

W. H.-M. Raab¹

Zur tierexperimentellen Bestimmung der Reaktion der Zahnpulpa auf zahnärztliche Materialien

Mit Hilfe der Laser-Doppler-Flußmessung können Veränderungen der Mikrozirkulation quantitativ erfaßt werden. Es wird überprüft, ob mit diesem Verfahren die Gewebeverträglichkeit zahnärztlicher Materialien untersucht werden kann. Die vorliegenden Experimente am Inzisivus der Ratte zeigen, daß Durchblutungsreaktionen in unmittelbarer Nähe des Applikationsortes erfaßt werden können. Die reaktive Änderung der Mikrozirkulation weist im apikalen Abschnitt deutliche Unterschiede zur lokalen Reaktion an der Applikationsstelle auf. Durch geeignete Modifikation der Versuchsanordnung ist es möglich, die Durchblutung im apikalen und inzisalen Pulpaabschnitt synchron darzustellen. Am Beispiel von Calciumhydroxid wird die lokale und die Gesamtreaktion der Pulpa dargestellt.

1 Einleitung

Unter dem Gesichtspunkt der Prüfung der Gewebeverträglichkeit nehmen die zahnärztlichen Materialien eine Sonderstellung ein. Dies ist darin begründet, daß sie in der überwiegenden Mehrzahl während oder nach der Applikation einem Erhärtungsprozeß unterliegen. Während dieses Vorgangs können sowohl physikalische Reize, wie z. B. Wärme oder Feuchtigkeitsentzug, aber auch chemische Reize durch toxische Zwischenprodukte auftreten. Die davon ausgehende Wirkung kann unabhängig von der Wechselwirkung der Einzelsubstanzen oder des Endproduktes erfolgen.

Mit den bisher angewandten Verfahren [1, 4, 13, 14] ist eine Überprüfung der Gewebeverträglichkeit in dieser initialen Phase nur schwer möglich. Eine Ausnahme stellt in dieser Hinsicht die Vitalmikroskopie [3, 5, 7] dar. Eine Übertragung von Ergebnissen aus der Zellkultur [4, 14, 19] oder dem Implantationsversuch [18] ist nur bedingt möglich, da die Zahnpulpa aufgrund ihrer morphologischen Gegebenheiten im Rahmen der Entzündungsabläufe eine Sonderstellung einnimmt. Bei beiden vorgenannten Untersuchungsmethoden bleibt zudem die Existenz von unterschiedlich starken Zahnhartsubstanzen unberücksichtigt.

Histologische Methoden [2] ermöglichen die Untersuchung am relevanten Organsystem, erlauben jedoch nur eine Momentaufnahme innerhalb eines dynamischen Prozesses.

Unsere Absicht war es, ein Verfahren zu entwickeln, das es ermöglicht, über eine Zeitdauer von mehreren Stunden die Reaktion der Pulpa vor, während und nach der Applikation zahnärztlicher Materialien unter klinikorientierten Bedingungen zu prüfen.

2 Material und Methode

Die Untersuchungen wurden an Wistar-Ratten durchgeführt. Die Tiere werden intraperitoneal mit Thiopental narkotisiert. Die weiteren Präparationsschritte erfolgen zunächst wie bereits für die Untersuchungen zur Laser-Doppler-Flußmessung an der Zahnpulpa beschrieben [9]. Zusätzlich wurde eine Kavität von 1,5 mm Länge in axialer Richtung für die Materialprüfung angelegt, wobei eine Restdentschicht von etwa 100 µm zur Pulpa belassen wird. Diese Kavität überdeckt ein Teflontubus mit einem Innendurchmesser von 1,5 mm und einer Wandstärke von 0,2 mm, der auf Höhe der Kavität eine Öffnung aufweist. Auf diese Weise erhält man eine 1,5 mm mal 1,5 mm große Fläche für die Prüfung der Materialien. Der Tubus wird nun mit kompensierter Ringerlösung von 37 °C gefüllt und mittels lichthärtendem Kunststoff im Randbereich fixiert (Abb. 1). die Ringerlösung füllt den kapillaren Spalt im Kontaktbereich zum Dentin und verhindert somit ein unerwünschtes Einfließen des Kunststoffes. Gleichzeitig wird hierdurch die physiologische Umgebungsbedingung bis zur eigentlichen Versuchsdurchführung aufrechterhalten.

Die Messung der Blutzirkulation erfolgt in einer Thermoküvette mittels eines Laser-Doppler-Flußmessers (Periflux Pf2B) [15, 16, 17] unter Verwendung einer Lichtleitersonde, die in unmittelbarer Nähe zur Testkavität fixiert wird (Abb. 2). Um systemische Blutdruckschwankungen und deren Auswirkungen auf die Zahnpulpa zu erfassen, wird eine weitere Lasersonde an der Hinterpfote angebracht.

Das Signal der Laser-Doppler-Flußmessung wird als Spannungswert ausgegeben, dessen Betrag direkt proportional dem Produkt aus Erythrozytenanzahl und deren Geschwindigkeit ist. Die erhaltenen Daten werden zur späteren Auswertung digitalisiert (CED 1401, Cambridge Electronic) und auf einem IBM-kompatiblen Rechner (Tandon AT) abgespeichert.

Wie anhand der Ergebnisse später dargestellt wird, veranlaßten uns die eigenen Beobachtungen, das beschriebene Verfahren für bestimmte Materialprüfungen zu modifizieren.

Zusätzlich zur bisher erfolgten Präparation wird nun ein weiteres Dentinfenster apikal zur Testkavität angelegt. Damit können die Veränderungen der Mikrozirkulation apikal und inzisal vom Applikationsort untersucht werden. Die Justierung der LDF-Sonden erfolgt über Mikromanipulatoren (Guhl) mit einer Einstellgenauigkeit von 0,05 mm. Die apikale Sonde zeigt einen Durchmesser von 1,75 mm, die inzisale von 0,75 mm. Beide Sonden unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Meßcharakteristik nicht.

Aufgrund der anatomischen Verhältnisse kann an der Rattenzahnpulpa mit der apikalen Elektrode der Blutfluß im gesamten Pulpaquerschnitt erfaßt werden. Das Meßfeld der inzisalen Elektrode entspricht etwa einem Drittel der der apikalen Elektrode. Um die physiologischen Umgebungsbedingungen aufrecht zu erhalten, wird der Zahn allseitig mit thermostatisierter kompen-

¹ Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie (Direktor: Prof. Dr. A. Kröncke), Universität Erlangen-Nürnberg.

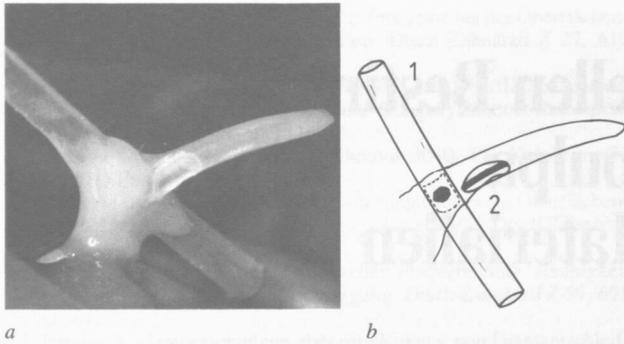


Abb. 1 a/b Inzisivus der Ratte mit fixiertem Teflontubus (1) und Dentinfenster für die Lasersonde (2)

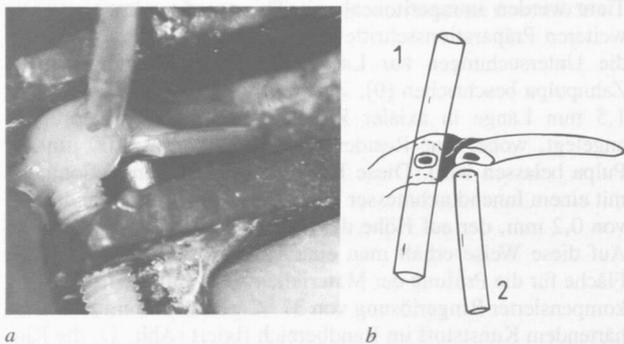


Abb. 2 a/b Lage des Zahnes in der Thermoküvette, der Tubus (1) wird durch den Küvettenboden geführt. Vor dem Dentinfenster erkennt man das Führungsrohr für die Lasersonde (2)

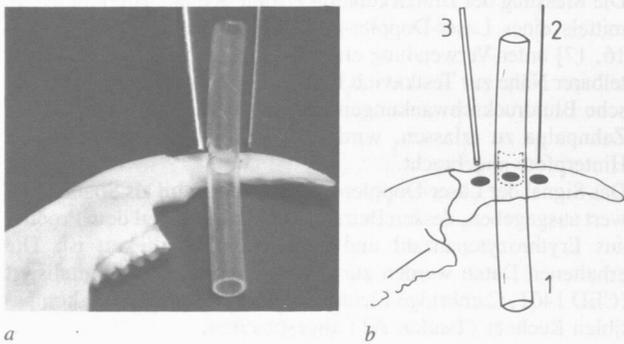


Abb. 3 a/b Rattenmandibel mit Tubus (1), inzisale (2) und apikale (3) Lage der Lasermesssonde

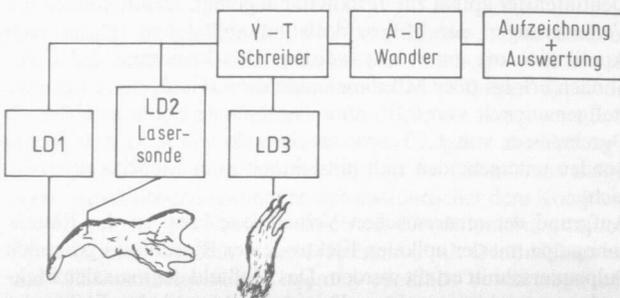


Abb. 4 Schematischer Versuchsaufbau für die Biokompatibilitätsprüfung mittels der Laser-Doppler-Flußmessung

stierter Ringerlösung Lösung von 37 °C umspült. In Abb. 3 ist die Lokalisation von Testkavität und Lasersonde an einem mazerierten Präparat dargestellt. Den schematischen Versuchsaufbau zeigt Abb. 4. Für die Dauer der Untersuchungen liegt das Tier auf einer temperierten Unterlage.

Zu Beginn der Messungen werden die Lasersonden justiert und die Blutzirkulation über einen Zeitraum von minimal 30 min kontrolliert. Ist die Pulpadurchblutung über diesen Zeitraum stabil, wird der eigentliche Versuch durchgeführt.

Aus dem Teflontubus wird die Ringerlösung abgesaugt und das Dentin im Bereich des Prüffensers getrocknet. Anschließend wird das zu untersuchende Material eingebracht. Während dieses Vorganges ist der Tubus an beiden Seiten offen, um zu verhindern, daß bei der Applikation Druck entsteht und dadurch eine mechanische Pulpairritation erfolgt.

3 Ergebnisse

Im folgenden sollen die Wechselwirkungen anhand von Einzelfällen dargestellt werden. Am Beispiel von Epinephrin zeigt sich, daß die Zirkulation der Zahnpulpa nahezu völlig zum Erliegen kommt. Die Latenzzeit zwischen Applikation und Reaktion beträgt 30 s. Die rechnerisch ermittelte Restzirkulation entspricht etwa 2–8% des Ausgangswertes. An der Kontrollaufzeichnung der Pfote sind keine Veränderungen feststellbar (Abb. 5).

Die folgenden Abbildungen zeigen die lokale Reaktion nach der Gabe von Calciumhydroxid. Nach der Applikation kommt es bei einer Dentinstärke zur Pulpa von etwa 100 µm zu einer Verminderung der Blutzirkulation zwischen 20 und 30%. Der Blutfluß zeigt Schwankungen um einen konstanten Mittelwert (Abb. 6).

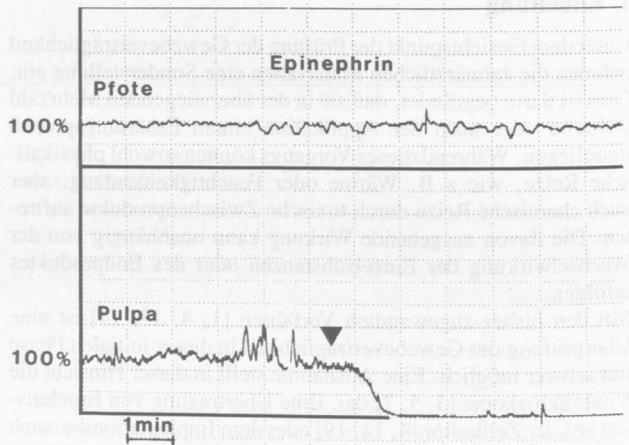


Abb. 5 Verminderung der Pulpadurchblutung nach lokaler Gabe von Epinephrin, die systemische Zirkulation (obere Kurve) ist nicht betroffen. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt

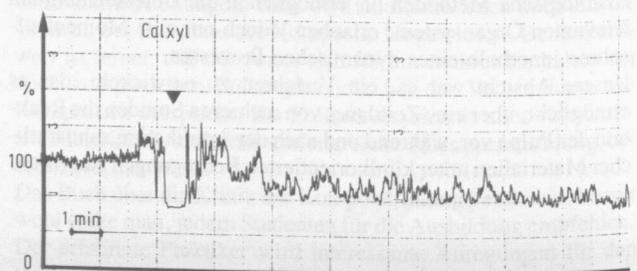


Abb. 6 Veränderung der Mikrozirkulation nach Applikation von Calciumhydroxid

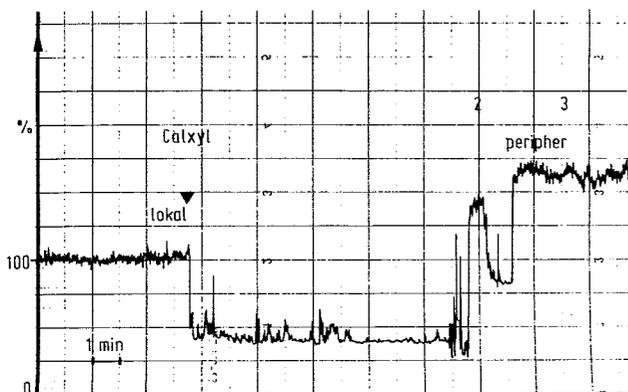


Abb. 7 Vergleich der lokalen und peripheren Mikrozirkulation nach Calciumhydroxid. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt

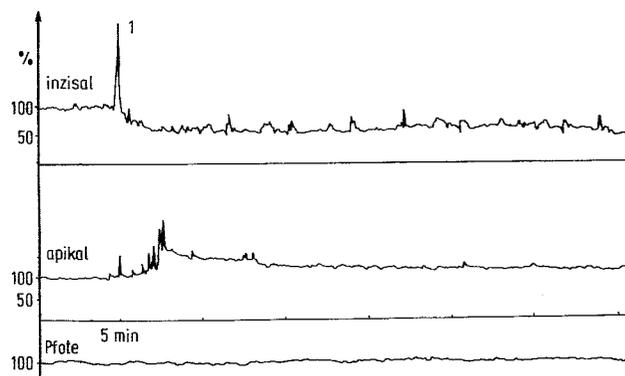


Abb. 8 Vergleich der inzisal und apikalen Durchblutung nach Calciumhydroxid, Kontrolle der systemischen Zirkulation an der Pfote. Das Bewegungsartefakt (1) markiert den Applikationszeitpunkt

In Abb. 7 ist die Reaktion über die gesamte Zeitdauer bei einer erhaltenen Dentinschicht von weniger als 50 μm dargestellt. Die starke Signalveränderung während der Applikation ist ein auf die Bewegung des Präparates zurückzuführendes Artefakt. Man erkennt den deutlichen Abfall der Blutzirkulation auf 15 bis 20% des Ausgangswertes. Die Positionierung der Lasersonde nach peripher ergibt eine lokale Hyperämie in den weiter apikal liegenden Abschnitten der Zahnpulpa (Abb. 7 Pos. 2 und 3). Eine Überprüfung dieser Ergebnisse unter Verwendung zweier Lasersonden ergibt ein vergleichbares Reaktionsmuster. Abbildung 8 zeigt die Reaktion im apikalen und inzisalen Pulpaabschnitt sowie das Kontrollsignal der Pfote nach Applikation von Calciumhydroxid. In analoger Weise zur vorhergehenden Abb. 8 kommt es unmittelbar bei der Applikation zu einem Abfall des Signals auf im Mittel 80% des Ausgangswertes. Die am Apex platzierte Sonde zeigt demgegenüber eine Zunahme der Durchblutung, die in diesem Fall 5 min nach Applikation ihr Maximum von 150% erreicht und innerhalb von 15 min auf ein Niveau von 120% abfällt. Der Ausgangswert wird innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 60 min nicht erreicht. Diese Reaktion ist, wie der Vergleich mit der Blutzirkulation an der Pfote zeigt, nicht systemisch bedingt, eine Mitreaktion ist nicht erkennbar.

4 Diskussion

Zahnärztliche Materialien werden mit verschiedenen Verfahren *in vivo* und *in vitro* getestet. Die am häufigsten angewandte In-

vitro-Untersuchung ist die Zellkultur [4, 13, 14, 19], wobei diesem Verfahren die Funktion einer Vorauswahl zukommt. Die *In-vivo*-Experimente basieren auf histologischen Untersuchungen der Zahnpulpa [2] oder der Implantationsumgebung [18], wobei je nach der späteren Applikationsart Implantation im Knochen oder z. B. im Muskelgewebe erfolgt.

Das Verfahren der vitalmikroskopischen Beurteilung [3, 5, 7] bietet für sich die Vorteile der Untersuchung am relevanten Organsystem und der dynamischen Verlaufskontrolle. Die wertende Beurteilung ähnlicher Präparate ist jedoch stark erschwert und nicht unproblematisch.

Mit dem hier vorgestellten Verfahren wird der Versuch unternommen, die Prüfung an der Zahnpulpa direkt durchzuführen und über die erhaltenen Meßwerte auch geringe Ausprägungsgrade einer Durchblutungsreaktion exakt bestimmen zu können. Aufgrund der systemischen Kreislaufkontrolle kann man die einzelnen Reaktionen gut abschätzen. Wie die Ergebnisse nach der lokalen Gabe von Epinephrin zeigen, kann von einem hohen Signal-Rausch-Abstand ausgegangen werden, der im Bereich von 2% liegt [9]. Damit ist eine quantitative Analyse der Durchblutungsänderung der Zahnpulpa möglich. Dadurch können diese Werte auch einer sinnvollen statistischen Analyse unterzogen werden, wobei die Reaktion hinsichtlich der Dauer, des Maximums und des dynamischen Verhaltens über die Zeit beurteilbar ist. Diese quantitative Darstellung der Daten ist Voraussetzung dafür, daß einzelne Präparate hinsichtlich ihrer Gewebsreaktion miteinander verglichen und geordnet werden können.

Von weitaus größerer Bedeutung ist jedoch die Beurteilung im klinischen Einsatz. Je nach Applikationsform können unterschiedliche Dentinstärken belassen werden. Darüber hinaus ermöglichen diese Untersuchungen eine Kontrolle über einen Zeitraum von bis zu 18 Stunden [10, 11]. Damit ist es möglich zu beurteilen, ob eine Reaktion, die unter der Erhärtung oder der Gewebereaktion des Materials an sich auftritt, möglicherweise als reversibel oder als irreversibel einzustufen ist.

Der wesentliche Vorteil des vorgestellten Verfahrens liegt jedoch in der Differenzierung zwischen lokaler Pulpreaktion, d. h. in unmittelbarer Nähe zum Applikationsort, und generalisierter Reaktion der Pulpa. Bei dieser Untersuchungsart ist der Beobachtungszeitraum jedoch kürzer (6–8 h). Untersuchungen zur Mikro-zirkulation der Zahnpulpa [6] haben gezeigt, daß der Aktivierung von Anastomosen im apikalen Pulpaabschnitt eine wesentliche Rolle bei der Durchblutungssteuerung zukommt. Diese Beobachtungen können auch durch die dargestellten Ergebnisse bestätigt werden. Es zeigt sich, daß eine lokale Reduktion der Mikro-zirkulation durchaus mit einer apikalen Durchblutungserhöhung verknüpft sein kann. Diese Beobachtung kann mit einer Umverteilung der Zirkulation über Anastomosen erklärt werden [6].

Mit Hilfe des beschriebenen Verfahrens kann die lokale und die gesamte Durchblutungsänderung der Zahnpulpa dargestellt werden. Der intrapulpaire Vergleich der Mikro-zirkulation ermöglicht eine präzisere Vorstellung von den reaktiven Veränderungen. Durch die quantitative Datenanalyse können auch geringgradige Reaktionen erfaßt werden.

Summary

Laser Doppler flowmetry is a useful method for quantifying changes in microcirculation. The present study is designed to clarify if this method may also be used to assess the biocompatibility of dental materials. The experiments carried out on rats' incisors have shown that it is possible to record circulatory reactions occurring in the direct vicinity of the site of application. The reactive change in microcirculation in the apical part clearly

differs from the local reaction at the site of application. A modification of the experimental set up allows the synchronous recording of blood flow in the apical and the incisal parts of the pulp. Calcium hydroxide is used to illustrate the local and the overall circulatory reaction of the dental pulp.

Literatur

1. Dahl, B. L., Tronstad, L.: Biological tests of a glassionomer (silico-polyacrylate) cement. *J Oral Rehabil* 3, 19–24 (1976).
2. Felton, D. A., Cox, C. F., Odom, M.: Histologic study of a light cured glass ionomer cavity liner. *J Dent Res* 67, 1517 (1988).
3. Gängler, P., Pilz, W.: Möglichkeiten biofunktioneller Untersuchungsmethoden der Blutversorgung. *Stomat DDR* 24, 303–307 (1974).
4. Geurtsen, W.: Untersuchungen zur Toxizitätsdauer eines Komposits. *Dtsch Zahnärztl Z* 41, 496–498 (1986).
5. Hoyer, I., Gängler, P., Krehan, F., Niemela, S., Weinert, W.: Biologische Prüfung und klinische Bewertung von Komposit Füllungen. *Dtsch Zahnärztl Z* 44 (2), 100–105 (1989).
6. Kim, S., Schuessler, G., Chien, S.: Measurement of blood flow in the dental pulp of dogs with the 133 Xenon washout method *Arch Oral Biol* 28 (6), 501–505 (1983).
7. Krehan, F., Gängler, P., Hoyer, I., Koch, I.-L.: Vitalmikroskopische Prüfung der Pulpreaktion auf Proviso-blend im akuten biologischen Test. *Dtsch Zahnärztl Z* 39, 508–511 (1984).
8. 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).
9. Raab, W. H.-M.: Die Laser-Doppler-Flußmessung: Untersuchungen zur Mikrozirkulation der Zahnpulpa. *Dtsch Zahnärztl Z* 3, 198 (1989).
10. Raab, W. H.-M. und Müller, H.: Temperaturabhängige Veränderungen der Mikrozirkulation der Zahnpulpa. *Dtsch Zahnärztl. Z* 7, 496, (1989).
11. Raab, W. H.-M., Magerl, W., Müller, H.: Changes in dental blood flow following electrical tooth pulp stimulation – influences of capsaicin and guanethidine. *Agents Actions* 25, 3/4 (1988).
12. 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).
13. Roulet, J. F., Rui, J., Ritz, B., Hotz, P.: Die Pulpaverträglichkeit von Glasionomer-Zement. (Eine tierexperimentelle Studie). *Schweiz Mschr Zahnheilk* 90, 1116–1126 (1989).
14. Schmalz, G.: Die Gewebeerträglichkeit zahnärztlicher Materialien. Möglichkeiten einer standardisierten Prüfung in der Zellkultur. Thieme, Stuttgart 1982.
15. 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.
16. 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).
17. Watkins, D., Holloway, G. A. jr: An instrument to measure cutaneous blood flow using the Doppler shift of laser light. *IEEE Trans Biomed Eng BME* 25, 28–33 (1984).
18. Welker, D., Katenkamp, D., Neupert, G.: Composite-Füllungsmaterial und Aluminium-Siliko-Polyacrylat-Zement im biologischen Test – Zellkultur und Implantation. *Öst Z Stomat* 76, 445–454 (1979).
19. Willershansen, B., Lemmen, C., Sonnabend, E.: Versuche mit Glasionomerzementen in der Zellkultur bei längerer Liegezeit. *Dtsch Zahnärztl Z* 42, 342–344 (1987).

Korrespondenzadresse:

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

(11280)