Tierexperimentelle Caries in 10 Tagen

Autor(en): **Mühlemann, H.R. / Marthaler, T.M. / König, K.G.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie Suisse des Sciences Medicales = Bollettino dell' Accademia Svizzera delle Scienze Mediche**

Band (Jahr): **12 (1956)**

Heft 6

PDF erstellt am: **29.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-307286

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

D.K. 616.314-002

Aus dem Zahnärztlichen Institut der Universität Zürich
Abteilung für Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie

Tierexperimentelle Caries in 10 Tagen*

Von **H. R. Mühlemann, T. M. Marthaler, K. G. König** und **H. S. Schmid**, Zürich

Die Suche nach neuen und besseren lokal wirkenden Carieshemmstoffen (Kontakt-Wirkstoffe) gliedert sich in *Laboratoriumsuntersuchungen*, *tierexperimentelle* und *klinische Studien*. Gegenstand der *in vitro-Untersuchungen* ist vorwiegend die Austestung von Hemmstoffen auf

a) antienzymatische und

b) schmelzlöslichkeitsherabsetzende Eigenschaften.

Im *Tierversuch* erfolgt die Prüfung der im Labor als aussichtsreich beurteilten Cariesprophylaktika. Dieses in vitro- und in vivo-«Screening» von neuen Hemmstoffen ist erforderlich, um beim folgenden Versuch am Menschen – ein Unternehmen, das einen Riesenaufwand erfordert – berechtigte Hoffnungen auf die cariesprophylaktische Bewährung des schließlich gewählten Wirkstoffes zu besitzen.

Unter *Laboratoriumsbedingungen* können mit relativ bescheidenen Mitteln Hunderte von antienzymatischen und «schmelzhärtenden» Substanzen durchgetestet werden. Das nachfolgende *Tierexperiment*, das nicht übergangen werden kann, ist in materieller und zeitlicher Hinsicht wesentlich anspruchsvoller und auferlegt dem Forscher eine absolute Beschränkung in der Wahl der Hemmstoffe. Bis zu Beginn der Fünfzigerjahre betrug die durchschnittliche Experimentalzeit zur Erzeugung der Ratten- und Hamstercaries sowohl in den USA als auch in Europa ca. 3–4 Monate. Es ist dies ein Zeitaufwand, der die Cariesforschung ungemein belastet und bremst. Das Bedürfnis nach besseren Experimentalbedingungen liegt auf der Hand. *McClure* (1) wies 1955 im Rahmen eines Teilbefundes auf die Möglichkeit 30tägiger in vivo-Cariesteste hin. *Losee*, *Gerende* und *Nemes* berichteten 1955 über «A thirty-day cariogenic diet for Osborne-

* Mit der dankenswerten Unterstützung durch die Gaba AG., Basel, und teilweise durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung.

Mendel rats» (2). *Stephan* (1955 [3]) veröffentlichte Cariesbefallzahlen bei einer 56-Tage-Experimentalzeit.

Es ist die Aufgabe dieser Mitteilung, darauf aufmerksam zu machen, daß bei entsprechenden Versuchsbedingungen und adäquaten Beobachtungsmethoden die Rattenzahncaries während einer noch viel kürzeren Experimentalzeit erzeugt und anschließend zuverlässig ausgewertet werden kann. Wir stützen uns dabei auf einen Cariesversuch (KV VI), dessen Ziel es war, die *unterste noch geeignete Experimentalzeit und die unterste Zahl der erforderlichen Versuchstiere festzustellen.* Nachdem in früheren Cariesstudien (KV I bis KV V) eine Experimentalzeit von 44, bzw. 22 Tagen gewählt worden war, wurde diese auf 15 bzw. 10 Tage angesetzt. Auch die pro Hemmstoff eingesetzte Zahl von Versuchstieren wurde von ursprünglich 24 in den ersten Versuchen auf nur 6 Tiere herabgesetzt, selbstverständlich unter Berücksichtigung biostatistischer Arbeitsmethoden sowohl bei der Planung als auch bei der Auswertung des Versuches.

Methodik

Als Versuchstier wurde die hoch cariesanfällige *Osborne-Mendel-Ratte** verwendet. Je acht 21 Tage alte Tiere aus 3 Würfen ($3B_1$, $3B_4$, $3A_4$) wurden innerhalb des Wurfes nach Zufall auf 3 Hemmstoffe und 1 Kontrolle verteilt. Eine Gruppierung nach dem Geschlecht unterblieb, da die früheren Cariesversuche keinen Hinweis auf eine Abhängigkeit des Cariesbefalls vom Geschlecht bei der Osborne-Mendel-Ratte gezeigt hatten.

Die eine Hälfte der Tiere wurde 10, die andere 15 Tage nach Versuchsbeginn geopfert und auf Zahncaries untersucht. Tab. 1 gibt Aufschluß über die Versuchsanordnung.

Die Ratten wurden in Einzelkäfigen mit Metalldrahtböden in einem klimatisierten Stall gehalten. Die *Wirkstoffe* (NaF, SnF_2, Präparat 276) wurden im Trinkwasser mittels Polyäthylenflaschen, bei einer Konzentration von 100 ppm F^- und bei einem pH von 2,9 verabreicht. Die Hemmstoffe und die cariogene Kost wurden gleichzeitig, vom 21. Lebenstag an, verabfolgt. Die trockene *cariogene Kost* bestand aus 66% Rohrzucker, 32% ungezuckerter Trockenmilch und 2% Trockenleber. Die Korngröße bewegte sich um 0,06–0,042 mm.

Zur Auswertung der cariösen Läsionen wurden von jedem Tier die nicht entkalkten UK-Molaren links und rechts mit der von *Jansen* (4) angegebenen und von *Cremer* (5) neuerdings beschriebenen Schnittmaschine

---

* Wir danken den National Institutes of Health, Bethesda, Md. für die Überlassung von Zuchttieren.

Tabelle 1
Cariesversuch VI; Zahl cariöser Läsionen im Unterkiefer nach 10- bzw. 15tägiger Versuchsdauer

Wirkstoff	pH	Versuchsdauer in Tagen	Würfe				Total
			$3B_1$	$3B_4$	$3A_4$	Zusammen	
NaF	2,9	10	7	9	4	20	40
		15	7	4	9	20	
SnF_2	2,9	10	2	6	9	17 (1)*	36 (1)
		15	5	8	6	19	
Präp. 276	2,9	10	2	6	7	15	36
		15	6	9	6	21	
Aqua dest.	2,9	10	9	12	12	33 (6)	64 (9)
		15	9	10	12	31 (3)	

* Zahl der approximalen Läsionen innerhalb der totalen Läsionenzahl.

in je 6 Schnitte pro Kieferhälfte zersägt, womit pro Tier insgesamt 12 Zahnschnitte zur Beurteilung unter dem Mikroskop (Vergrößerung 25 und 50 mal) gelangten. Diese mikroskopische Untersuchung der Schmelz- und Dentincaries wurde durch Anfärben mit fuchsinschwefliger Säure (Schiff-Reagenz) erleichtert. Cariöse Läsionen wurden in bezug auf ihre Anzahl und Schwere beurteilt. Die Schwere der Hartsubstanzveränderungen wurde nach folgender Gradeinteilung definiert:

Grad A: Farbreaktion auf den Schmelz beschränkt, bei intakter Schmelzoberfläche und nicht angefärbter Schmelz-Dentin-Grenze.*

Grad B: Farbreaktion an und jenseits der Schmelz-Dentin-Grenze: beginnende Dentinbeteiligung; halbmondförmige Ausbreitung des Prozesses unter dem Schmelz; geringe Ausdehnung sowohl in die Tiefe als auch entlang der Schmelz-Dentin-Grenze; frühestes definitives Stadium der Caries nach *Schlack, Howell, Taylor* (6) und nach *Losee, Gerende, Nemes* (2).

Grad C: Intensive Dentinanfärbung: in die Tiefe des Dentins und entlang der Schmelz-Dentin-Grenze; höckerwärts fortgeschrittene Dentincaries bei beginnender Abhebung des Schmelzes und beginnender Kavitation.

Das Verhältnis der 2 Grade B und C innerhalb einer Gruppe diente zur Charakterisierung der Schwere des cariösen Befalls dieser Gruppe.

Resultate

1. Häufigkeit der Läsionen

Die Resultate gehen aus der Tab. 1 hervor. Bereits nach einer 10tägigen Versuchsdauer wurden pro Unterkiefer in den Hemmstoffgruppen gleich viele *okklusale Läsionen* (Grad B, C*; Fissurencaries) gefunden:

* Grad A wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt, da in so kurzzeitigen Versuchen die entsprechenden Farbreaktionen keine eindeutige Unterscheidung zwischen stellenweise noch nicht abgeschlossener Schmelzreifung und Grad A zuläßt.

für NaF = 20; SnF_2 = 17; Präparat 279 = 15. Bei einer 15tägigen Versuchsdauer waren die Verhältnisse prinzipiell dieselben.

In der Kontrollgruppe waren 55 *okklusale* und zusätzlich 9 *proximale Läsionen*, die in den Hemmstoffgruppen fehlten, vorhanden.

Die Unterschiede der *Läsionenzahlen* zwischen Hemmstoffgruppen und Kontrollen sind bei Zusammenfassung des 10- bzw. 15-Tage-Versuches signifikant, wie aus einer Streuungszerlegung (Tab. 2) hervorgeht.

Tabelle 2
Statistische Auswertung der Läsionenzahlen mittels einer Streuungszerlegung (KV VI)

Streuung	Freiheitsgrade	Summe der Quadrate	Durchschnitts-Quadrat	Signifikanz P_F
Zwischen Versuchsgruppen	3	90,67	30,22	<0,01
Orthogonale Aufteilung:				
mit/ohne Hemmstoffe	1	88,89	88,89	<0,001
NaF/SnF_2+276	1	1,78	1,78	
$SnF_2/276$	1	0,0	0,0	
Zwischen Würfen	2	25,58	12,79	
Zwischen Versuchsdauer	1	1,50	1,50	
Versuchsstreuung*	16	65,58	4,10	
Insgesamt	22	183,33		

* Da die Zweifaktoren-Wechselwirkungen sich nicht von der Reststreuung unterscheiden (P >0,1), wurden die Summen der Abweichungsquadrate zusammengezählt und ein neuer Versuchsfehler ermittelt. Da die Läsionenzahl einer Ratte fehlte und ersetzt werden mußte, reduzierte sich die ursprüngliche Zahl der Freiheitsgrade von 17 (6 + 6 + 3 + 2) auf 16.

2. *Schwere der Läsionen*

Die Schwere des cariösen Befalls innerhalb der zusammengefaßten Hemmstoffgruppen und der Kontrollgruppe ist in Abb. 1 graphisch dargestellt. Es ist ersichtlich, daß die Hemmstoffgruppe relativ mehr leichte Läsionen (B) als schwere (C) aufweist wenn sie mit der Kontrollgruppe verglichen wird. Die Unterschiede sind ebenfalls signifikant. Abb. 2 zeigt die Approximal- und Fissurencaries eines Kontrolltieres.

Diskussion

Es sei ausdrücklich betont, daß die Resultate dieses Versuches *nichts Bindendes über den cariesprophylaktischen Effekt der verwendeten Hemmstoffe aussagen* wollen und können. Jedoch ist für weitere Versuche festzuhalten: a) daß mit den beschriebenen Arbeitsmethoden die experimentelle Rattencaries innerhalb von 10 Tagen okklusal und auch approximal zu erzeugen und zu erfassen ist. Es macht durchaus den Eindruck,

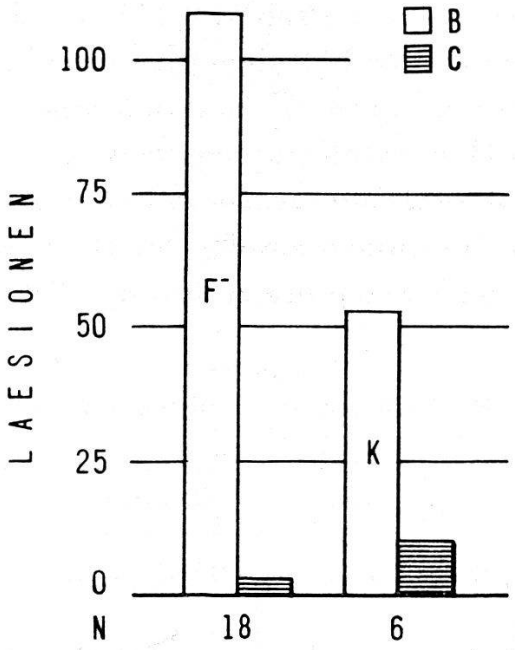

Abb. 1. Zahl der Läsionen B und C bei 18 experimentellen (F^-) und 6 Kontrollratten (K).

Abb. 2. Approximal- und Fissurencaries in Unterkieferrattenmolaren (Grad B) nach 10 Tagen Carieskostverfütterung. Tieralter 31 Tage.

daß a) die Versuchsdauer noch weiter gesenkt werden kann; b) daß innerhalb 10 Tagen Experimentalzeit bereits cariesprophylaktische Hemmstoffwirkungen auf die Zahl und Schwere der Läsionen zu beobachten sind.

Auf Grund der Resultate dieses Versuches dürften in Zukunft zur orientierenden Beurteilung cariesprophylaktisch bedeutungsvoller Hemmstoffe 12 Ratten pro Wirkstoff ausreichend sein. Voraussetzung ist allerdings eine zufällige Verteilung der *Tiere desselben Wurfes* auf die zu prüfenden Substanzen und eine weitgehendste Standardisierung aller äußeren Einflüsse. Eine Blockbildung (Würfe = Blöcke) ist absolut unerläßlich, da selbst bei homogenen Inzuchtstämmen die Cariesanfälligkeit zwischen den Würfen erheblich, innerhalb des Wurfes jedoch nur wenig streut. Insbesondere die vorgeschlagene Zahl 12 (12 Tiere pro Wirkstoff) eignet sich nicht nur infolge ihrer Teilbarkeit durch 2, 3, 4 und 6, sondern auch durch den Umstand, daß bei der Blockbildung und Verfahrenszuteilung pro Wurf meistens mit 6–8 Tieren gerechnet werden kann.

Kurzfristige Cariesversuche besitzen zahlreiche Vorteile:

1. Es wird in Zukunft besser zwischen der Hemmung der *Initiation* und der *Progression* einer cariösen Läsion unterschieden werden können, was, wie schon *Johansen* (7) gezeigt hat, unbedingt erforderlich ist.

2. Die kurze Experimentalzeit gestattet eine viel höhere Dosierung der Wirkstoffe im Trinkwasser. Dadurch werden Bedingungen erzielt, die denjenigen der Zahnpastenprophylaxe ähnlicher sind.

3. Kurzfristige Cariesversuche gestatten ein wirkungsvolleres Arbeiten. Bei geringerem materiellem Aufwand können innert relativ kurzer Zeit zahlreiche Substanzen geprüft werden.

Zusammenfassung

An der Osborne-Mendel-Ratte sind innerhalb von 10 Tagen cariöse Schmelz- und Dentinläsionen (Fissuren- und Approximalcaries) zu erzeugen. Die cariesprophylaktische Wirkung von Kontakthemmstoffen (z. B. Natriumfluorid, Zinnfluorid) ist bei der kurzfristigen Experimentalzeit sowohl in bezug auf die Zahl als auch die Schwere der Läsionen feststellbar. In kurzfristigen Versuchen kann besser zwischen Hemmung der Initiation und der Progression der cariösen Läsionen differenziert werden. Die Studie zeigt, daß zur orientierenden Austestung cariesprophylaktisch bedeutungsvoller Stoffe 12 Tiere pro Hemmstoff genügen. Voraussetzung ist jedoch eine Versuchs*planung* und Auswertung nach den Regeln der Biostatistik, wie auch eine weitgehende Standardisierung der äußeren Versuchsbedingungen.

Kurzfristige Cariesversuche gestatten eine rasche Austestung von Hemmstoffen und eine Hemmstoffverabreichung im Trinkwasser bei einer (toxischen) Dosierung, wie dies in mehrmonatigen Cariesversuchen unmöglich ist. Damit gleichen sich die Carieshemmstudien den Bedingungen an, wie sie bei Verwendung sogenannter cariesprophylaktischer Zahnpasten bestehen.

Résumé

Dans l'espace de 10 jours, il est possible de provoquer chez le rat de type Osborne-Mendel des lésions cariées de l'émail et de la dentine (carie en fissure et interproximale). Même dans une expérimentation de si courte durée, il est possible d'apprécier l'action prophylactique de substances protectrices de contact (p. ex. NaF, SnF_2) tant au point de vue du nombre que de la gravité des lésions constatées. Dans des expériences de courte durée, il est plus aisé de différencier entre le blocage du début des lésions et l'arrêt de progression de lésions déjà commencées. L'expérience montre qu'il suffit d'une douzaine d'animaux par substance protectrice étudiée pour tester l'action prophylactique vis-à-vis de la carie dentaire d'un produit donné. Il faut toutefois comme condition préliminaire un plan de travail déterminé et une appréciation critique des résultats, selon les lois de la biostatique et aussi une standardisation aussi grande que possible des conditions extérieures des expériences.

Des essais de courte durée permettent un test rapide de substances protectrices et un dosage de ces substances dans l'eau de boisson à des taux, qui sont impossibles parce que trop toxiques, lors d'expérimentations durant plusieurs mois. C'est ainsi que l'étude de substances bloquant l'apparition de la carie dentaire réalise les conditions qui se présentent lorsqu'on applique, par exemple, des pâtes dentifrices protégeant de la carie.

Riassunto

Con una dieta appropriata è stato possibile provocare, nel breve periodo di 10–15 giorni, lesioni da carie (fissurali, approssimali) nello smalto e nella dentina di ratti Osborne-Mendel. In un esperimento di così breve durata è possibile controllare l'azione profilattica delle sostanze anticarie (NaF, SnF_2 etc.) tanto dal punto di vista del numero che della gravità delle lesioni osservate.

L'esperimento dimostra che sono sufficienti 12 ratti (per ogni sostanza da esaminare) per poter constatare l'azione profilattica di un prodotto ad azione anticarie.

Come condizione preliminare è necessario tuttavia

a) lavorare secondo un piano di studio esattamente prestabilito;

b) un apprezzamento critico dei risultati secondo le leggi della biostatica;

c) standardizzare il più possibile le condizioni esterne delle varie esperienze.

Esperimenti di breve durata permettono un esame rapido delle sostanze anticarie, nonchè la somministrazione delle stesse in dosi tali che sarebbero letali se l'esperienza dovesse durare parecchi mesi. Inoltre, in questi esperimenti di breve durata, si realizzano condizioni analoghe a quelle in cui le sostanze anticarie vengono a trovarsi quando sono incorporate per esempio nelle paste dentifricie ad azione anticarie.

Summary

It was possible to induce with a suitable diet the occlusal- and proximal-type caries lesions in Osborne-Mendel rats in short periods of 10 or 15 days. The influence of cariesprotective agents on the number and severity of caries lesions could be evaluated microscopically.

The method allows rapid screening of anticaries substances at concentrations higher than in long period experiments. The use of 12 animals per experimental group is suggested for further studies if those are planned according to the methods of efficient experimental design.

1. *Mc Clure, F. J.*, und *Folk, J. E.:* J. Dent. Res. **34**, 358 (1955). – 2. *Losee, F. L., Gerende, L. J.*, und *Nemes, J. L.:* Naval Med. Res. Inst. (Bethesda, Md.) 1955; Res. Rep. Proj. NM 008 012. 01. 14. – 3. *Stephan, R. M.*, und *Harris, M. R.:* Advanc. Exp. Caries Res. (Wash.) 1955, S. 47. – 4. *Dalderup, L. M.*, und *Jansen, B. C. P.:* Int. Z. Vitaminforsch. **26**, 235 (1955). – 5. *Büttner, W., Cremer, H. D.*, und *Herrmann, U.:* Dtsch. zahnärztl. Zschr. **11**, 984 (1956). – 6. *Schlack, C. A., Howell, S. R.*, und *Taylor, B. L.:* Naval Med. Res. Inst. (Bethesda, Md.) 1947; Proj. X-418, Rep. Nr. 5. – 7. *Johansen, Erling* und *Keyes, P. H.:* Advanc. Exp. Caries Res. (Wash.) **1955**, S. 1.