

W. H.-M. Raab¹

Die Laser-Doppler-Flußmessung: Untersuchungen zur Mikrozirkulation der Zahnpulpa

Die Laser-Doppler-Flußmessung ermöglicht es, die Blutzirkulation in umschriebenen Gewebsabschnitten zu untersuchen. Durch Entwicklung eines geeigneten Versuchsaufbaus kann dieses Meßprinzip auch an der Zahnpulpa angewandt werden. Am Beispiel von Rattenincisivi wird gezeigt, daß durch geeignete Präparationsmaßnahmen eine quantitative Analyse von Durchblutungsänderungen durchgeführt werden kann.

1 Einleitung

Die die Pulpa umgebenden Zahnhartsubstanzen limitieren die Anwendbarkeit von Untersuchungen zur Mikrozirkulation. Durch Modifikation an anderen Organen erfolgreich angewandter Verfahren oder durch geeignete Präparationsmaßnahmen am Zahn ist es aber möglich, Meßtechniken zur Untersuchung der Mikrozirkulation auf die Zahnpulpa zu übertragen.

Upthegrove et al. [11] bedienen sich eines photoplethysmographischen Verfahrens, dessen Aussagekraft jedoch durch die Opazität der Zahnhartsubstanzen eingeschränkt ist. Edwall und Kindlova [3] benutzten die Methode der lokalen Isotopen clearance. Allen genannten Verfahren ist eine Korrelation zwischen

Blutfluß und Signalgröße gemeinsam; es können allerdings keine quantitativen Aussagen über die Größe der Blutzirkulation gemacht werden. Die Laser-Doppler-Flußmessung (LDF) wurde erstmals 1964 von Yeh und Cummins [13] beschrieben. 1972 gelang Riva [9] mit Messungen zur Blutzirkulation der Kaninchenretina die Übertragung der LDF auf biologische Systeme. In der Folgezeit wurden von vielen Autoren [4, 7, 1, 2] die Anwendungsmöglichkeiten der LDF an unterschiedlichen Organstrukturen dargestellt. Mit der Einführung eines zweikanaligen Lichtfaserleiters, der sowohl die Lichtemission als auch gleichzeitig die Aufnahme des reflektierten Lichtes im Untersuchungsgebiet ermöglichte, war das Verfahren für die klinische Anwendung geeignet. Allen diesen Messungen war jedoch gemeinsam, daß Bewegungsartefakte und Pulsationsschwankungen der Gefäße das eigentliche Signal überlagerten [12]. Auf Grund dieser Erfahrungen entwickelte Tenland [10] eine Modifikation der LDF mit dem Ziel, das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Ausgangspunkt hierfür war folgende Überlegung: das Signal der LDF ist direkt proportional zum Produkt aus Erythrozytenzahl und deren Fließgeschwindigkeit. Die Blutzirkulation ist streng genommen keine laminare Strömung. Folglich variieren die Anzahl der Erythrozyten und deren jeweilige Flußrate bei Betrachtung eines eng umschriebenen Untersuchungsgebietes stochastisch. Daraus ergibt sich die Tatsache, daß Messungen an zwei eng benachbarten Stellen das statistisch voneinander unab-

¹ Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie (Direktor: Prof. Dr. A. Kröncke), Zahn-, Mund- und Kieferklinik, Erlangen.

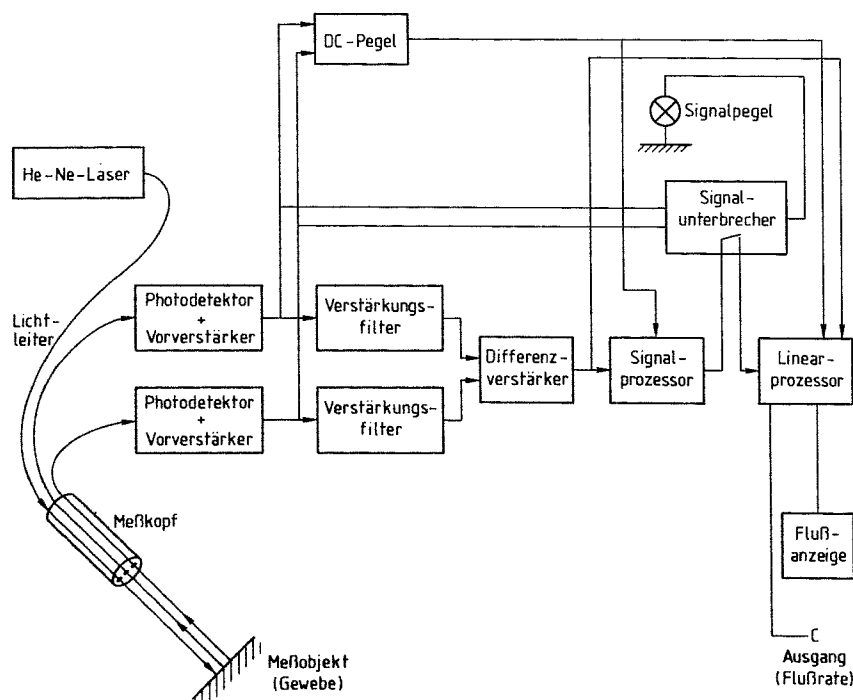


Abb. 1 Meßprinzip der LDF mit Differenzbildung des erhaltenen Signals

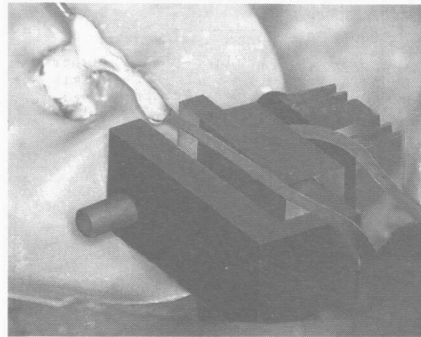
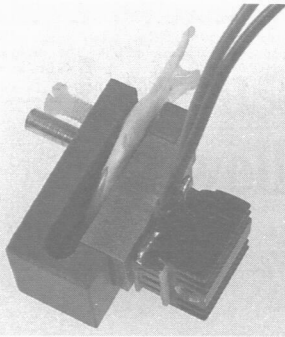


Abb. 2 (links) Thermoküvette mit mazeriertem Präparat, neben der Fixationsschraube befindet sich die Metallhülse zur Aufnahme der Lasersonde, rechts im Bild das Peltierelement mit Kühlkörper für die Thermostatisierung

Abb. 3 (rechts) Präparierter Rattenincisivus für die LDF-Messung vor der Fixation in der Thermoküvette

hängige Ergebnis eines gemeinsamen Vorganges, der Mikrozirkulation, widerspiegeln. Durch die Differenzbildung beider Meßwerte werden alle Signale, die in identischer Form zu gleichem Zeitpunkt an beiden Meßpunkten erfaßt werden, als Artefakte eliminiert.

Unsere Absicht war es, mit Hilfe der LDF geringgradige Veränderungen der Mikrozirkulation der Zahnpulpa zu erfassen.

2 Material und Methode

Für die Experimente verwenden wir Wistar-Ratten. Nach intra-peritonealer Anästhesie mit Thiopental werden die Tiere tracheotomiert. Den bei der Tracheotomie durchgeführten medianen Hautschnitt verlängern wir bis zur Unterlippe. Die bindegewebige Verbindung der beiden Hemimandibeln läßt sich jetzt mit einer Schere oder mit einem Skalpell unter weitgehender Schonung des Mundbodens trennen. An der für die Untersuchung vorgesehenen Unterkieferhälfte präparieren wir die Schleimhaut sowie die inserierenden Muskeln bis auf Höhe des ersten oder zweiten Molaren stumpf ab.

Bei mehreren Vorversuchen zeigte sich, daß bei intakter Zahnhartsubstanz Durchblutungsschwankungen in einem zeitlichen Zusammenhang zum gesetzten Reiz dargestellt werden können. Jedoch sind aufgrund des geringen Signal-Rausch-Abstandes unter den oben genannten Bedingungen reproduzierbare Aussagen nur schwer zu erhalten. Versuche, in deren Verlauf der pigmentierte Anteil der Zahnhartsubstanzen entfernt wurde, führten zu einer Anhebung des Signallevels. Ein hohes und reproduzierbares Signal läßt sich erreichen, indem die Streuung sowie Reflexion des Lichtes am Schmelz-Dentin-Mantel zwischen Lasersonde und Pulpa verringert wird.

Zu diesem Zweck werden die Zahnhartsubstanzen auf der der Lasersonde zugewandten Seite auf eine dünne, ca. 100–150 µm starke, die Pulpa bedeckende Dentinwand reduziert. Es muß jedoch sichergestellt sein, daß die Fixation der Lasersonde am Zahn keine mechanische Irritation der Pulpa hervorruft. Die verbleibende Dentinwand kann darüber hinaus keine ausreichende Schutzfunktion gegenüber der Pulpa ausüben, welche daher durch eine geeignete Versuchsanordnung vor Temperaturschwankungen und Flüssigkeitsverlust geschützt werden muß.

Die Voraussetzung hierfür bietet eine von uns entwickelte Thermoküvette (s. Abb. 2), die gleichzeitig die Fixation der Lasersonde übernimmt. Ein Gefäß aus Hart-PVC (10 × 10 × 25 mm) mit einer Öffnung an der Schmalseite nimmt das Präparat auf. Der Zahn kann mittels einer Nylonschraube so fixiert werden, daß der präparierte Abschnitt des Zahnes unmittelbar von der Metallhülse, in die die Lasersonde später eingeführt wird, zu liegen kommt. Die gegenüberliegende Wand wird durch eine Kupferplatte gebildet, an der für die Thermoregulation ein Peltierelement (PKE 12A 0020, Peltron) mit einer Größe von 8,5 × 13 × 5 mm und einer Leistung von 2,7 W aufgeklebt ist. Dieses wiederum ist mit einem Aluminiumkühlgehäuse für die Ableitung der Prozeßwärme verbunden. Die Regelung des Pel-

tierelementes erfolgt über einen in die Kupferplatte eingelöteten Thermofühler. Als Steuereinheit dient ein nach eigenen Angaben modifiziertes Gerät der Firma Peltron, Nürnberg.

Das Peltierelement wird auf die Temperatur der Kupferplatte eingeregelt und nicht auf die des Wasserbades direkt; dadurch wird verhindert, daß das Regelsystem aufgrund der relativ hohen Wärmekapazität des Wassers und der hohen Regelgenauigkeit von < 0,1 ° C zu Schwingungen angeregt wird. Versuche, dieses Phänomen durch die Ankoppelung des Peltierelementes an eine Wasserkühlung zu verbessern, mußten aufgegeben werden, da sich die Zirkulation im Kühlsystem als Vibration auf das Präparat überträgt und das Grundrauschen des LDF-Signals mehr als verdoppelt.

Die mesiale Zahnfläche wird angeätzt und mit Kunststoff beschichtet. Neben einer mechanischen Stabilisierung bewirkt diese Maßnahme eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses. Durch diese Kunststoffauflage wird die Transparenz des Schmelzes, die zu einem Lichtverlust infolge mangelnder Reflexion auf der dem Laser abgewandten Seite führt, umgangen.

Infolge der verbesserten Reflexion des vom Laser ausgesandten Lichtes kann eine Signalanhebung um nahezu 100% erzielt werden. Im Anschluß wird der Zahn in die Thermoküvette eingebracht und mit einer Nylonschraube (s. Abb. 3.) vorläufig fixiert. Über das Führungsrohr der Lasersonde wird die Lage des präparierten Zahnes überprüft und korrigiert. Die dauerhafte Fixierung und gleichzeitige Abdichtung zwischen Präparat und Thermoküvette erfolgt mittels Kunststoff. In einem letzten Arbeitsschritt wird die Küvette mit Ringerlösung beschickt und diese abschließend mit Paraffinöl überschichtet. Dadurch kann bei langer Versuchsdauer (bis zu 16 h) die Verdunstung und damit eine Veränderung der Osmolarität verhindert werden.

Für die LDF verwenden wir einen He-Ne Laser von 2 mW Leistung (Periflux PF2). Das Meßsignal der LDF wird als Spannungswert ausgegeben und mit einer Frequenz von 10 Hz digitalisiert. Die Daten werden offline an einem PC (Tandon AT) ausgewertet.

3 Ergebnisse und Diskussion

Schmerzhafte Reize führen zu charakteristischen Blutdruckschwankungen. Als Stimulus wurde ein mechanischer Druck durch eine Klemme am Schwanz ausgeübt. Wie Kontrollmessungen an der Hinterpfote zeigen, sind die Durchblutungsänderungen an Pfote und Zahnpulpa gleichsinnig. Bei einer Stimulation des Parasympathikus (tracheales Absaugen) kommt es zu einem rapiden Abfall der Durchblutung. Diese Veränderung ist ebenfalls an beiden Ableitorten gleichermaßen feststellbar (Abb. 4).

Demgegenüber zeigen selektive *pulpale* Reize wie die elektrische Pulpastimulation *keine* synergistische periphere Reaktion. Als Reiz dient ein alternierender stromkonstanter Rechteckreiz von 2 ms Dauer und einer Frequenz von 20 Hz. Man erkennt deutlich, daß während der Stimulation infolge der Reizung des

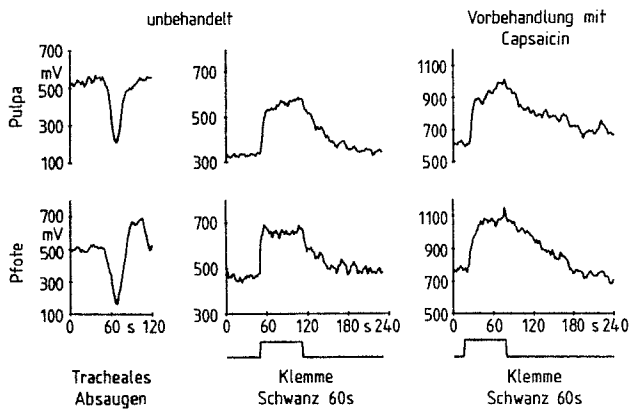


Abb. 4 Vergleich der Reaktionen an Zahnpulpa und Hinterpfote der Ratte auf systemische Reize

Sympathikus die Zirkulation abnimmt und nachfolgend die Durchblutung durch die Freisetzung von Neuropeptiden aus den afferenten Neuronen für die Dauer mehrerer Minuten zunimmt. Diese Veränderungen erfolgen ohne Überlagerung reizsynchrone systemischer Effekte [8] (Abb. 5). Postmortal zeigt sich an der Zahnpulpa, daß das LDF-Signal nahezu identisch mit der elektrischen Nulllinie verläuft. Das Signal an der Hinterpfote nimmt dagegen aufgrund des schlechteren Rausch-Signalverhältnisses ein deutlich höheres Niveau ein (Abb. 6).

Das von uns entwickelte Verfahren zur LDF der Zahnpulpa ermöglicht aufgrund des hohen Signalabstandes eine quantitative Analyse der Durchblutungsänderung der Zahnpulpa. Im Gegensatz zu anderen Verfahren, wie Vitalmikroskopie [5] und Injektion von Mikrospheres [6], können funktionelle Aspekte der Durchblutungsänderung nicht erfaßt werden. Durch die Entwicklung einer Thermoküvette können die physiologischen Umgebungsbedingungen über Stunden aufrecht erhalten werden. Die LDF der Zahnpulpa bietet somit die Möglichkeit, auch über lange Zeiträume von mehreren Stunden hinweg die Auswirkungen noxischer Reize auf die Mikrozirkulation der Zahnpulpa zu untersuchen.

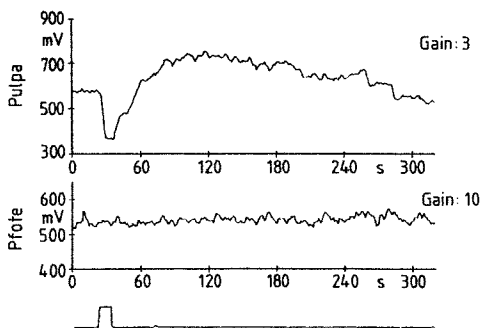


Abb. 5 Vergleich der LDF an Zahn und Hinterpfote bei elektrischer Stimulation der Pulpa

Summary

Laser Doppler Flowmetry permits studies of the blood circulation in circumscribed tissue areas. This measuring method may also be applied to the dental pulp if a suitable experimental design is developed. Incisor teeth of rats are used as an example to illustrate that a quantitative analysis of changes in the blood flow is possible with the aid of suitable preparation procedures.

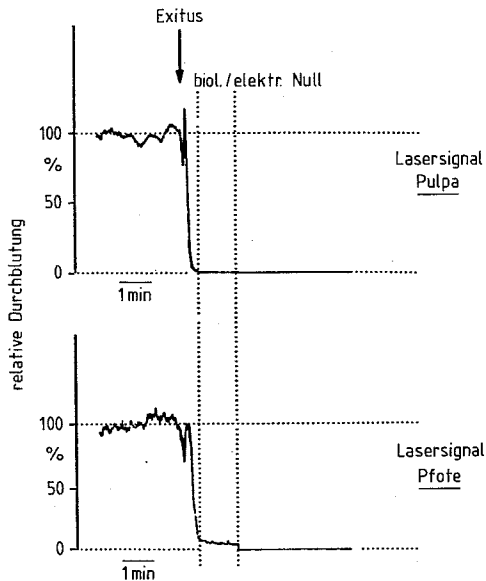


Abb. 6 Bei postmortalem Zirkulationsstillstand zeigt sich nahezu keine Differenz zwischen biologischer und elektrischer Nulllinie der LDF am Zahn

Literatur

- Born, G. V. R., Melling, A., Whitelaw, J. H.: Laser Doppler microscope for blood velocity measurements. *Biorheology* 15, 163-172 (1978).
- Cochrane, T., Earnshaw, J. C.: Practical laser Doppler microscopes. *J Phys E Sci Instrum* 11, 196-198 (1978).
- Edwall, L., Kindlova, M.: The effect of sympathetic nerve stimulation on the rate of disappearance of tracers from various oral tissues. *Acta Odont Scand* 29, 387-400 (1971).
- Einav, S., Berman, H. J., Fuhro, R. L., Digiovanni, P. R., Fine, S., Fridman, J. D.: Measurement of velocity profiles of red blood cells in the microcirculation by laser Doppler anemometry (LDA). *Biorheology* 12, 207-210 (1975).
- Gängler, P., Pilz, W.: Möglichkeiten biofunktioneller Untersuchungsmethoden der Blutversorgung. *Stomat DDR* 24, 303-307 (1974c).
- Kim, S., Schuessler, G., Chien, S.: Measurement of blood flow in the dental pulp of dogs with the ¹³³Xenon washout method. *Arch Oral Biol* 28, 501-505 (1983).
- Mishina, M., Koyama, T., Asakura, T.: Velocity measurements of blood flow in the capillary and vein using a laser Doppler microscope. *Appl Optics* 14, 2326-2327 (1975).
- Raab, W. H.-M.: Untersuchungen zur neurogenen Entzündung der Zahnpulpa. *Med Habilitationsschrift*, Erlangen 1988.
- Riva, C., Ross, B., Bendek, G. B.: Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries. *Invest Ophthalmol* 11, 936-944 (1972).
- Tenland, T.: On Laser Doppler Flowmetry. *Methods and Microvascular Applications*. Linköping Studies in Science and Technology Dissertations No. 83 / Linköping University Medical Dissertations No. 136, Linköping 1982.
- Uptegrove, D. D., Bishop, J. G., Dorman, H. L.: A method for detection of blood flow in the dental pulp. *J Dent Res* 45, 1115-1119 (1966).
- Watkins, D., Holloway, G. A. jr.: An instrument to measure cutaneous blood flow using the Doppler shift of laser light.
- Yeh, Y., Cummins, H. Z.: Localized fluid flow measurements with an He-Ne laser spectrometer. *Appl Phys Letters* 4, 176-178 (1964).

Korrespondenzadresse:

Priv.-Doz. Dr. W. H.-M. Raab,
Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie,
Glückstraße 11, D-8520 Erlangen.

(1063)