

# Qualitative Befunde bei in situ erzeugter Initialkaries in tumortherapeutisch bestrahltem Dentin

Eine kombiniert rasterelektronenmikroskopische und mikroradiographische Studie

## Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Studie war, den Einfluss einer Radiotherapie auf die In-situ-Entstehung von initialen Demineralisationen bei bestrahlten Dentinproben unter Berücksichtigung unterschiedlicher Mundhygienemassnahmen qualitativ zu erfassen. Insgesamt wurden 48 bestrahlte (60 Gy) und 48 unbestrahlte Proben für fünf Wochen in der Mundhöhle von 12 Probanden mit normalen Speichelfliessraten exponiert. Eine Hälfte der Proben wurde von den Probanden regelmässig mit einer fluoridfreien Zahnpaste geputzt, die andere Hälfte blieb ungeputzt. Anschliessend wurden senkrecht zur Oberfläche laufende Schnitte von 150 µm Dicke präpariert, die mikroradiographisch und rasterelektronenmikroskopisch untersucht wurden. Unter dem Einfluss einer anhaltenden Demineralisation änderte sich die Ultrastruktur des Dentins. Die Grundstruktur blieb jedoch selbst bei massivem Mineralverlust weitgehend intakt. Die Bestrahlung selbst zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Mikrostruktur. Bei regelmässig durchgeführter Mundhygiene kann bestrahltes Dentin gesund erhalten werden. Ein möglicher direkter Bestrahlungseffekt im Dentin zeigt klinisch hinsichtlich einer initialen Demineralisation keine Auswirkung. Das Bild der «Strahlenkaries» scheint demnach in erster Linie auf mangelndem Speichelfluss und schlechter Mundhygiene zu beruhen.

Acta Med Dent Helv 3: 161–168 (1998)

Schlüsselwörter: Dentinkaries, Radiotherapie, In-situ-Studie, REM, TMR

Zur Veröffentlichung angenommen: 1. Juli 1998

## Korrespondenzadresse:

Priv.-Doz. Dr. Andrej M. Kielbassa,  
Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde,  
Poliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie,  
Hugstetter Strasse 55, D-79106 Freiburg  
Tel.: + 49-761-2704888, Fax: + 49-761-2704762

ANDREJ M. KIELBASSA, HANS-GÜNTER SCHALLER  
und ELMAR HELLWIG

Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde,  
Abteilung Poliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

## Einleitung

Da die Karies in erster Linie Zahnkronen befällt, wurden in der Vergangenheit Demineralisationsvorgänge vornehmlich am Schmelz untersucht. Dem Zahnbein wurde demgegenüber vergleichsweise wenig Aufmerksamkeit geschenkt. In besonderem Masse gilt dies für Untersuchungen zum Einfluss der Radiotherapie auf die Kariesentstehung im Dentin. Zu dieser Thematik gibt es in der zugänglichen Literatur nur vereinzelte Hinweise (JERVØE 1970, ZACH 1976), die sich zudem auf klinische Beobachtungen (MÜHLEMANN 1945, WILlich et al. 1988) bzw. auf indirekte und zumeist mit dem Schmelz in Verbindung stehende Folgeerscheinungen stützen (PIOCH & MAYER 1997, POYTON 1968). Bei In-vitro-Versuchen mit bestrahltem Dentin wurde eine im Vergleich zu unbestrahltem Dentin reduzierte Löslichkeit beschrieben (MARKITZIU et al. 1986), die jedoch von anderen Autoren nicht bestätigt werden konnte (RÖSSLER et al. 1995). KIELBASSA et al. (1997a, 1998) haben nach fraktionierter Bestrahlung sowohl bei bovinem als auch bei menschlichem Dentin eine signifikante Verringerung der Mikrohärtigkeit beschrieben. Dies könnte klinische Auswirkungen auf die Kariesentstehung haben. Ziel der vorliegenden In-situ-Studie war daher, die Auswirkung der Bestrahlung auf die Entwicklung einer initialen Dentinkaries bei speichelgesunden Probanden qualitativ zu erfassen, wobei die Auswirkungen einer unterschiedlichen Mundhygiene als begleitende Parameter herangezogen wurden.

## Material und Methoden

### Präparation der Dentinproben

Für diese Untersuchung wurden 48 frisch extrahierte menschliche Weisheitszähne verwendet, die in mesio-distaler Richtung geteilt wurden. Aus den oralen und bukkalen Zahnhalsberei-

chen wurden quaderförmige Dentinproben (ca.  $3 \times 4 \times 2 \text{ mm}^3$ ) unter ständiger Wasserkühlung herauspräpariert, in ein Autopolymerisat (Technovit 4071; Kulzer, Wehrheim, Deutschland) eingebettet und oberflächlich unter geringem Substanzabtrag bis zur vollständigen Entfernung von Zement- und Schmelzresten plangeschliffen (Körnung 4000; Struers, Kopenhagen, Dänemark). Um ein Austrocknen zu verhindern, wurden alle Proben während des gesamten Versuchs in Ringerlösung (DAB 7; Delta-Pharma, Pfullingen, Deutschland) aufbewahrt. Jeweils alternierend wurde anschliessend entweder die orale oder die vestibuläre Dentinprobe jedes Zahnes mit einem Linearbeschleuniger (Clinac 600 C; Varian, Darmstadt, Deutschland) fraktioniert mit insgesamt 30 Bestrahlungszyklen (2 Gy/d, 5 d/W) bis zur Gesamtdosis von 60 Gy bestrahlt. Während der Bestrahlungszyklen lagen die eingebetteten Dentinproben in einem mit Kochsalzlösung gefüllten Wasserbad, das jeweils nach der Bestrahlung gewechselt wurde (Höhe des Flüssigkeitsspiegels 2 cm). Nach Bestrahlungsende wurden die Proben wieder in Ringerlösung gelagert. Die übrigen Dentinproben ( $n = 48$ ) wurden nicht bestrahlt.

### In-situ-Exposition der Proben

Nach Plasmasterilisation im Niedrigtemperaturverfahren (Sterad NTP; Johnson&Johnson ASP, Irvine, CA, USA) wurden von den insgesamt 48 vorbereiteten Dentinproben jeweils zwei bestrahlte und zwei unbestrahlte Proben in die beiden bukkalen Flügel von zwölf intraoralen Befestigungsplatten eingebaut. Die Dentinblöcke wurden dabei auf ihrer Unterseite mit einem dünnen Wachsfilm isoliert und etwa 1 mm tief in autopolymerisierenden Kunststoff (Orthocryl; Dentaaurum, Pforzheim, Deutschland) eingelassen, so dass auf den Proben Plaque aufwachsen konnte.

Zwölf vollbezahnte und zahnmedizinisch suffizient versorgte Probanden (6 männlich, 6 weiblich, durchschnittliches Alter 26,6 Jahre) wurden für den Versuch ausgewählt. Vor Versuchsbeginn wurde die Kariesfreiheit der Probanden klinisch und ggf. röntgenologisch kontrolliert. Die Probanden wurden mündlich und schriftlich über den Zweck der Studie aufgeklärt und nahmen freiwillig an der Untersuchung teil (informed consent). Ein Studienabbruch war jederzeit gewährleistet. Der Ruhespeichel der Probanden lag mit  $0,5 (\pm 0,18) \text{ ml/min}$  im Normalbereich. Anamnestisch wurde eine systemische Medikation mit antibiotischem oder salivationshemmendem Effekt ausgeschlossen.

Die Befestigungsplatten wurden von den zwölf Probanden für einen Zeitraum von fünf Wochen ganztags getragen und lediglich während der Mahlzeiten aus dem Mund entnommen. Während dieser Zeit wurden die Befestigungsplatten in 10%ige Saccharoselösung (Saccharose; Merck, Darmstadt, Deutschland) eingelegt. Die Lösung diente als standardisiertes Substrat für die wachsende Plaque. Die in die linke Seite der intraoralen Befestigungsplatte eingelassenen Dentinproben wurden zweimal täglich mit einer fluoridfreien Zahnpaste (Aronal<sup>®</sup>, Charge aus dem Jahr 1996; Wybert, Lörrach, Deutschland) geputzt (1 min). Die Probanden waren gehalten, die rechte Seite der Befestigungsplatte nur bei grober Verschmutzung oberflächlich unter fließendem Wasser zu reinigen. Hierdurch war ein kontinuierliches Aufwachsen der Plaque gewährleistet. Die häusliche Mundhygiene der Probanden erfolgte während des gesamten Versuchszeitraumes ausnahmslos mit fluoridfreien Produkten (Aronal<sup>®</sup>, nicht fluoridierte Zahnpaste).

Nach Beendigung der In-situ-Exposition wurden die intraoralen Befestigungsplatten mit den darin befindlichen Dentinproben unter fließendem Wasser gereinigt und bis zur weiteren

Verarbeitung in Ringerlösung gelagert. Die Dentinproben wurden vorsichtig aus den Platten entfernt und unter lauwarmem Wasser von der Isolierschicht befreit. Danach wurden die Proben senkrecht zur ehemals der Mundhöhle ausgesetzten Oberfläche geschnitten. Die erhaltenen Dentinoberflächen wurden poliert (Körnung 4000) und mit Hilfe eines lichterhärtenden, ungefüllten Kunststoffes (Heliobond; Vivadent, Ellwangen, Deutschland) auf durchsichtige Plexiglas-Objektträger (Exakt Apparatebau; PSI Grünwald, Laudenbach, Deutschland) geklebt. Unter ständiger Wasserkühlung wurden nun mit einer 200  $\mu\text{m}$  dicken, diamantierten Bandsäge (Exakt Trennschleifsystem; Exakt Apparatebau) planparallele Scheiben von etwa 300  $\mu\text{m}$  Dicke hergestellt. Die Vorschubkraft des Probentisches betrug dabei 50 g, die Schnittgeschwindigkeit der diamantierten Säge war auf 200 m/min eingestellt.

Die definitive Parallelisierung und Glättung der Proben erfolgte mit einem gewässerten Schleifpapier (Körnung 2000) in einer Mikroschleifapparatur (Exakt Mikroschleifsystem; Exakt Apparatebau) (DONATH & BREUNER 1982). Die definitive Schliffdicke der Dentinproben betrug 150  $\mu\text{m}$ . Die Parallelität der Proben wurde mit einem digitalen Mikrometer bei einer Genauigkeit von 0,001 mm überprüft (Mitutoyo, Japan). Auf diese Weise waren die Schriffe sowohl für die polarisationsoptische als auch für die mikroradiographische Untersuchung vorbereitet.

### Mikroradiographische Darstellung der Läsionen

Die senkrecht zur ehemaligen Dentinoberfläche (transversal) verlaufenden, planparallelen Schriffe wurden polarisationsmikroskopisch (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) hinsichtlich Lage und Ausdehnung der entstandenen Läsionen begutachtet. Danach wurden die Proben mikroradiographisch untersucht. Zu diesem Zweck erfolgte eine 24stündige Lagerung in Ethandiol (Merck), so dass Schrumpfungartefakte vermieden wurden (RUBEN & ARENDS 1993). Anschliessend wurden die Proben von im Randbereich eventuell noch haftenden Kunstharzresten befreit und auf spezielle Probenhalter (TMR Probenhalter; Inspektor Research Systems BV, Amsterdam, Niederlande) fixiert. Zur mikroradiographischen Darstellung der Läsionen wurden die Probenhalter mit den darin befindlichen Dentinproben in der Röntgenröhre eines Röntgenstrahlengenerators (PW 1830/40; Philips, Kassel, Deutschland) montiert. Die mikroradiographische Untersuchung erfolgte bei einer Röhrenspannung von 20 kV und einem Röhrenstrom von 20 mA. Die Anordnung der Probe erfolgte unter Kontakt zu dem unmittelbar hinter der Probe befindlichen, hochauflösenden hologra-

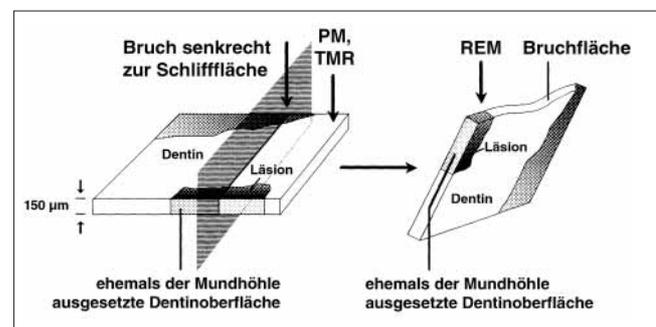


Abb. 1 Schematische Darstellung der Probenpräparation für die polarisationsmikroskopische (PM), mikroradiographische (TMR) und rasterelektronenmikroskopische (REM) Untersuchung

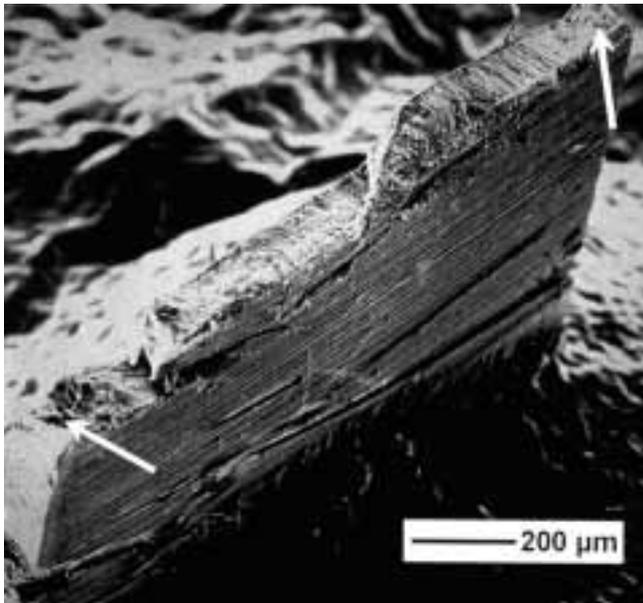


Abb. 2 REM-Darstellung einer in vivo demineralisierten Dentinprobe in der Übersicht. Die Probe wurde bestrahlt und während der Tragedauer im Mund nicht geputzt. Die Demineralisation befindet sich im linken Bereich der Bruchfläche (linker Pfeil), während die rechte Seite nicht der Mundhöhle ausgesetzt war (rechter Pfeil).

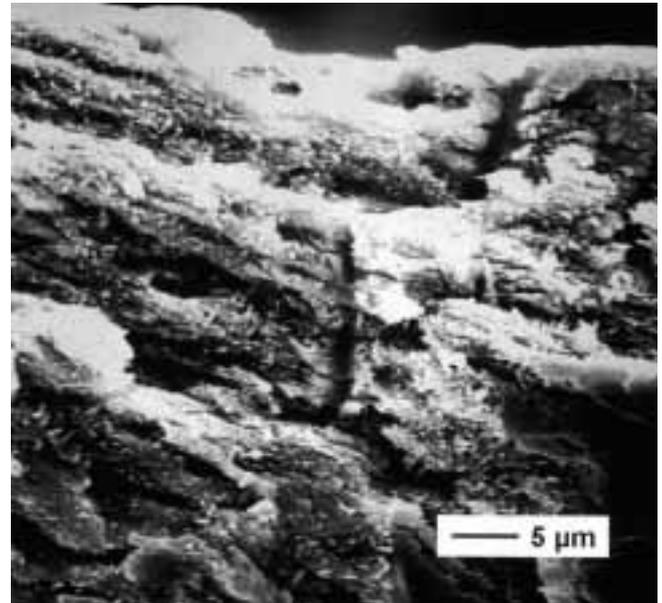


Abb. 3 REM-Darstellung des aus Abb. 2 bekannten Läsionsbereichs. Die normale Struktur des Dentins ist nicht mehr zu erkennen.

phischen Film (high speed holographic film, Kodak SO-253; Kodak, Stuttgart, Deutschland). Als Belichtungszeit wurden 15 s gewählt.

Nach der Entwicklung wurden die mikroradiographischen Aufnahmen mit einem Universalmikroskop (Axioplan; Zeiss, Oberkochen, Deutschland), an dem eine Videokamera (CCD Video-camera Modul XC77E; Sony, Japan) angeschlossen war, untersucht. Die Berechnung des Mineralverlaufs erfolgte mit dem Programm Transversal Micro Radiography (TMR für Windows, Version 1.24; Inspektor Research Systems BV).

#### Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Läsionen

Nach Abschluss der mikroradiographischen Auswertung wurden die Schlitze im Bereich des gesunden Dentins punktförmig mit einem Skalpell belastet, um eine mittig durch die Läsion laufende, schmierschichtfreie Bruchfläche zu erhalten. Die Herstellung der Bruchpräparate erfolgte unter polarisationsmikroskopischer Kontrolle. Die erhaltenden Bruchpräparate wurden in Kunstharz (Technovit 4071) eingebettet, so dass die Bruchflächen rasterelektronenmikroskopisch ausgewertet werden konnten (Abb. 1).

Die eingebetteten Proben wurden mit einem leitfähigen Kleber (Silver Print; GC, Tokyo, Japan) auf entsprechende Probenhalter fixiert (Plano; Plannet, Wetzlar, Deutschland) und nach Trocknung im Wärmeschrank mit Gold bedampft (SCD 040; Balzers, Wiesbaden, Deutschland; Dicke der Goldschicht: ca. 20 nm). Die Darstellung der auf den Proben entstandenen Läsionen erfolgte mit einem Rasterelektronenmikroskop (DSM 950; Zeiss, Oberkochen). Die Beschleunigungsspannung des Primärelektronenstrahls betrug jeweils 15 kV. Die mikromorphologischen Untersuchungen im Bereich der Demineralisationen erfolgten bei 100 bis 5000-facher Vergrößerung. Am Rasterelektronenmikroskop war eine EDX-Anlage (Kevex µX System 7000, analytical spectrometer; Getac, Mainz, Deutschland) angeschlossen,

mit deren Hilfe die Konzentration verschiedener Elemente bestimmt werden konnte. In der vorliegenden Arbeit werden die rasterelektronenmikroskopischen Befunde präsentiert und – sofern für das Verständnis der Aufnahmen wichtig – mit der mikroradiographischen Auswertung verglichen. Präsentation und Diskussion der mikroradiographischen Auswertung würden den Rahmen der vorliegenden Arbeit überschreiten und erfolgen daher in einer gesonderten Publikation.

#### Resultate

Die nachfolgenden rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 2 bis Abb. 6) zeigen exemplarisch die Auswirkungen der unterschiedlichen Mundhygienemassnahmen in bestrahltem Dentin. Die histologische Grobstruktur des Dentins ist vor allem in den nicht von einer Demineralisation betroffenen Bereichen weitgehend erhalten.

In Abb. 2 ist das Bruchpräparat einer Läsion in der Übersicht zu sehen. Der Bruch verläuft dabei mittig durch den Läsionskörper, der sich auf der vorliegenden Aufnahme im Bereich der linken Bruchfläche (untere Bildhälfte) befindet. Der Bereich der auf dieser Darstellung rechts befindlichen Bruchfläche (obere Bildhälfte) war nicht der Mundhöhle ausgesetzt und ist nicht von einer Demineralisation betroffen. Der Grenzbereich zur ehemals der Mundhöhle ausgesetzten Oberfläche der bei dieser bestrahlten, ungeputzten Dentinprobe entstandenen Läsion ist in der Vergrößerung ( $\times 2000$ ) in Abb. 3 schmierschichtfrei dargestellt. Eine normale Struktur des Dentins ist auf dieser Aufnahme nicht mehr zu erkennen. Vereinzelt sichtbare Dentinkanälchen, die längs bzw. quer getroffen und teilweise nur zu erahnen sind, werden von ausgeprägten Ablagerungen dominiert. Diese Ablagerungen lassen eine Unterscheidung zwischen dem in diesem Bereich weitgehend demineralisierten inter- und peritubulären Dentin nicht mehr zu.

Der nicht der Mundhöhle ausgesetzte Bereich dieser bestrahlten Dentinprobe zeigt demgegenüber eine mit gesundem Dentin vergleichbare, normale Struktur (Abb. 4). Auf dieser Aufnahme ist die aus Abb. 2 bekannte rechte Bruchfläche in derselben Vergrößerung ( $\times 2000$ ) wie in Abb. 3 dargestellt. Die mikromorphologischen Elemente (inter- und peritubuläres Dentin) sind hier gut erhalten und lassen sich im Vergleich zu den demineralisierten Bereichen dieser Dentinprobe deutlich unterscheiden. Im rechten unteren Bildbereich befinden sich Reste eines Odontoblastenfortsatzes.

Ein ähnliches rasterelektronenmikroskopisches Bild ist in Abb. 5 dargestellt. Hierbei handelt es sich jedoch um den ehemals der Mundhöhle ausgesetzten Bereich einer bestrahlten, geputzten Dentinprobe, bei der nach In-situ-Exposition weder polarisationsmikroskopisch, noch mikroradiographisch Anzeichen einer Demineralisation erkennbar waren. Die Bruchfläche dieser Probe ( $\times 2000$ ) zeigt, im Gegensatz zu Abb. 3, eine weitgehend erhaltene Struktur des Dentins. Deutlich zu erkennen sind längsfrakturierte Dentinkanälchen, die senkrecht auf die Ausenfläche des Dentins zulaufen. Eine Unterscheidung zwischen inter- und peritubulärem Dentin ist anhand dieser Aufnahme nicht möglich. Die Oberfläche der in den Tubuli befindlichen Hartsubstanz erscheint nicht homogen und glatt. Im unmittelbar an der Grenze zur ehemals der Mundhöhle ausgesetzten Oberfläche liegenden Bereich (oberer Bildabschnitt) sind Ablagerungen zu erkennen, die offensichtlich zu einem äusseren Verschluss der Orifizien geführt haben.

Das rasterelektronenmikroskopische Bild einer bei bestrahltem, ungeputztem Dentin entstandenen initialen Demineralisation mit «pseudointakter» Oberflächenschicht ist in Abb. 6a ( $\times 200$ ) dargestellt. Zu erkennen ist die mittig durch die Läsion laufende, schmierschichtfreie Bruchfläche, wobei sich die ehemals der Mundhöhle ausgesetzte Oberfläche im linken Bildabschnitt befindet. Der Probenausschnitt entspricht dem in Abb. 6b dargestellten mikroradiographischen Bild dieser Läsion (vgl. Massstabsangabe).

Ähnlich wie in Abb. 3 sind auf dieser Aufnahme im Grenzbe-  
reich zur ehemals der Mundhöhle ausgesetzten Oberfläche relativ dicht erscheinende Ablagerungen zu erkennen, die sich auf die äussersten 20–30  $\mu\text{m}$  beschränken. In den tiefer liegenden Bereichen ist die Mikrostruktur des Dentins trotz fortgeschrittener Demineralisation weitgehend erhalten. In einer Tiefe von etwa 120  $\mu\text{m}$  (vom linken Probenrand aus betrachtet) lassen sich ebenfalls vermehrt kanalartige Strukturen erkennen, die teilweise bereits eine Unterscheidung zwischen inter- und peritubulärem Dentin zulassen. Diese nicht von einer Demineralisation betroffenen Strukturen sind im rechten Bildbereich sehr deutlich ausgeprägt. Hier hat offensichtlich keine Demineralisation stattgefunden.

Der Verlauf der Kalzium-Verteilung innerhalb dieser Probe zeigt deutlich, dass im Bereich der ehemals der Mundhöhle ausgesetzten Oberfläche eine im Vergleich zu den tiefer liegenden Läsionsbereichen höhere Konzentration angetroffen wird. Ab einer Tiefe von etwa 100  $\mu\text{m}$  erreicht der Kurvenverlauf einen konstant bleibenden Wert, der den an der Oberfläche gemessenen Wert deutlich übertrifft. Die Konzentration der Elemente Kalzium, Phosphor und Schwefel an den mit Sternen markierten Punkten variiert in vergleichbarer Weise. Während die Verteilung von Ca, P und S im Bereich unmittelbar unterhalb der Oberfläche (\*) 39,5 Gew.%, 47,4 Gew.% bzw. 13,2 Gew.% beträgt, liegt der Ca- und P-Gehalt im Bereich des gesunden Dentins (\*\*) bei 45,1 Gew.% bzw. 47,1 Gew.%. Demgegenüber beträgt hier die Schwefelkonzentration nur 7,8 Gew.%. Diese

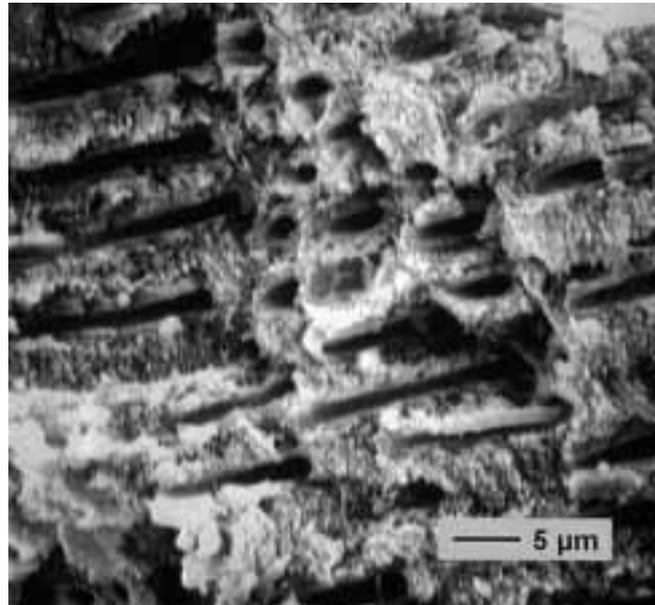


Abb. 4 REM-Darstellung des nicht der Mundhöhle ausgesetzten Bereichs der aus Abb. 2 bekannten bestrahlten Dentinprobe. Die mikrostrukturellen Elemente (inter- und peritubuläres Dentin) sind gut zu unterscheiden.

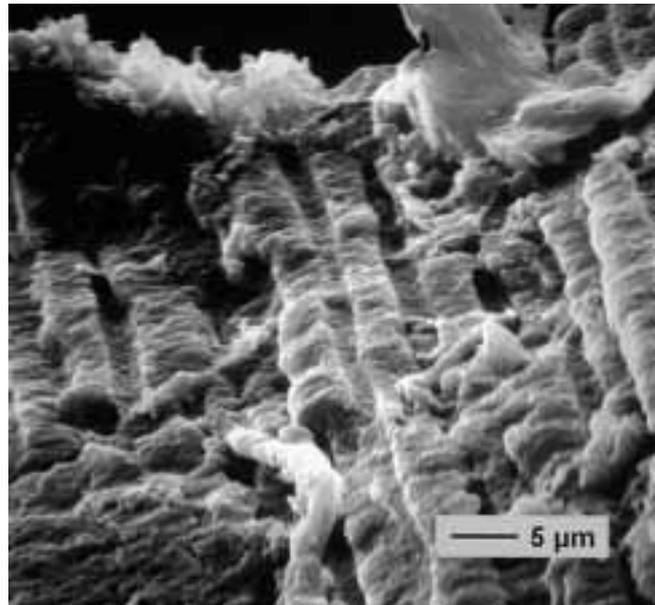


Abb. 5 REM-Darstellung der Bruchfläche einer bestrahlten, geputzten Dentinprobe, die nach In-situ-Exposition nicht demineralisiert wurde. Die Dentinstruktur ist auch im ehemals der Mundhöhle ausgesetzten Bereich weitgehend erhalten.

Elementverteilung deckt sich weitgehend mit der in Abb. 6b dargestellten mikroradiographischen Aufnahme dieser Läsion. Hier ist eine im Vergleich zum Läsionskörper höher mineralisierte Oberflächenschicht zu erkennen. Der mit Hilfe der mikroradiographischen Auswertung ermittelte Mineralverlauf dieser Läsion ist in Abb. 6c dargestellt und entspricht weitgehend der aus der EDX-Analyse (Abb. 6a) bekannten Verteilung der Kalzium-Konzentration.

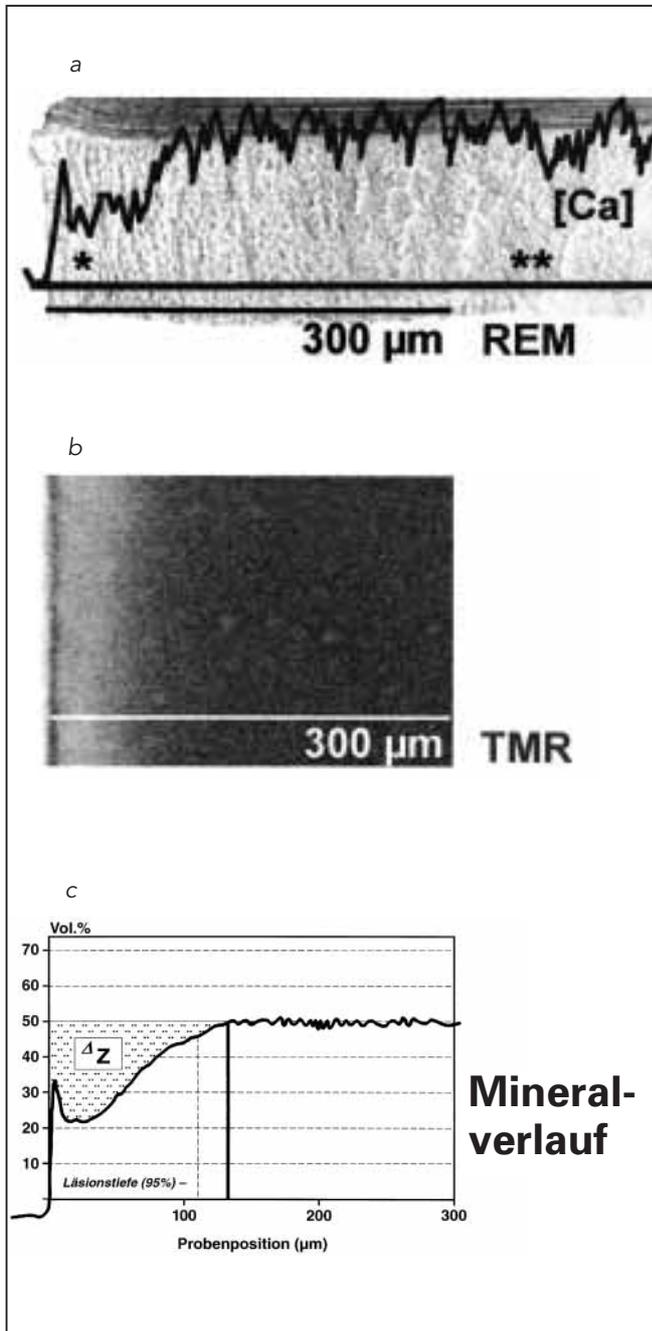


Abb. 6a) REM-Darstellung einer bestrahlten, nicht geputzten Dentinprobe. Im linken Bildbereich ist die fortgeschrittene Demineralisation zu erkennen, während im rechten Bildabschnitt weitgehend gesundes Dentin dargestellt ist (vgl. Abb. 2). Der bei dieser Probe gemessene Verlauf der Kalzium-Konzentration (Line-Scan) ist als Kurve dargestellt. Die mit Sternchen markierten Punkte kennzeichnen die Lokalisationen, bei denen die Konzentrationen von Ca, P und S gemessen wurden (siehe Text). b) Mikroradiographische Darstellung derselben Dentinprobe (bestrahltes, nicht geputztes Dentin). Im linken Bildbereich ist die röntgenopake, höher mineralisierte Oberfläche zu erkennen. Im Anschluss daran folgt die Zone der fortgeschrittenen Demineralisation, während im rechten Bildabschnitt weitgehend gesundes Dentin dargestellt ist. c) Das bei dieser Probe ermittelte Mikroradiogramm zeigt den Verlauf des Mineralgehaltes, der gut mit der oben dargestellten Kalzium-Konzentration korreliert.

## Diskussion

Postradiotherapeutisch sind kariöse Veränderungen bekanntlich häufig bei Zahnhälsen zu beobachten, wobei das in diesem Bereich freiliegende Dentin von einer foudroyant verlaufenden kariösen Zerstörung betroffen ist (MÜHLEMANN 1945). Da eine aus kariologischer Sicht klinisch relevante, strahlenbedingte Schädigung des Schmelzes bisher nicht nachgewiesen werden konnte (KIELBASSA et al. 1997b, KIELBASSA et al. 1997c), erhebt sich die Frage, ob die fraktionierte Bestrahlung mit tumortherapeutisch wirksamen Dosen einen Einfluss auf die Kariesentstehung im Dentin hat. Die wenigen, aus der zugänglichen Literatur verfügbaren Hinweise zu dieser Thematik sind widersprüchlich (MARKITZIU et al. 1986, RÖSSLER et al. 1995) und basieren zudem auf In-vitro-Untersuchungen. Auf der Grundlage dieser kontroversen Diskussion basierte das in dieser In-situ-Studie verwendete, bereits früher beschriebene Versuchsdesign (KIELBASSA et al. 1997c).

Die Befunde der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass sich die Kariesentstehung im bestrahlten Dentin mikromorphologisch nicht von unbestrahltem Dentin unterscheidet. Bei bestrahltem Zahnbein bildet sich in vielen Fällen eine Oberflächenschicht aus, die in ihrer Ausdehnung variabel ist und einen höheren Mineralgehalt als das Zentrum der Läsion besitzt. Diese Beobachtungen sind bei Läsionen in unbestrahltem Dentin bereits früher beschrieben worden (ALMQUIST et al. 1990, FURSETH & JOHANSEN 1968, HALS & SELVIG 1977, NYVAD & FEJERSKOV 1987, SCHÜPBACH et al. 1989, SCHÜPBACH et al. 1990, WEFEL et al. 1985, WESTBROOK et al. 1974). Es ist bekannt, dass die Bildung einer mineralreichen Oberflächenschicht im Dentin durch die Anwesenheit von Fluoriden begünstigt wird (HOPPENBROUWERS et al. 1987b, MELLBERG & SANCHEZ 1986, TEN CATE & DUJSTERS 1983). In der vorliegenden Untersuchung wurden jedoch keine Fluoride verwendet, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die von NYVAD et al. (1989) für unbestrahltes Dentin beschriebenen Demineralisationsmuster auch für bestrahltes Zahnbein gültig sind.

Die rasterelektronenmikroskopischen Darstellungen lassen keine Interpretation im Sinne einer erhöhten Kariesanfälligkeit des bestrahlten Dentins zu. Vielmehr ist die Mikrostruktur des Dentins in den nicht von einer Demineralisation betroffenen Bereichen erhalten. Die mit den polarisationsoptischen und mikroradiographischen Aufnahmen korrespondierenden Regionen erhöhter Demineralisation lassen die Mikrostruktur des Dentins teilweise nicht mehr deutlich erkennen und sind wahrscheinlich vornehmlich mit organischer Substanz durchsetzt. Dies entspricht früheren Beobachtungen verschiedener Autoren (FURSETH & JOHANSEN 1968, HALS & SELVIG 1977, SELVIG & ZANDER 1962), die in kariösem Wurzelzahnbein einen erhöhten Schwefelgehalt beschrieben, der durch die die initiale Karies verursachenden Bakterien bzw. deren Stoffwechselprodukte hervorgerufen war (FRANK 1990, FRANK et al. 1989). Die für kariöses Dentin beschriebene, gute Übereinstimmung zwischen Kalziumgehalt und mikroradiographischem Befund (HALS & SELVIG 1977) konnte in der vorliegenden Untersuchung auch für bestrahltes Dentin bestätigt werden.

Ähnliche rasterelektronenmikroskopische Befunde wurden für kariöses (unbestrahltes) Dentin bisher nur von ARENDS et al. (1989a) beschrieben. Diese Autoren fanden in demineralisiertem Dentin ebenfalls vermehrt organische Ablagerungen und teilweise im Durchmesser vergrößerte Dentinkanälchen. Die Demineralisation betraf dabei sowohl das inter- als auch das peritubuläre Dentin. Auch in anderen Untersuchungen konnte

beobachtet werden, dass das mikrostrukturelle Grundgerüst des Dentins trotz fortgeschrittener Demineralisation zumindest in tieferen Läsionsbereichen weitgehend erhalten ist (OHGUSHI & FUSAYAMA 1975).

Die in der vorliegenden Untersuchung bei bestrahlten Dentinproben im mikroradiographischen Bild (Abb. 6b) häufig beobachtete, höher mineralisierte Oberflächenschicht konnte raster-elektronenmikroskopisch (Abb. 6a) als eine auf wenige Mikrometer begrenzte, dichte mineralhaltige Zone identifiziert werden. Dieser Befund entspricht den aus der Literatur bekannten Ergebnissen nach Remineralisation von unbestrahltem Dentin. Auch hier konnte eine dem noch weitgehend demineralisierten Dentin aufliegende, kompakte Schicht beobachtet werden (ARENDS et al. 1989b).

Diese Befunde zeigen zwar, dass die Kariesentstehung bei bestrahltem Dentin unter den In-situ-Bedingungen mit normalem Speichelfluss prinzipiell der Demineralisation von unbestrahltem Dentin vergleichbar ist. Hinsichtlich der Situation des tumortherapeutisch bestrahlten Patienten muss jedoch bedacht werden, dass durch die Radio-Dyssialie die Zufuhr von Kalzium- und Phosphationen nicht mehr in ausreichendem Masse gegeben ist. Die Ausbildung einer höher mineralisierten Oberflächenschicht oder gänzlich remineralisierende Effekte sind in diesen Fällen nicht zu erwarten. Dies ist hinsichtlich der Entstehung der «radiogenen Karies» im Dentin von besonderer Bedeutung, da eine durch Kollagenasen enzymatisch verursachte Zerstörung des Dentins selbst bei annähernd neutralen pH-Werten fortschreitet, sofern eine ausreichend hohe Demineralisation vorausgegangen ist (KAWASAKI & FEATHERSTONE 1997). Dies hat für die klinische Situation nach abgeschlossener Radiatio die schwerwiegende Konsequenz, dass Dentin mit entsprechend hoher Demineralisation als verloren betrachtet werden muss. Die post radiationem häufig unzulängliche Mundhygiene trägt entscheidend dazu bei, dass der Zerstörungsprozess des im Vergleich zum Schmelz wesentlich leichter zu demineralisierenden Dentins (HOPPENBROUWERS et al. 1986, HOPPENBROUWERS et al. 1987a) beschleunigt wird. Damit findet die häufig zu beobachtende ausgeprägte Karies im Zahnhalsbereich mit darauffolgender Amputation der klinischen Krone eine mögliche Erklärung. Die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Dentinproben stammten von extrahierten Zähnen und waren daher nicht mehr zu einer vitalen Reaktion im Sinne einer zellulär gesteuerten Obliteration der Dentinkanälchen fähig. Aus diesem Grunde konnten hier lediglich Demineralisationsvorgänge untersucht werden. Die bei vitalen Zähnen anzutreffenden Abwehrreaktionen der Pulpa-Dentin-Einheit (wie z. B. sklerosiertes Dentin) (DACULSI et al. 1979, FRANK 1990, SCHÜPBACH et al. 1990) wurden naturgemäss nicht beobachtet. Auch die remineralisierende Eigenschaft des Dentinliquors (SHELLIS 1994, TATSUMI et al. 1992) konnte mit dem vorgestellten Versuchsdesign nicht simuliert werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass diese Abwehrmechanismen in vivo durchaus zu einem verlangsamt Fortschreiten einer Läsion beitragen. Eine geringfügige Abwehrreaktion der Pulpa-Dentin-Einheit kann demnach bei einer Übertragung der vorliegenden Ergebnisse auf vitale Zähne unterstellt werden. Die in der vorliegenden Studie untersuchte Demineralisation war jedoch auf oberflächliche Veränderungen (maximal 350 µm) beschränkt, so dass keine wesentlichen Unterschiede zur klinischen Situation bei vitalen Zähnen zu erwarten sind. Darüber hinaus sollte bedacht werden, dass die «Strahlenkaries» bekanntlich auch bei devitalen Zähnen entsteht. In diesem Fall ist ebenfalls keine Reaktion der Odontoblasten möglich.

Die Entwicklung einer initialen kariösen Läsion in bestrahltem Dentin scheint sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen prinzipiell nicht von unbestrahltem Dentin zu unterscheiden. Darüber hinaus scheint unter dem Einfluss einer regelmässigen Mundhygiene eine kariöse Veränderung auch des bestrahlten Dentins weitgehend vermeidbar.

## Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung lassen die Schlussfolgerung zu, dass sich der in der Literatur beschriebene direkte Einfluss einer tumortherapeutischen Bestrahlung auf das Dentin hinsichtlich einer initialen Demineralisation bei suffizientem Speichelfluss nicht auswirkt. Vielmehr sind aus morphologischer Sicht die nach einem kariösen Angriff entstandenen Läsionen bei bestrahltem und unbestrahltem Dentin weitgehend identisch. Darüber hinaus behindert eine regelmässig durchgeführte mechanische Plaqueentfernung die Demineralisationsvorgänge auch im bestrahlten Dentin. Die bekannten kariesätiologischen Faktoren, die post radiationem in besonderem Masse akzentuiert werden, müssen daher als primäre Ursache der häufig foudroyant auftretenden «Strahlenkaries» angesehen werden.

## Verdankung

Die Autoren bedanken sich bei Herrn Dipl.-Phys. Dr. G. Bruggmoser (Abt. Strahlentherapie der Radiologischen Klinik der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) für die Durchführung der Bestrahlung der Dentinproben sowie bei Herrn D. Kambiz (Poliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) für die Hilfe bei der EDX-Analyse. Diese Untersuchung wurde von der Deutschen Krebshilfe e.V. gefördert (70-01803-Ki I).

## Summary

KIELBASSA A M, SCHALLER H-G, HELLWIG E: **Qualitative observations of in situ caries in irradiated dentin. A combined SEM and TMR study** (in German). Acta Med Dent Helv 3: 161-168 (1998)

The objective of this study was to evaluate qualitatively the effect of irradiation of human dentin on the onset of initial caries lesions under the circumstances of different oral hygiene regimens. A total of 48 irradiated (60 Gy) and 48 non-irradiated dentin specimens were exposed in the mouths of 12 volunteers with normal flow rates of saliva for a period of 5 weeks. Half of the specimens were brushed regularly with a non-fluoridated toothpaste while on the other specimens plaque was allowed to grow. Specimens were bisected perpendicular to the surface, and slices of 150 µm thickness were prepared. Subsequently the severed sections were studied by means of transversal microradiography and SEM. The results showed that the ultrastructure of the dentin changes during severe demineralization. The main ultrastructural features were, however, still largely intact, even if much of the mineral originally present has been lost. Irradiation itself did not show any significant effects on microstructure. Moreover, irradiated dentin can be preserved sound if brushed regularly. It can be assumed, that possible irradiation effects on dentin are not responsible for initial demineralisation under clinical conditions. «Radiation caries» seems to be caused mainly by reduced salivary flow rates and poor oral hygiene techniques.

## Résumé

Le but de la présente étude était d'estimer l'influence d'une irradiation tumeurthérapeutique des spécimens de dentine sur la genèse *in vivo* de la déminéralisation initiale et de la comparer avec l'influence du lavage des dents régulier. 48 spécimens irradiés (60 Gy) et 48 spécimens non-irradiés étaient exposés pendant 5 semaines dans la cavité buccale de 12 volontaires avec sialisme normal. La moitié des spécimens était lavée régulièrement avec un dentifrice non-fluoré, l'autre moitié restait non-lavée. Les échantillons étaient coupés perpendiculairement à la surface en tranches d'une épaisseur de 150 µm. Ensuite les sections séparées étaient examinées par micro-radiographie transversale et SEM. L'infrastructure avait changé sous l'influence d'une déminéralisation continue. La structure élémentaire restait intacte malgré la perte massive de minéraux. L'irradiation même ne montrait aucune influence significative sur la microstructure. La dentine irradiée peut rester indemne grâce à une hygiène de la bouche régulière. En conclusion, l'effet de l'irradiation directe de la dentine n'est pas significatif par rapport à une déminéralisation initiale sous ces conditions cliniques. L'image de «la carie radiante» semble provenir principalement d'un sialisme réduit et d'une mauvaise hygiène de la bouche.

## Literatur

- ALMQUIST H, LAGERLÖF F, ANGMAR-MÄNSSON B: Automatic pH-cycling caries model applied on root hard tissue. *Caries Res* 24: 1–5 (1990)
- ARENDS J, RUBEN J, JONGEBLOED W L: Dentine caries *in vivo*. Combined electron microscopic and microradiographic investigation. *Caries Res* 23: 36–41 (1989a)
- ARENDS J, CHRISTOFFERSEN J, RUBEN J, JONGEBLOED W L: Remineralization of bovine dentine *in vitro*. The influence of the F content in solution on mineral distribution. *Caries Res* 23: 309–314 (1989b)
- DACULSI G, KEREBEL B, LE CABELLEC M T, KEREBEL L M: Qualitative and quantitative data on arrested caries in dentine. *Caries Res* 13: 190–202 (1979)
- DONATH K, BREUNER G: A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 11: 318–326 (1982)
- FRANK R M: Structural events in the caries process in enamel, cementum and dentin. *J Dent Res* 69: 559–566 (1990)
- FRANK R M, STEUER P, HEMMERLE J: Ultrastructural study on human root caries. *Caries Res* 23: 209–217 (1989)
- FURSETH R, JOHANSEN E: A microradiographical comparison of sound and carious human dental cementum. *Arch Oral Biol* 13: 1197–1206 (1968)
- HALS E, SELVIG K A: Correlated electron probe microanalysis and microradiography of carious and normal cementum. *Caries Res* 11: 62–75 (1977)
- HOPPENBROUWERS P M M, DRIESENS F C M, BORGGREVEN J M P M: The vulnerability of unexposed human dental roots to demineralization. *J Dent Res* 65: 955–958 (1986)
- HOPPENBROUWERS P M M, DRIESENS F C M, BORGGREVEN J M P M: The mineral solubility of human tooth roots. *Arch Oral Biol* 32: 319–322 (1987a)
- HOPPENBROUWERS P M M, DRIESENS F C M, BORGGREVEN J M P M: The demineralization of human dental roots in the presence of fluoride. *J Dent Res* 66: 1370–1374 (1987b)
- JERVØE P: X-ray-diffraction investigation on the effect of experimental and *in situ* radiation of mature human teeth. A preliminary report. *Acta Odontol Scand* 28: 623–631 (1970)
- KAWASAKI K, FEATHERSTONE J D B: Effects of collagenase on root demineralization. *J Dent Res* 76: 588–595 (1997)
- KIELBASSA A M, BEETZ I, SCHENDERA A, HELLWIG E: Irradiation effects on microhardness of fluoridated and non-fluoridated bovine dentin. *Eur J Oral Sci* 105: 444–447 (1997a)
- KIELBASSA A M, PIOCH T, ROWBOTHAM F, HELLWIG E, STAEHLE H J: *In vivo* erzeugte Demineralisation bei tumortherapeutisch bestrahltem, menschlichem Zahnschmelz. Eine REM-Untersuchung. *Acta Med Dent Helv* 2: 193–198 (1997b)
- KIELBASSA A M, ROWBOTHAM F, HELLWIG E, SCHADE-BRITTINGER C: Der Einfluss der Mundhygiene auf die Entstehung der initialen Karies in tumortherapeutisch bestrahltem Schmelz – eine *In-situ*-Untersuchung. *Dtsch Zahnärztl Z* 52: 735–740 (1997c)
- KIELBASSA A M, WRBAS K-T, DORNFELD B, SCHADE-BRITTINGER C, HELLWIG E: *In-vitro*- und *In-situ*-Untersuchungen zum Einfluss der tumortherapeutischen Bestrahlung auf die Kariesentstehung in menschlichem Dentin. *Dtsch Zahnärztl Z* (1998, im Druck)
- MARKITZIU A, GEDALIA I, RAJSTEIN J, GRAJOVER R, YARSHANSKI O, WESHLER Z: *In vitro* irradiation effects on hardness and solubility of human enamel and dentin pretreated with fluoride. *Clin Prevent Dent* 8: 4–7 (1986)
- MELLBERG J R, SANCHEZ M: Remineralization by a monofluorophosphate dentifrice *in vitro* of root dentin softened by artificial caries. *J Dent Res* 65: 959–962 (1986)
- MÜHLEMANN H R: Das Verhalten von Kiefer und Zähnen bei der Radiotherapie von malignen Tumoren der Mundhöhle und des Pharynx. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 55: 641–688 (1945)
- NYVAD B, FEJERSKOV O: Active and inactive root surface caries: Structural identities? In: Thylstrup A., Leach S.A., Quist V. (eds.): Dentine and dentine reactions in the oral cavity. IRL Press, Oxford, S. 165–179 (1987)
- NYVAD B, TEN CATE J M, FEJERSKOV O: Microradiography of experimental root surface caries in man. *Caries Res* 23: 218–224 (1989)
- OHGUSHI K, FUSAYAMA T: Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin. *J Dent Res* 54: 1019–1026 (1975)
- PIOCH T, MAYER T: Mikroskopische Untersuchungen an Frakturflächen von Zähnen mit «radiogener Karies». *Stomatol* 97: 19–25 (1997)
- POYTON H G: The effects of radiation on teeth. *Oral Surg* 26: 639–646 (1968)
- RÖSSLER R, KREYLOS S, KLIMEK J: The effect of X-ray irradiation on the demineralisation of enamel and dentine. *J Dent Res* 74: 536 (Abstr.#1083) (1995)
- RUBEN J, ARENDS J: Shrinkage prevention of *in vitro* demineralized human dentine in transversal microradiography. *Caries Res* 27: 262–265 (1993)
- SCHÜPBACH P, GUGGENHEIM B, LUTZ F: Human root caries: Histopathology of initial lesions in cementum and dentin. *J Oral Pathol* 18: 146–156 (1989)
- SCHÜPBACH P, GUGGENHEIM B, LUTZ F: Histopathology of root surface caries. *J Dent Res* 69: 1195–1204 (1990)
- SELVIG K A, ZANDER H A: Chemical analysis and microradiography of cementum and dentin from periodontally diseased human teeth. *J Periodontol* 33: 303–310 (1962)
- SHELLIS R P: Effects of supersaturated pulpal fluid on the formation of caries-like lesions on the roots of human teeth. *Caries Res* 28: 14–20 (1994)

- TATSUMI T, INOKOSHI S, YAMADA T, HOSODA H: Remineralization of etched dentin. *J Prosthet Dent* 67: 617–620 (1992)
- TEN CATE J M, DUJSTERS P P E: Influence of fluoride in solution on tooth demineralisation. II. Microradiographical data. *Caries Res* 17: 513–519 (1983)
- WEFEL J S, CLARKSON B H, HEILMANN J R: Natural root caries: A histologic and microradiographic evaluation. *J Oral Pathol* 14: 615–623 (1985)
- WESTBROOK J L, MILLER A S, CHILTON N W, WILLIAMS F L, MUMMA R D: Root surface caries: A clinical, histopathologic and microradiographic investigation. *Caries Res* 8: 249–255 (1974)
- WILICH N, GUNDACKER K, ZWINGERS T, ROHLOFF R: Die Entstehung der Strahlenkaries nach hochdosierter Bestrahlung. *Strahlenther Onkol* 164: 466–473 (1988)
- ZACH G A: X-ray diffraction and calcium-phosphorus analysis of irradiated human teeth. *J Dent Res* 55: 907–909 (1976)