

Institutt for klinisk odontologi

Det helsevitenskapelige fakultet

In vitro micro-CT analyse av demineraliseringslesjoner på emaljeoverflaten

Robert Julian Johansen, Mathias Gyllan Hanssen og Oda Bendika Damås Olsen

Masteroppgave i klinisk odontologi, Mai 2020

Innhold

1. Introduksjon	7
1.1. Objektiv	11
2. Metode.....	12
2.1. Innsamling, utvalg og klargjøring av tenner.....	12
2.2. Valg av demineraliseringsløsninger, tidsbruk og temperatur	14
2.2.1. Valg av demineraliseringsløsninger	14
2.2.2. Tidsintervaller og temperaturer	15
2.3. Mikro-CT – Evaluering og bildeanalyse	16
3. Resultater.....	17
4. Diskusjon.....	22
4.1. Resultater og funn	22
4.2. Begrensninger med studien	23
4.2.1. Emaljekvalitet.....	23
4.2.2. Neglelakk.....	24
4.2.3. Begrensninger i utvalgte syreløsninger	24
4.2.4. Begrensninger i analyse.....	25
4.3. Styrker ved studien.....	26
4.4. Sammenligning av studier	27
5. Konklusjon	29
6. Vedlegg	30
7. Referanser.....	31

Forkortelser

DMFT/DMFS: Decay missing filled teeth, decay missing filled surface

Micro-CT: Microcomputed tomography

REK: Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk

GØRS: Gastroøsofagal reflukssykdom

TkNN: Tannhelsetjenestens kompetansesenter Nord-Norge

UTK: Universitetstannklinikken

UiT: Universitetet i Tromsø

UiO: Universitet i Oslo

IKO: Institutt for klinisk odontologi

CAS-nr: Chemical Abstracts Service number: et registreringsnummer for kjemikalier

Preskanning: skanning av kronebit før den blir utsatt for respektiv syreløsning

Postskanning: skanning av kronebit etter den har blitt utsatt for respektiv syreløsning i x antall minutter/timer

BT: Berit Tømmerås

NLB: Napat Limchaichana Bolstad

Tabelloversikt

Tabell 1 – Kariesfrie barn og ungdom mellom 6-19 år presenteres i prosent med D3MFT

Tabell 2 – Oversikt over resultater

Tabell 3 – Studier, type og antall tenner, demineraliseringsmodell, demineraliseringsløsning, pH, tid, inkubator (37° celsius), lesjonsdybde.

Figuroversikt

Figur 1 – Bedømming av initialkaries røntgenologisk

Figur 2 – Oversikt over antall tenner benyttet og ekskludert

Figur 3 – Viser illustrert hvordan kronebitene ble utformet med heldekkende neglelakk med unntak av demineraliseringsvinduet

Figur 4 – Kronebiter sett i DataViewer utsatt for Coca-Cola® (The Coca-Cola Company, USA)

Figur 5 – Kronebiter sett i DataViewer utsatt for syreløsning 1

Figur 6 – Kronebiter sett i DataViewer utsatt for syreløsning 2

Figur 7 – Kronebiter sett i DataViewer utsatt for TotalEtch® (Ivoclar Vivadent, Lichtenstein)

Figur 8 – Kronebiter sett i DataViewer naturlig karies, utvalgte syreløsninger og erosjon

Veiledere

Napat Limchaichana Bolstad, førsteamanuensis i kjeve- og ansiktsradiologi, Institutt for klinisk odontologi, UiT Norges arktiske universitet.

Lina Stangvaltaite-Mouhat, førsteamanuensis i kariologi, Institutt for klinisk odontologi, UiT Norges arktiske universitet.

Berit Tømmerås, overingeniør, UiT Norges arktiske universitet

Forord

Oppgaven ble valgt i samråd med Napat Limchaichana Bolstad våren 2018, og siden da har det vært en jevn fordeling av arbeid (skriving og forsøk) mellom alle studentene. Alle har også bidratt likt i utvelging av kilder.

Vi ønsker å gi en stor takk til alle våre veiledere, Napat Limchaichana Bolstad, Lina Stangvaltaite-Mouhat og Berit Tømmerås for all hjelp og oppfølging under forsøkene på lab og oppgaveskriving. Vi ønsker også å takke Eirin Grinde Tunheim for hennes arbeid med de innledene forsøk sommeren 2019.

Sammendrag

Nøkkelord: tannemalje, demineralisering, micro-CT, in vitro, pilotstudie

Målsetting: Målet med dette masterforsøket er å danne demineraliseringslesjoner som ligner på initialkaries ved hjelp av 4 ulike syreløsninger på emaljeoverflaten in vitro, og deretter sammenlikne bildene utfra de diagnostiske kriteriene, definert under, for å se hvilken som gir det beste resultatet.

Metode: 40 tenner ble samlet inn fra UTK og TkNN, hvor deretter 12 tenner ble randomisert valgt ut til bruk i dette studiet. Hver krone ble spaltet fra roten og delt videre inn i 2, slik at vi fikk 24 kronebiter. De 24 kronebitene ble utsatt for 4 forskjellige syreløsninger og 2 forskjellige tidsparametere slik at vi fikk 8 grupper totalt. Coca-Cola® (The Coca-Cola Company, USA) (pH 2.4), syreløsning med pH 2.4 og pH 4.4 ble utsatt for syreløsningen i 96 timer og 144 timer. I gruppene hvor Total Etch® (Ivoclar Vivadent, Lichtenstein) 37 % forforsyre-gel med pH<1 ble brukt, var tidsintervallene 30 min og 6 timer. Kronebitene ble scannet før og etter de ble utsatt for syreløsningene med micro-CT (Skyscan 1272, Brukers, Kontich, Belgia). I DataViewer (Brukers, Kontich, Belgia) vises snittbildene av tannkronen i tre ulike plan (sagittalt, koronalt og transversalt).

Resultat: I gruppen Coca-Cola® (The Coca-Cola Company, USA), med målt pH til 2.4, viste en liten demineralisering. Gruppen syreløsning 1 (pH 2.4) viste en klar demineralisering med gjenværende emalje i overflaten. Gruppen syreløsning 2 (pH 4.4) ga ingen synlig demineraliseringslesjon. Total Etch® (Ivoclar Vivadent, Lichtenstein) 37% fosforsyre gel med en pH på <1.00, ga en svak demineraliseringslesjon.

Konklusjon: I analysene av in vitro demineraliseringslesjonene fant vi ut at demineralisering med syreløsning 1 (pH 2.4) ga den tydeligste demineraliseringslesjonen (mest likt initialkaries). Videre forsøk kan benytte seg av denne løsningen, og de valgte tidsparametrene. Coca-Cola® med pH 2.4 og Total Etch® med pH<1.00 kan også brukes i dannelsen av in vitro demineraliseringslesjoner. Syreløsning 2 (pH 4.4.) ga minst tydelig demineralisering, så hvis denne skal benyttes bør tidsparametret økes.

Det er behov for flere studier med økt antall kronebiter og statistiske analyser, for å få mer bekreftende resultater.

Etiske vurderinger

Regional etisk komite (REK) gir tillatelse til å bruke biologisk materiale i dette studiet, se vedlegg 1.

1. Introduksjon

I nyere forskning har vi sett en signifikant nedgang i kariesprevalens hos barn og ungdom i Skandinavia (1). Det meste av disse dataene er basert på DMFT/DMFS-indeksen, noe som vil si at karies må ha invadert dentinet for å bli registrert (2). Dermed har ikke karieslesjoner som er begrenset til emaljen, kalt initialkaries, blitt inkludert i datasettene (3). Til tross for dette er initialkaries likevel en signifikant del av den totale kariesprevalensen (4).

Tabell 1: Kariesfrie barn og ungdom mellom 6-19 år presenteres i prosent med D3MFT (5)

Land	Danmark 2009	Færøyene 2007	Finland 2003	Island 2005	Norge 2008	Sverige 2008
	5 år = 84	5 år = 59	5 år = 53	6 år = 58	5 år = 79	6 år = 74
	12 år = 69	12 år = 47	12 år = 42	12 år = 34	12 år = 48	12 år = 61
	15 år = 47	15 år = 22	17 år = 20	15 år = 20	18 år = 16	19 år = 30
	18 år = 32					

Tabell 1 viser at andelen kariesfrie barn (5-, 12-, 18 år i Norge) i Norden er høyt, og at Norge kommer dårligst ut blant kariesfrie 18-åringer i 2008. Med kariesfri menes personer med karies som ikke omfattes av DMFT-indeksen. Dette inkluderer tenner med karies i emaljen som ikke enda har trengt inn i dentinet. Statistikken fra tabellen beviser at karies blant unge i norden fortsatt er et problem. Dermed vil det også hele tiden være nødvendig med nye studier som retter seg mot karies, og i dette tilfellet, hvordan danne initialkaries in vitro. Offentlige rapporter viser at kariesprevalensen er gått opp og ned fra 80-tallet og frem til 2000 (1, 3, 5, 6). Deretter har det vært stabilt med gjennomsnittlig DMFT på 1.7 for 12-åringer og 5.0 for 18-åringer, men med økende antall kariesfrie barn (6). I Oslo ble et utvalg 35-åringer fulgt opp fra de var 18 til de ble 37 år (6). Gjennomsnittlig DMFT-score på 37-åringene var 11.7, og som 18-åringer hadde de en gjennomsnittlig DMFT på 9.1. Disse DMFT-verdiene er ansett som et akseptabelt gjennomsnitt nasjonalt (6). Det er dog betydelige geografiske variasjoner på kariesprevalensen. DMFT-verdiene for 12-åringer sank fra 3.4 i 1985 til 1.5 i 1999, men steg til 1.7 i 2005. DMFT-tallet for 18-åringer har holdt seg rundt 5.0 frem til 2005 (1, 3, 5, 6). I studien ser vi videre at Norge har den laveste DMFT-verdien for 18 åringer, hvor den falt fra 48 hos 12-åringene til 16 hos 18-åringene. Med så lav D-verdi (tenner med dentinkaries), er det ekstra interessant å se på arrestering av D1- og D2- emaljekaries. Vår studie kan bidra til økt kunnskap om utvikling av in vitro demineraliseringslesjoner, som kan brukes i forskning på emaljekariesprofylakse.

Termen karies brukes til å beskrive tegn og symptomer på lokal kjemisk oppløsning av tannsubstans forårsaket av metabolske aktiviteter i biofilmen som dekker området på tannen (3). Det skjer en kjemisk oppløsning av hardvev som kommer av melkesyre produsert av bakterier etter degradering av lav molekylvekts sukkerarter, som for eksempel glukose, fruktose og sukrose. Karies oppstår hvor plakk får ligge «beskyttet» og uforstyrret, og kan dermed modnes og få lavere pH (3). Når pH i biofilmen når et kritisk nivå, vil demineralisering av tannsubstansen starte (3).

Emaljens kritiske pH-verdi for når den vil bli demineralisert av syrer er avhengig av mineralsammensetningen til emaljen. For emalje av hydroksylapatitt er denne verdien pH 5.5, mens emalje som er inkorporert fluor, fluorapatitt (fluorhydroksylapatitt), er pH-verdien 4.5. Det kritiske pH-punktet for emaljen vil dermed ligge mellom pH 4.5-5.5. Når pH-verdien er over det kritiske punktet, vil emaljen remineraliseres med mineraler fra saliva (3).

Første tegn på en karieslesjon (initialkaries) er *white spot lesion* som kan observeres visuelt. En *white spot lesion* kan være ny, men den kan også være flere år gammel, da det er mulig å arrestere utviklingen av lesjonen. *White spot lesions* kjennetegnes visuelt som en hvit, opak forandring i emaljen. Overflaten er intakt, men svekket. En arrestert *white spot lesion* vil ha en glattere og mer skinnende overflate når den sonderes. En aktiv *white spot lesion* vil er mer ru enn en arrestert lesjon, samt ha en mattere farge (3).

Kunnskap om emaljens mineralinnhold er nyttig når man undersøker demineraliseringer, og man kan bruke denne kunnskapen til å velge metoder for demineralisering og ikke minst graden av demineralisering. Når tannen er i munnhulen inneholder emaljen 95 % mineraler og 5 % vann og organisk matriks etter vekt (7). For at emaljen skal kunne remineraliseres kreves det at kalsium- og fosforioner har mulighet til å diffundere inn i den porøse underoverflaten til emaljen. Dette skjer som oftest gjennom den relativt intakte øvre sonen (3). Ved *white spot lesions* vil vi kunne se fire forskjellige typer histopatologiske soner, som deles inn henholdsvis i to demineraliseringssoner og to remineraliseringssoner. For demineralisering ser vi en translusent sone (1 % mindre tetthet) som går langs fronten av lesjonen, og selve kroppen til lesjonen (>5-25 % mindre tetthet) som er hoveddelen av

lesjonen (ligger under den intakte emaljeoverflaten). I de to sonene med remineralisering har vi en «mørk sone» (2-4 % mindre tetthet) som befinner seg nær fronten av *white spot lesion*, rett over den translusente sonen, og en overflate sone (1-<5 % mindre tetthet), som danner det intakte overflatelaget over lesjonen (8).

Etter ICDAS-II klassifiseringen av karies er radiolusensen til initialkaries begrenset til emaljen, og gjennom felles kriterier for kariesregistrering er det mulig å få kariesdiagnostikk standardisert. Grad 1 er inntil halvveis i emaljetykkelsen og grad 2 er inntil dentingrensen, men ikke inn i dentinet (9). På figur 1 er ICDAS-II demonstrert gjennom UiO sine bilder, hvor vi ser initialkaries grad 1 og grad 2. På røntgen vil initialkaries vises som en trekantet radiolusens hvor spissen går inn mot dentinet. Overflaten til radiolusensen er intakt, og dette kan ses på røntgenbildet.



GRAD 1 (A1)



GRAD 2 (A2)

Figur 1: Bedømming av initialkaries røntgenologisk, grad 1 og grad 2 (9)

Det er i nyere undersøkelser rapportert om en høy prevalens av dentale erosive skader hos unge. Prevalensen av erosjoner hos unge i Skandinavia har blitt rapportert til å være mellom 59.0-65.0 % (10-12). Andre studier rapporterer opp mot 100.0 % (13).

Erosiv tannslitasje er en to-trinns prosess. I det første trinnet blir tannsubstansen svekket og "mykgjort" av sure løsninger. I det andre trinnet skjer slitasjen, hvor den svekkede tannsubstansen blir slitt bort av intra-orale friksjons-prosesser (13). Erosjonslesjoner har typiske karakteristikker når det kommer til lokalisering, morfologi og klinisk utseende. Det vanligste affiserte områdene er palatinalflaten på maxillære incisiver og okklusalflatene på

6'ere i mandibelen (14, 15). Erosjoner på et tidlig stadium ses som glatte og flate fasetter på incisiver og okklusalt på molarer som lokaliserte, små groper. Videre progresjon av lesjoner i okklusalflaten vil fremstå som dype "cuppings" med eksponert dentin og tap av okklusal høyde og morfologi (15). Cuppings er en konkavitet i emaljen slik at dentin blir eksponert på en kuspesspiss, og er et vanlig tegn på en dental erosjon. Oftest sees cuppings på første molar (16).

Årsaksfaktorene som fører til erosive tannskader kan deles opp i to grupper etter hva som forårsaker skaden, intrinsiske og ekstrinsiske (13). Erosjonsskader kan oppstå som følge av vedvarende og gjentakende eksponering for endogene væsker, som magesyre. Dette er et eksempel på en intrinsisk årsaksfaktor (13). Magesyre har en pH på 1.6-2.9 (17), men i munnhulen har pH-verdien en tendens til å synke på grunn av bufferegenskapene til saliva (13). Pasienter med gastroøsofagal reflukssykdom, og pasienter med spiseforstyrrelser hvor oppkast er involvert, har ofte omfattende erosive tannskader (13). Uhlen et al. rapporterte i en studie at 69.7 % av pasientene med selvpåført oppkast (eks. bulimia nervosa) hadde dentale erosive skader (18). Inntak av sure drikker som appelsinjuice og CocaCola® (pH målt til 2.4) kan også føre til erosive skader, disse er eksempel på ekstrinsiske årsaker (13). Andre ekstrinsiske faktorer er som kan føre til dentale erosjoner er medikamenter, livsstil og miljø (19). Fellesnevneren for både intrinsiske og ekstrinsiske erosjoner er at grad av skade som oppstår i all hovedsak er styrt av pH-verdi, og i hvor stor grad eksponeringen er gjentakende og vedvarende (13). I likhet med karies har saliva også en viktig rolle i beskyttelse mot erosjoner, og personer med tilstander og sykdommer som reduserer saliva-sekresjon er mer utsatt for erosjoner (19).

Prinsippet til erosjon benyttes også av behandlere i form av forskjellige etsgeler for å skape bedre retensjon mellom restaureringer og tannsubstans. Etsemønsteret til disse er like som ved en erosjon, dette i den forstanden at det er en overflateerosjon uten dannelsen av et lag under overflaten som er demineralisert. Ved etsing med syrer ser vi derimot at syren penetrerer dypere inn i emaljen og eksponerer prismene til emaljen i en større grad enn i erodert emalje (20). Når fukt fra dette området fjernes, ved hjelp av luftblåsing, vil det etsede området virke hvitt og krittaktig (3).

Til tross for utvikling av anti-kariesprodukter er karies fortsatt en av de mest prevalente kroniske sykdommene på verdensbasis (21, 22). Studier på demineralisering og remineralisering har en viktig rolle i forskning på demineraliserings-patologi, testing og utvikling av nye profylaktiske metoder (21, 22). Dette er fordi initialkaries kan remineraliseres og fluorbehandling kan stanse progresjonen av erosiv tannslitasje (13, 23-25). I majoriteten av epidemiologiske kariesstudier som utføres, bruker man DMFTs-indeksen for å avgjøre hva som regnes som karies, og den benyttes i hele verden. Det vil si at en pasient ikke har karies før vedkommende har karies som går inn i dentinet (og dermed krever operativ behandling). Samtidig ser man en høyere andel av pasienter med emaljekaries (initialkaries) i land med stadig lavere DMFTs-score (1, 4). Profesjonell applisert fluorid, som f.eks. fluorlakk og fluorgel, er effektivt i å forhindre kariesutvikling, og benyttes også for å arrestere initialkaries (23). Fluoridbehandling kan ikke remineralisere erosive lesjoner, men kan stanse progresjonen og beskytte gjenværende emalje (13, 24). Som et resultat av dette er det i dag et stort fokus på ikke-operativ behandling av karies, og produsenter finner stadig nye produkter som kan, ifølge produsentene, gjøre dette (25). Derfor er det behov for evidensbaserte metoder for å skape initialkaries in vitro (25).

I en samleartikkel av Yu et al. (22) som ga oversikt over antall studier med ulike modeller som kan brukes til konstruksjon av kunstig demineraliseringslesjoner, var det 37 artikler om biofilm modellen og 257 om den kjemiske modellen. Kjemisk fremstilt in vitro karies var den vanligste brukte metoden i samleartikkelen (22). Fordelen til de kjemiske modellene er at de er enkle, koster lite, er ikke tidkrevende og de er lettere reproducerbar enn biofilm-modellene. De kjemiske metodene lager dog ikke biologisk karies. Kjemisk fremstilt "karies" klarer heller ikke å etterligne en karieslesjon i de komplekse forholdene i munnhulen (22).

1.1. Objektiv

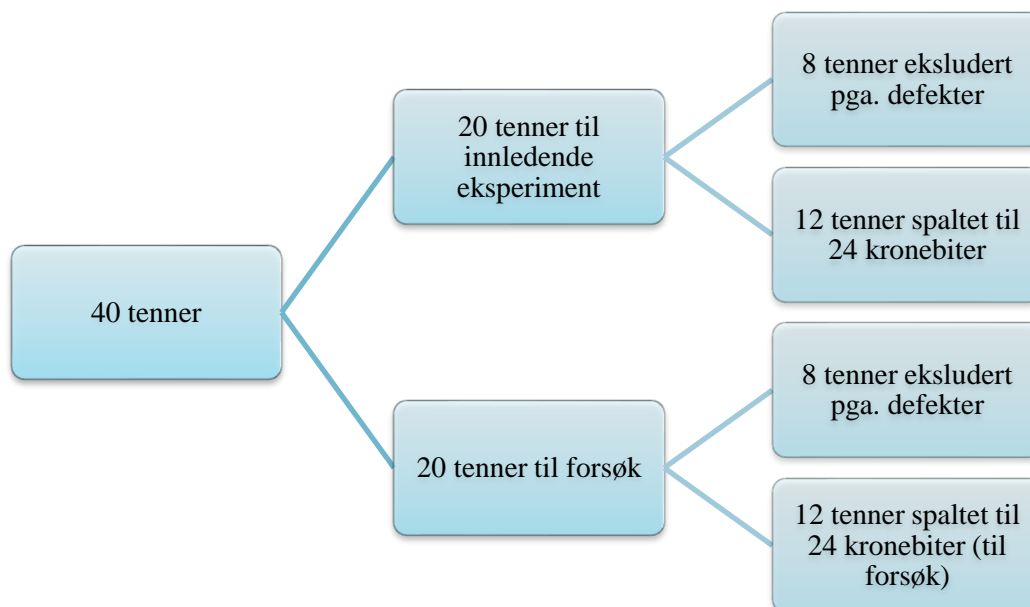
Målet med dette masterforsøket er å danne demineraliseringslesjoner (som er mest mulig likt initialkaries) ved hjelp av 4 ulike syreløsninger: Coca-Cola® med pH 2.4, syrebuffer med pH 2.4 og 4.4, og Total Etch® pH<1.0 på emaljeoverflaten in vitro. Resultatene blir evaluert med mikrotomografi (mikro-CT), for å se hvilken syreløsningoppskrift som gir det beste demineraliseringsresultatet.

Hypotesen er at alle syreløsningene som har en pH under 4.5 vil gi tilnærmet like demineraliseringslesjoner.

2. Metode

2.1. Innsamling, utvalg og klargjøring av tenner

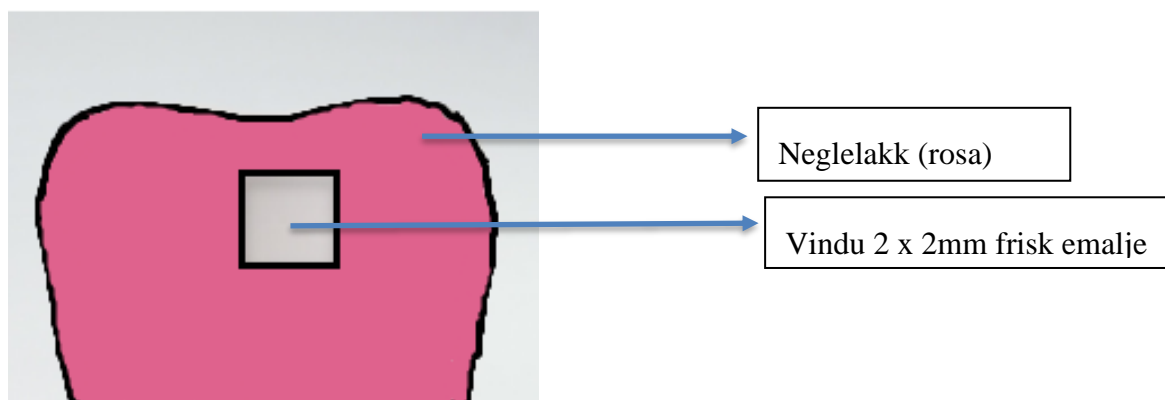
I forkant av forsøket ble totalt 40 ekstraherte tenner samlet inn fra universitetstannklinikken og kirurgiavdeling ved TkNN. Det ble distribuert et informasjonsskriv til tannleger og studenter ved UTK og TkNN med prosedyre for innsamling (Vedlegg 2). Tennene ble skylt i rent vann, og rengjort for blod og saliva. Eventuelle rester av bløtvev ble forsiktig fjernet mekanisk. Etter rengjøring ble tennene oppbevart i en glassbeholder med Kloramin-T (0,5%), og oppbevart i kjøleskap ved 4 grader celsius frem til forsøksstart. Som figur 2 viser ble 20 tenner valgt ut til et innledende eksperiment, hvor målet var å se om vi kunne lage demineraliseringslesjoner likt initialkaries, med hjelp av Coca-Cola® (The Coca-Cola Company, USA) med pH 2.4. Åtte tenner ble ekskludert på grunn av synlige defekter og skader i emaljen (karies, fyllinger, hypomineraliseringer, annet).



Figur 2: Oversikt over antall tenner benyttet og ekskludert

Som vi kan se på figur 2 ble det etter det innledende eksperimentet valgt ut 12 tenner med visuelt frisk emalje, hvor overflaten var intakt og ingen synlige fargeforandringer spaltet til krone og rot (tennene var ikke utsatt for noen tidligere syrebehandling in vitro). Kronen ble deretter spaltet i to deler for å tilpasse størrelse i mikro-CT skanner. Til spaltingen ble det benyttet turbin (KaVo ExpertTorque Lux Miniturbin E677L (KaVo Dental GmbH, Tyskland)) med en avrundet sylinder (141 ø014) og vannavkjøling. Total 24 kronebiter ble inkludert i dette studiet.

Alle kronebitene ble skylt i deionisert vann. Videre ble de fordelt i 8 grupper. Hver gruppe inneholdt da 3 kronedeler. I en artikkel fra Kucuk et al. (26) ble neglelakk brukt som beskyttelse mot syre, og hadde en god effekt. Alle kronebitene ble dekket med syreressistent neglelakk (Hennes & Mauritz, Sverige), foruten et vindu på 2 mm x 2 mm med frisk emalje på hver kronebit. Visuell teknikk ble brukt for å bedømme hva som ble kategorisert som frisk emalje eller ikke, utfra kriteriene: ingen synlig emaljemisdannelse, fylling eller initialkaries. Dette ble kontrollert av 2 individer. Vinduene ble laget ved å måle opp 2 mm x 2 mm med periodontal sonde (Hu Friedy 3-2-3-2 (Hu Friedy, USA)) på tape som ble plassert på emaljeoverflaten i forkant av penslingen med neglelakk. Tapen ble fjernet og kronebiten hadde da et vindu på 2 mm x 2 mm som kunne bli eksponert for syreløsning. Hver kronebit ble oppbevart i et lukket reagensrør fylt med deionisert vann, og nummerert med gruppe og forsøksnummer.



Figur 3: Viser illustrert hvordan kronebitene ble utformet med heldekkende neglelakk med unntak av demineraliseringsvinduet

2.2. Valg av demineraliseringsløsninger, tidsbruk og temperatur

2.2.1. Valg av demineraliseringsløsninger

Før forsøket startet ble det gjort tester for å avgjøre hvilke syreløsninger som skulle brukes. Valget av materialer er basert på innledende forsøk og tidligere studier (2, 26-33) med kriteriet om å ha pH under 4.5. Vi konkluderte med at Coca-Cola® (pH 2.4), syreløsninger med pH 2.4 og 4.4, og Total Etch® (Ivoclar Vivadent, Lichtenstein) 37.0% fosforsyre-gel skulle inkluderes i forsøket (26, 27).

Gruppe 1: Coca-Cola® (The Coca-Cola Company, USA)

Coca-Cola® er en verdenskjent leskedrikk som har vært på det norske marked siden 1926. I likhet med flere andre leskedrikker, har den i teorien en pH lav nok til å kunne demineralisere emalje (28). Vi testet pH i Coca-Cola® med pH-meter i flere temperaturer: 4 grader celsius, 37 grader celsius og romtemperatur (21 grader celsius). I alle temperaturene ble pH målt til konstant 2.4. Coca-Cola® er en sammensetning av kullsyreholdig vann, sukker, fargestoff (karamell E150d), surhetsregulerende middel (E338, fosforsyre), naturlige aromaer (inkl. koffein) (28). Flere in vitro studier viser erosiv effekt og mineraltap på emaljen ved eksponering for syrlige leskedrikker (29). En in vitro studie som har sett på den erosive effekten av blant annet Coca-Cola® kunne konkludere med at overflate hardheten til emaljen sank med 24% etter eksponering for drikken etter 30 min (30). Ettersom Coca-Cola® er en populær leskedrikk og har erosivt evne valgte vi å inkludere cola i vårt forsøk (28-32).

Gruppe 2: Syreløsning pH 2.4 ble bestemt til å ha pH 2.4 da vi ønsket å ha en løsning med samme pH-verdi som Coca-Cola® (The Coca-Cola Company, USA).

Syreløsning med pH 2.4 ble fremstilt av labteknikker ved IKO (BT), og justert med edikksyre. Syreløsningene ble fremstilt ved å blande 2.2 mM CaCl₂ (CAS-nr 10043-52-4), 0.244 g/L, 2.2 mM NaH₂PO₄·H₂O (CAS-nr: 10049-21-5) 0.303 g/L og 50 mM C₂H₄O₂ (CAS-nr 64-19-7) 3mL.

Gruppe 3: Syreløsning med pH 4.4, under kritisk nivå for fluorapatitt. For å oppnå ønsket pH i syreløsningene ble de justert med eddiksyre.

Syreløsningen er laget med de samme komponentene, men til forskjell har vår løsning et ekstra vannmolekyl, samt at vi justerte våre syreløsninger med eddiksyre (33-35).

Gruppe 4: Total Etch® (Ivoclar Vivadent, Lichtenstein)

Total Etch ® er en etsende viskøs gel fra produsenten Ivoclar Vivadent, og inneholder 37.0% fosforsyre (CAS: 7664-38-2) (36). Total Etch® (Ivoclar Vivadent, Lichtenstein) brukes blant annet for selektiv ets av emaljen når man skal bonde restaureringsmaterialer, slik som kompositt, til emalje. Dette danner en erosjonslignende lesjon. Ets gelen trenger dypere inn i emaljen og eksponerer emaljeprismene (3). Vi ønsket dermed å inkludere denne type ets i vårt forsøk for å se effekt på mikro-CT da den blir hyppig brukt i restaureringer av fyllinger og forseglinger.

2.2.2. Tidsintervaller og temperaturer

Valg av tiden de ulike prøvene skulle eksponeres for syreløsning er basert på tidligere studier og forsøkene vi gjorde initielt (27-33). Syreløsning med pH 4.4 har blitt brukt i flere studier og rapporterer om vellykket demineralisering (26, 37-39) samplene ble eksponert for syreløsning i 96 timer (40). Vi valgte da to ulike tider for gruppe 1-6, hvor kronebitene skulle ligge i syreløsning 96- og 144 timer.

Ved etsning gruppe 7 og 8, ble det utført testing forut for forsøket, som viste at 30 minutter og 6 timer med Total Etch® (Ivoclar Vivadent, Lichtenstein) 37 % ga synlige demineraliseringer, og disse tidsintervallene ble derfor valgt i dette studiet.

Vi valgte å gjennomføre alle demineraliseringer i en inkubator (Memmert, INB400, Tyskland) uten bevegelse, som holdt 37 °C for å få en mest mulig konstant temperatur i alle forsøkene. Tabell 2 viser oversikt over grupper, material, tid og temperatur for de ulike forsøkene.

Tabell 2 – Oversikt over material, tid og temperaturen for de ulike forsøkene

Gruppe	Material	Tid	Temperatur
1	Coca-Cola® (pH 2.4)	96 timer	37 °C
2	Coca-Cola® (pH 2.4)	144 timer	37 °C
3	Syreløsning 1 (pH 2.4)	96 timer	37 °C
4	Syreløsning 1 (pH 2.4)	144 timer	37 °C
5	Syreløsning 2 (pH 4.4)	96 timer	37 °C
6	Syreløsning 2 (pH 4.4)	144 timer	37 °C
7	Total Etch® 37 % (pH<1.0)	30 min	37 °C
8	Total Etch® 37 % (pH<1.0)	6 timer	37 °C

2.3. Mikro-CT – Evaluering og bildeanalyse

Alle kronebitene ble scannet med Skyscan 1272 (Brukers, Kontich, Belgia) i forkant av eksponering for syreløsninger. Dette ble gjort for å kunne sammenligne emaljvinduet før og etter de ble utsatt for syreløsningene. Etter at kronebitene hadde vært eksponert for respektive syreløsninger ble de lagret i deionisert vann i påvente av å bli scannet på nytt.

I dette forsøket ble et mikro-CT system benyttet (Skyscan 1272 (Brukers, Kontich, Belgia) for å evaluere karakteristikken til demineraliseringslesjonen på overflaten. Hver prøve ble montert på et datamaskin kontrollert roterende bor, slik at røntgenstrålen traff kronebiten perpendikulært. Følgende verdier i Skyscan 1272 (Brukers, Kontich, Belgia) ble benyttet: 100mA, 100kV, 0.5mm aluminium-kobber filter, 180° rotering med et step på 0.4, og en oppløsning på 7µm. Gjennomsnittstiden til en full scanning var omtrent 70 minutter. De samme scanningsparameterene ble benyttet både før eksperimentet (preskanning) og etter (postskanning). For mer informasjon om Skyscan 1272 (Brukers, Kontich, Belgia) kan *Brukers* hjemmeside besøkes (41).

Etter scanningen ble alle bildene rekonstruert i NRecon (ver. 2.0.2.6) (Micro Photonics Inc., USA) for visuell og kvantitativ rekonstruksjon. Kalibrering ble utført av to operatører (NBL og BT), før rekonstruksjonen, hvor det ble justert for ring artifakt, beam-hardening og post-

alignment justering av bildene (42, 43). Alle rekonstruerte data ble analysert videre i DataViewer (ver. 1.5.0.0) (Brukers, Kontich, Belgia), hvor kronebitene kunne visuelt analyseres. Vinduene på overfalten av emaljen på pre- og postskanningsbildene ble lokalisert ved å orientere seg samtidig i programmet ved de ulike snittene koronalt, sagittalt og transversalt plan. Dette ble samtidig sammenlignet med den fysiske kronebiten som ble scannet. 3 observatører ble benyttet i denne fasen, og funnene ble diskutert og vurdert sammen.

Før- og etterbildene ble sammenlignet på DataViewer, og de beste prøvene fra hver gruppe ble inkludert som eksempel i resultatene. Bildene ble vurdert etter kriteriene fra ICDAS-II og UiOs for approksimal kariesregistrering (grad 1 i ytre halvdel av emalje, mens grad 2 er i indre halvdel av emalje) (9).

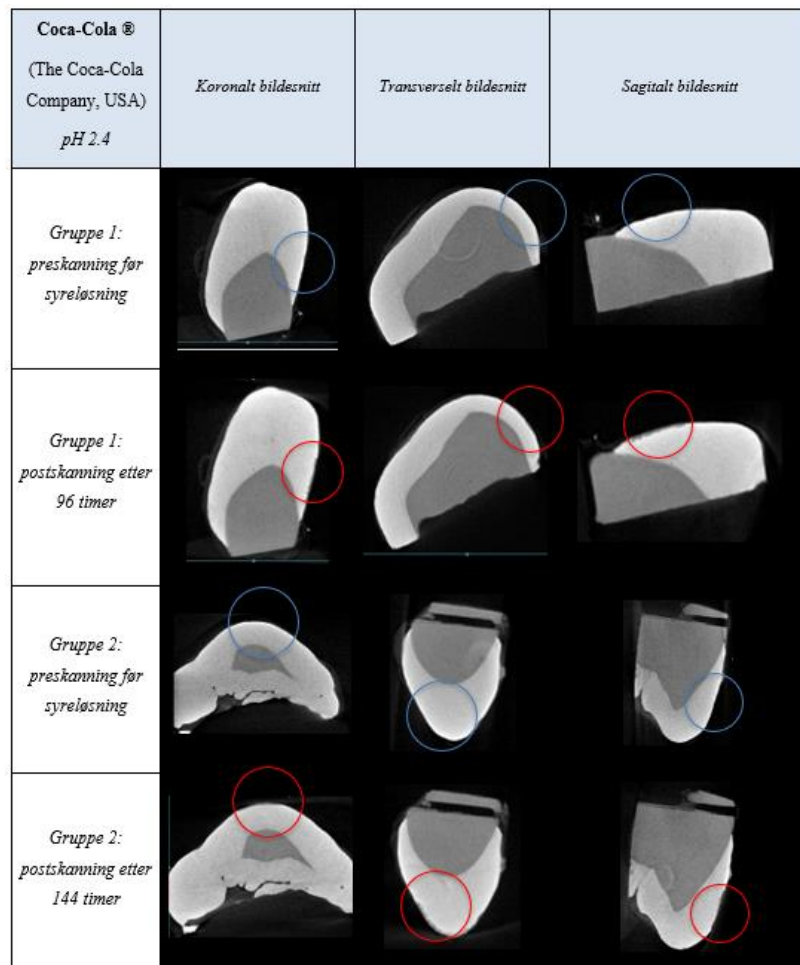
Kriterier for tilstedeværelse eller fravær av demineralisering

1. Demineralisering ble vurdert til å ha blitt dannet når det var en reduksjon i gråskalaen. Det eksponerte arealet (2x2 mm vindu) viste radiologisk forskjell i tetthet mellom pre- og post-scanning både i sagittal og transversal snitt.
2. Demineralisering som vurderes lik initialkaries må kun involvere ytre halvdel av emaljen.
 - a. Økt radiolusent areal viser delvis demineraliseringssone
 - b. Tap av emaljeoverflatens outlines viser fullstendig demineralisering
3. Demineraliseringsområdet progriderer inn i den indre halvdel av emaljen, lesjonen vurderes som uttalt erosiv eller uekte initialkaries.

3. Resultater

I gruppe 1 og 2 ble kronebitene lagt i Coca-Cola® (The Coca-Cola Company, USA) i henholdsvis 96 og 144 timer. I figur 4 kan man, i begge gruppene, se at det har forekommet en demineralisering og tap av tannsubstans i det koronale, transversale og sagittale bildesnittet. Demineraliseringslesjonen vises med en jevn dybde over hele vinduet, og ifølge figur 1 tilsvarer det en karies 1, ettersom demineraliseringslesjonen er i ytre halvdel av emaljen.

Demineraliseringslesjonen både for 96 timer og 144 timer fremstår som like, og bedømmes utfra kriteriene satt lenger opp til å være en karieslignende lesjon (9).



Figur 4– Gruppe 1 og 2: kronebiter sett i DataViewer utsatt for Coca-Cola® (The Coca-Cola Company, USA) med pH 2.4 i 96 og 144 timer

I gruppe 3 og 4 ble kronebitene lagt i syreløsning 1, med pH 2.4, i henholdsvis 96 og 144 timer. På figur 5 kan vi i begge gruppene se en forandring i det koronale, transversale og sagittale bilde snittet. I gruppe 3, som lå 96 timer i syreløsning 1 ser vi en halvmåne form som strekker seg dypt inn i emaljen. Demineraliseringslesjonen grenser helt mot dentinet, mens vi fortsatt har igjen emalje i overflaten. Gruppe 4 deler samme resultat som gruppe 3, sett fra figur 3. I gruppe 4 er det mindre tannsubstans igjen under overflaten enn i gruppe 3. Gruppe 3 og 4 faller innenfor kriteriene som er satt ovenfor om en karieslignende lesjon, samt at de begge har en dybde som er i indre halvdel av emaljen, tilsvarer karies 2 røntgenologisk ifølge figur 1 (9).

Syreløsning 1 pH 2.4	Koronalt bildesnitt	Transverselt bildesnitt	Sagittalt bildesnitt
Gruppe 3: preskanning før syreløsning			
Gruppe 3: postskanning etter 96 timer			
Gruppe 4: preskanning før syreløsning			
Gruppe 4: postskanning etter 144 timer			

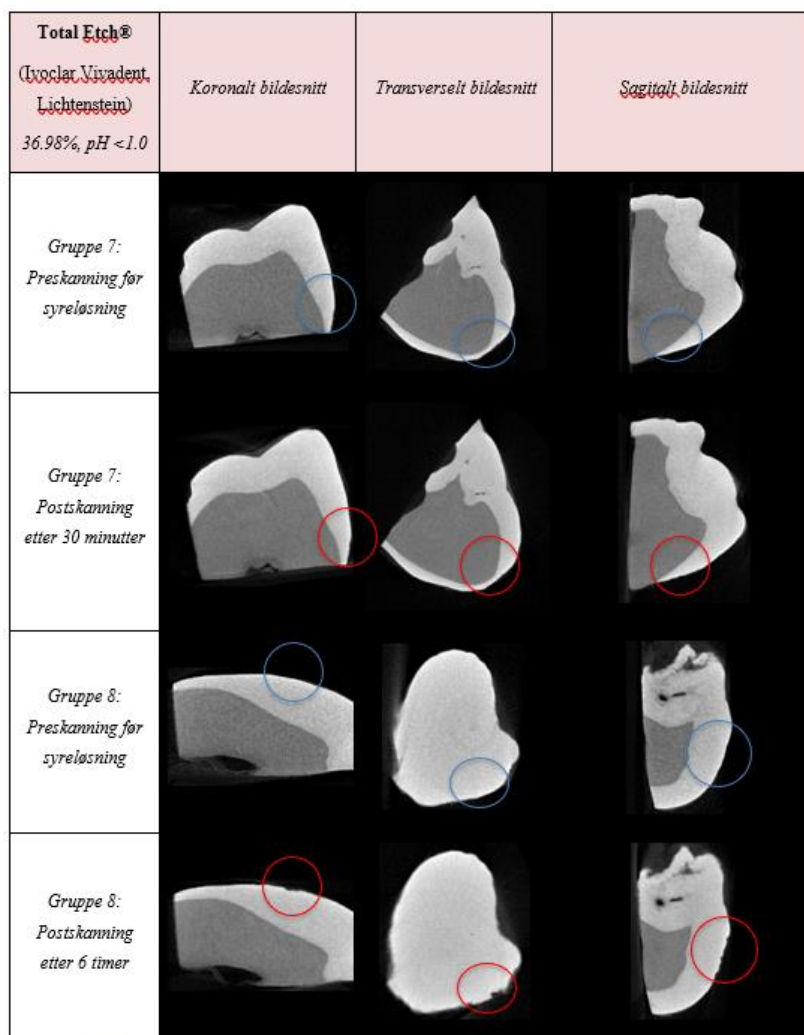
Figur 5 – Gruppe 3 og 4: kronebiter sett i DataViewer utsatt for syreløsning 1 med pH 2.4 i 96 og 144 timer.

I gruppe 5 og 6 ble kronebitene lagt i syreløsning 2, med pH 4.4, i henholdsvis 96 og 144 timer. I begge gruppene er det ikke mulig å se en forandring i emaljeoverflaten i figur, på hverken det koronale, transversale eller sagittale bildesnittet. Da det ikke er forandring i emaljen er det ikke mulig å stille en røntgenologisk diagnose utfra figur 1, og vi kan dermed si at syreløsningen ikke hadde noen effekt på emaljen (9).

Syreløsning 2 pH 4.4	Koronalt bilde snitt	Transverselt bilde snitt	Sagittalt bilde snitt
Gruppe 5: Preskanning før syreløsning			
Gruppe 5: Postskanning etter 96 timer			
Gruppe 6: Preskanning før syreløsning			
Gruppe 6: Postskanning etter 144 timer			

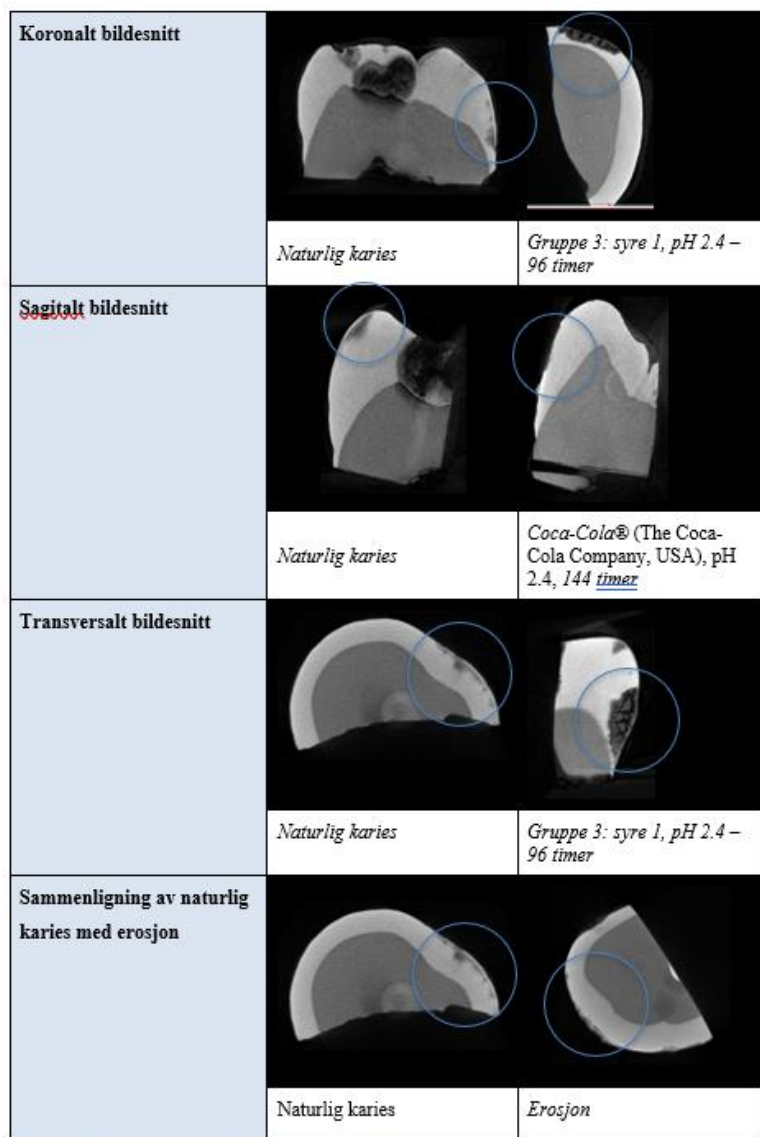
Figur 6 – Gruppe 5 og 6: kronebiter sett i DataViewer utsatt for syreløsning 2 med pH 4.4 i 96 og 144 timer.

I gruppe 7 og 8 ble kronebitene påført Total Etch® (Ivoclar Vivadent, Lichtenstein) i vinduet, i henholdsvis 30 minutter og 6 timer. På figur 7 kan vi i gruppe 7 og 8 se en demineraliseringslesjon i overflaten på emaljen på det koronale, transversale og sagittale bilde snittet. Forandringen ses som en hakkete, ru overflate hvor Total Etch® (Ivoclar Vivadent, Lichtenstein) har vært applisert. Ut fra kriteriene satt over er dette en erosjonslignende lesjon, og tilsvarer karies 1 ut fra kriteriene i figur 1 (9).



Figur 7 – Gruppe 7 og 8: kronebiter sett i DataViewer utsatt for Total Etch® (Ivoclar Vivadent).

Noen tenner som ble samlet inn i innsamlingsperioden ble ansett som defekte tenner for forsøket utfra kriteriene satt over (kunne se klinisk karies på dem). Vi valgte å scanne noen av disse med SkyScan 1272 (Brukers, Kontich, Belgia) med samme parametere som gruppe 1-8, for å kunne sammenligne den naturlige kariesen med demineraliseringslesjonene vi laget i laboratoriet. I det koronale bildesnittet i figur 8 sammenlignet vi naturlig karies med gruppe 3 (pH 2.4). Okklusalt ser vi en stor karieslesjon tilsvarende grad 3 røntgenologisk, mens vi ser karies 2 på sidene. I det sagitale bildesnittet ble naturlig karies sammenlignet med gruppe 2, hvor demineraliseringslesjonen til gruppe 2 virker mer som enn erosjonslesjon (utfra kriteriene satt over). I det transversale bildesnittet ble naturlig karies sammenlignet med gruppe 3, hvor vi kan se en klar likhet mellom de to demineraliseringslesjonene.



Figur 8 – Kronebiter sett i DataViewer, naturlig karies, utvalgte syreløsninger og erosjon

4. Diskusjon

4.1. Resultater og funn

En naturlig initialkaries blir sett på som en kjegleformet lesjon som strekker seg inn mot emalje-dentin grensen (3). Dette klarte vi ikke å gjenskape i resultatene våre, hvor vi fikk en mer jevn demineralisering over hele området som ble eksponert for de ulike syreløsningen. Vi har klart å skape demineraliseringslesjoner i gruppe 1-4 samt gruppe 7-8. Noen av

demineraliseringslesjonene som man kan se på figur 4-7 over lignet mer på karieslesjoner enn erosjonslesjoner satt ufra kriteriene over. Disse anser vi som mulige å kunne benytte til videre forskning, ved at funnene i denne studien kan appliseres til videre forskning på karieslesjoner og erosjonslesjoner. I tillegg er det mulig å benytte pilotstudiet videre slik at man kan utføre forskning på hvordan man også enklere og bedre kan forebygge og stoppe karieslesjoner og erosjonslesjoner. Resultatene fra studiet kan også brukes til å designe større studier som produserer sikrere og mer anvendbare resultater.

4.2. Begrensninger med studien

4.2.1. Emaljekvalitet

Vi hadde få begrensninger for hvilke typer tenner som kunne være en del av forsøket. Tennene ble samlet inn fra både TkNN og UTK, hvor det var et flertall molarer som ble innhentet. Noen tenner var operert ut, og hadde ikke vært eksponert for orale forhold, mens andre hadde stått lenge i munnhulen. Dette kan ha effekt på emalje og på effekt av demineralisering. Tenner som har emalje med fluorapatitt er mer syreressistent enn tenner med kun hydrokapatitt. Flaten til vinduet ble kun inspisert visuelt før demineralisering, men eventuelle defekter ville blitt oppdaget på pre-scanning (44).

Tidligere studier viser ifølge Anatoly A et al. (45) at den mest løselige emaljen er nært gingiva og i approssimalkontakter, som indikerer deres reduserte mineralisering. Tannen er minst løselig og mest mineralisert i den okklusale delen. Samtidig er nivået av emaljepermeabilitet forskjellig ved ulike aldre, høyest i ikke erupterte tenner og lavest i voksne. Andre studier viser ifølge Anatoly A et al. (45) at det er store forskjeller i ioneutveksling i emalje som blir påvirket av flere faktorer. En av disse er alder, men det finnes ingen statistiske resultater på viktigheten av forandringene i organisk og uorganisk komponenter i emalje er avhengig av alder (45). Dermed anså vi ikke alder som relevant med tanke på innsamling av tenner og dens emaljekvalitet.

4.2.2. Neglelakk

Etter at tennene i gruppene ble utsatt for sine respektive syreløsninger og deionisert vann førte det til at flere av tennenes neglelakk løsnet. Dette gjorde at det ble vanskeligere å lokalisere vinduene på alle tennene, og da spesielt de gruppene som ikke viste noe synlig demineraliseringslesjon i DataViewer. Flere studier anvender neglelakk som beskyttelse av resterende emalje utenom vinduet, og rapporterer ikke om samme problem (26, 33, 35, 42). Det er heller ikke nevnt noe om seleksjon eller valg av neglelakktype. Selv om vi ikke fant disse vinduene på snittene anså vi det som mulig å kunne se demineralisering fra før og etterbilde ved hjelp av DataViewer. Hvis mye av neglelakken var borte ble derimot flere av tennene demineralisert over hele flaten som havnet i kontakt med syren vi brukte. Dette gjaldt da gruppene hvor kronebitene lå i flytende syreløsning.

I fremtiden for å fortsette å kunne forske videre på de- og remineralisering av emalje vil det være anbefalt at man også ser på hvilken type neglelakk som er best egnet, eventuelt et annet produkt som ikke blir påvirket av deionisert vann og syreløsning.

4.2.3. Begrensninger i utvalgte syreløsninger

I gruppe 1 og 2 ble Coca-Cola® (Coca-Cola® Company USA) benyttet som demineraliseringsløsning. I motsetning til de andre syreløsningene inneholder dette mineralvannet kullsyre, noe som kan påvirke demineraliseringen. En annen ting som er verdt å nevne er at man ikke har eksakt oppskrift på denne, men det er fortsatt et billig og lett tilgjengelig alternativ.

På gruppe 3 og 4 (syreløsning med pH 2.4) var demineraliseringslesjonene tydeligere. Ved fremtidig forsøk bør man vurdere mindre tidsintervall hvis man skal bruke denne pH-verdien.

På snittene til gruppe 5 og 6 med pH 4.4 var det ikke mulig å observere en demineraliseringslesjon. På andre studier har de fått demineraliseringen med lik/nærliggende pH-verdi, men disse var veldig grunne (26, 33). Det er mulig at vi har en demineralisering, men at den er så

liten at vi ikke klarer å se den på snittene. Tidsintervallene vi benyttet var også lengere enn på de andre studiene, så vi forventet å se demineralisering på disse gruppene. Vi kunne i ettertid lagt samplene tilbake i syren med pH 4.4, og sett om det etter lengere tid ble en synlig demineraliseringslesjon. En annen forklaring er observasjonsfeil.

I gruppe 7 og 8 ble Total Etch© benyttet. En studie av Nanjannawar et al. (46) konkluderte med at det fortrinnsvis skjer en oppløsning av prismeperiferien, som fører til en brosteinlignende overflate på emaljen når man etser den med 37 % fosforsyre (46). I studien brukte de elektronmikroskop (SEM) til å analysere demineraliseringen. De oppgir ikke hvilke tidsparametre de brukte, men det kan virke som de har brukt normal klinisk ets-tid, som er 12-20 sekunder. Gelen har en høyere viskositet enn de andre løsningene. Etter endt demineraliseringsperiode på 6 timer var gelen tørket ut. Uttørkingen kan ha hatt en negativ effekt på demineraliseringen. Man kan anta at det kun var den delen av gelen som var i direkte kontakt med tannoverflaten som hadde en demineraliserende effekt, og at den etter hvert tørket ut og mistet effekten. Uttørkingen har skjedd gradvis og ujevnt, og dermed skapte det en ujevn demineralisering i emaljen. Det kan diskuteres om man hadde fått det jevnere hvis man brukte en metode hvor man fikk tilført fuktighet til gelen under demineraliseringsperioden. Ets-gel-gruppen ble også inkubert på 37° C, men her kunne man vurdert lagring på en lavere temperatur, f.eks. romtemperatur, for å motvirke uttørkingen av løsningen.

Oppskriften på syreløsning 1 og 2 er samme som har blitt brukt i andre studier (26, 33, 35). Det ble ikke testet noen andre oppskrifter enn disse. Samtlige av de andre fikk demineralisering med sin oppskrift, så vi valgte å bruke den samme.

4.2.4. Begrensninger i analyse

Den lave samplestørrelsen gjør det vanskelig å kunne bruke statistiske analyser. Dette er en klar begrensning i studien. Ozgul et al. tok data fra tidligere utførte studier som lignet sin studie, og brukte en poweranalyse for å avgjøre antall samples som trengtes for å få signifikante resultater. Poweranalysen indikerte at de minimum måtte ha $n = 5$ for å oppnå $\alpha = 0.05$ (42). I

fremtidige studier bør man prøve å oppnå en samplestørrelse på > 5 for å oppnå signifikante resultater. På grunn av tap av neglelakk underveis i demineraliseringen var det heller ikke grunnlag for å gjøre volumemtriske analyser. Så analysen av demineraliseringene begrenset seg til at tre observatører vurderte snittene i de ulike gruppene. Dette kombinert med mangel på kvantitative resultater fører til fare for observatørbias. Økt samplestørrelse og kvantitative analyser ville kunne styrket resultatene. Snittene kunne dog vurderes på høy oppløsning og kvaliteten på bildene var gode.

Oppsummert er samplestørrelse og mulighet for standardisering av analysene en stor begrensning i forsøket. Det er også nevnt over andre tiltak som kunne bidra til mer pålitelige resultater. Det er behov for oppfølgende studier med flere samples og kvantitative statistiske analyser. Micro-CT og analytisk programvare er et godt verktøy for å vurdere demineraliseringslesjoner, slik at videre forskning kan med fordel benytte dette.

4.3. Styrker ved studien

Micro-CT

Det finnes mange ulike teknikker for å måle emaljetykkelsen til en tann. Noen eksempler på analyseverktøy som har blitt brukt er elektronmikroskop, laser-fluorescens, konvensjonell røntgen, digital calipher og data-analysert digital imaging tann (22, 26, 34, 35, 47-50). En sentral faktor i analyseverktøyene er prisen. Mens elektronmikroskopi og mikro-CT er dyre og ressurskrevende, er bruk av laser og konvensjonell røntgen billigere. Til gjengjeld får man mer ekstakte analyser og høyere kvalitet ved bruk av elektronmikroskopi og mikro-CT (26).

CT har også tidligere blitt benyttet, men har gitt svært lav oppløsning på bildene. I dette forsøket har vi benyttet Skyscan 1272 (Brukers, Kontich, Belgia), som er en micro-CT med mulighet for høyoppløsningsbilder. Bildene har så blitt analysert i programvare som gjorde det mulig å analysere snittene på høy oppløsning. For en kvalitativ studie, lik denne, er det avgjørende å ha høy kvalitet på bildene. Valget falt dermed på mikro-CT med 180° rotasjon. 180° rotasjon er å foretrekke over 360° fordi man sparer tid, lagringsplass og øker levetiden på micro-CT maskinen uten at det påvirker resultatet av scanningen (51). Scanning med micro-

CT er heller ikke invasivt, det vil si at den ikke skader samplene under scanning. Dermed kan man bruke samplene videre i remineraliseringsforsøk også. Siden det er programvare som kan gjøre volumetriske analyser, er det også et godt alternativ for studier med flere samples. En negativ faktor er tidsbruk, da en full scanning tar ca. 70 minutter. Hver sample skal også scannes to ganger.

4.4. Sammenligning av studier

Tabell 3 – studier, type og antall tenner, demineraliseringsmodell, demineraliseringsløsning, pH, tid, inkubator (37° celsius), lesjonsdybde

Publikasjon	Type og antall tenner	Metode	Demineraliseringsløsning	pH	Tid	Inkubator	Lesjonsdybde	Analyseverktøy
<i>Ithagurun et al (2011) (50)</i>	Perm. tenner	Først demineralisering pH-cycling	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ og 0.05 M CH ₃ COOH pH Justert med 1M KOH	4.4	96 timer	Ikke oppgitt	80-100um	Polarized light microscopy (PLM) Transvers microradiography (TMR)
<i>Liu et al (2012) (59)</i>	40 perm. tenner	Demineralisering, pH cycling	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ og 0.05 M CH ₃ COOH pH Justert med 1M KOH	4.4	168 timer	Ikke oppgitt	Gj: 173.6 um	Micro-CT
<i>Ozgul et al (2013) (38)</i>	10 perm. og 10 prim. tenner	Først demineralisering, før pH-cycling	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ og 0.05 M CH ₃ COOH pH Justert med 1M KOH	4.4	96 timer	Ja	150-200um	Micro-CT
<i>Malakafzali et al (2015) (60)</i>	20 prim. tenner	Først demineralisering, pH-cycling	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ og 0.05 M CH ₃ COOH pH Justert med 1M KOH	4.5	96 timer	Ja	100 um	PLM
<i>Kucuk et al (2015) (2)</i>	40 perm. tenner	Demineralisering	0.264 g NaH ₂ PO ₄ , 0.244 g CaCl ₂ og 2.86 mL CH ₃ COOH	4.4	96 timer	Ikke oppgitt	110 um	Micro-CT
<i>Benjaruwatet et al (2017) (61)</i>	50 prim. tenner	Først demineralisering, før pH cycling	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ og 0.05 M CH ₃ COOH pH Justert med 1M KOH	4.4	96 timer	Rom temp.	60-100 um	Micro-CT

En systematisk oversiktsartikkel fra 2017 (52) viser til flere studier som bruker biofilm modeller for å skape karieslesjoner in vitro. Det finnes mange ulike metoder for bruk av biofilm, fra enkle til mer komplekse modeller. Resultatene fra disse studiene er varierende,

men en fellesfaktor for de fleste er at forsøkene må gjennomføres flere ganger, noe som gjør dem kostbare og svært tidkrevende. I en annen oversiktsartikkel (22) av vanlige modeller brukt for demineralisering-remineralisering i kariesforskning er det en overvekt i bruk av kjemiske modeller. Dette kan ha sammenheng med at studiene ønsker et enklere studiedesign med lavere kostnader og for tidsbesparelse. Ved bruk av kjemiske modeller kan man ikke gjenskape den komplekse strukturen av den orale kaviteten, mikrobiologisk effekt av biofilmen og den hydrodynamiske ustabiliteten av saliva (22).

Majoriteten av tidligere studier på dette området er begrenset til remineralisering og legger ikke stor vekt på selve demineraliseringen, noe som gjør det vanskelig å sammenligne resultater med vårt studie.

Vår syreløsning har de samme komponentene som studier vist i tabell 3, men er ulik da vi har justert pH med eddiksyre og tidligere studier har justert med KOH (42, 53-56). Det varierer hvor stor mengde syreløsning tenner er eksponert for i de forskjellige studiene, men da dybde på lesjonene de rapporterer er omtrentlig like, anser ikke vi at dette har en effekt på resultatene. Ozgul et al. bruker blant annet en ristende inkubator der løsningen er i konstant bevegelse. Etersom andre studier rapporterer tilnærmet like resultater på demineralisering uten bruk av ristende inkubator er det lite sannsynlig at dette har stor innvirkning på resultatene våre (26, 54). Sammenlignet med studiene (26, 42, 54) fikk vi ingen visuelle resultater på micro-CT bildene i gruppe 5 og 6. Vi kan derfor ikke utelukke at vår syreløsning har en annen egenskap enn syreløsning brukt i de andre studiene. I en studie av By Liu et al. (54) ble 40 permanente tenner fordelt i 4 grupper, der tenner først ble eksponert for remineraliseringsløsning i 5 min, kontrollgruppe med 10 tenner ble eksponert for deionisert vann. Deretter ble tennene lagt i syreløsning som beskrevet i tabell i 168 timer. Ved bruk av Micro-CT kunne de rapportere at gjennomsnitt lesjonsdybde for kontrollgruppen var 173.6µm (54). Selv etter 144 timer slik som i gruppe 6 fikk vi ingen visuelle resultater.

Den oppgitte syreløsning blir brukt i studier med både permanente og primære tenner. Det er nevneverdig at studiene rapporterer at de lager demineraliseringslesjoner med omtrent samme dybde. Mengde organisk materiale i primære tenners emalje er høyere enn i en permanent

tann, noe som gjør den primære tannen mykere, mer porøs og mer utsatt for karies sammenlignet med permanent emalje (dybden på lesjonene dannet in vitro er dog omtrent like (26, 42, 56).

Da vi dessverre i denne studien fikk mangel på tid, har vi ikke kunne gjennomført målinger på lesjonsdybde, eller utført andre kvalitative målinger. I gruppe 1 og 2, som eksempel, kan vi se på micro-CT bildene at vi har laget en karieslignende-lesjon utfra våre kriterier, og kan dermed regnes som suksessfulle resultat. Lesjonene i disse gruppene ligner også bildene oppgitt i andre studier, da vi ser en intakt overflate med underliggende substans (54).

Vi anser dette forsøket kun som en pilotstudie, hvor vi åpner opp for videre forskning om hvilke metoder som kan brukes for å best mulig kunne produsere karieslignende lesjoner utenfor munnhulen. Pilotstudiet åpner opp for flere forskere som ønsker å se på dannelsen av karieslesjoner og hvordan vi kan gjenskape disse, slik at vi i fremtiden vil kunne skape våre egne karieslesjoner, og drive med forskning for remineralisering hvor vi får sett på hvilke produkter som gir best klinisk effekt i remineraliseringen utenfor munnhulen. Dette vil igjen kunne gjenspeile hvilke anbefalinger vi som klinikere velger å gi våre pasienter, slik at de best mulig kan ivareta sin egen orale helse. Videre forskning på området anser vi som svært viktig, da karies er verdens mest vanlige sykdom, og koster samfunnet store summer hvert år.

5. Konklusjon

I analysene av in vitro demineraliseringslesjonene fant vi ut at demineralisering med syreløsning 1 (pH 2.4) ga den tydeligste demineraliseringslesjonen (mest likt initialkaries, se figur 5). Videre forsøk kan benytte seg av denne løsningen, og de valgte tidsparametrene. Coca-Cola® med pH 2.4 og Total Etch® med pH<1.00 kan også brukes i dannelsen av in vitro demineraliseringslesjoner. Syreløsning 2 (pH 4.4.) ga minst tydelig demineralisering, så hvis denne skal benyttes bør tidsparametret økes.

Det er behov for flere studier med økt antall kronebiter og statistiske analyser, for å få mer bekreftende resultater.

6. Vedlegg



REGIONALE KOMITEER FOR MEDISINSK OG HELSEFAGLIG FORSKNINGSETIKK

Region: REK nord	Saksbehandler: Veronica Sørensen	Telefon: 77620758	Vår dato: 03.06.2019	Vår referanse: 2019/977/REK nord
			Deres dato: 27.05.2019	Deres referanse:

Vår referanse må oppgis ved alle henvendelser

Napat Bolstad
Univeristet i Tromsø

2019/977 Micro computed tomography evaluering av initial karies remineralisering

Vi viser til innsendt framleggingsvurderingsskjema datert 27.05.2019.

Prosjektleder: Napat Bolstad

Bakgrunn og formål (original):

This is a laboratory study using extracted human teeth. Around 30 extracted teeth will be collected from the oral surgery department at TKNN and Universitetstannklinikken (UTK). The human teeth will be extracted due to medical reasons, which will not be the purpose of this study. All teeth are anonymous and put in the same jar. Extracted teeth will be applied with the re active initial caries. After that all decay surfaces will be restored back by remineralising agents. The improvement of the decay areas will be analysed using micro-CT. The teeth will be scanned and the volume of the restored surfaces will be calculated and compared between different periods of time (1 day, 14 days and 30 days)

Tenner vil alltid være å regne som biologisk materiale. Med dette som utgangspunktet for REKs vurdering av framleggingsplikten, er spørsmålet hvorvidt prosjektet faller inn under helseforskningsloven og krever godkjenning av REK. De prosjekt som krever godkjenning av REK er prosjekt som dreier seg om «medisinsk og helsefaglig forskning på mennesker, humant biologisk materiale eller helseopplysninger», jf. helseforskningsloven § 2. «Medisinsk og helsefaglig forskning» er i § 4 a), definert som «virksomhet som utføres med vitenskapelig metodikk for å skaffe til veie ny kunnskap om helse og sykdom». Det er altså formålet med studien som avgjør om et prosjekt skal anses som framleggelsespliktig for REK eller ikke.

I omtalte prosjekt søker man å samle inn 40 ekstraherte tenner fra universitetets tannklinikker (Universitetstannklinikken, UTK) og kirurgisk avdeling for tannkompetansesenter for Nord-Norge (Tannhelsetjenesten kompetansesenter for Nord-Norge, TKNN)

Tennene vil bli delt inn i fire grupper (10 tenner per gruppe) med tre eksperimentelle og en kontrollgruppe. Tennene blir rengjort og fjernet mykt vev før de lagres i en glasskrukke.

Det beskrives at man vil benytte en aktiv demineraliseringsprosess for å simulere karieslesjonene. Hver tann vil lagres under det simulerte miljøet ved hjelp av en demineralisasjonsløsning. Målet beskrives som å evaluere de valgte remineraliseringsmidlenees effekt på rot og emalje karies lesjoner.

Selv om dette er en helsefaglig studie og funnene i studien indirekte vil kunne gi en helsemessig gevinst faller ikke prosjektet inn under definisjonen av de prosjekt som skal vurderes etter helseforskningsloven. Etter REKs vurdering faller prosjektet, slik det er beskrevet, utenfor virkeområdet til helseforskningsloven.

Besøksadresse:
MH-bygget UiT Norges arktiske
universitet 9037 Tromsø

Telefon: 77646140
E-post: rek-nord@asp.uit.no
Web: <http://helseforskning.etikkom.no/>

All post og e-post som inngår i
saksbehandlingen, bes adressert til REK
nord og ikke til enkelte personer

Kindly address all mail and e-mails to
the Regional Ethics Committee, REK
nord, not to individual staff

Innsamling av tenner til masterprosjekt

Hvilke tenner?

Alle permanente tenner, hele og spaltede, er av interesse.

Hva er Kloramin-T?

Kloramin-T er et mildt desinfeksjonsmiddel med biocidiske egenskaper.

Fremgangsmåte

1. Fjern biologiske rester på tannen (obs! Ikke bruk hydrogenperoksid, men kun mekanisk fjerning)
2. Skyll tannen godt i rent vann eller fysiologisk saltvann.
3. Legg tannen i flasken som er merket med Chloramin-T.]

Hvor finner man flaskene?

Man finner flaskene i kjøleskap på kirurgen og på UTK (lager).

7. Referanser

1. Petersen PE, Programme WHOOH. The World oral health report 2003 : continuous improvement of oral health in the 21st century : the approach of the WHO global oral health programme. Geneva: World Health Organization; 2003.
2. Broadbent JM, Thomson WM. For debate: problems with the DMF index pertinent to dental caries data analysis. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2005;33(6):400-9.
3. Fejerskov O, Kidd EAM, Nyvad B. Dental caries : the disease and its clinical management. 3rd ed. ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2015.
4. Martignon S, Chavarría N, Ekstrand K. Caries status and proximal lesion behaviour during a 6-year period in young adult Danes: an epidemiological investigation. *Clinical Oral Investigations.* 2010;14(4):383-90.
5. Aksnes K. Samarbeid om kvalitetsindikatorer for tannhelse viser: Statistiske forskjeller i Norden. *Den norske tannlegeforenings tidende.* 2011:246-7.
6. Haugejorden O, Birkeland JM. Karies i Norge i fortid og fremtid ; analyse av endringer og årsaker. *Den norske tannlegeforenings tidende.* 2008;118(2):84-90.
7. Akkus A, Akkus A, Roperto R, Akkus O, Porto T, Teich S, et al. Evaluation of mineral content in healthy permanent human enamel by Raman spectroscopy. *J Clin Exp Dent.* 2016;8(5):e546-e9.
8. Pathak S, Roopa K, Parameswarappa P, E N. White spot lesions: A literature review. *Journal of Pediatric Dentistry.* 2015;3.
9. Kliniske rutiner- Kariologi Oslo, Norway2010 [updated 10.11.2010; cited 2020 25.02.]. Available from: <https://www.odont.uio.no/studier/ressurser/kariologi/Diagnoser/kariesregistrering.html>.
10. Fredriksen Ø, Jacobsen ID, Tveit AB, Espelid I, Crossner CG, Mulic A. Erosive tannslitasjer ; forekomst og alvorlighetsgrad blant 16-åringer i Troms. *Den norske tannlegeforenings tidende.* 2017;127(7):600-5.
11. Mulic A, Tveit AB, Songe D, Sivertsen H, Skaare AB. Dental erosive wear and salivary flow rate in physically active young adults.(Research article)(Report). *BMC Oral Health.* 2012;12:8.
12. Sovik J, Tveit AB, Storesund T, Mulic A. Dental erosion: a widespread condition nowadays? A cross-sectional study among a group of adolescents in Norway. *Acta Odontol Scand.* 2014;72(7):523-9.
13. Amaechi BT. Dental Erosion and Its Clinical Management. Cham: Springer International Publishing : Imprint: Springer; 2015.
14. Ann-Katrin J, Ridwaan O, Gunnar EC, Anders J. Dental Erosion and Its Growing Importance in Clinical Practice: From Past to Present. *International Journal of Dentistry.* 2012;2012(2012):723-39.
15. Ren Y-F. Dental Erosion: Etiology, Diagnosis and Prevention. *RDH.* 2011:75-84.

16. Johansson A-K, Birkhed D, Omar R, Baghdadi S, Carlsson G. Dental erosion, soft-drink intake, and oral health in young Saudi men, and the development of a system for assessing erosive anterior tooth wear. *Acta odontologica Scandinavica*. 1997;54:369-78.
17. Bartlett DW, Coward PY. Comparison of the erosive potential of gastric juice and a carbonated drink in vitro. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2001;28(11):1045-7.
18. Uhlen M-M, Tveit AB, Refsholt Stenhagen K, Mulic A. Self-induced vomiting and dental erosion - a clinical study. *BMC Oral Health*. 2014;14(1).
19. Mohd Nor H, Harun NA. Conservative Management of Dental Erosion in Adolescents with Medical Conditions. *Case Reports in Dentistry*. 2018;2018.
20. Lopes G, Thys D, Klaus P, Oliveira G, Widmer N. Enamel acid etching: A review. *Compendium of continuing education in dentistry (Jamesburg, NJ : 1995)*. 2007;28:18-24; quiz 5, 42.
21. ten Cate JM. Models and Role Models. *Caries Research*. 2015;49(suppl 1)(Suppl. 1):3-10.
22. Yu OY, Zhao IS, Mei ML, Lo EC-M, Chu C-H, Yu OY. A Review of the Common Models Used in Mechanistic Studies on Demineralization-Remineralization for Cariology Research. *Dentistry journal*. 2017;5(2).
23. Gao SS, Zhang S, Mei ML, Lo EC-M, Chu C-H. Caries remineralisation and arresting effect in children by professionally applied fluoride treatment - a systematic review. *BMC oral health*. 2016;16(10):12.
24. Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Buzalaf MAR, Lussi A. Fluoride in Dental Erosion. *Fluoride and the Oral Environment*. 2011;22:158-70.
25. Raadal M, Espelid I, Crossner C-G. Non-operativ vs operativ behandling av karies blant barn og unge ; er det tid for å endre strategi? *Den norske tannlegeforenings tidende*. 2011;121(1):10-7.
26. Kucuk EB, Malkoc S, Demir A. Microcomputed tomography evaluation of white spot lesion remineralization with various procedures. *American Journal of Orthodontics & Dentofacial Orthopedics*. 2016;150(3):483-90.
27. Bilgiç F, Küçük EB, Sözer ÖA, Ay Y, Kaya A, Kaptaç M. Analysis of six orthodontic journals in science citation index and science citation index expanded: A bibliometric analysis. *Turkish Journal of Orthodontics*. 2018;31(3):73-8.
28. Coca-Cola original taste: The Coca-Cola company; 2017 [25.02.2020]. Available from: <https://www.coca-cola.ie/drinks/coca-cola/coca-cola>.
29. Seow W, Thong K. Erosive effects of common beverages on extracted premolar teeth. *Australian Dental Journal*. 2005;50(3):173-8.
30. Kitchens M, Owens BM. Effect of carbonated beverages, coffee, sports and high energy drinks, and bottled water on the in vitro erosion characteristics of dental enamel. *The Journal of clinical pediatric dentistry*. 2007;31(3):153.
31. Jain P, Nihill P, Sobkowski J, Agustin MZ. Commercial soft drinks: pH and in vitro dissolution of enamel. *Gen Dent*. 2007;55(2):150-4; quiz 5, 67-8.

32. Willershausen B, Schulz-Dobrick B, Willershausen B. In vitro study on dental erosion provoked by various beverages using electron probe microanalysis. *European journal of medical research*. 2004;9(9):432-8.
33. Guglielmi CAB, Mohana A, Hesse D, Lenzi TL, Bonini GC, Raggio DP. Influence of ultrasound or halogen light on microleakage and hardness of enamel adjacent to glass ionomer cement. *International Journal of Paediatric Dentistry*. 2012;22(2):110-5.
34. memiş özgül B, Orhan K, Tulga Öz F. Micro-computed tomographic analysis of progression of artificial enamel lesions in primary and permanent teeth after resin infiltration. *Journal of oral science*. 2015;57:177-83.
35. Mendes FM, Nicolau J. Utilization of laser fluorescence to monitor caries lesions development in primary teeth. *Journal of dentistry for children (Chicago, Ill)*. 2004;71(2):139.
36. Vivodent I. Total Etch [cited 2020 26.02.]. Available from: <https://www.ivoclarvivadent.com/en/p/dental-professional/products/adhesives/etchant/total-etch>.
37. Cleaton - Jones P, Fatti P, Bönecker M. Dental caries trends in 5 - to 6 - year - old and 11 - to 13 - year - old children in three UNICEF designated regions - Sub Saharan Africa, Middle East and North Africa, Latin America and Caribbean: 1970–2004. *International Dental Journal*. 2006;56(5):294-300.
38. Ditmyer M, Dounis G, Mobley C, Schwarz E. Inequalities of caries experience in Nevada youth expressed by DMFT index vs. Significant Caries Index (SiC) over time.(Research article)(Report). *BMC Oral Health*. 2011;11:12.
39. Petrovski M, Ivanovski K, Minovska A. DMFT Index among Institutionalized Elderly. *Balkan Journal of Dental Medicine*. 2015;19(1):21-5.
40. Thaveesangpanich P, Itthagaran A, King NM, Wefel JS. The effects of child formula toothpastes on enamel caries using two in vitro pH-cycling models. *International Dental Journal*. 2005;55(4):217-23.
41. SKYSCAN 1272 2020 [25.02.2020]. Available from: <https://www.bruker.com/products/microtomography/micro-ct-for-sample-scanning/skyscan-1272/overview.html>.
42. Ozgul BM, Orhan K, Oz FT, Ozgul BM. Micro-computed tomographic analysis of progression of artificial enamel lesions in primary and permanent teeth after resin infiltration. *Journal of oral science*. 2015;57(3):177-83.
43. Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res*. 1989;4(1):3-11.
44. He B, Huang S, Zhang C, Jing J, Hao Y, Xiao L, et al. Mineral densities and elemental content in different layers of healthy human enamel with varying teeth age. *Archives of Oral Biology*. 2011;56(10):997-1004.
45. Kunin AA, Evdokimova AY, Moiseeva NS. Age-related differences of tooth enamel morphochemistry in health and dental caries. *EPMA J*. 2015;6(1):3-.

46. Nanjannawar LG, Nanjannawar GS. Effects of a self-etching primer and 37% phosphoric acid etching on enamel: a scanning electron microscopic study. *The journal of contemporary dental practice*. 2012;13(3):280.
47. Dedeoglu N, Altun O, Kucuk EB, Altindis S, Hatunogl E, Dedeoglu N. Evaluation of the anatomical variation in the nasal cavity and paranasal sinuses of patients with cleft lip and palate using cone beam computed tomography. *Bratislavske lekarske listy*. 2016;117(12):691-6.
48. Hariri I, Hariri I, Sadr A, Nakashima S, Shimada Y, Tagami J, et al. Estimation of the Enamel and Dentin Mineral Content from the Refractive Index. *Caries Research*. 2013;47(1):18-26.
49. Nassur C, Pomarico L, Maia L. Reliability analysis of two methods for measuring active enamel demineralization: An in vitro study. *European Journal of Dentistry*. 2013;7(2):159-64.
50. Sleibi A, Tappuni A, Mills D, Davis GR, Baysan A, Sleibi A. Comparison of the Efficacy of Different Fluoride Varnishes on Dentin Remineralization During a Critical pH Exposure Using Quantitative X-Ray Microtomography. *Operative dentistry*. 2018;43(6):E308-E16.
51. Rovaris K, Ferreira LM, Sousa TO, Peroni LV, Freitas DQ, Wenzel A, et al. Feasibility of micro-computed tomography to detect and classify proximal caries lesions in vitro. *Dent Res J (Isfahan)*. 2018;15(2):123-9.
52. Maske TT, van de Sande FH, Arthur RA, Huysmans MCDNJM, Cenci MS. In vitro biofilm models to study dental caries: a systematic review. *Biofouling*. 2017;33(8):661-75.
53. Itthagaran A, Wei SHY, Wefel JS. The effect of different commercial dentifrices on enamel lesion progression: an in vitro pH-cycling study. *International Dental Journal*. 2000;50(1):21-8.
54. Liu B, Lo E, Li C. Effect of silver and fluoride ions on enamel demineralization: a quantitative study using micro - computed tomography. *Australian Dental Journal*. 2012;57(1):65-70.
55. Malekafzali B, Ekrami M, Mirfasihi A, Abdolazimi Z. Remineralizing Effect of Child Formula Dentifrices on Artificial Enamel Caries Using a pH Cycling Model. *J Dent (Tehran)*. 2015;12(1):11-7.
56. Benjasuwantep P, Rirattanapong P, Vongsavan K. The remineralization effect of bioactive glass on enamel caries-like lesions in primary teeth. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2017;48:1127-32.