Störungen auf, so war die Messung nutzlos und wurde sofort abgebrochen. Nach Ablauf von 3 Stunden wurde die Messung gestoppt, die Probe entnommen, sorgfältig abgespült und ihre Oberfläche unter der Stereolupe auf Erosionen oder Auflagerungen untersucht.

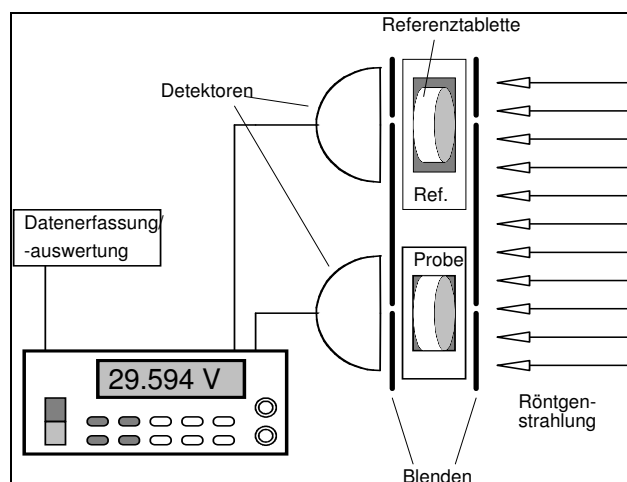


Abb. 7: Messapparatur (schematisch) für Radiographie

2.2.2. Bestimmung des Mineralgehaltes

Die Massenbelegung der Proben wurde mittels Röntgenradiographie bestimmt [35, 37]. Die Messmethode ist im Folgenden detailliert dargestellt. Hieraus konnte man errechnen, dass die Auflösung der radiographischen Methode besser als $6,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ist. Sie beträgt bei Zugrundelegen des in der gesamten Studie gewählten Umrechnungsfaktors 0,08 mg. Damit liegt die Genauigkeit der Methode deutlich über den zu erwartenden Effekten. Die Reproduzierbarkeit ergab sich aus Messungen einer Dummyprobe.

2.2.2.1. Physikalischer Hintergrund

Für die physikalische Untersuchung von Remineralisationsänderungen in Hydroxylapatitproben stand eine für Röntgenabsorptionsmessungen geeignete Apparatur zur Verfügung.

Der Messmethode liegt das Absorptionsgesetz $I = I_* \cdot e^{-\mu d}$ zugrunde. Die zu untersuchende Probe wird in den Strahlengang einer Röntgenquelle mit der Intensität I_* gebracht und die durch den Absorber der Dicke d abgeschwächte Intensität I gemessen.

Um netz- oder gerätebedingte Intensitätsschwankungen der Röntgenstrahlung zu eliminieren, wurde eine Zweistrahltechnik verwendet, d.h. der Primärstrahl wird in zwei Teilstrahlen aufgetrennt, wobei einer die Probe, der andere einen Referenzkörper durchdringt. Als Referenzkörper wurde eine während der gesamten Studie nicht manipulierte Hydroxylapatit-Tablette verwendet. Durch diese Maßnahme konnten Intensitätsschwankungen der Primärstrahlung rechnerisch eliminiert werden. Mit $I_R = I_* \cdot e^{-\mu_R d_R}$ als Intensität der Röntgenstrahlung an der Referenzmessstelle erhält man als Verhältnis zwischen Mess- und Referenzstrahlintensität einen Ausdruck, der die Primärintensität I_* nicht mehr enthält:

$$\frac{I}{I_R} = \frac{I_* \cdot e^{-\mu d}}{I_* \cdot e^{-\mu_R d_R}} = \frac{e^{-\mu d}}{e^{-\mu_R d_R}} = e^{\mu_R d_R - \mu d}.$$

Der natürliche Logarithmus des obigen Quotienten ist ein direktes Maß für die Änderung der effektiven Absorberdicke:

$$\ln\left(\frac{I}{I_R}\right) = \mu_R \cdot d_R - \mu \cdot d.$$

Die messtechnische Realisierung gestaltete sich nicht so leicht, wie die Darstellung der physikalischen Zusammenhänge, da der zu untersuchende Effekt nur einige μV Signal lieferte und wegen verschiedener Störeinflüsse nahe an der Nachweisgrenze lag. Diesem Sachverhalt hätte man durch Erhöhen der Intensität oder durch Erhöhen der Röntgenstrahlenergie entgegenwirken können; jedoch sinkt die Fähigkeit eines Materials, Röntgenstrahlen zu absorbieren mit kleiner werdender Wellenlänge (steigender Energie) drastisch ab gemäß der Beziehung $\mu \propto \lambda^3$. Die mess- und schaltungstechnischen Schwierigkeiten ließen sich jedoch durch Auswahl geeigneter, qualitativ hochwertiger Komponenten in den Griff bekommen.

2.2.2.2. Beschreibung der Schaltung

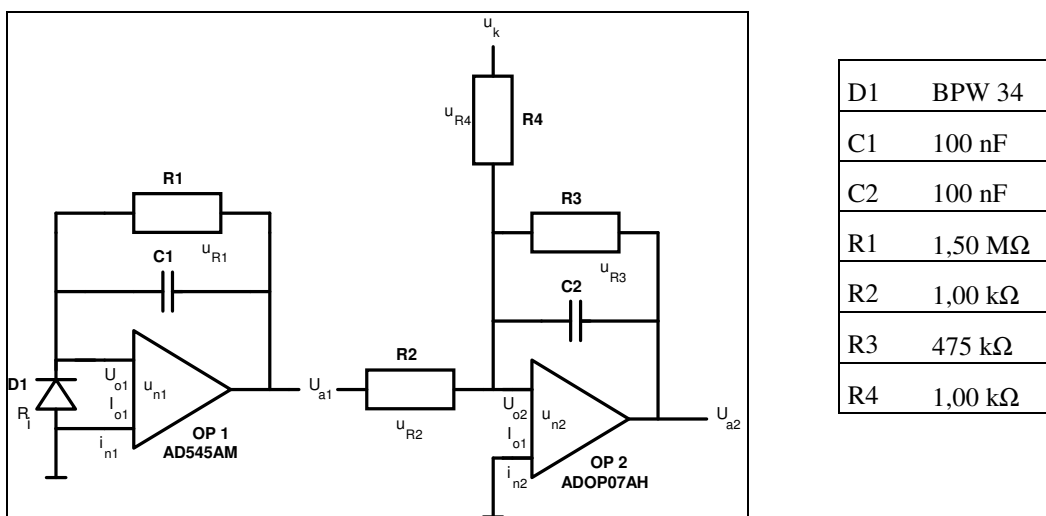


Abb. 8: Schaltung zur Messung des Mineralgehaltes mit Hilfe von Röntgenabsorption

OP1 mit der Beschaltung R1, C1 wirkt als Strom/Spannungswandler für den von der Photodiode D1 gelieferten Photostrom. Mit R2 wird dieses Signal an den nachfolgenden Verstärker OP2 angekoppelt. Die Beschaltung von OP2 stellt einen Analogaddierer dar; durch Einspeisung einer von einer Konstantspannungsquelle gelieferten einstellbaren Spannung U_k lässt sich nicht nur der Offset U_{o2} von OP2 sondern auch der verstärkte Offset von OP1 kompensieren. Weiterhin ist eine

Verschiebung des Arbeitspunktes in großen Bereichen möglich, sodass für den unipolaren Betrieb ein linearer Hub von $2 \cdot 14V$ zur Verfügung steht.

Das Gerät hat zwei Kanäle, den Mess- und den Referenzkanal. Der Verstärkungsfaktor der beiden Kanäle ist identisch.

2.2.2.3. Reproduzierbarkeit der Messungen

Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der Messungen wurden Kontrollmessungen durchgeführt. Dazu wurden sowohl unmittelbar nach Inbetriebnahme der Apparatur, als auch alternierend nach jedem Messzyklus mit einer Dummy-Tablette mehrere, die Betriebsparameter charakterisierende Messwerte aufgenommen. Anhand dieser Messungen konnte festgestellt werden, dass an verschiedenen Messtagen die Beschleunigungsspannung auf $\pm 0,8\%$ reproduzierbar eingestellt werden konnte. Diese Toleranz wirkte sich auf den Absorptionskoeffizienten $\mu = 48,3$ bei 17 kV für Hydroxylapatit mit $\pm 1\%$ aus. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass über die Dauer eines Messzyklus (ca. 3h) die durchgeführten Kontrollmessungen mit identischen Tabletten zu 99,8% reproduziert werden konnten.

Die Radiographie liefert als Messwerte elektrische Spannungen, die proportional zu den Röntgenintensitäten nach Durchgang durch die Probe sind. Der Logarithmus

$\ln\left(\frac{I}{I_0}\right)$ ist proportional zur Massenbelegung der Probe, also proportional zu ihrer

Masse/Fläche. Der Proportionalitätsfaktor ist der Massenabsorptionskoeffizient, der für Apatit bei der Anregungsspannung von 17 kV den Wert

$$\frac{46 \text{ cm}^{-1}}{3 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}} = 15 \frac{\text{cm}^2}{\text{g}}$$

aufweist. Der differentielle Absorptionskoeffizient für das vorliegende Bremspektrum liegt bei 46 cm^{-1} , die Dichte des Apatits wird zu 3 g/cm^3 angenommen. Da das Produkt aus der Probenfläche und der Massenbelegung gleich der Gesamtmasse der Probe ist, erhält man mit der Probenfläche von $0,461 \text{ cm}^2$ einen Umrechnungsfaktor zwischen den Logarithmen der Röntgenintensitäten und der Probenmasse von

$$\frac{0,461\text{cm}^2}{15\frac{\text{cm}^2}{\text{g}}} = 0,0307\text{g} = 30,7\text{mg}.$$

Reine Apatitablagerung angenommen, müsste also zwischen den gravimetrisch bestimmten Massenzuwachs und dem röntgenradiographischen Messwert $\ln\left(\frac{I}{I_0}\right)$ der folgende Zusammenhang bestehen:

$$m_{\text{grav}} = A_{\text{Apatit}} \cdot \ln\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

In den Versuchsgruppen stimmt keiner der experimentellen Umrechnungsfaktoren mit dem für Apatit gemessenen überein, zudem unterscheidet sich der Proportionalitätsfaktor noch zwischen den Gruppen. Aus diesen Abweichungen ließ sich die Menge an (wenig absorbierendem) organischem Material abschätzen, das durch die Gravimetrie miterfasst wurde, bei der Radiographie wegen seiner Röntgentransluzenz jedoch nicht ins Gewicht fiel.

Die Nachweisgrenze liegt bei 0,2 µg

2.2.2.4. Genauigkeit

Die Auflösung der Messmethode beträgt in Abhängigkeit von der Beschleunigungsspannung und der Absorberdicke zwischen 200 (U_a ca. 18 kV und 900 µm Al) und 600 nm (U_a ca. 30 kV und 2000 µm Al) Aluminium. Die Langzeitdriften über 24 Stunden (15 Messreihen in zeitlichem Abstand mit Messfrequenzen von 1 Messung/2 min sowie 1 Messung/4 min) sind bei 20 kV Anodenspannung und 10 mA Anodenstrom sowie 1000 µm Al-Absorber in (Mess- und Referenzstrahl) kleiner als ± 300 nm Al [39].

2.2.3. Zeitliches Messprotokoll

2. In-vitro Untersuchungen zur Remineralisation mit calciumhaltiger Fruchtgummimasse

Das zeitliche Messprotokoll sah als Periode_0 eine ca. 30minütige Umspülung der entgasten, d.h. mit aqua dest. getränkten Proben mit einer Lösung vor, die 5 ppm Fluorid enthielt.

Darauf folgte als Periode_1 („Fruchtgummi“) die Umspülung der Proben mit einer Lösung, die 1 Gewichtsteil Fruchtgummi und 1,5 Gewichtsteile künstlichen Speichel enthielt. Bei allen hier vorgestellten Messungen war der pH-Wert auf pH 4 (was dem pH des Fruchtgummis entsprach) eingestellt worden. Die Periode_1 dauerte in einer Gruppe der Messungen 20 min. In einer anderen Gruppe, die auf Beobachtung der Diffusionseffekte ausgerichtet war, betrug diese Periode 120 min.

Die anschließende Periode_2 („Speichel“) dauerte in der Gruppe mit 20 min. „Fruchtgummi“ 100 min, die der anderen Gruppe 120 min. In dieser Phase wurde die Probe mit künstlichem Speichel umspült.

Bei der Gruppe mit 20 min „Fruchtgummi“ wurde das Wechselspiel 4 mal wiederholt (4 Zyklen), bei der anderen Gruppe nur 2 mal. In jedem Falle folgte die „Nachtruhe“, bei der die Proben bis zum nächsten Morgen mit künstlichem Speichel umspült wurden.

2.3. Messergebnisse

In den Diagrammen in Abb. 9 bis 12 sind wichtige Einflüsse der Zusammensetzung von calciumhaltigen Fruchtgummilösungen, Speichel und Zeitprofil auf die Mineralbilanz zu erkennen, die im Folgenden diskutiert werden.

2.3.1. Allgemeine Beschreibung der Messkurven

2.3.1.1. Die Achsen

Auf der X-Achse der Diagramme ist die Zeit in Minuten aufgetragen, auf der Y-Achse die Änderung der Extinktion beim Durchgang des Röntgenstrahls durch die Küvette. Diese setzt sich aus zwei Anteilen zusammen:

2. In-vitro Untersuchungen zur Remineralisation mit calciumhaltiger Fruchtgummimasse

- Die Extinktion in der Flüssigkeitsschicht zwischen Austrittsfenster und Probe. Die verschiedenen Medien enthalten unterschiedliche Mengen an gelösten Stoffen und absorbieren deshalb unterschiedlich stark.
- Die Extinktion in der Probe. Diese wird durch die abgeschiedenen Feststoffe, z. B. das abgeschiedene Mineral und durch die in die Poren eingedrungene Lösung beeinflusst.

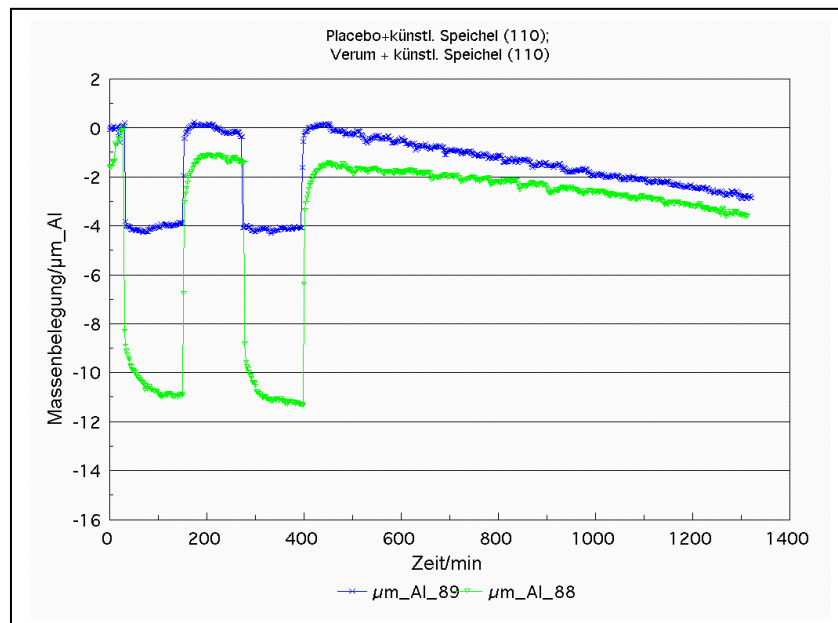


Abb. 9: In-vitro Mineralisation: Placebo - Verum

Die Extinktion wurde umgerechnet in Aluminiumäquivalente, also in Schichtdicken von Aluminium, welche die gleiche Absorptionsänderung verursachen wie die Änderung der Massenbelegung im Messstrahl.

Im Diagramm bedeutet ein Ausschlag nach unten eine Erhöhung der Absorption im Messstrahl, ein Ausschlag nach oben bedeutet umgekehrt eine Verringerung der Massenbelegung im Messstrahl. (Der Wert der Y-Achse ist annähernd proportional zu $\text{Log}(I_{\text{mess}} / I_{\text{ref}})$, also zum Logarithmus aus dem Quotienten der Intensitäten im Mess- und Referenzstrahl).

2.3.1.2. Bedeutung der einzelnen Kurvenabschnitte

In **Phase_0** wurde die Probe mit der beschriebenen Fluorid-Lösung umspült. Zu erwarten ist eine Messkurve mit nahezu waagerechtem Verlauf, was auf eine neutrale Mineralbilanz hinweist. Abweichungen können sich ergeben, wenn sich die Lösung mit Calcium aus der Probe in Calciumfluorid aufsättigt. Das verursachte einen schwachen Anstieg der Messkurve (Mineralverlust in der Probe).

In **Phase_1** wurde die Fruchtgummi-Speichel-Lösung durch die Küvette geleitet. Der Raum zwischen Probe und Strahlaustrittsfenster wurde „momentan“ (= innerhalb von 2 min) mit der röntgenoptisch dichteren Lösung aufgefüllt. Dies äußerte sich in der Messkurve durch eine Stufe nach unten. Während des nun folgenden, gekrümmten Abschnitts der Messkurve diffundierte Material aus der Lösung in die Probe ein, was die Röntgenopazität im Messstrahl weiter erhöhte.

Bei der **Phase_2** wurde die Fruchtgummi-Speichel-Lösung durch den künstlichen Speichel ersetzt. Dieser besaß eine geringere Röntgenopazität und füllte den Zwischenraum zwischen Probe und Austrittsfenster „momentan“ aus. Das führte im Diagramm zu der Stufe nach oben. Dieser Stufe folgte dann wieder ein gekrümmter Abschnitt der Kurve in dem ein Teil der Protonen auswanderte und ein Teil des zurückgebliebenen Calciums und Phosphats sich solide an den Wänden niederschlug. Der Unterschied der Konzentrationen der Lösung und damit der Absorption der Röntgenstrahlung in Phase Null und den weiteren Phasen muss bei der Auswertung berücksichtigt werden.

2.3.2. Vergleich der Massenbilanzen von Placebo- und Verum-Fruchtgummi

In Abb. 9 sind die Messkurven für Placebo- und Verum-Fruchtgummi gegenübergestellt. In der blauen Kurve $\mu\text{m_Al_89}$ wurde handelsübliche Fruchtgummimischung vom 26.09.05 verwendet, der kein Calcium zugesetzt war. Zum Vergleich ist in Kurve $\mu\text{m_Al_88}$ ein Verum-Präparat mit 200 mmol Calcium pro kg Fruchtgummi (= 8 g Ca/kg) grün eingezeichnet.

Zunächst fällt auf, dass die Stufen beim Placebo nur etwa halb so hoch sind wie die beim Verum-Präparat. Das organische Material in der Placebo-Lösung weist also

eine wesentlich geringere Absorption auf. Im Vergleich zur Verumkurve fehlt in der Phase_0 der Diffusionsbereich fast vollständig; d.h. die allenfalls in die Probe eindiffundierenden Stoffe besitzen nur geringe Röntgenopazität. Es handelt sich also im Wesentlichen um organisches Material. Nach ca. 30 min wendet sich in der Phase_1 die Messkurve nach oben. Das bedeutet einen Mineralverlust. Nach Übergang zu Phase_2 schwenkt die Messkurve zu einer Geraden mit schwacher negativer Steigung ein. Hier macht sich die Remineralisation durch den künstlichen Speichel bemerkbar. Die Steigung zu Ende der Phase_2 entspricht der während der „Nachtruhe“. Der zweite Zyklus zeigt praktisch das gleiche Bild. Insgesamt ist die neutrale Mineralbilanz beim Placebo-Präparat nur der Remineralisationskraft des künstlichen Speichels in den Ruhephasen zu verdanken.

Ein komplett anderes Bild zeigt die Messkurve $\mu\text{m_Al_88}$ mit dem Verum-Präparat. Die Stufe von Phase_0 zu Phase_1 ist etwa doppelt so hoch wie die bei der Placebokurve. Dies wird durch den Calciumgehalt der Lösung bewirkt. An die Stufe schließt sich mit großer Amplitude ein gekrümmter Kurvenverlauf an, der schließlich in einen annähernd stationären Zustand übergeht. Das weist auf einen Diffusions-Relaxations-Prozess hin, bei dem, unter Berücksichtigung der Ergebnisse für die Placebokurve, Calcium die bedeutende Rolle spielt. Die Stufe zu Phase_2 mündet wieder in ein Diffusionsintervall, das in eine Gerade übergeht, deren Neigung etwa der der Placebokurve entspricht. Die Form des Kurvenverlaufs der Phase_2 im zweiten Zyklus weicht geringfügig von der im Zyklus_1 ab. Die Mineralbilanz im zweiten Zyklus ist geringer als die im ersten Zyklus. Vermutlich hat sich im ersten Zyklus die spezifische Oberfläche der obersten Schicht der Probe durch Mineralabscheidung verringert: die Mineralabscheidungsrate ist proportional zur spezifischen Oberfläche. Auf diesen Sachverhalt weist auch die kleinere Abscheidungsrate während der „Ruhezeit“ hin.

Die Messung zeigt deutlich die Bedeutung des Calciumgehalts der Probe. Die calciumhaltige Lösung führte zu einer positiven Mineralbilanz in der Probe, während das Placebo-Präparat ohne die remineralisierende Wirkung des Speichels eine negative Mineralbilanz zur Folge hätte. Es sei nochmals darauf hingewiesen, dass es sich hier nicht um einen pH-Wert-Effekt handelt; denn, wie oben ausgeführt wurde, sind alle Lösungen auf pH 4 eingestellt.

2.3.2.1. Einfluss des Zeitregimes auf die Mineralbilanz

Die beiden Messungen $\mu\text{m_Al_87}$ und $\mu\text{m_Al_86}$ in Abb. 10 illustrieren den Effekt des Zeitregimes auf die Mineralbilanz. Die gesamte Versuchszeit betrug in beiden Fällen ca. 8 bzw. mit „Ruhezeit“ 22 Stunden. Beim Zeitregime von $\mu\text{m_Al_87}$ dauerten, wie im Vergleich $\mu\text{m_Al_88}$ mit $\mu\text{m_Al_89}$, Phase_1 und Phase_2 je 2 Stunden. Pro Messung wurden zwei Zyklen durchgeführt. In der Messung $\mu\text{m_Al_86}$ dauerten Phase_1 und_2 gemeinsam 2 Stunden (Phase_1: 20 min, Phase_2: 100 min) und eine Messreihe bestand aus 4 Zyklen plus Ruhephase. Als Präparat diente Fruchtgummi der Charge Trolli 01.08.05 mit Salzhydratschmelze. Als Speichel wurde eine Lösung nach Geigy ohne zugesetztes Fluorid verwendet.

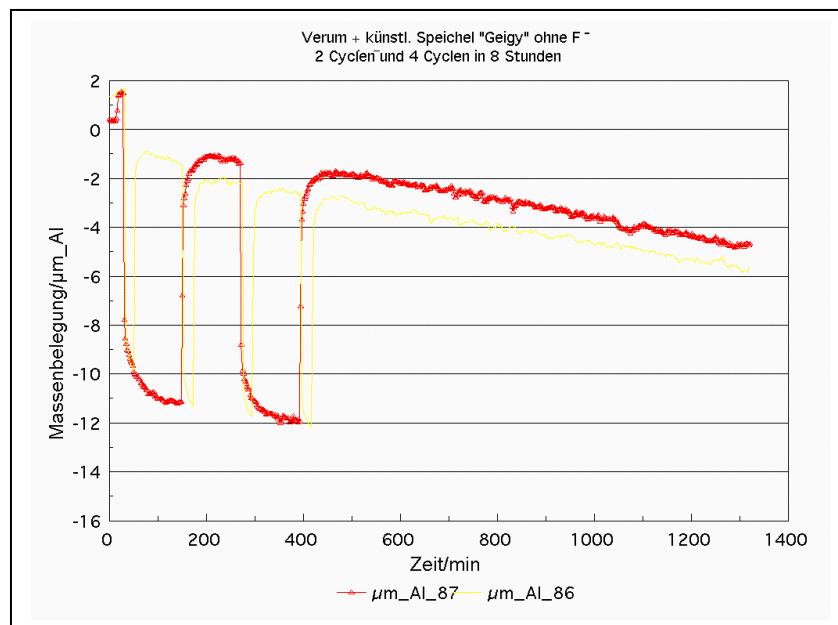


Abb. 10: Abhängigkeit der in-vitro Remineralisation vom Zeitregime

Die Verschiebung des Nullpunkts um $1,5 \mu\text{m Al}$ berücksichtigt die um diesen Betrag stärkere Absorption des künstlichen Speichels Geigy ohne Fluorid gegenüber der während der ersten 30 min verwendeten NaF-Lösung.

Zu Beginn der Phase_1 sind im ersten Zyklus beide Kurven deckungsgleich. Am Ende des ersten Zyklus von $\mu\text{m_Al_87}$ begann der dritte Zyklus vom $\mu\text{m_Al_86}$. Zu dieser Zeit war die Messreihe mit kürzerer Zykluszeit in Bezug auf die Mineralbilanz

schon im Vorteil. Am Ende der dritten Phase_1 lag die gelbe Kurve unter der roten. Während der Ruhezeit wies die gelbe Kurve eine kleinere Steigung auf als die rote, bei der nur zwei längere Zyklen durchgeführt wurden. Dies deutet wieder, wie im vorigen Abschnitt dargelegt wurde, auf die Mineraleinlagerung in oberflächennahe Schichten der Probe während der ersten kurzen Zyklen hin.

2.3.2.2. Einfluss der Zusammensetzung der Fruchtgummimasse auf die Mineralbilanz

Die für die beiden Versuche $\mu\text{m_Al_83}$ und $\mu\text{m_Al_82}$ verwendeten Fruchtgummimassen unterschieden sich im Wesentlichen nur durch die Menge an freiem Säurerest und die Aromatisierung. Für die Messung $\mu\text{m_Al_83}$ ist eine Charge handelsüblichen Fruchtgummis mit Salzhydratschmelze, der zusätzlich noch 3 g Äpfelsäure zugesetzt waren, verwendet worden. Die Masse $\mu\text{m_Al_82}$ war ohne zusätzliche Äpfelsäure zubereitet wurde. Beide Lösungen waren wieder auf pH 4 eingestellt, sodass Effekte durch einen unterschiedlichen pH-Wert ausgeschlossen werden können.

Die Nullpunktverschiebung berücksichtigt wieder die unterschiedliche Röntgendichte der Lösung in Phase_0 und dem künstlichen Speichel in Phase_2.

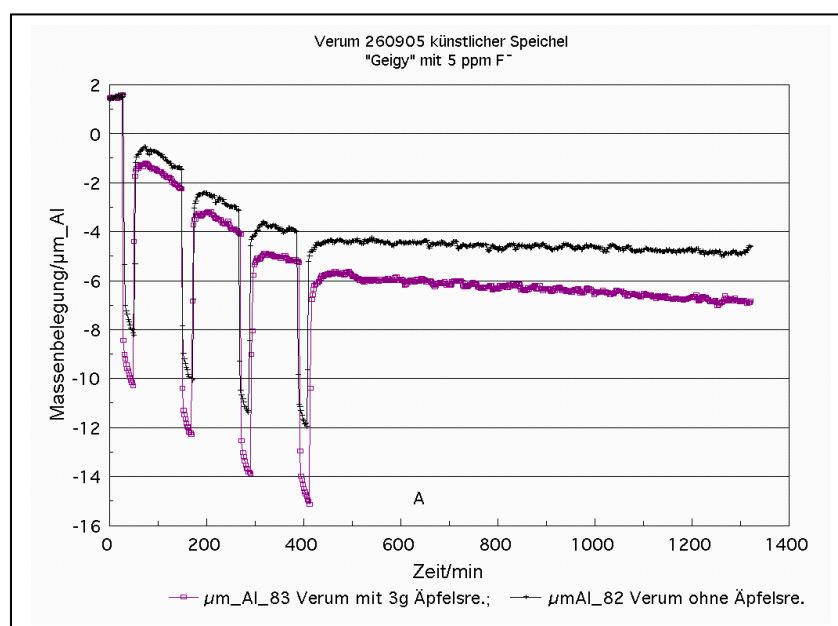
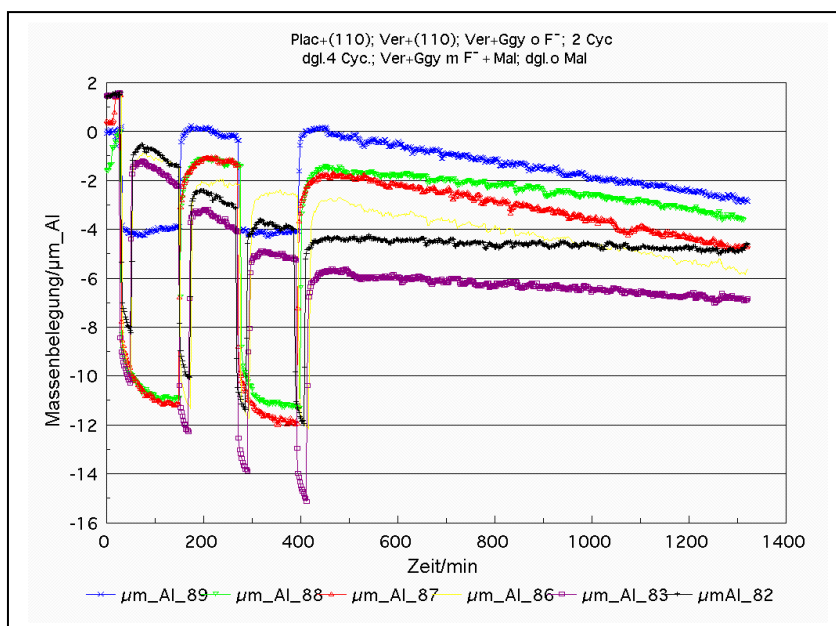


Abb. 11: Einfluss der Säurereste auf die in-vitro Remineralisation

Beim Betrachten von Abb. 11 fällt auf den ersten Blick auf, dass die Messkurve für das Verum ohne zusätzliche Apfelsäure stets über der Versuchskurve des Verums mit zugesetzter Apfelsäure liegt. Der Abstand der beiden Kurven wird mit jedem Zyklus größer. In Zyklus_1/Phase_2 beträgt er ca. 0,6 $\mu\text{m Al}$, an entsprechender Stelle im Zyklus_2 erhöht er sich auf ca. 0,7 $\mu\text{m Al}$, im Zyklus_3 auf ca. 1 $\mu\text{m Al}$, im Zyklus_4 auf ca. 1,1 $\mu\text{m Al}$. Am Ende der Ruhephase beträgt er fast 2 $\mu\text{m Al}$. Die Gesamtmineralbilanz ist dennoch in beiden Messungen stark positiv: Am Ende des vierten Zyklus, bei 510 min, nahm die Massenbelegung der Probe bei Behandlung mit Verum ohne Malat um ca. 4 $\mu\text{m Al}$ zu. Die Behandlung der Probe mit Verum mit Malat führte sogar zu einer Steigerung der Massenbelegung um knapp 6 $\mu\text{m Al}$. Der nahezu waagerechte Verlauf der Messkurve μm_Al_82 (ohne Malat) in der „Ruhephase“ deutet auf eine verstärkte Ablagerung des Minerals in oberflächennahe Schichten hin, die, wie schon in den vorangegangenen Abschnitten diskutiert wurde, eine verringerte Einlagerung von Mineral zur Folge haben.

2.3.3. Auswertung der Ergebnisse

Die vorangehenden Untersuchungen stellen wesentliche Einflussgrößen auf die Mineralbilanz heraus (Abb. 12).



2. In-vitro Untersuchungen zur Remineralisation mit calciumhaltiger Fruchtgummimasse

Abb. 12: Zusammenfassung der in-vitro Remineralisation

- Den größten Einfluss auf die Mineralbilanz besitzt der Calciumgehalt der Fruchtgummimasse. Die Mineralbilanz bei der Behandlung mit Placebo-Masse ist, wenn die Remineralisationskraft des künstlichen Speichels subtrahiert wird, negativ.
- Auch das zeitliche Profil besitzt einen deutlichen Einfluss auf die Mineralbilanz. Bei vorgegebener Behandlungszeit sind mehrere kürzere Zyklen weniger langen überlegen. Hier gibt es offenbar ein optimales Zeitregime.
- Die Komposition der Säurereste sowie deren Konzentration beeinflussen die Mineralbilanz zusätzlich in einem signifikanten Umfang. Der physikochemische Hintergrund ist vermutlich in einer verstärkten komplexen Bindung des Calciums an die Fruchtsäurereste zu suchen, wenn deren Konzentration erhöht wird. Mit abnehmender Konzentration der freien Calciumionen in der Lösung findet Mineralabscheidung auch in tieferen Oberflächenschichten statt (Größenordnung 100 µm bis 300 µm).

3. In-situ Untersuchungen zur Remineralisation mit Fruchtgummimasse

Nach dem Ergebnis eines eindeutigen Mineralzuwachses der Proben im in-vitro Testlauf sollte festgestellt werden, inwieweit sich diese Ergebnisse in-situ bestätigen und in Süßwaren, im vorliegenden Fall in Fruchtgummiprodukte, umsetzen lassen.

3.1. Material

3.1.1. Produkte

Auch in dieser Testreihe wurde die Wirkung der Produkte

1. Fruchtgummi P: marktübliche Fruchtgummiprodukte (vgl. 2.1.1.) im Folgenden als **P (Placebo)** bezeichnet)

2. Fruchtgummi V: die gleichen marktüblichen Fruchtgummiprodukte angereichert mit 200 mmol Calcium/kg (vgl. ebenfalls 2.1.1.) (im Folgenden als **V (Verum)** bezeichnet)

untersucht, es kamen jedoch noch zwei weitere, zuckerreduzierte Produkte hinzu:

3. Fruchtgummi ZRP: neu entwickelte Fruchtgummiprodukte mit calciumhaltiger Salzhydratschmelze, angereichert mit dem Zuckeraustauschstoff Sorbitol (im Folgenden als **ZRP (ZuckerReduziertes Placebo)** bezeichnet)

4. Fruchtgummi ZRV: die gleiche Neuentwicklung, angereichert mit 200 mmol/kg Calcium (im Folgenden als **ZRV (ZuckerReduziertes Verum)** bezeichnet)

3.1.2. Probanden

Als Versuchspersonen dienten 10 weibliche Probanden im Alter zwischen 18 und 55 Jahren (mittleres Alter 32 Jahre). Bei den Probandinnen handelte es sich um 8 zahnärztliche Helferinnen aus der Zahnklinik sowie eine Laborantin und eine Doktorandin (Autorin dieser Arbeit) aus dem eigenen Labor. Alle Probandinnen wiesen ein vollständiges Gebiss auf.

Aus mehreren Gründen wurden bewusst diese Probanden ausgesucht:

- weibliche Personen weisen mehr Karies auf als männliche, sind demzufolge für das vorliegende Versuchsdesign geeigneter [49]
- die ausgewählten Versuchsteilnehmerinnen sind den Untersuchern als besonders zuverlässig bekannt
- durch die Hauszugehörigkeit standen die Probandinnen zusätzlich unter täglicher Kontrolle
- die Probandinnen waren von Berufs wegen außerordentlich motiviert, bei der Studie verlässlich mitzuhelfen.

3.1.3. Die Proben

Auch hier wurden als Proben für den Mineraleinbau künstlich hergestellte poröse Keramikkörper aus Hydroxylapatit verwendet. Ausgangsmaterial für diese stellte ein käufliches Hydroxylapatit-Pulver der Firma Budenheim Typ C13-08 dar. Je 145 mg dieses Pulvers wurden axial bei 2200 kp/cm^2 zu zylindrischen Grünkörpern von 8 mm Durchmesser gepresst. Die Grünkörperdichte betrug $1,45 \text{ g/cm}^2$. Anschließend wurden die Grünkörper innerhalb von 90 min auf 900°C aufgeheizt. Die Temperatur wurde 1 Stunde aufrechterhalten. Die Abkühlphase betrug 24 Stunden. Die fertigen Proben hatten eine Dichte von $1,65 \text{ g/cm}^2$ mit einer Streuung von $\pm 0,02 \text{ g/cm}^2$, d.h. die Dichte von mehr als 2/3 der Proben unterschied sich um weniger als 1% vom Sollwert.

Eine Seite der Probenkörper wurde nass auf Siliziumkarbid-Papier (600 grid) beschliffen, sodass die Proben eine Dicke von 1,0 mm erhielten. Anschließend wurden sie in destilliertem Wasser 15 min gewässert und danach mit fluoridfreier Zahncreme beidseitig je 15 sec mit einer weichen Zahnbürste gereinigt, um in den Poren eventuell vorhandene schnell- und leichtlösliche Anteile zu entfernen. Nach dieser Zeit änderte sich das Gewicht auch bei längerer Behandlung mit destilliertem Wasser nicht mehr wesentlich.

Um die Proben zu identifizieren, wurden sie durchnummeriert. Die Probennummer wurde auf der Mantelfläche der zylindrischen Probe angebracht.

3.1.4. Behandlung der Proben vor den Messungen

Vor der ersten Messung wurden die Proben mit einer weichen Zahnbürste sowie mit Placebo Paste und Wasser je 15 sec lang auf beiden Seiten gereinigt. Obgleich in Vorversuchen sichergestellt worden war, dass diese Maßnahme zu keinem messbaren Gewichtsverlust führte, wurde die Reinigung mit Bürste und Wasser stets standardisiert bezüglich Anpressdruck und Zeit durchgeführt. Nach einer Spülung mit entionisiertem Wasser wurde die Probe in aqua bidest. 5 min gewässert und anschließend die Oberfläche mit saugendem Papier abgetupft. Durch 15 minütiges Trocknen bei 100°C im Trockenschrank wurde alles bei dieser Temperatur flüchtige Wasser ausgetrieben. Vorversuche hatten ergeben, dass die Proben nach 15 min bereits konstantes Gewicht besitzen. Nach der Abkühlphase von 30 min in einem abgedeckten Gefäß wurde die Probe zum Wägen entnommen.

Bei den jeweiligen Zwischenuntersuchungen wurden die Proben nach der gleichen Prozedur behandelt. Die prothetischen Halteapparaturen (Abb. 13) wurden nach der Entnahme der Probenkörper mit einem Dampfstrahler gereinigt.

3.1.5. Applikationsgerät für die Proben

Da alle Probandinnen ein vollständiges Gebiss aufwiesen, mussten spezielle prothetische Haltevorrichtungen für den Unterkiefer angefertigt werden (Abb. 13). Die Proben sind rechts und links an Halterungen in Höhe der beiden ersten Molaren angebracht, eine davon dem Zahn, die andere der Wange zugewandt. Durch den etwa 1 mm breiten Spalt zwischen Zahnoberfläche und Probenoberfläche auf der rechten Seite sollte ein im Hinblick auf die Kariesentstehung gefährdeter Zahnzwischenraum simuliert werden. Im Hinblick auf die Zwischenuntersuchungen war es nötig, die Proben aus ihren Halterungen leicht und ohne Beschädigung entnehmen zu können. Darüber hinaus musste der Zutritt von Speichel zur hinteren Fläche und dem Mantel der zylindrischen Probe unterbunden sein. Zu diesem Zweck wurden die metallischen Halter als Schüsseln mit unter sich gehendem Rand ausgebildet, in welche die Probe mit Polyäther-Abdruckmasse eingebettet wurde.

Von der Probe blieb nur die geschliffene Fläche frei, die im Versuch dem Mundmilieu ausgesetzt war.



Abb. 13: Stahlskelett für die Aufnahme der künstlichen Schmelzproben

Voruntersuchungen hatten ergeben, dass aus der Polyäther-Abdruckmasse Ausdünstungen in die Proben eindringen [59]. Dadurch wurde das Remineralisationsverhalten beeinflusst. Abhilfe schaffte die Einlagerung der Abdruckmasse in 50%igem Äthanol für 14 Tage. Nach dieser Vorbehandlung konnten Einflüsse auf das Remineralisationsverhalten nicht mehr festgestellt werden.

3.2. Methodik

3.2.1. Versuchsablauf

Für das Experiment wurde das Modell der Kreuzklassifikation verwendet, d. h. ein Versuchsdesign, bei dem an jedem Probanden in randomisierter Reihenfolge die Wirkung eines jeden Produkts untersucht wird.

Die gesamte Versuchszeit war in vier zweiwöchige Phasen unterteilt. Dazwischen lag jeweils eine sog. „Wash-out“ Zeit, in der die Probandinnen Mundhygiene mit einer Placebo-Paste, ohne Verwendung von anderen Prophylaktika betrieben. Durch die „Wash-out“ Phase sollten Wirkstoffüberträge von einer Produktgruppe zur nächsten

ausgeschlossen werden. Eine solche „Wash-out“ Zeit wurde auch der gesamten Versuchsreihe vorangestellt.

Jede Probandin musste jedes der vier untersuchten Produkte, also zwei Fruchtgummi-Placebos und zwei Fruchtgummi-Produkte mit Verum, während einer Dauer von jeweils 14 Tagen verzehren. Anschließend begann eine 1-wöchige „Wash-out“ Zeit, in der der zweite Zyklus vorbereitet wurde. Die tägliche Ration von 100 g Fruchtgummis war auf zwei Portionen zu je 50 g aufgeteilt, wovon eine am Vormittag und die andere am Nachmittag in einem Zeitfenster von jeweils ca. 20 min zu verspeisen war. Eine Portion bestand aus 6-8 Fruchtgummis zu je ca. 7 g Masse. Die Probandinnen waren angehalten, jedes Fruchtgummi etwa 2-3 Minuten lang zu einer „breiigen Soße“ zu zerkauen und damit den Probenkörper möglichst intensiv zu benetzen. Wenn sich Fruchtgummimasse zwischen dem rechten Probenkörper und dem Zahn verklemmte, sollten die Probanden diese nicht entfernen, damit die üblicherweise zahnschädigenden Verhältnisse in einem Zahnzwischenraum simuliert werden konnten.

Aus zeitlichen Gründen war es nicht möglich, die Messung der Proben sämtlicher Probandinnen an einem Tag vorzunehmen. Innerhalb einer Phase wurden deshalb die Messtage bei einer Gruppe der Probandinnen auf Montag und Donnerstag gelegt, in einer zweiten auf Dienstag und Freitag.

Für die erste Gruppe ergab sich also der Messzyklus: Montag - Donnerstag - Montag - Donnerstag – Montag. Nach der Abgabe der Probenkörper im Labor begann auch die nächste „Wash-out“ Periode, die eine Woche andauerte.

Für die zweite Gruppe der Probandinnen ergab sich folglich der Messzyklus: Dienstag - Freitag - Dienstag - Freitag – Dienstag. Ein Untersuchungszyklus dauerte somit (ohne „Wash-out“ Phase) 14 Tage.

Trotz der oben beschriebenen Aufteilung der Messtage, mussten die einzelnen Messungen nach einem strengen zeitlichen Schema durchgeführt werden, um die Messungen an den 10 Proben (zwei pro Probandin) in der zur Verfügung stehenden Zeit durchführen zu können. Insgesamt bedurfte eine Probe eines Zeitaufwandes von durchschnittlich 100 min. Jeweils am Morgen wurden die Applikationsgeräte mit den Proben von den Probandinnen im Labor abgegeben. Nach Eingang der ersten zwei

bis drei Applikationsgeräte wurden deren Proben entnommen, gereinigt und 1 Stunde zum Trocknen in den Trockenschrank gestellt.

Während des Trocknens wurden die nächsten Proben vorbereitet, Halterungen auf Schäden hin untersucht und wenn nötig erneuert. Darüber hinaus wurden die Stahlskelette jedes Mal gründlich von Belägen gereinigt. Nach der Trocknung wurden die Proben nach einer Abkühlungsphase gemessen.

Alle Arbeiten (Reinigen, Trocknen, Abkühlen und Messen) wurden so organisiert, dass ein kontinuierlicher Arbeitsablauf gewährleistet war. Am Nachmittag, wenn die Messungen abgeschlossen waren, wurden die Applikationsgeräte wieder an die Probandinnen zum erneuten Tragen zurückgegeben.

3.2.2. Instruktion der Probanden

Die Probanden waren gehalten, das Applikationsgerät mit den Proben kontinuierlich und auch während des Essens zu tragen. Dieser Forderung wurde auch weitgehend entsprochen. Bei rauer, harter Kost allerdings mussten aus Gründen der Sicherheit die Applikationsgeräte kurzzeitig aus dem Mund herausgenommen werden. Bei vorübergehender Entnahme der Spange wurde diese in einer feuchten Kammer gelagert. Zu diesem Zwecke waren Plastikdosen, ausgelegt mit einem feuchten Krepppapier, ausgehändigt worden.

Die Mundhygienemaßnahmen wurden stets mit der Applikation in-situ durchgeführt. Die Stellen im Mund, die beim Zähneputzen durch das Gerät abgedeckt waren, wurden zusätzlich bei herausgenommener Spange gereinigt.

Für das Zähneputzen galt die Vorschrift: 2 mal täglich 2 Minuten mit der ausgegebenen Zahnpasta Elmex rot. Während der gesamten Versuchsdauer sollte von allen Probandinnen stets die gleiche Art Zahnbürste verwendet werden. Dazu wurden vom Versuchsleiter zu Beginn einheitliche Zahnbürsten der Marke Oral B verteilt. Diese waren besonders weich, um Einflüsse durch Abrieb beim Zähneputzen zu vermeiden.

Jeweils zu Beginn der „Wash-out“ Phase durfte Elmex Gelée einmalig verwendet werden, um dem Bedürfnis der Probanden nach zusätzlicher Prophylaxe gerecht zu werden.

3.2.3. Versuchsplan

Bei der Versuchsplanung wurde die Reihenfolge, in der die Probanden die Produkte verzehrten, pro Versuchseinheit randomisiert. Als eine Versuchseinheit galt die vergleichende Studie mit marktüblichen Fruchtgummiprodukten bzw. deren Modifikation mit 8 g reagiblen Calciumionen/kg, als die andere die Studie mit zuckerreduzierten Produkten mit und ohne Calcium.

3.2.4. Messung der Mineralzunahme

3.2.4.1. Gewichtsbestimmung

Da, wie unter 3.1.4. (Behandlung der Proben vor den Messungen) beschrieben, die Probenkörper vor jeder Messung mit einer Zahnbürste gereinigt wurden, was einen Massenverlust zur Folge hatte, wurde in dieser Messreihe zusätzlich eine Gewichtsbestimmung durchgeführt, um diesen Messfehler herausrechnen zu können.

Die Masse der Proben wurde mit einer Analysenwaage von Sartorius Typ MC1 RC 210 P bestimmt (Abb.14). Diese Waage ist auf 0,01 mg genau abzulesen. In den technischen Daten ist die Reproduzierbarkeit besser als 0,02 mg angegeben.



Abb. 14: Analysenwaage für die gravimetrischen Messungen

Die Genauigkeit der Massemessung wird durch die Gleichmäßigkeit der Präparation bestimmt. Diese wurde experimentell während des klinischen Versuchs mitbestimmt. Dazu wurde bei jedem Messdurchgang auch das Gewicht einer Dummy-Probe ermittelt. Diese Probe wurde jeweils nur angefeuchtet und getrocknet. Bei ihr entfiel also das Bürsten. Aus diesen Vergleichsmessungen ergab sich ein Fehler bei der Massebestimmung (Standardabweichung) von 0,09 mg (n = 41); das bedeutet, dass weniger als 1/3 der Massewerte mehr als 0,09 mg vom wahren Massewert der Probe abweichen.

Nach der Wägung wurde die Probe wieder in das abgedeckte Gefäß zurückgegeben und zur Messung der Röntgenabsorption gegeben.

Die gravimetrischen Messungen waren blind durchgeführt worden, d. h. die von der digitalen Waage angezeigten Werte wurden dokumentiert, ohne dass beim Messvorgang die im vorliegenden Zyklus verwendete Fruchtgummisorte bekannt war. Auch die radiographischen Werte wurden ohne Einfluss von außen automatisch vom Messgerät aufgenommen, sodass hier die Objektivität per se gewährleistet war.

3.2.4.2. Radiographische Bestimmung der Mineralzunahme

Zum Nachweis der Mineralaustauschvorgänge bei der in-situ Untersuchung müssen in den Probenkörpern sehr geringe Änderungen an Schmelzmineral quantitativ nachgewiesen werden. Als präzise Meßmethode kommen neben der Wägung insbesondere die Röntgenradiographie und die Härtemessung in Frage.

Wegen des variablen Wassergehaltes von Schmelzproben ist für den Zahnschmelz die gravimetrische Methode relativ ungenau. Für Zahnschmelz ist die Methode der Wahl die Bestimmung der Absorption von weichen Röntgenstrahlen. Sie hat als „longitudinale“ und „transversale“ Radiographie Eingang in die Kariesforschung gefunden [3, 17, 21].

Unmittelbar nach der Wägung wurde in der vorliegenden Studie die Massenbelegung der Proben mit der Röntgenradiographie analog zum in-vitro Versuch ermittelt. Es konnte jedoch nur an den festgelegten Untersuchungstagen gemessen werden und nicht, wie beim in-vitro Versuch, kontinuierlich.

3.3. Ergebnisse

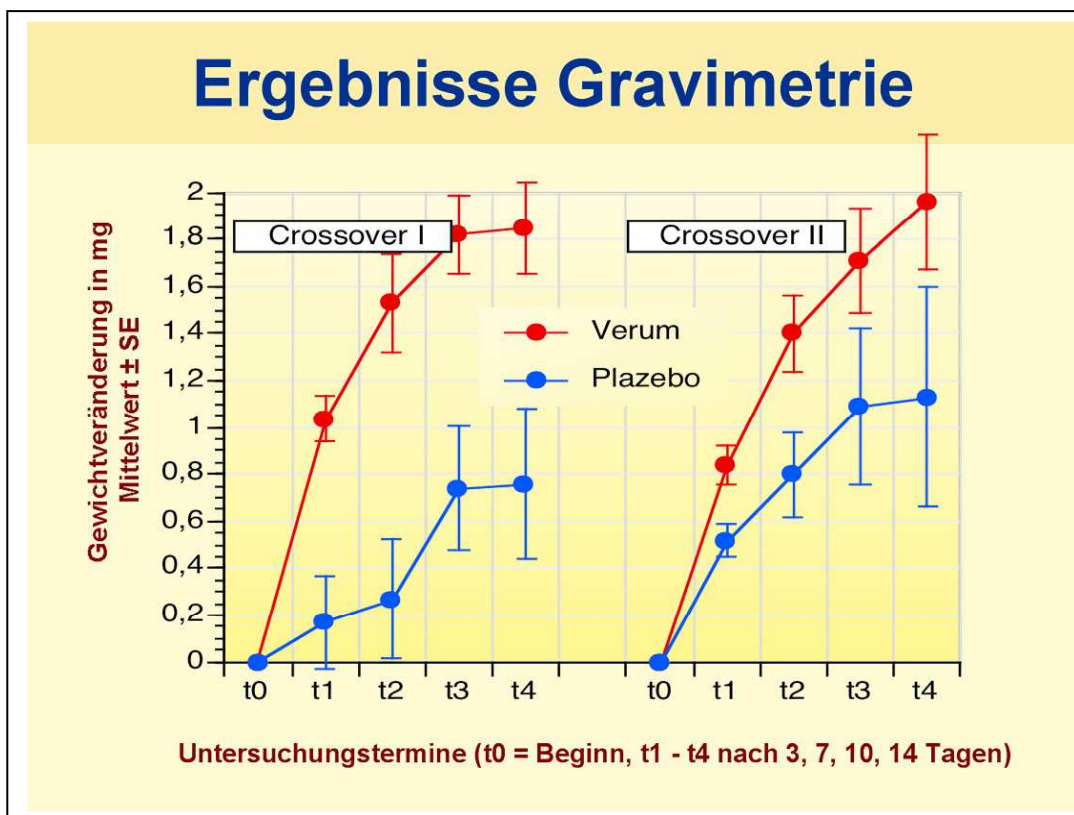
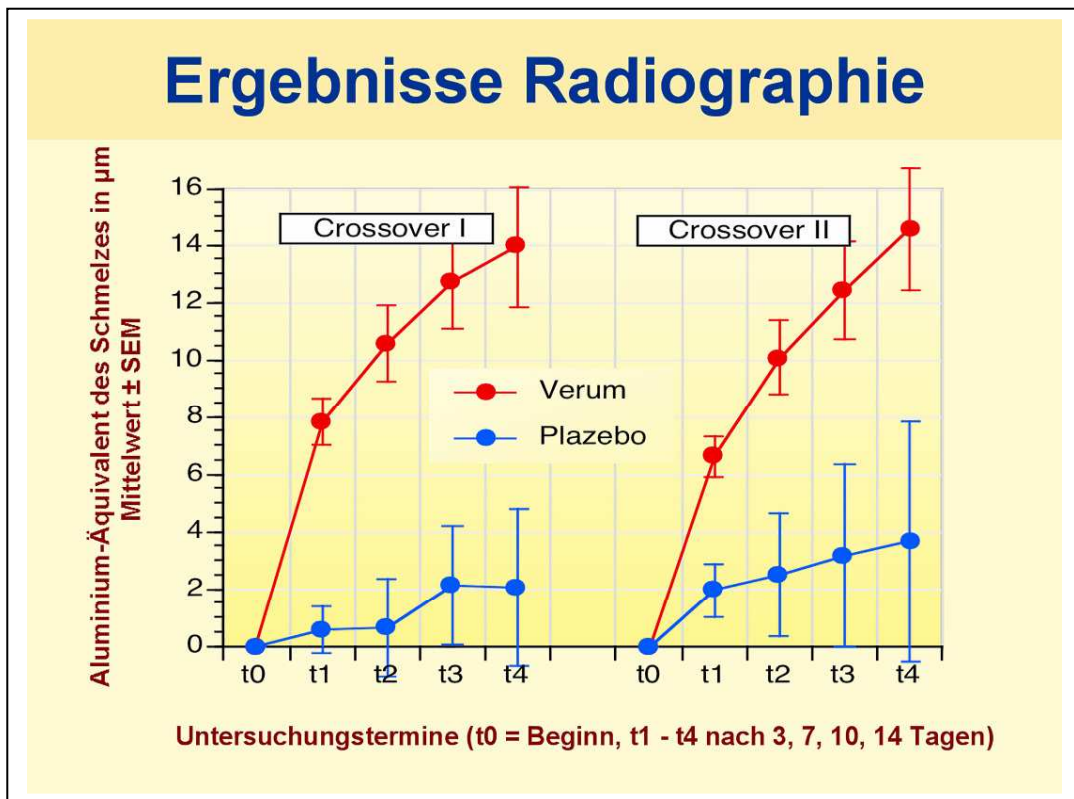


Abb. 15 und 16: Zusammenfassende Ergebnisse der radiographischen und gravimetrischen Messungen.

Crossover I: mit vollem Zuckergehalt, Crossover II: zuckerreduziert mit Sorbitol.
(Umrechnungsfaktor Al-Äquivalent auf Schmelz = 0,47; d. h. 1 μm HAP = 0,47 μm Al).

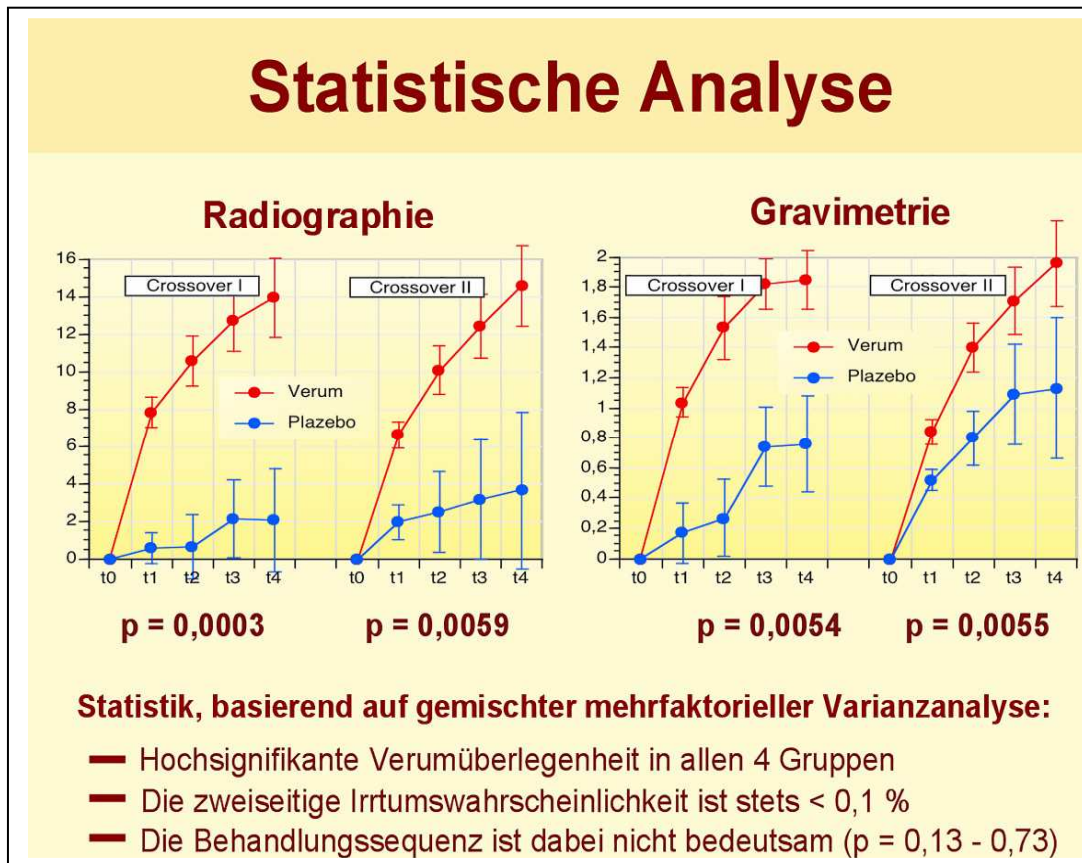


Abb. 17: Kurzfassung der statistischen Analyse. Hochsignifikante Überlegenheit des Verums.

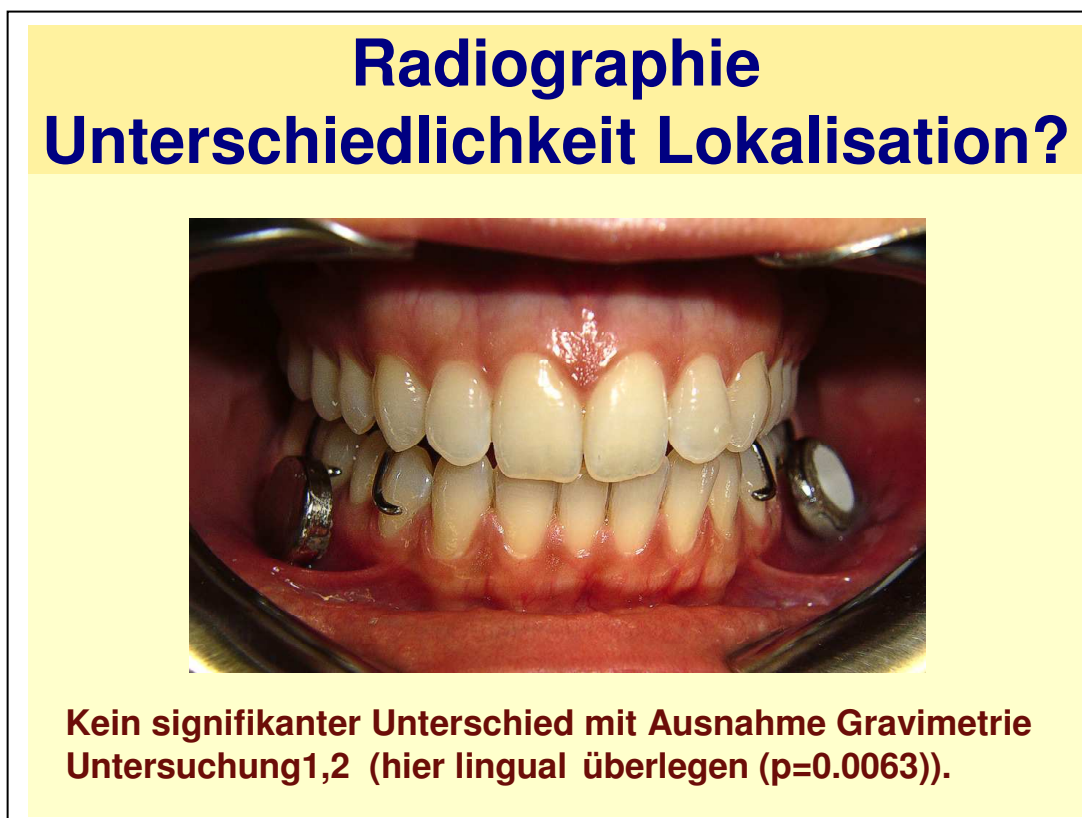


Abb. 18: Kein bedeutungsvoller Unterschied bezüglich der Lokalisation der Messstellen.

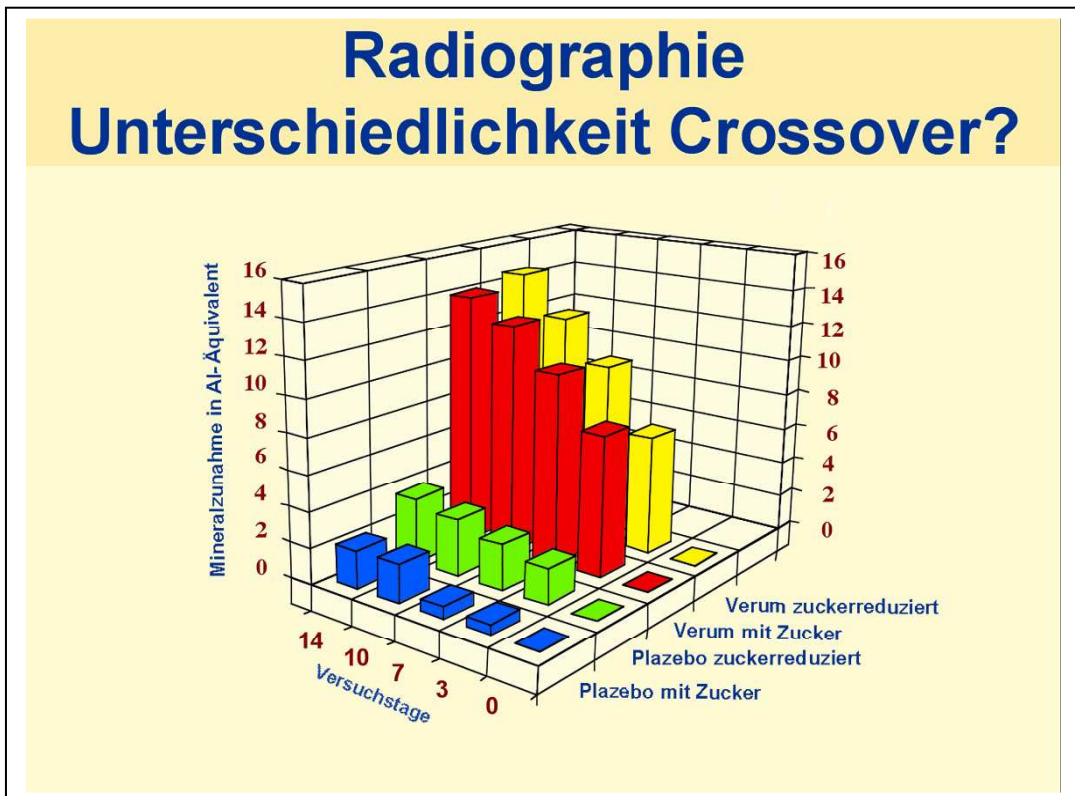


Abb. 19: Zusammenfassende Übersicht über die radiographischen Messergebnisse in allen 4 Gruppen.

Umrechnungsfaktor Al-Äquivalent auf Schmelz = 0,47, d. h. 1 µm HAP = 0,47 µm Al.

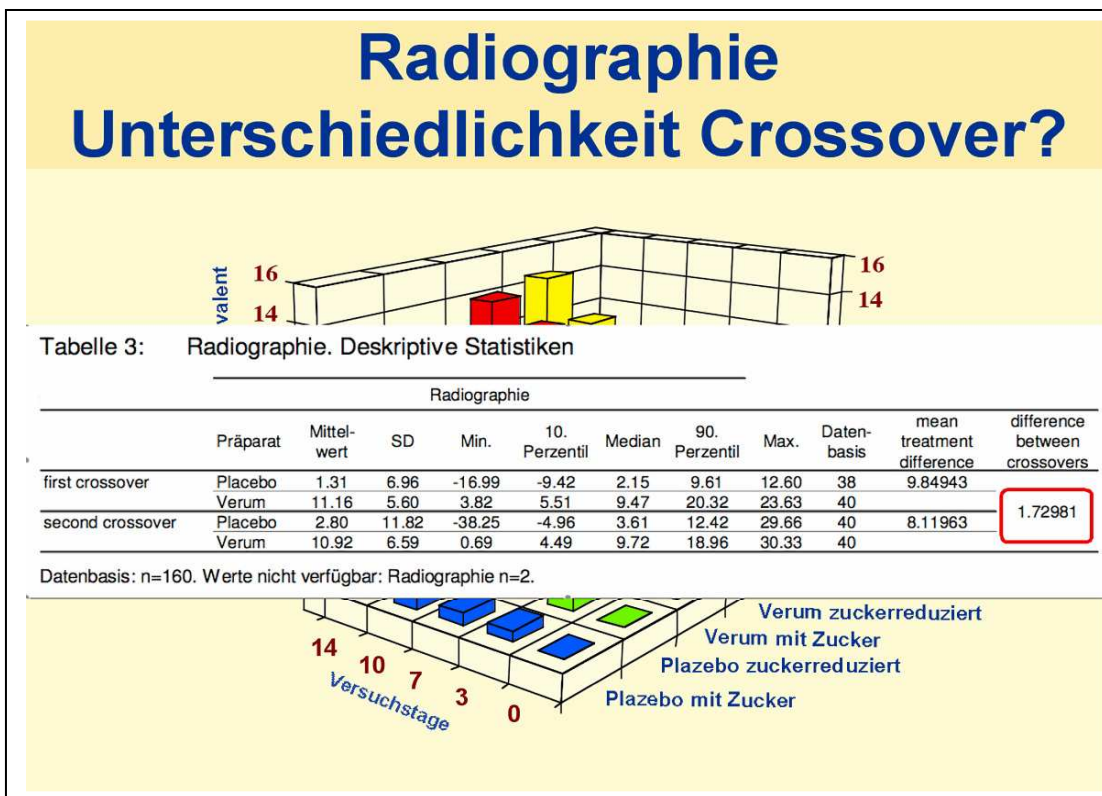


Abb. 20: Deskriptive Statistik zur Frage nach Unterschiedlichkeiten zwischen den beiden Crossover-Versuchsreihen der Radiographie.

Radiographie Unterschiedlichkeit Crossover?

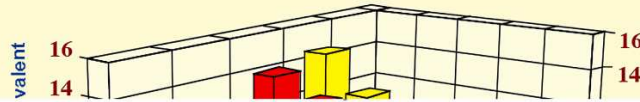


Tabelle 3: Radiographie. Deskriptive Statistiken

| | | Radiographie | | | | | | | | mean treatment difference | difference between crossovers |
|------------------|----------|--------------|-------|--------|---------------|--------|---------------|-------|------------|---------------------------|-------------------------------|
| | Präparat | Mittelwert | SD | Min. | 10. Perzentil | Median | 90. Perzentil | Max. | Datenbasis | | |
| first crossover | Placebo | 1.31 | 6.96 | -16.99 | -9.42 | 2.15 | 9.61 | 12.60 | 38 | 9.84943 | 1.72981 |
| | Verum | 11.16 | 5.60 | 3.82 | 5.51 | 9.47 | 20.32 | 23.63 | 40 | | |
| second crossover | Placebo | 2.80 | 11.82 | -38.25 | -4.96 | 3.61 | 12.42 | 29.66 | 40 | 8.11963 | |
| | Verum | 10.92 | 6.59 | 0.69 | 4.49 | 9.72 | 18.96 | 30.33 | 40 | | |

Datenbasis: n=160. Werte nicht verfügbar: Radiographie n=2.

Tabelle 4: Radiographie: Befunde der Varianzanalyse (SAS procedure mixed) zur Frage von Unterschieden je nach Präparat, Proband ("pb"), Periode, Untersuchungssequenz ("seq") und letztlich Crossover (erstes, zweites). Die Messwiederholung wurde im varianzanalytischen Modell berücksichtigt (Faktoren Treatment und Subject).

| | Estimate | Error | DF | t Value | Pr > t | Alpha | Lower | Upper |
|---|----------|--------|-----|---------|---------------|-------|---------|--------|
| crossover (1st, 2nd) by treatment interaction | 2.7537 | 1.5778 | 135 | 1.75 | 0.0832 | 0.05 | -0.3667 | 5.8742 |

Abb. 21: Kein Crossover-Effekt bei der Radiographie zwischen den Hauptuntersuchungen 1,2 und 3,4.

Gravimetrie Unterschiedlichkeit Crossover?

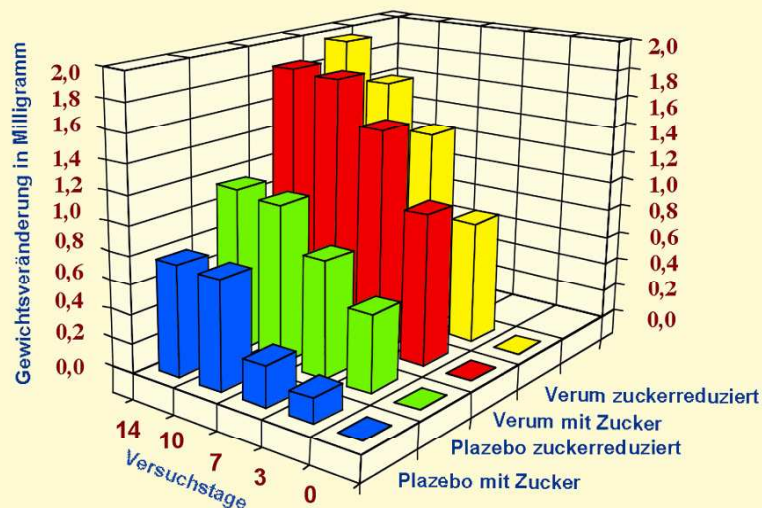


Abb. 22: Zusammenfassende Übersicht über die gravimetrischen Messergebnisse in allen 4 Gruppen.

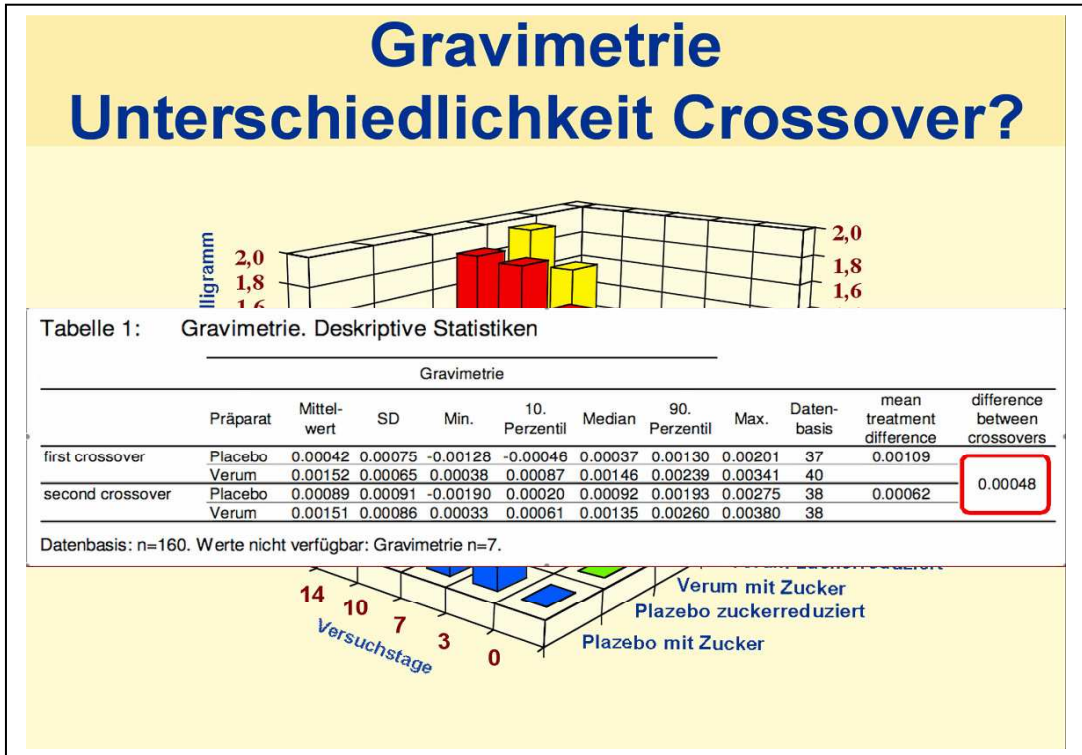


Abb. 23: Deskriptive Statistik zur Frage nach Unterschiedlichkeiten zwischen den beiden Crossover-Versuchsreihen der Gravimetrie.

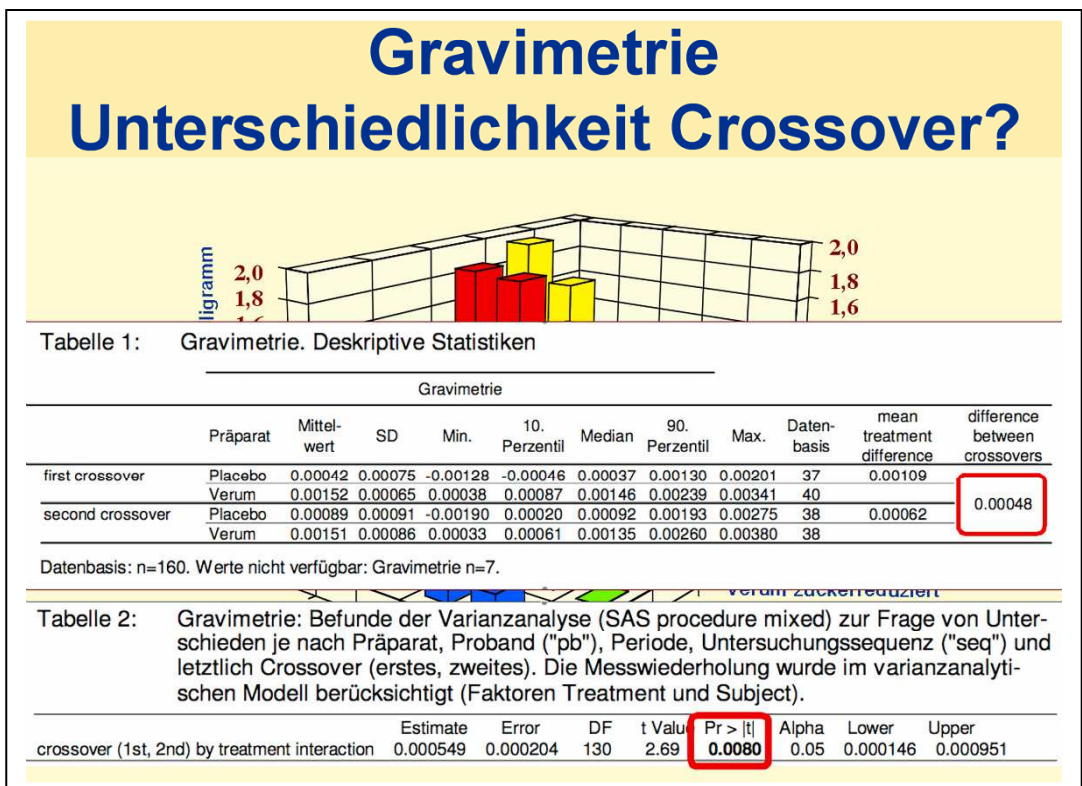


Abb. 24: Kein Crossover-Effekt bei der Gravimetrie zwischen den Hauptuntersuchungen 1,2 und 3,4.

3.3.1. Die statistische Analyse des in-situ Experimentes

Die statistische Analyse des Datenmaterials erfolgte mithilfe des Statistikprogramms „Systat“ als multifaktorielle Varianzanalyse. Die verwendete Varianzanalyse basiert auf so genannten gemischten varianzanalytischen Modellen und wurde mehrfaktoriell mit den Faktoren Treatments, Probanden, Crossover, Präparaten Untersuchungszeitpunkte und Untersuchungssequenzen unter Berücksichtigung der Messwiederholungsfaktoren der Behandlung (Treatment und Proband) berechnet.

Die klinische Studie war, wie oben beschrieben, in 2 Abschnitte unterteilt. Im ersten Teil kamen verkaufsübliche, stark zuckerhaltige Fruchtgummis zum Einsatz, im zweiten Teil zuckerreduzierte Fruchtgummiprodukte, die zusätzlich mit dem Zuckeraustauschstoff Sorbit angereichert waren.

Der erste Abschnitt über 2 mal 2 Wochen wird im Folgenden als Hauptuntersuchung 1,2 (Crossover I) bezeichnet, der zweite Abschnitt mit den zuckerreduzierten Produkten als Hauptuntersuchung 3,4 (Crossover II).

Nachfolgend sind die wesentlichen Ergebnisse der klinischen Studie zusammengefasst. Es sei vorweggenommen, dass sich die Behandlungssequenz bei allen Untersuchungen signifikant als nicht bedeutsam erwiesen hatte, was bedeutet, dass kein carry-over Effekt stattgefunden hatte. Mit anderen Worten: die Reihenfolge, in der die Probanden die Produkte verzehrt hatten, war für die Ergebnisse bedeutungslos.

3.3.2. Allgemeine Beschreibung der Messkurven

3.3.2.1. Die Achsen

Auf der X-Achse der Diagramme in Abb. 15 bis 17 sind die Untersuchungstermine aufgetragen. Bei t₀ wurden die Proben erstmals gemessen und anschließend an die Probandinnen ausgegeben. t₁ - t₄ entsprechen den Untersuchungsterminen nach 3, 7, 10 und 14 Tagen.

Die Y-Achse zeigt in den Diagrammen zur Radiographie (Abb. 15 und Abb. 17 links) die Extinktion beim Durchgang des Röntgenstrahls durch die Küvette, der sich in der in-situ Messung nur aus der Extinktion der Probe ergibt. Die Extinktion ist auch hier ausgedrückt durch die ermittelten Aluminiumäquivalente.

In den Diagrammen zur Gravimetrie stellt die Y-Achse die Gewichtsveränderung in mg dar.

3.3.2.2. Bedeutung der Kurven

Die roten Kurven in Abb. 15 bis 17 geben die Messergebnisse des Verums, die blauen Kurven die des Placebos wieder. Ein Ausschlag nach oben bedeutet jeweils eine Erhöhung der Absorption im Messstrahl beziehungsweise eine Massenzunahme und damit eine Mineralzunahme. Ab Abb. 19 wurde bei Verum und Placebo jeweils noch zwischen zuckerhaltigem und zuckerreduziertem Fruchtgummi unterschieden. Zur besseren Darstellung der Mineral- bzw. Gewichtszunahme dieser vier Fruchtgummichargen wurden ab Abb. 20 Balkendiagramme erstellt.

3.3.3. Vergleich der Massenbilanzen von Placebo- und Verum-Fruchtgummimasse

Da bis zum Zeitpunkt **t₀** noch keine de- oder remineralisierenden Effekte auftreten konnten, entspricht dieser Wert unserem Nullwert und ist bei Placebo- und Verum-Produkt gleich.

Zum ersten Untersuchungstermin nach 3 Tagen kann bei den Verum-Produkten gravimetrisch und radiographisch ein deutlicher Mineralzuwachs verzeichnet werden, der zum Großteil auf die in den Fruchtgummis enthaltene calciumhaltige Salzhydratschmelze zurückzuführen sein dürfte. Einen kleinen Teil steuert hier auch die Remineralisationswirkung des Speichels bei.

Bei den Placebo-Produkten kann ebenfalls ein geringer Mineralzuwachs verzeichnet werden, der aber wohl allein auf den remineralisierenden Einfluss des Speichels zurückzuführen ist. Die eher demineralisierende Wirkung des Placebos, das ja nur zweimal täglich 20 min wirkt, wird durch die Wirkung des Speichels ausgeglichen. In die Apatittabletten wird sogar etwas Mineral eingelagert.

Auch nach 7, 10 und 14 Tagen sind wieder jeweils deutliche Mineralzunahmen bei den Verum-Produkten und geringe bei den Placebo-Produkten festzustellen. Im Crossover I des Radiographie-Diagramms wurde bei dem Placebo-Produkt sogar eine Demineralisation in den letzten 4 Tagen gemessen (Abb. 15).

Der Kurvenverlauf im Crossover I ist dem des Crossover II sehr ähnlich. Bei den Placebo-Produkten fällt auf, dass das zuckerreduzierte Placebo etwas mehr Remineralisation bewirkte als das zuckerhaltige. Bei den Verum-Produkten ist nach 3, 7 und 10 Tagen das zuckerhaltige Produkt sowohl radiographisch als auch gravimetrisch noch leicht im Vorteil, am Tag 14 konnte jedoch das zuckerreduzierte Produkt einen leicht höheren Mineralisationswert erzielen (Abb. 19).

Die Gewichtsbilanz fällt sowohl bei den Verum- als auch bei den Placebo-Produkten höher aus als die, die man aus der Radiographie mit Hilfe des Aluminium-Hydroxylapatit-Äquivalents und der Probenfläche errechnet. Grund hierfür sind die organischen Auflagerungen auf den Proben, die zwar in der gravimetrischen Untersuchung erfasst werden, röntgenologisch aber nicht messbar sind, da hierbei nur anorganisches Material den Röntgenstrahl schwächt.

Die Massenbilanz zeigt bezüglich der Lokalisation der Messstellen (dem Zahn bzw. der Wange zugewandt) keinen bedeutungsvollen Unterschied. Zwar war in der gravimetrischen Untersuchung Crossover I die dem Zahn zugewandte Apatittablette leicht überlegen, aber auch hier dürfte der Grund in den organischen Auflagerungen zu suchen sein. Bei der Bürstenreinigung, die die Probandinnen nach Anweisung durchführten, wurden die Tabletten, die der Wange zugewandt waren, mit der Zahnbürste besser erreicht und gereinigt als die dem Zahn zugewandte, wodurch auf letzterer mehr organische Ablagerungen verblieben, die nur gravimetrisch miterfasst wurden.

3.3.4. Auswertung der Ergebnisse

Folgendes kann festgestellt werden:

- Sowohl die gravimetrisch als auch die radiographisch gemessene Mineralbilanz ist in allen Proben positiv.
- Die Gewichtsbilanz ist sowohl in Crossover I als auch in Crossover II größer als die aus der Röntgenopazität (mit Hilfe des Aluminium-Hydroxylapatit-Äquivalents und der Probenfläche) berechnete.
- Der Unterschied in der Gewichtsbilanz weist auf organische Ablagerungen hin.
- Dieser Unterschied ist bei der Probe, die zum Zahn hin gewendet war, kleiner als bei der Probe mit offen liegender Oberfläche.
- Die zuckerreduzierte Variante brachte beim Placebo tendenziell positivere Ergebnisse.
- Das zuckerreduzierte Verum konnte erst nach 14 Tagen eine bessere Remineralisation bewirken als die zuckerhaltige Variante.

Die Menge an Mineral, welche von den Proben aus standardisiertem, künstlichem Zahnschmelz während der zweiwöchigen Tragezeit unter der Wirkung von Speichel und gelöstem Fruchtgummi aufgenommen worden ist, wurde sowohl röntgenradiographisch als auch gravimetrisch bestimmt.

Dabei ergaben sich die folgenden Resultate, welche die **Quantität** an eingebautem Mineral betreffen:

1. Der Effekt aller Salzhhydratschmelze-haltigen Fruchtgummis ist signifikant größer als der der Placebopräparate
2. Die Salzhhydratschmelze-haltigen Fruchtgummis bewirken einen signifikant größeren Mineraleinbau als herkömmliche fluoridhaltige Zahncremes, wie aus früheren gleichgearteten Untersuchungen abgeleitet werden kann [59].

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass trotz des Verzehrs von zuckerhaltigen Fruchtgummiprodukten das Gleichgewicht zwischen Demineralisation und Remineralisation an der Zahnoberfläche nicht nur stationär gehalten wird, sondern sogar zugunsten der Remineralisation verschoben wird, sofern die Fruchtgummiprodukte mit einer calciumhaltigen Salzhhydratschmelze angereichert sind.

3.3.5. Härtemessung

Etwa 3 Monate nach Beendigung der klinischen Studie wurden an den Probenkörpern nachträglich die Vickers-Härte bestimmt. Bis dahin waren sie trocken in abgeschlossenen Behältern unter Raumtemperatur aufbewahrt worden.

Die Härtemessung erfolgte mit dem Leitz-Durimeter (Abb. 25) und einem Auflagegewicht von 2N. Die Diagonalenlängen wurden optisch vermessen und



addiert.

Während der Härtebestimmung war dem Untersucher nicht bekannt, welche Art von Probenkörper vorlag.

Da die Daten normalverteilt waren, konnten sie mit Hilfe der parametrischen Statistik bearbeitet werden. Es zeigte sich auch bei der Härtemessung eine hochsignifikante Verumüberlegenheit mit einer zweiseitigen Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 0,001%.

Abb. 25: Leitz-Durimeter zur Härtemessung

Die Werte der addierten Diagonalenlängen (Mittelwert \pm Standardfehler des Stichproben-Mittelwertes):

Verum: $83,71 \pm 0,421$

Plazebo: $87,59 \pm 0,57$

Eine kürzere Diagonalenlänge bedeutet einen härteren Werkstoff, da die Diamantpyramide weniger tief in ihn eindringen kann. Dies besagt im vorliegenden Fall, dass die Verum-Probenkörper hochsignifikant härter waren als die Placebo-Proben.

4. Diskussion

Es ist bekannt, dass die Kariesaktivität durch das Ungleichgewicht zwischen Demineralisation (durch Zuckeraufnahme und Bakterien) und präventiven Faktoren gekennzeichnet ist [6, 24, 43]. Inzwischen ist es weltweit gelungen, bei vielen Kindern eine Neutralisation der kariogenen Angriffe durch präventive Faktoren zu erzielen [58].

Das Mundgesundheitsverhalten in der Bevölkerung hat sich gegenüber Befunden einer kariesepidemiologischen Studie von Patz und Naujoks im Jahre 1980 bis heute nachweislich verbessert [50]. Aus einer damaligen Studie von Gülzow et al., geht eindeutig hervor, dass das Zahn- und Mundpflegeverhalten ausgesprochen ungenügend war und zudem bezüglich Zeitpunkt, Zeitdauer und Putztechnik nicht den heutigen Standards entsprach [26, 27].

Die Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie 2006 belegt nun eindrucksvoll, dass sich die Zahngesundheit der deutschen Bevölkerung, insbesondere die der Jugendlichen, seitdem erheblich gebessert hat [47]. Es putzen sich nach eigenen Angaben heute 94 bis 98 Prozent aller Befragten wenigstens einmal täglich die Zähne, 61 bis 90 Prozent sogar zweimal täglich [28].

Ganz allgemein wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Untersuchungen zur Epidemiologie, Kariesätiologie und den Risikofaktoren durchgeführt [10]. Als eines der herausragenden Ergebnisse wurde festgestellt, dass bei dem angesprochenen Caries Decline der vergangenen 20 Jahre unzweifelhaft die kariespräventive Wirksamkeit der Fluoride eine entscheidende Rolle gespielt hat [25, 41, 46]. Systematische Literaturübersichten und Stellungnahmen von Experten zur Effektivität von Maßnahmen der Kariesprävention belegen dies eindrucksvoll [9, 30, 42, 43, 44]. Nach heutiger Erkenntnis ist eine Reduktion der prophylaktischen Maßnahmen automatisch mit dem Risiko verbunden, das entstandene Gleichgewicht wieder zu Gunsten höherer Kariesaktivität zu verschieben.

Von zusätzlicher Bedeutung für das Kariesrisiko und für dessen Bekämpfung ist die Tatsache, dass bei Jugendlichen ein ungleicher Kariesrückgang zu verzeichnen war: etwas 25 % der sogenannten Karies-Hochrisikokinder entwickeln ungefähr 75 % der registrierten kariösen Defekte [58].

Auf Grund Medline-basierter Literaturübersichten darf geschlussfolgert werden, dass zwar verschiedene Methoden zur Identifikation solcher Kariesrisikokindern entwickelt

wurden, es jedoch häufig schwierig ist, diese in gezielte Programme umzusetzen [32, 54].

Als vermutlich bestimmende Faktoren für den Karieszuwachs werden Erziehung und Deprivation genannt [29]. In diesem Zusammenhang sollte nicht unerwähnt bleiben, dass z.B. deutsche Gymnasiasten nur halb so viel Karies erfahren haben wie Haupt- oder Realschüler [46].

Inzwischen gibt es wieder Hinweise für einen erneuten Kariesanstieg und Zunahme der Behandlungsbedürftigkeit, insbesondere bei Milchzähnen. So kam es zwischen 2000 und 2004 in mehreren Bundesländern zu einem geringen Kariesanstieg, während ein Rückgang in den anderen Bundesländern nur minimal bzw. nicht nachweisbar war.

Auch in der Gruppe der Sechsjährigen kommt es derzeit wieder zu einem hohen Kariesanstieg. Gerade der sich ändernde individuelle Lebensstil und ein verändertes Gesundheitsverhalten wirken sich direkt auf die Mundgesundheit aus. Und eine schlechte Mundgesundheit kann wiederum gerade das Entstehen von chronischen Erkrankungen begünstigen

Zusammenfassend kann den obigen Ausführung entnommen werden, dass während der letzten 20 Jahre zwar ein deutlicher Caries Decline stattgefunden hat, dass dieser jedoch noch nicht alle Bevölkerungsgruppen erreicht hat und dass sogar erste Hinweise darauf hindeuten, dass in bestimmten Bevölkerungsgruppen eine Umkehr der Kariesreduktion eingetreten ist. Aus diesem Grunde ist es ratsam, nicht nur die bewährten Strategien der Kariesprophylaxe fortzuführen, sondern auch nach Alternativen bzw. Ergänzungen zu forschen.

Ein neuer Ansatz der Kariesprophylaxe wurde in der vorliegenden Studie untersucht. Das Vorgehen orientiert sich dabei am Vorbild der Natur, die uns unbemerkt vorführt, was gezielte Mineralisation am frisch durchgebrochenen Zahn bewirken kann: Die sog. primäre und sekundäre Schmelzreifung (vor dem Durchbruch des Zahnes in die Mundhöhle) führt den Zahnschmelz nicht zum erwünschten vollkommenen Endzustand, der zeitlebens die uneingeschränkte Integrität des Zahnes garantieren könnte. Deshalb schließt sich nach dem Durchbruch der Zähne die tertiäre Schmelzreifung im Sinne einer posteruptiven Mineralisation an. Diese geht ohne sichtbare Grenze in die Phase der ständigen Wechselbeziehungen zum Mundhöhlenmilieu über. Sie endet erst mit dem Verlust des Zahnes.

Die posteruptive Schmelzreifung ist durch Vorgänge charakterisiert, die die Zahnoberfläche in ihrer Qualität verbessern, während sich die später ablaufenden und lebenslang andauernden Vorgänge auf die Erhaltung dieser Qualität orientieren.

Der Schmelz des durchbrechenden Zahnes ist noch nicht voll mineralisiert. Zwischen den Kristalliten befinden sich schmale Mikrospalten und Poren. Auch die Grenzen der Schmelzprismen sind mit Spalträumen durchsetzt. Sie können weit in die Tiefe reichen. Kleinere Moleküle können diese Mikrokapillaren und Mikroporen passieren. Entlang der Mikrokanäle können Substanzen dann aus der Mundhöhle bzw. dem Außenmedium des Zahnes in den Schmelz eindringen bzw. mit dem Flüssigkeitsstrom des Schmelzliquors, der von der Zahnaußenfläche nach innen verläuft, transportiert werden. Dadurch wird der fehlende Stoffwechsel des Schmelzes teilweise ausgeglichen [7].

Es finden chemische Reaktionen statt, die seine Zusammensetzung verändern, seine passive Widerstandskraft fördern oder auch schwächen. Der Anteil des Carbonatapatits in den Oberflächenarealen des Schmelzes wird auf diese Weise verringert. Die Mineralionen gelangen aus dem Speichel über Plaque und Zahnoberhäutchen in den Schmelz und wandeln dort auf dem Wege des Ionenaustausches die vorliegende leichter lösliche Hartsubstanz in den schwer löslichen Hydroxylapatit oder gar Hydroxyfluorapatit um. Die Kristallite sind in der Lage, durch Wachstum die Mikroporen zu verschließen. Die Mikrokapillaren werden nach und nach verengt. Innerhalb weniger Wochen besitzt der Schmelz in der Regel eine genügend hohe Kompaktheit. Die entscheidenden abdichtenden Vorgänge finden weiterhin an der eigentlichen Oberfläche ab, wo sie ständig ablaufen. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass mit dieser Mineralisation lediglich Spalten im submikroskopischen Bereich (Freiräume zwischen Kristalliten u. a.) geschlossen werden können. Größere Defekte können nicht restauriert werden. Trotzdem nimmt der Mineralgehalt des Schmelzes postnatal um etwa weitere 20% zu und gelangt in ein Endstadium [7].

Während der ständige Kontakt zu den Ionen der Mundflüssigkeit und des Speichels an Glatflächen des Zahnes gewährleistet ist, entstehen im Kontaktbereich und im Sulkusgebiet Schwierigkeiten durch die dort veränderten Strömungsverhältnisse. Auch die Fissuren entziehen sich teilweise wegen ihrer anatomische Form und Lage

der mineralisierenden Wirkung des Speichels. Der Fissurenschmelz gelangt infolgedessen nie oder nur in breiten Fissuren zu völligen Ausreifung.

Es sei noch einmal verdeutlicht, dass diese unverzichtbare Mineralisation, die sog. tertiäre Schmelzreifung unreifer frisch durchgebrochener Zähne durch den Speichel bewirkt wird, dem die Zähne nach ihrem Durchbruch ausgesetzt sind. Speichel stellt bekanntlich eine etwa zweifach übersättigte Lösung an Calciumionen dar, die u. a. für die Kristallbildung bei der Mineralisation und ggf. bei der Remineralisation von porös gewordenem Schmelz verantwortlich sind.

Es ist unstrittig, dass dem Calcium bei den chemischen Abläufen einer De- und Remineralisation von Zahnschmelz eine besondere Bedeutung zukommt. Was die Auflösung von Zahnschmelz anbetrifft, so gehorchen die chemischen Reaktionen dem Massenwirkungsgesetz. $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ wird sich umso schwächer lösen, je höher die Konzentration aller für den (Wieder-)Aufbau in Frage kommenden Ionen im Außenmedium ist [40]. Die Ionen werden physiologischerweise aus dem Speichel bzw. aus der Plaque an die Zahnoberfläche gebracht und wirken dessen Auflösung entgegen. Schon 1961 war es Ahrends [1] gelungen, signifikante Unterschiede zwischen kariesfreien und kariesaktiven Individuen nachzuweisen: Die Plaqueflüssigkeit der Kariesfreien enthielt viel mehr Calcium und Phosphat, d.h. auch bei starker Säurebildung konnte in ihrer Plaque noch lange Übersättigung aufrechterhalten werden [55]. Pearce u. Mitarb. konnten 1984 klinisch experimentell an calcium-, phosphat- und fluoridreicher Plaque folgendes beobachten: erstens führe bakterielle Zuckervergärung gegenüber der Kontrollplaque zu geringerem pH-Abfall; zweitens wurde die mineralreiche Plaque trotz Säurebildung kaum untersättigt, und drittens wurde der unterliegende Schmelz nicht entkalkt – im Gegensatz zum Schmelz unter mineralarmer Kontrollplaque [51].

Für alle Calciumphosphate ist die Sättigungskonzentration durch das Löslichkeitsprodukt bestimmt, im Falle von Hydroxylapatit

$$(K_{Lp})_{\text{HAP}} = f(\text{C}_{\text{Ca}^{2+}})^{10} \cdot (\text{C}_{\text{PO}_4^{3-}})^6 \cdot (\text{C}_{\text{OH}^-})^2$$

wobei (C_i) die Konzentration der betreffenden Ionenart und f eine durch die Ionenstärke bestimmte Konstante darstellen. Damit ist die Stabilität z. B. der Calciumphosphatphase HAP in Lösung außer vom pH noch stärker von der Konzentration der Calcium- und der OH-Ionen anhängig (Margolis u. Mitarb, 1985 [45]).

Aufgrund der Löslichkeitsprodukte hat ten Cate [13] die „Löslichkeits-Isothermen“ für die wichtigsten Calciumphosphatphasen berechnet (s. Abb. 4 auf Seite 8). Daraus ergibt sich als wesentliche Aussage, dass die Sättigungskonzentration und somit auch die Löslichkeit von Calciumphosphatverbindungen in entscheidendem Maße vom pH-Wert abhängig sind.

Aus der aufgeführten Formelgleichung für das Löslichkeitsprodukt von Hydroxylapatit $(K_{Lp})_{HAP} = f(C_{Ca^{2+}})^{10} \cdot (C_{PO_4^{3-}})^6 \cdot (C_{OH^-})^2$ ergibt sich, dass dem Calcium bezüglich der Hemmung der Löslichkeit und somit auch bezüglich einer Diffusionsumkehr des Calciums vom Außenmedium in den Zahnschmelz hinein eine entscheidende Rolle zukommt, da es mit dem Potenzfaktor 10 auftritt. Der Potenzfaktor des Phosphats ist demgegenüber beinahe vernachlässigbar klein.

Die Erkenntnisse um die Bedeutung des Calciums und der Lösungsisothermen bezüglich Calciumphosphatverbindungen hatten ten Cate bereits 1982 [14] veranlasst, Remineralisationsversuche mit sog. „pH-Wechselbädern“ durchzuführen. Das bedeutet, dass er demineralisierte Schmelzproben abwechselnd stundenlang in Demineralisationslösung bzw. anschließend in Remineralisationslösung einlegte. Er kam u. a. zu dem Ergebnis, dass die Auflösung von Schmelz durch Ca^{2+} und andere Kationen sowie durch Anionen in Abhängigkeit vom Zeitprofil und den Konzentrationen der verwendeten Lösungen unterdrückt werden kann.

Die Ergebnisse der pH-Wechselbäder stagnierten allerdings, weil ihnen ein entscheidendes Element fehlte, das auch bei der angesprochenen tertiären Schmelzreifung bedeutsam sein dürfte: die zyklisch-dynamische Veränderungen der Ionen-Konzentrationen an der Zahnoberfläche. Es hat sich gezeigt [33], dass das Zeitprofil sich dynamisch verändernder pH-Schwankungen zu ungleich besseren Remineralisationsraten führt als das statische Modell von ten Cate [31].

In der vorliegenden Studie war versucht worden, mit den Erkenntnissen aus der Remineralisationsforschung eine weitere ergänzende Methode zur Kariesprophylaxe zu untersuchen. Aufbauend auf den Erkenntnissen

- Speichel remineralisiert unreifen frisch durchgebrochenen Zahnschmelz
- Calcium ist der entscheidende Faktor bei der Remineralisierung
- Statischer Wechsel vom Remineralisationsmedium ist nicht so wirksam wie dynamischer
- Das Ernährungsverhalten hinsichtlich Zucker lässt sich nur schwer beeinflussen

sollte versucht werden, eine remineralisierende Süßware zu entwickeln und ggf. die Grenzen der Remineralisierbarkeit initialer Karies zu verbessern [34].

Eines der wesentlichen Probleme bei der Entwicklung war die Antwort auf die Frage, wie eine an ungebundenem Calcium hohe Konzentration in einem Lebensmittel geschaffen werden kann. Die bekannten Calciumverbindungen sind entweder nicht (Calciumcarbonat 0,014 g/l) oder nur schwer löslich (z.B. Calciumlactat 66 g/l, Calciumgluconat 30 g/l) oder sie besitzen einen abstoßenden, nicht übertünchbaren Geschmack wie das Calciumchlorid.

In der vorliegenden Studie fand erstmals eine Salzhydratschmelze Anwendung, die sich durch eine besonders hohe Calciumkonzentration auszeichnet, dabei angenehm säuerlich schmeckt und extrem wasserarm ist. Bei der Salzhydratschmelze handelt es sich um eine unterkühlte Schmelze aus den ehemals kristallinen Edukten Calciumlactat, -gluconat, Milchsäure und Zitronensäure. Die Schmelze ist amorph, damit unterliegen die darin enthaltenen Ca-Ionen keiner Nahordnung und sind relativ ungebunden und stehen für Reaktionen zur Verfügung. Die Schmelze selber kann mit einer Calciumkonzentration bis etwa 2,8 Mol hergestellt werden, was einem Gehalt an freien Calciumionen von etwa 112 g/kg entspricht.

Mit Hilfe dieser Schmelze war es möglich Fruchtgummis herzustellen, die 8 g Calciumionen/kg enthalten. Röntgendiffraktometrische und polarisationsoptische Untersuchungen hatten unzweifelhaft ergeben, dass auch in Fruchtgummis, denen die Schmelze zugegeben war, keine Rekristallisation stattgefunden hatte und die Calciumionen ungebunden vorlagen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie entsprachen den Erwartungen, die auf Grund der zahlreichen in-vitro Studien gehegt wurden. Vergleichend getestet wurde die Remineralisationswirkung von Fruchtgummis mit bzw. ohne Zugabe eines Calciumkonzentrats. Da die Remineralisationswirkung geprüft werden sollte, konnte nicht mit gesundem Zahnschmelz gearbeitet werden. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen an künstlichem Hydroxylapatit durchgeführt, der so eingestellt war, dass er 40 Prozent Poren (vergleichbar den Poren im demineralisierten Zahnschmelz) enthielt. Diese Methode ist seit Aoba und anderen [4, 48, 53] für diese Fragestellung anerkannt.

Es wurde bewusst darauf verzichtet, Phosphationen ebenfalls in hoher Konzentration zuzufügen. Zum einen wird immer wieder angeführt, Phosphat verursache Aufmerksamkeitsstörungen und Hyperaktivität. Ein Beweis für diese These steht ebenso aus wie ein Gegenbeweis. Weiterhin sollte der Gefahr vorgebeugt werden, dass Calcium und Phosphat vorzeitig reagieren und sich evtl. als Zahnstein niederschlagen und drittens ist Phosphat im Speichel und insbesondere im stimulierten Speichel, der bei Fruchtgummiverzehr unweigerlich auftritt, überreichlich vorhanden. Zwar sinkt der Gehalt an anorganischem Phosphat mit Beginn der Speichelstimulation auf etwas über die Hälfte ab, um dann langsam und stetig wieder anzusteigen, aber wegen der durch die Stimulation stark erhöhten Fließrate (bis zum 5fachen gegenüber unstimulierten Speichel) erhöht sich automatisch der für die Remineralisation verfügbare Phosphatgehalt [12].

Für die durchgeführten in-vitro und in-situ Versuche gelangten vier verschiedene Fruchtgummiprodukte zum Einsatz: Placebo (ohne Zusatz der calciumhaltigen Schmelze), Verum (mit calciumhaltiger Schmelze) sowie jeweils eine zuckerreduzierte Variante dazu.

Die radiographisch und gravimetrisch durchgeführten Untersuchungen zeigten deutlich, dass die Verumprodukte den Testschmelz signifikant besser remineralisieren als die Vergleichsprodukte ohne Wirkstoff. Das ist auch nicht verwunderlich, betrachtet man die Tatsache, dass der menschliche Speichel physiologischerweise etwa doppelt mit Calcium übersättigt ist, die Fruchtgummilösung jedoch 100- bis 200-fach. Zwar konnten auch bei den Placeboversuchen leicht positive Werte ermittelt werden, diese dürften vorwiegend der Remineralisationsleistung des Speichels zu verdanken sein.

Vergleicht man zuckerreduziertes und zuckerhaltiges Verum, so entfaltete das zuckerreduzierte Produkt bis zum 10ten Versuchstag eine leicht geringere Remineralisationwirkung als das zuckerhaltige, am 14ten Versuchstag jedoch erbrachte es leicht höhere Werte. Gründe für den nicht signifikanten Unterschied dürften in der Streuung der Messergebnisse begründet sein, so dass man sagen kann, dass zuckerhaltiges und zuckerreduziertes Verum vergleichbare Remineralisationswirkung haben.

Ähnlich verhält es sich beim Vergleich der beiden Placebo-Produkte. Die zuckerreduzierte Form ist stets leicht im Vorteil, wobei auch hier der Unterschied vernachlässigbar klein ist.

Um möglichst reale Verhältnisse nachzuahmen, wurde ein zu testender Prüfkörper der Wange und ein zweiter im Abstand von ca. 0,5 mm dem Zahn zugewandt, um so den schwer zu reinigenden Zahnzwischenraum zu simulieren. Die Untersuchungen ergaben, dass bezüglich der Lokalisation keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Remineralisationsleistung bestehen, d. h. der „empfindliche“ Zahnzwischenraum wird durch das calciumhaltige Fruchtgummi ebenso gut erreicht wie die Außenflächen. Zwar zeigten sich bei den gravimetrischen Analysen höhere Werte an den zum Zahn gewandten und damit schwer zugänglichen Proben, diese sind aber auf vermehrte organische Ablagerungen zurückzuführen, da ja dieser Bereich auch mit der Zahnbürste nur schwer erreicht wurde. Dabei ist zu bedenken, dass die aussagekräftigere Mikroradiographie nur die Massenbelegung durch anorganische Feststoffe, nicht jedoch die organischen Ablagerungen erfassen kann. Diese werden bei der Gravimetrie jedoch mitbestimmt.

Nach Abschluss aller Untersuchungen wurden an allen Tabletten Härtemessungen mit einem Leitz-Durimeter durchgeführt. Die Ergebnisse bestätigen die Wirksamkeit der Verum-Produkte. Proben, die mit Verum behandelt wurden, waren anschließend härter als die, die dem Placebo ausgesetzt waren.

Die vorgestellten Untersuchungen belegen, dass mit Salzhydratschmelze angereicherter Fruchtgummi beim Verzehr poröse Hydroxylapatitproben röntgendichter, härter und schwerer macht als Fruchtgummi ohne Calciumkonzentrat. Alle Befunde sprechen dafür, dass dadurch der zu schützende Schmelz härter, mineralreicher und somit resistenter gegen Karies wird.

5. Literaturverzeichnis

- [1] **Ahrens G:** Beziehungen zwischen dem Phosphatgehalt des Speichels und Karies. Arch Oral Biol 6 (1961)
- [2] **Almqvist H, Lagerlöf F, Angmar-Mansson B:** Automatic pH-cycling caries model applied on root hard tissue. Caries Res 24, 1-5 (1990)
- [3] **Anderson P, Elliott JC:** Scanning X-ray microradiographic study of the formation of caries-like lesions in synthetic apatite aggregates. Caries Res 19 (1985)
- [4] **Aoba T, Moriwaki Y, Doi Y, Okazaki M, Takahashi J:** The intact surface layer on natural enamel caries and acid dissolved hydroxyapatite pellets. J Oral Path 10 (1981)
- [5] **Arends J, ten Bosch JJ:** Demineralization and remineralization evaluation techniques. J Dent Res 71, Spec No: 924-8 (1992)
- [6] **Baca P, Junco P, Bravo M, Baca AP, Munoz MJ:** Caries incidence in permanent first molars after discontinuation of a school-based chlorhexidine-thymol varnish program. Community Dent Oral Epidemiol 31 (2003)
- [7] **Binus W, Pilz MEW und Stiefel A:** Initialkaries. Johann Ambrosius Barth, Leipzig (1987)
- [8] **Bodky, J:** Einfluss der pH-Anstiegsrate auf die Effizienz der Remineralisation initialer Karies bei Anwendung einer fluoridfreien Remineralisationslösung. Med. Dissertation Würzburg (1991)
- [9] **Brambilla E, Toselli A, Felloni A, Gagliani M, Malerba A, Strohmenger L:** The effect of biannual applications of amine fluoride solution on caries incidence in permanent first molars: a 5-year study. Int J Paediatr Dent 7 (1997)

- [10] **Bratthall D, Hänsel P, Sundberg H:** Reasons for the caries decline: what do experts believe? *Eur J Sci* 104 (1996)
- [11] **Brown WE, Chow LC:** US patent, No. 4, 612,053 (1986)
- [12] **Burkhardt D, Gülzow D-J:** Der Einfluß von Kaugummi auf Speichelparameter. *Oralprophylaxe* 25 (2003)
- [13] **ten Cate, JM:** A Remineralization of Enamel Lesions. A Study of the Physico-chemical Mechanism. *Naturwiss. Diss. Groningen* (1979)
- [14] **ten Cate JM, Duijsters PP:** Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res* 16, 201-10 (1982)
- [15] **ten Cate, JM:** A model for enamel lesion remineralization. In: *Demineralisation and remineralization of the teeth*. SA Leach and WM Edgars eds. IRL Press, Oxford (1983)
- [16] **ten Cate JM, Larsen MJ, Pearce EIF, Fejerskov O:** Chemical interactions between the tooth and oral fluids. In: *Fejerskov O, Kidd EAM, editors. Dental Caries: The Disease and its Clinical Management*. Blackwell: Munksgaard, 49-69 (2003)
- [17] **Cser S, Klinger HG, Wiedemann W:** Quantitative on-line determination of mineral deposition in porous hydroxyapatite pellets by X-ray absorption. *Caries Res* 27 (1993)
- [18] **Cser S, Klinger HG, Wiedemann W:** Mineralization with a cycling pH-regime – The effect of the initial phase at pH 4.5. *ORCA* (1996)
- [19] **van Dijk JWE, Borggreven JMPM, Driessens FCM:** Chemical and mathematical simulation of caries. *Caries Res.* 169 – 180 (1979)
- [20] **Emons H-H, Voigt W:** Zur Chemie geschmolzener Salze, *Sitzungsber. AdW DDR* 15 N (1981)

- [21] **Featherstone JDB, ten Cate JM, Shariati M und Arends J:** Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res* 17 (1983)
- [22] **Featherstone JDB:** Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol*, 27 (1999)
- [23] **Fischer S:** Anorganische Salzhydratschmelzen – ein unkonventionelles Löse- und Reaktionsmedium für Cellulose. Habilitationsschrift Freiberg (2003)
- [24] **Gillham J, Lennon D:** The biology of children of Hopewood House, Bowral, N.S.W.II, Observations extending over five years (1952-1956), 4. Dietary Survey. *Austr Dent J* 3 (1958)
- [25] **Glass R:** The first international Conference of the declining prevalence of dental caries. *J Dent Res* 61 (1982)
- [26] **Gülzow H-J, Busse G:** Klinisch-experimentelle Untersuchungen über die Wirksamkeit verschiedener Zahnputzmethoden und Zahnputzmittel. *Dtsch Zahnärztl Z* 25, 1126-1134 (1970)
- [27] **Gülzow H-J, Labermeier M, Pohl U:** Mundhygiene bei Wehrpflichtigen aus Nord- und Süddeutschland. *Kariesprophylaxe* 3 (1981)
- [28] **Gülzow HJ, Kiene B:** Eine 25-jährige Erfolgsgeschichte. *ZM* 96, Nr. 6 (2006)
- [29] **Guindy J, Weber C, Meyer J:** Die Zahngesundheit von 7- und 12-jährigen Schülerinnen und Schülern im Kanton Solothurn. *Acta Med Dent Helv* 5 (2000)
- [30] **Hausen H, Karkkainen S, Seppa L:** Application of the high risk strategy to control dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 28 (2000)

- [31] **Jahns R:** Einfluss der pH-Anstiegsrate auf die Effizienz der Remineralisation initialer Karies bei Anwendung einer fluoridierten Remineralisationslösung. Med. Dissertation Würzburg (1991)
- [32] **Kay E, Locker D:** A systematic review of the effectiveness of health promotion aimed at improving oral health. *Community Dent Health* 15 (1998)
- [33] **Kleinert, A:** Vergleichende klinische Untersuchung über den Einfluss der forcierten Remineralisation bei der Therapie hypersensibler Zahnhälse. Med. Dissertation Würzburg (1998)
- [34] **Klinger H, Wiedemann W:** Grenzen der Remineralisierbarkeit initialer Karies. *Dtsch Zahnärztl Z*, 40 (1985)
- [35] **Klinger H, Wiedemann W:** A method for radiographic longitudinal study for mineral content during in vitro de- and remineralization of dental enamel. *Archs oral Biol* 30 (1985)
- [36] **Klinger HG:** Die Beeinflussung der Remineralisationsbedingungen im Diffusions-Reaktions-System „Schmelz“ durch zyklische Remineralisation. DFG, unveröffentlicht (1988)
- [37] **Klinger H, Redelberger Th, Wiedemann W:** Digitale Bildverarbeitung in der radiographischen Kariesdiagnostik. *Dtsch Zahnärztl Z* 44 (1989)
- [38] **Klinger H, Cser S and Wiedemann W:** Mineralization with a cycling pH-regime – The effect of the pH-profile and the composition of the pH 6.5 solution. ORCA (1996)
- [39] **Klinger H, Wiedemann W:** Projekt remineralisierender Fruchtgummi. Forschungsbericht Drittmittelforschung Würzburg (2005)
- [40] **König KG: Karies und Parodontopathie: Ätiologie und Prophylaxe.** Thieme Verlag Stuttgart (1987)

- [41] **Künzel W:** Caries decline in Deutschland: Eine Studie zur Entwicklung der Mundgesundheit. Hüthig, Heidelberg (1997)
- [42] **Letters to the Editor:** Community Dent Health 19 (2002)
- [43] **Levine R:** The Aetiology of Dental Caries – An Outline of Current Thought. Int Dent J 27 (1977)
- [44] **Madlena M, Nagy G, Gabris K, Marton S, Keszthelyi G, Banoczy J:** Effect of amine fluoride toothpaste and gel in high risk groups of Hungarian adolescents: results of a longitudinal study. Caries Res 36 (2002)
- [45] **Margolis H, Moreno E, Murphy B:** Importance of high pKA acids in cariogenic potential of plaque. J Dent Res 64 (1985)
- [46] **Marthaler TM, O'Mullane DM, Vrbic V:** The prevalence of dental caries in Europe 1990-1995. Caries Res 30 (1996)
- [47] **Micheelis W, Schiffner, U:** Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV), Deutscher Zahnärzte Verlag (2006)
- [48] **Moreno E, Kresak M, Zahradnik R:** Physiochemical aspects of fluoride-apatite systems relevant to the study of dental caries. Caries Res 11 Suppl 1 (1977)
- [49] **Patz J, Schedl H, Naujoks R:** Kariesepidemiologische Untersuchungen an 15 bis 18-jährigen Oberschülern im Raume Würzburg. Dtsch Zahnärztl Z 22 (1967)
- [50] **Patz J, Naujoks R:** Morbidität und Versorgung der Zähne in der Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland. Dtsch Zahnärztl Z 35 (1980)
- [51] **Pearce E, Hancock E, Gallagher I:** The effect of fluorhydroxylapatite in experimental human dental plaque on its pH, acid production and soluble

calcium, phosphate and fluoride levels following glucose challenge. Arch Oral Biol 29 (1984)

- [52] **Peters J:** Strukturuntersuchungen an Cellulose und Cellulosederivaten aus ionischen Lösemitteln. Dissertation Freiburg (2004)
- [53] **Redelberger T, Klinger HG, Wiedemann W:** Effect of pore topology on the remineralization rate of surface-softened enamel and synthetic hydroxyapatite: an experimental comparison and mathematical model. Caries Res 25 (1991)
- [54] **Schuller A A, Kalsbeek H:** Effect of the routine professional application of topical fluoride on caries and treatment experience in adolescents of low socio-economic status in the Netherlands. Caries Res 37 (2003)
- [55] **Shaw L, Murray A, Burchell K, Best J:** Calcium and phosphorous content of plaque and saliva in relation to dental caries. Caries Res 17 (1983)
- [56] **Silverstone LM:** The surface zone in caries and caries-like lesions. Br Dent J 125 (1968)
- [57] **Silverstone LM:** Remineralization phenomena. Caries Res 11 (1977)
- [58] **Splieth Ch H, Heyduck Ch, König K G:** Gruppenprophylaxe nach dem Caries Decline. Oralprophylaxe & Kinderzahnheilkunde 28(2) 2006
- [59] **Wiedemann W:** persönliche Mitteilung
- [60] **Wiedemann W:** Neue Erkenntnisse über Fluoride und ihre praktische Umsetzung in der Kariesprophylaxe. Symposium des IME. Hamburg (1984)
- [61] **Wiedemann W, Klinger HG, Cser S:** Forcierte Remineralisation von Zahnschmelz. Forschungsvorhaben Nr. 9034, Zwischenbericht AIF (01. 07. 1993 bis 31. 12. 1993)

[62] World Health Organisation: Fluorides and oral health. Technical Report Series 846. WHO, Geneva (1994)

[63] Zimmermann SO: A mathematical theory of enamel solubility and the onset of dental caries. III Development and computer simulation of a model of caries formation (1966)

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde die Remineralisationswirkung von Fruchtgummi-Produkten, die mit einer neuartigen calciumhaltigen Salzhydratschmelze angereichert waren, vergleichend in-vitro und in-situ getestet. Als Vergleich diente in der in-vitro Untersuchung ein handelsübliches Fruchtgummi-Produkt ohne Zusatz der zu testenden Salzhydratschmelze. In der klinischen Studie wurde zusätzlich ein zucker-reduziertes Fruchtgummi-Produkt getestet, dem zum Teil ebenfalls eine calciumreiche Salzhydratschmelze zugefügt worden war.

Die remineralisierende Wirkung der calciumreichen Salzhydratschmelze beruhte auf dem Prinzip der forcierten dynamischen Remineralisation, die sich grundlegend von der remineralisationsfördernden Wirkung von Fluoriden unterscheidet: Durch Absenken des pH-Wertes im Außenmedium des Zahnes kann entsprechend dem Massenwirkungsgesetz sowie des Löslichkeitsproduktes der beteiligten Stoffe die Konzentration an Mineral um ein Vielfaches erhöht werden, ohne dass die Sättigungsgrenze überschritten wird.

Nach Beendigung des Verzehrs des gelösten sauren Fruchtgummis, der zusätzlich mit weiterer Säure und einer amorphen Salzhydratschmelze angereichert ist, steigt durch die Speichelclearance der pH-Wert in dem Umgebungsmilieu des Zahnes dynamisch wieder an, gleichzeitig aber sinkt die Mineralkonzentration drastisch ab. Dadurch bedingt diffundieren aus dem porösen Zahnschmelz sowohl Protonen als auch ein Teil des während der Applikation des Fruchtgummis eingeschleusten Minerals in die Mundhöhle zurück. Wegen der sehr großen Beweglichkeit der H^+ und des nichtlinearen Zusammenhangs zwischen Diffusionszeit und –strecke verarmt der oberflächennahe Bereich schneller an Mineral als die tiefer gelegenen Schichten. In diesen ist das Mineral nach Abzug der H^+ gefangen und schlägt sich wegen des angestiegenen pH-Wertes an den Porenwänden nieder. Auf diese Weise werden durch das zeitliche Konzentrationsprofil, das durch die Applikation vorgegeben ist, sowohl der Ort als auch die Menge des Mineraleinbaus beeinflusst.

Untersuchungen in-vitro dokumentieren einen signifikanten Anstieg der Remineralisationsrate mit dem Fruchtgummi-Produkt, das mit der Salzhydratschmelze angereichert war.

Eine anschließende klinische Studie mit 10 Probanden bestätigte dieses Ergebnis:

Der Fruchtgummimasse wurden wiederum 200 mmol/kg Calcium in Form einer speziell zusammengesetzten amorphen Salzhydratschmelze zugegeben. Diese Schmelze kann Lebensmitteln entweder bei erhöhter Temperatur direkt als nicht kristalline aufgeschmolzene Flüssigkeit oder bei Raumtemperatur als glasartig erstarrte, ebenfalls nicht kristalline unterkühlte Schmelze zugegeben werden. Wegen ihrer besonderen Eigenschaften bilden solche Salzhydratschmelzen innerhalb der Salz-Wasser-Systeme mit steigender Salzkonzentration einen eigenständigen Stoffzustand: Sie sind nicht kristallin, sondern amorph, sie sind leichter löslich als kristalline Salze und sie sind hochkonzentriert und dabei wasserarm, was bei der Herstellung von Lebensmitteln bedeutsam sein kann.

Die Menge an Mineral, die von den Proben aus standardisiertem künstlichen Zahnschmelz während der zweiwöchigen Tragezeit unter der Wirkung von Speichel und gelöstem Fruchtgummi wurde röntgenradiographisch, gravimetrisch und mittels Härtemessung bestimmt.

Dabei ergaben sich zusammengefasst folgende Resultate, die die Quantität an eingebautem Mineral betreffen:

1. Der Effekt aller salzhydratschmelzehaltigen Fruchtgummis ist signifikant größer als der der Plazebopräparate
2. Die schmelzehaltigen Fruchtgummis bewirken einen signifikant größeren Mineraleinbau als herkömmliche Fluoridpräparate in Zahnpasten, wie aus früheren gleichgearteten Untersuchungen abgeleitet werden kann.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass trotz des Verzehrs zuckerhaltiger Fruchtgummiprodukte das Gleichgewicht zwischen Demineralisation und Remineralisation an der Zahnoberfläche nicht nur stationär gehalten wird, sondern sogar zugunsten der Remineralisation verschoben wird, sofern die Fruchtgummiprodukte mit einer calciumhaltigen Salzhydratschmelze angereichert sind.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. dent. Wiedemann, der mich sowohl in die Methodik des experimentellen Arbeitens im Labor einführte als auch später bei der Niederschrift der Dissertation tatkräftig unterstützte. Er war mit stets eine sehr große Hilfe, die oftmals weit über das übliche Maß hinausging. Auch danke ich ihm für die bereitwillige Überlassung der Abbildungen, die in dieser Arbeit Verwendung fanden.

Ich danke Prof. Dr. med. dent. Holste dafür, dass er sich als Korreferent zur Verfügung gestellt hat.

Auch ein ganz besonderer Dank an die „Laborfee“ Helga Dietrich für Ihre unermüdliche Geduld und immer gute Laune im Labor und dass ich stets mit all meinen Fragen zu Ihnen kommen konnte.

Meinen Eltern danke ich für die finanzielle Unterstützung während meiner gesamten Schul- und Studienzeit.

Ich danke außerdem meinem Freund, meiner Patin und meiner Oma, die mir während der Studienzeit stets zur Seite standen und mir immer wieder den nötigen Anstoß zur Vollendung dieser Arbeit gaben.

Lebenslauf

Name: Julia Staebler

15.06.1983 geboren in Rothenburg ob der Tauber

1989 – 1993 Besuch der Grundschule Luitpoldschule in Rothenburg ob der Tauber

1993 – 2002 Besuch des Reichsstädtgymnasiums in Rothenburg ob der Tauber, beendet mit dem Abitur

10/2002 – 11/2007 Studium der Zahnheilkunde an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg, abgeschlossen mit dem Staatsexamen und Approbation als Zahnärztin

seit 12/2007 Vorbereitungsassistentin in Rothenburg ob der Tauber

Rothenburg, Oktober 2008,

(Julia Staebler)