

Institutt for klinisk odontologi  
Det helsevitenskapelige fakultet

## **Evaluering av *in Vitro* metode for demineralisering av rotoverflaten**

*En pilotstudie*

**Studenter:** Synne Alette Fjær Skåre, Kristine Fjellsøy og Aud Irene Bredeli

**Veileder:** Napat L. Bolstad

**Biveileder:** Berit Tømmerås, Lina Stangvaltaite-Mouhat

*Masteroppgave i klinisk odontologi, Mai 2020*



## Innholdsfortegnelse

1. Innledning .....	6
1.1. Bakgrunn .....	6
2. Hensikt med forsøket .....	7
3. Teori .....	8
3.1. Rotens utvikling og sammensetning .....	8
Dannelsen av roten .....	8
Dentin .....	8
Sement .....	9
3.2. Rotsementens beskyttende effekt .....	10
3.3. Erosjoner og karies – likheter og ulikheter .....	10
Demineralisering .....	10
Rotkaries .....	11
Erosjoner .....	11
3.4. Demineralisering av rotoverflaten .....	12
3.5. <i>In vitro</i> -metode for dannelse av demineralisering .....	12
Biofilm-mediert modell .....	12
Kjemisk modell .....	13
4. Metode .....	15
4.1. Kvalitativ pilotstudie .....	15
4.2. Utvalg .....	15
Tenner .....	15
Tidsskjema og temperatur .....	17
4.3. Etisk vurdering av prosjektet .....	18
4.4. Analyse med mikro-CT .....	18
4.5. Visuelle vurderinger .....	18
5. Resultat .....	20
5.1. Beskrivelse av resultater .....	20
6. Diskusjon .....	25
6.1. Diskusjon av metode .....	25
6.2. Diskusjon av resultater .....	27
7. Konklusjon .....	29
8. Referanser .....	30
Vedlegg 1 .....	33

## Tabelliste

Tabell 1- Oversikt over studier som benytter kjemisk modell.

Tabell 2- Informasjon om syreløsninger.

## Figurliste

**Figur 1-** Pre- og postskanning av gruppe 1 og 2. Demonstrasjon av mest tydelige snittbilder. Sett i to plan (sagittalt, transversalt) av pre- og postskann. Gruppe 1 Coca Cola®. pH 2,4, 96 timer og gruppe 2 Coca Cola®. pH 2,4, 144 timer. Røde ringer viser vindu 2x2 mm før og etter syrepåvirkning.

**Figur 2-** Pre- og postskanning av gruppe 3 og 4. Demonstrasjon av mest tydelige snittbilder. Sett i to plan (sagittalt, transversalt) av pre- og postskann. Gruppe 3 Sigma Aldrich. pH 2,4, 96 timer og gruppe 4 Sigma Aldrich. pH 2,4, 144 timer. Røde ringer viser vindu 2x2 mm før og etter syrepåvirkning.

**Figur 3 -** Pre- og postskanning av gruppe 5 og 6. Demonstrasjon av mest tydelig snittbilder. Sett i to plan (sagittalt, transversalt) av pre- og postskann. Gruppe 5 Sigma Aldrich. pH 4,6, 96 timer og gruppe 6 Sigma Aldrich, pH 4,6, 144 timer. Røde ringer viser vindu 2x2 mm før og etter syrepåvirkning.

**Figur 4 -** Pre- og postskanning av gruppe 7 og 8. Demonstrasjon av mest tydelig snittbilder. Sett i to plan (sagittalt og transversalt) av pre- og postskann. Gruppe 7 Ivoclar Vivadent. pH<1, 30 minutter og gruppe 8 Ivoclar Vivadent. pH<1, 6 timer. Røde ringer viser vindu 2x2 mm før og etter syrepåvirkning.

**Figur 5 -** Tre snittbilder av naturlig rotkaries i forskjellige plan, skannet med mikro-CT (Skyscan 1272, Bruker, Kontich, Belgium).

## Forkortelser

Mikrotomografi, micro-computed tomography: mikro-CT.

Preskanningen: mikro-CT-bildene før rotoverflaten ble behandlet med en syreløsning.

Postskanningen: mikro-CT-bildene etter rotoverflatene ble behandlet med syreløsning.

## Vedlegg

Vedlegg 1- Svar fra REK

**Nøkkelord:** demineralisering, rotoverflate, *in vitro* studie, erosjon, rotkaries.

## Forord

Oppgaven ble valgt i samråd med Napat L. Bolstad, førsteamanuensis i kjeve- og ansiktsradiologi, Institutt for klinisk odontologi (IKO), UiT. Skriveprosessen har vært jevnt fordelt mellom hver student for individuell skriving, og i etterkant gjennomarbeidet og korrigert i fellesskap. Seleksjon og vurdering av kilder er gjort av alle studenter.

Vi ønsker å rette en stor takk til våre veiledere Napat L. Bolstad, Lina Stangvaltaite-Mouhat og Berit Tømmerås for god oppfølging og veiledning under gjennomføring av laboratoriestudier og oppgaveskriving. Vi vil også rette en takk til Eirin Grinde Tunheim for arbeid med forforskene sommeren 2019.

## Sammendrag

**Bakgrunn:** Stadig flere eldre beholder sine egne tenner i høy alder. Blant de utfordringene som hyppig ses er blottlagte rotoverflater. Rotoverflatene er sårbare for kariesangrep og erosjoner. Målet for studien var å skape demineralisering *in vitro* på rotoverflater med et utvalg av fire syreløsninger. Vi skulle beskrive hvordan eventuelle demineraliseringer visuelt artet seg på rotoverflaten, og diskutere om resultatene kunne benyttes i fremtidige studier av remineraliseringsmetoder.

**Metode:** 12 tenner ble samlet inn ved universitetstannklinikken (UTK) og ved Tannhelsetjenestens kompetansesenter for Nord-Norge (TkNN). Tennene ble spaltet i rotsegmenter og dekket av neglelakk med unntak av et eksponeringsvindu på 2x2 mm. Rotfragmentene ble inndelt i åtte grupper og hver gruppe ble utsatt for en syreløsning. To og to grupper ble utsatt for samme syreløsning, men med ulikt tidsintervall. Rotfragmentene ble skannet med mikrocomputer tomografi (mikro-CT, Skyscan 1272, Bruker, Kontich, Belgium) før og etter syrepåvirkningen, og visuelt sammenliknet av respektive tannlegestudenter. Bildene ble evaluert i programmet DataViewer (Bruker, Kontich, Belgium).

**Resultat:** Forandringer i overflatekontur ses i gruppe utsatt for Coca Cola® ved 96t og 144t, gruppe utsatt for syreløsning pH 2,4 i 96t og 144t og gruppe utsatt for fosforsyre 37% ved 30 min og 6t. I gruppe utsatt for syreløsning pH 2,4 i 96t og 144t ses i tillegg en demineraliseringszone med økt radiolusens. I gruppe utsatt for syreløsning pH 4,6 i 96t og 144t ses ingen forandring i overflatekontur.

**Konklusjon:** Vi har klart å skape visuelt tydelige demineraliseringer på rotoverflaten. I gruppen med syreløsning pH 2,4 fikk vi både en endring i overflatekontur og en demineraliseringssone under rotoverflaten. Videre kvantitative analyser vil kunne gi en mer utfyllende beskrivelse av resultatene. Flere studier er også av behov for å kunne finne den mest effektive og korrekte metoden for å lage demineraliseringer på rotoverflater.

# 1. Innledning

## 1.1. Bakgrunn

Verden står i dag overfor et skifte innen aldersdemografien hvor befolkningen blir stadig eldre. De aller fleste kan i dag forvente å nå en levealder høyere enn 60 år (1). Denne fremgangen skyldes i stor grad økt helseforståelse, evnen til å forebygge sykdom og forbedrede behandlingsmuligheter ved sykdom. Men selv om mange oppnår høyere alder er ikke alltid alderdommen synonymt med god helse. Økt alder kan også by på ytterligere utfordringer som krever oppmerksomhet (1).

Den økte populasjonen av eldre påvirker hvilke utfordringer vi står overfor innen oral helse. Av orale sykdommer blant denne aldersgruppen er periodontal sykdom og karies av de aller vanligste, samt at erosjonsskader er av økende forekomst (2). En systematisk studie og meta-analyse publisert i 2019, India, undersøkte 74 ulike studier prevalens av rotkaries. Resultatet viste til en prevalens på 41,5%, hvilket tilsvarer at 2 av 5 i den voksne befolkningen har rotkaries. På grunn av høy heterogenitet blant studiene som var inkludert må resultatet anses som noe usikkert. Eksempelvis var alderskategoriene i studiene ulike. Kun 12 av studiene benyttet WHO sine spesifikke aldersgrupper 35-44 år og 65-74 år. Studien viste at prevalens økte med alder, og at kjønnsfordelingen var tilnærmet lik. Studiene var innhentet fra Sør-Amerika, Nord-Amerika, Afrika, Australia, Asia og Europa (3).

Erosjoner er en form for tannslitasje som klinikere møter på i kontakt med sine pasienter. De fleste studier som er gjennomført for å undersøke prevalens av erosjoner, er utført på yngre pasienter. Erosjoner er tannslitasje som følger pasientens tannsett livet ut og man kan derfor anta at den eldre pasient også har erosjonsskader, om mulig i større grad på grunn av den kumulative effekten (2). I en studie fra 1996 undersøkte erosjonsskader på tennene blant ulike aldersgrupper, og det ble observert at pasienter over 65 år hadde tre ganger mer erosjonsslitasje sammenliknet med pasientgruppen 26-35 år (4).

Periodontal sykdom kan medføre gingivale retraksjoner som igjen gir blottlagte rotoverflater (5). Rotoverflaten har lavere motstandsdyktighet mot syreholdige avfallsstoffer fra kariogene bakterier sammenliknet med emaljen. Rotsementen som kommer i kontakt med munnhulen er

mer sårbar, og kariesrisikoen øker markant (6). Mange eldre har et behov for et bredt spekter av medisiner grunnet ulike helseproblemer, som også er med på å øke kariesrisikoen. Dette er fordi mange medisiner er kariogene og erosive, og mange medisiner har munntørrehet som en bivirkning (7). Utviklingen innen tannhelse har medført at flere bevarer eget tannsett opp i alderdommen. Færre har helproteser, og tannstatus består i stor grad av kroner, broer og implantater. Dette setter et større krav til vedlikehold av tannsettet (8).

Det finnes forskning som undersøker materialers evne til å styrke tennene og forhindre utvikling av karies (9). Flere av disse studiene baserer seg på demineraliserte overflater dannet i laboratoriet (*in vitro*). Demineraliserte overflater er betegnelsen på tannvev hvor den opprinnelige mineraltettheten er redusert. Karieslesjoner er en type demineralisert overflate (10). Å gjenskape de orale forholdene vil være en utfordring i laboratoriet. Munnhulen er et svært spesifikt økologisk miljø i form av bakteriesammensetning, pH-verdier, bufferkapasitet, temperaturer, mekanisk påvirkning osv. Kariesutviklingen i en tann er en særegen form for demineralisering som utvikles igjennom en biofilm-mediert pH-reduksjon (11).

Det finnes ulike metoder for å skape demineralisering på rotoverflatene i et laboratorium. To av metodene vi ser er benyttet i tidligere studier, er kjemisk modell og biofilm-medierte modell. Den kjemiske modellen bruker kjemiske løsninger med lav pH, mens den biofilm-medierte modellen gjensker demineralisering ved hjelp av kariogene bakterier. Hver av de to metodene har sine fordeler og ulemper. I vår masteroppgave skal vi forsøke å lage demineraliseringer på rotoverflaten med en kjemisk modell (12).

## **2. Hensikt med forsøket**

Vårt innledende mål med studien var å undersøke ulike produkters evne til å remineralisere demineraliserte rotoverflater. Ved oppstart av studien møtte vi på utfordringer med å gjenskape visuelt tydelige demineraliseringer ved bruk av kjemiske løsninger, som tidligere var benyttet i andre studier (9). Vi så derfor et behov for å undersøke hvilke demineralingsløsninger som gir best utgangspunkt for bruk i videre remineraliseringsforsøk.

Målet for studien var å undersøke et utvalg av fire syreløsninger for å forsøke å skape demineralisering på rotoverflater, og å beskrive hvordan eventuelle demineraliseringer visuelt

artet seg på rotoverflaten. Vi skal også diskutere om resultatene kan benyttes i fremtidige remineraliseringsstudier.

## 3. Teori

### 3.1. Rotens utvikling og sammensetning

Tannroten består av to mineraliserte vev: dentin og sement. Dentinet ligger nærmest pulparommet, mens sementen ligger som et beskyttende lag rundt dentinet. Sementen forankrer tannen til omliggende vev, og er derfor en viktig bestanddel av periodontiet, sammen med periodontalligamentet og alveolarbeinet (13).

#### Dannelsen av roten

Selve initieringen og dannelsen av roten er en prosess som ikke er helt klarlagt per i dag. Teoriene bygger på at tannkronen dannes først, og når kronen er ferdigstilt igangsettes rotdannelsen. Utgangspunktet for utviklingen er antatt å være epitelceller fra det indre og ytre emaljepitel. Når rotdannelsen initieres dannes et dobbelt epitellag ved navn *Hertwigs rotepitel*. Cellene i Hertwigs rotepitel initierer odontoblast- og sementoblastdifferensieringen som henholdsvis igangsetter produksjonen av rotdentin og sement (14).

#### Dentin

Odontoblastene starter opp dentinogenesen og deponerer først predentinet. Predentinet er umineralisert og består hovedsaklig av kollagen type I, inkludert mindre mengder av type III og V kollagen. Odontoblastene omkranser pulpa og deponerer predentinet vekk fra pulparommet. Raskt etter at deponeringen av predentinet er igangsatt, vil det skapes en mineraliseringsfront hvor ikke-kollagene matriksporteiener inkorporeres i det umineraliserte vevet. Dentinet vokser i tykkelse samtidig som mineraliseringsgraden øker. Gradvis modnes dentinet. Dentinet utgjør hoveddelen av røttene. Grovt sett består dentinet av 70% mineraler, 20% organisk matriks og 10% vann. Dentinet er et heterogent og komplekst vev og kan deles inn i ulike typer. Perifert mot sementen ligger hyalinlaget, og deretter Tomes granulære lag, som begge er omtrent 15-30µm tykke. Innenfor disse lagene finner man det circumpulpale dentinet som utgjør vevet rundt dentintubuli (15).



## Sement

Når predentinet er dannet, startes sementdannelsen på rotoverflaten. De spesifikke celler og triggerfaktorer som promoterer for dannelse av sementoblaster og sementproduksjonen er ukjent. Det likevel antatt at Hertwigs rotepitel spiller en viktig rolle. Aller først dannes den primære sement. De første sementblastene legger seg på utsiden av ikke-mineralisert nydannet predentin, og sementen utvikles fra det cervicale mot det apikale. Sementblastene likner fibroblaster i den grad at de har utløpere som kan strekke seg inn i det umineraliserte predentinet. Her deponerer de kollagenfibre som blander seg sammen med dentinkollagenet. Når dentinet så mineraliseres, brer mineraliseringsfronten seg fra det indre predentin og ut mot det ytre, for så å spre seg ytterligere inn i sementen. De blandede kollagenfibrene fra de to vevene mineraliseres og det skapes en sementodentin-forbindelse som kopler vevene sammen. Sementblastene på rotoverflaten migrerer så vekk fra overflaten mens de samtidig deponerer kollagen og ikke-kollagene matriksproteiner. På den måten øker tykkelsen på sementen (16).

Sement kan klassifiseres i tre hovedgrupper: acellular extrinsic fiber sement (AEFC), cellular intrinsic fiber sement (CIFC) og cellular mixed stratified sement (CMSC). Førstnevnte, acellulær extrinsic fiber sement, har extrinsic fibre og ingen sementocytter, mens cellular intrinsic fiber sement inneholder intrinsic fibre og sementocytter. I cellular mixed stratified sement ses lagdelinger av både CIFC og AEFC. CIFC er betraktet som en undergruppe av CMSC Yamamoto, Hasegawa (17).

De ulike sementtypene dekker tannens rotdentin på ulike steder. I cervikale deler av rotoverflata finner man AEFC. Tykkelsen på denne typen sement varierer ifra 50-200µm, og hvor langt apikalt sementen strekker seg varierer mellom ulike tenner. CMCS dekker rotens apikale deler og eventuelle furkasjoner. Generelt sett er denne sementen tykkere enn AEFC. I molarer kan sementen bli opptil 1500µm på det tykkeste (17). Sementtykkelsen øker med levealder. Forskning viser at sementlaget kan tredoble tykkelsen sin mellom leveårene 20-60 år (18).

Biokjemisk sett består sement av omtrent 50% mineraler, apatitkrystaller, og 50% organisk matriks. Den organiske matriksen består i hovedsak av kollagen type I (90%). Andre kollagentyper, som kollagen type III og XII, finnes også i små mengder, samt en rekke ikke-kollagene matriksproteiner (19).

### 3.2. Rotsementens beskyttende effekt

Sementen vedlikeholder og opprettholder tannens funksjon i periodontiet. Et intakt sementlag vil ha en beskyttende effekt mot demineralisering (20). For å kunne fungere som optimal beskyttelse er sementen avhengig av resterende del av periodontiet. Ved gingivale retraksjoner med blottlagte rotoverflater, vil sementens beskyttende effekt svekkes (14). I tillegg er sementen mer mottakelig for kariesangrep sammenliknet med emaljen. Dette fordi demineralisering av rotoverflaten vil forekomme ved høyere pH sammenliknet med emaljen (21).

Ved endringer i det orale miljøet rundt sementen vil sammensetning og struktur kunne forandres og svekke sementens motstandsevne. Ved periodontal sykdom vil bakterier og sykdommens behandling med gjentatte overflatescalinger og rotplaneringer, være med på å svekke den beskyttende evnen til sementen. Sett i sin helhet mister rotsementen derfor mye av sin motstandskapasitet. Ytterligere skapes en ond sirkel som gjør den blottlagte og sårbare overflaten mer mottakelig for demineralisering (14).

### 3.3. Erosjoner og karies – likheter og ulikheter

#### Demineralisering

Demineralisering er prosess hvor mineralisert vev mister sin mineraliseringstetthet. Tannvev er i stor grad mineralisert, med emalje som inneholder ca. 90% mineraler, dentinet som inneholder ca. 70% mineraler og sementen som inneholder ca. 50% mineraler. I rotsementen er kollagenfibrene hovedbestanddel i den organiske matriksen, og fungerer som et nettverk som binde mineralene. Mineralene forekommer som apatittkrystaller, mer konkret hydroksylapatitt (17). Hydroksylapatitt har den kjemiske formelen  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  (22). Dette krystallmolekylet påvirkes av pH-forandring. Den kritiske pH-verdien for rotsement er antatt å være ca. 6-6,8 (23). Under denne pH-en løses hydroksylapatitten opp i ioner:  $5\text{Ca}^{2+} + 3\text{PO}_4^{3-} + \text{OH}^-$ . Disse ionene felles ut av sementen, og resultatet er en demineralisert overflate (22). Demineraliseringer kan ha ulik etiologi, og vi skal videre se på demineralisering som et resultat av karies og erosjoner.

## **Rotkaries**

Karies er en biofilm-mediert prosess hvor man finner mineraltap i tannens hardvev (24).

Karies på rotoverflaten dannes ved at eksponert sement utsettes for en kariogen biofilm. Den kariogene biofilmen består av bakterier som metaboliserer fermenterbare karbohydrater til organiske syrer. Dersom disse syrene når kritisk pH for rotsementen ved pH 6-6,8, og om biofilmen får ligge urørt over lengre tid, vil de organiske syrene initiere demineralisering i form av en karieslesjon (25).

Kariesprosessen kan deles opp i to faser, en oppløsning av mineraler og en degradering av organisk matriks. Klinisk ser rotkaries forskjellig ut i farge og overflatetekstur avhengig av om lesjonen er aktiv eller ikke. Den aktive lesjonen vil ha en gulbrun farge med en matt og myk overflatetekstur, mens en kronisk lesjon vil ofte ha en mørkere farge samt en hard og glinsende overflate. Særegent for det histologiske bildet av kariesdemineralisering, er at demineraliseringen forekommer som tap av mineraler under en delvis mineralisert overflate (26).

## **Erosjoner**

Dental erosjon defineres som et tap av mineraler i tannens hardvev som følge av en kjemisk prosess som ikke involverer bakterier. Erosjoner dannes av gjentatte syrepåvirkninger på tennenes overflate. Erosjoner kan ha en intern eller ekstern årsak. Eksterne årsaker er blant annet syreholdig mat og drikke. Interne årsaker inkluderer syrepåvirkning fra sykdommer som GERD og spiseforstyrrelser. Det histologiske bildet ved erosjoner viser tap av mineraler og tannvev lag for lag uten misfarging eller mykgjøring av overflaten. Det skiller seg fra karies ved at overflaten i sin helhet reduseres. Klinisk er ofte overflaten på erosjoner avrundede, og lesjonene er enten matte eller blanke avhengig av prosessens aktivitet. Når mineralkonsentrasjonen i mat/drikkevaren er høyere enn den i plakkvæsken, vil den syreholdige væsken/maten ikke ha evne til å løse opp tannmineralene, selv om pH er under kritisk nivå (27).

Både erosjoner og karies er prosesser i munnhulen der tennenes hardvev demineraliseres som følge av en syredreven prosess, men viktige forskjeller er som nevnt årsak til pH-reduksjonen og lesjonenes strukturelle forskjeller.

### 3.4. Demineralisering av rotoverflaten

En demineralisering som følge av en erosjonsprosess eller en kariesprosess eksponerer hardvevenes organiske matriks. Dette skjer etter en utfelling av hydroksylapatittkrystaller fra tannens hardvev. Den organiske matriksen består som tidligere nevnt hovedsakelig av kollagen type I fibre (90%). Den resterende komponenten er ikke-kollagene proteiner, lipider og enzymer. Etter at matriksen eksponeres starter en hydrolytisk degradering ved hjelp av enzymer. Enzymene er hovedsakelig av gruppen matriks metalloproteinaser og cysteine katepsiner. Disse enzymene virker som proteinaser. En proteinase er et enzym som bryter ned andre proteiner, i dette tilfellet hovedsakelig kollagen. Etter at tannen utsettes for en synkende pH starter enzymene nedbrytningen av dentinmatriksen. Andre enzymer i gruppen matriks metalloproteinaser og cystein katepsiner kan også «slå på» andre enzymer, som i en selvforsterkende kaskadeprosess (28, 29). I en kariesprosess vil også bakterier ha egne kollagenaser (kollagennedbrytende enzymer) som er med på å bryte ned kollagenmatriksen (30). For å kunne remineralisere en tann trenger man dette nettverket av kollagenfibre og andre proteiner. Når det forsvinner eller kollapser er det ikke lengre mulig å remineralisere med mineraler (30).

### 3.5. *In vitro*-metode for dannelselse av demineralisering

Det har blitt gjort en rekke *in vitro* studier som benytter seg av kunstig fremstilte demineraliserte overflater. Lesjoner av kariøs art dannes av syreproduserende bakterier i en biofilm. Å gjenskape dette i laboratoriet krever en annen tilnærming, og det forekommer i hovedsak to metoder.

#### Biofilm-mediert modell

Denne metoden baserer seg på å dyrke kariogene bakterier *in vitro*, ved hjelp av å etablere et mest mulig likt oralt miljø utenfor munnhulen. Når man har opparbeidet en koloni av bakterier, overføres de til overflaten av en tann hvor de medierer en biofilm som produserer kariogene biprodukter og utvikler demineralisering på overflaten. Dersom man har en jevn tilførsel av sukrose (karbohydrat) til sammenligning av en periodevis tilførsel av sukrose, vil man kunne lage en erosjonslesjon med bakteriekolonien (31). Dette kan tyde på viktigheten av at karies en kontinuerlig prosess med både demineralisering og remineralisering, hvor til slutt summen viser en demineralisering av dentalt vev (32).

## **Kjemisk modell**

Den kjemiske modellen baserer seg på teorien om at de kariogene bakteriene produserer et surt miljø. Ved å utsette tannoverflaten for løsning av lav pH, vil overflaten demineraliseres og gi en lesjon som kan ligne det vi ser ved naturlig forekomne demineralisering i munnhulen. For rotoverflaten antas den kritiske verdien for demineralisering å være mellom pH 6,8-6 (23). Forskerne som benytter denne metoden mener å produsere en lesjon som er tilnærmet lik karies, og som kan benyttes ved forskning (9). En kjemisk modell forholder seg kun til den fysiske og kjemiske delen av demineraliseringen (33).

Neste side viser en oversiktstabell (tabell 1) over studier som har benyttet en kjemisk modell for fremstilling av kunstige karieslesjoner. Tabellen sammenligner ulike variabler som kjemisk løsning, størrelsen på utvalget, metode for analyse, syremotstandig beskyttelseslakk, temperatur og tid.

- 1) 2018/Zamperini, C. Bedran-Russo, A. (34).
- 2) 2016/Epasinghe, DJ. Tiu, C. Burrow, MF. (35).
- 3) 2019/Bächli, K. Schmidlin, PR. Wegehaupt, F. Paqué, F. Ramenzoni, L. Botter, S (36).
- 4) 2016/Kucuk, E. B. Malkoc, S. Demir, A. (9).
- 5) 2014/Arnold, WH. Heidt, BA. Kuntz, S. Naumova, EA. (37).
- 6) 2002/Dietz, W. Kraft, U. Hoyer, I. Klingberg, G. (38).
- 7) 2017/Mohd Said, SN. Ekambaram, M. Yiu, CK. (39).



År/forfatter	Navn på artikkel	Type modell	Oppskrift på kjemisk løsning benyttet	Antall tenner	Syremotstandsbeskyttelseslakk	Analyse	Tid og temperaturer
2018/Zamperini, C. Bedran-Russo, A.	Remineralization Potential of Mints Containing Bioactive Agents in <b>Artificially Induced Root Caries</b>	Bruker kjemisk modell for å fremstille demineralisering på rotoverflate	2.2 mM CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O, 2.2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 50 mM acetate, pH 4.6	105	«Syremotstandsdyktig» neglelakk	Fluorescence mikroskopi Og mikro-CT	96 timer i 37 °C
2016/Epasinghe, DJ. Tiu, C. Burrow, MF.	Effect of flavonoids on remineralization of <b>artificial root caries</b>	Bruker kjemisk modell for å fremstille demineralisering på rotoverflate	2.2 mM CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 2.2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 50 mM acetate, pH 4.6	40	«Syremotstandsdyktig» neglelakk	Confocal laser scanning microscopy	96 timer i 37 °C
2019/Bächli, K. Schmidlin, PR. Wegehaupt, F. Paqué, F. Ramenzoni, L. Botter, S.	Remineralization of <b>Artificial Dentin Caries</b> Using Dentin and Enamel Matrix Proteins	Bruker kjemisk modell for å fremstille demineralisering på dentin	5 L destillert vann, 2.205 g CaCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O (3.0 mM), 2.041 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (3.0 mM), 10 mL MHDP løsning (preparert fra 100 mL destillert vann med 0.0528 g methylen difosforsyre), 14.3 mL CH <sub>3</sub> COOH (50 mM), og 10 M KOH til titrering for løsning til pH 4.95	48	Flytende komposittresin (Filtek supreme XTE Flow)	Micro-CT (Skyscan 1176)	33 dager i 37 °C
2016/Kucuk, E. B. Malkoc, S. Demir, A.	Microcomputed tomography evaluation of <b>white spot lesion</b> remineralization with various procedures	Bruker kjemisk modell for å fremstille demineralisering på emaljeoverflate	1 L of deionisert vann, 0.264 g monosodium fosfat, 0.244 g kalsiumklorid, og 2.86 mL eddiksyre, pH satt til 4.4	44	«Syremotstandsdyktig» neglelakk	Micro-CT	96 timer (temperatur ikke nevnt)
2019/Arnold, WH. Heidt, BA. Kuntz, S. Naumova, EA.	Effects of fluoridated milk on <b>root dentin remineralization</b>	Bruker kjemisk modell for å fremstille demineralisering på rot dentin	1.6% hydroxyethylcellulose assidifisert med eddiksyre til pH 4.7	30	Dental wax	Polarisert lysmikroskopi	3 dager (temperatur ikke nevnt)
2002/Dietz, W. Kraft, U. Hoyer, I. Klingberg, G.	Influence of cementum on the demineralization and remineralization <b>processes of root surface caries in vitro</b>	Bruker kjemisk modell for å fremstille demineralisering på rotoverflaten/cement	0.1 M Na-acetate buffer (pH 4.95) i 6% hydroxyethylcellulose med 1.5 mmol/l CaCl <sub>2</sub> , 0.9 mmol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 150 mmol/l KCl	41	Ikke nevnt	Polarisert lysmikroskopi	7 dager i 37 °C
2017/Mohd Said, SN. Ekambaram, M. Yiu, CK.	Effect of different fluoride varnishes on remineralization of <b>artificial enamel carious lesions</b>	Bruker kjemisk modell for å fremstille demineralisering på emaljeoverflate	CaCl <sub>2</sub> 2.2 mM, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2.2 mM, og eddiksyre 0.05 M, justert med KOH 1 M (pH 5.0) og deionisert vann	60	«Syremotstandsdyktig» neglelakk	Lysmikroskopi	96 timer (temperatur ikke nevnt)

Tabell 1 – Oversikt over studier som benytter kjemisk modell.

## 4. Metode

### 4.1. Kvalitativ pilotstudie

Vi har valgt å benytte oss av en kvalitativ metode ved denne studien. Det innebærer at resultatene i denne studien vurderes visuelt. Resultatene vurderes utfra en preskanning og en postskanning med mikrokomputertomografi (mikro-CT). Vi skal utfra disse dataene skape oss en oppfatning om de ulike prosedyrenes effekt. Funnene våre vil ikke presenteres som tall, men som subjektive vurderinger av mikro-CT-røntgenbilder. Dette er med bakgrunn i oppgavens størrelse og tidsramme. Vi ønsker derfor å kategorisere denne oppgaven som en pilotstudie, som kan ha potensialet til å kunne utvides til en større studie med oppbygging av kvantitativ metode (40).

### 4.2. Utvalg

#### Tenner

Det ble samlet inn et randomisert utvalg av 12 ekstraherte tenner fra UTK og den kirurgiske avdelingen på Tannhelsetjenestens kompetansesenter for Nord-Norge (TkNN). Tennene ble rengjort og alt bløtvevet ble fjernet før de ble oppbevart i et glass med 0,5% Chloramine T trihydrate (cas: 7080-50-4) ved 4°C til konservering (41, 42). Tennene kunne ikke spores tilbake til pasientene i ettertid da de ble liggende sammen i to glass. Vi hadde ingen ytterligere eksklusjonskriterier med unntak av at tennene i sin helhet måtte være visuelt inntakte. Røttene ble separert fra kronene ved hjelp av en sylinderdiamant og turbin.

Røttene ble så ytterligere spaltet i 24 mindre rotfragmenter; dette for å kunne øke oppløsningen på mikro-CT-skanningen til 10 mikrometer per piksel. 24 rotfragmenter ble randomisert delt inn i 8 grupper bestående av tre rotfragmenter. På hvert rotfragment ble det laget et område som skulle påvirkes av ulike kjemiske løsninger. Dette ble gjort ved å feste på en tapebit i størrelse 2x2 mm før tannen ble lakkert med neglelakk (Hennes & Mauritz, Stockholm, Sverige) (9). Etter at lakken tørket, ble tapebiten fjernet. Rotfragmenten hadde da et eksponert vindu på 2x2 mm inn til rotsementen, mens den resterende overflaten var tildekket.

Det ble så gjennomført en preskanning med mikro-CT på samtlige rotfragmenter som viste utgangspunktet før demineraliseringen. Deretter ble hver av gruppene utsatt for ulike kjemiske løsninger. I påvente av postskanning med mikro-CT ble rotfragmentene oppbevart i kjøleskap i reagensrør med destillert vann.

## Materialer

Syreløsning	Produsent/ Kjemikalieprodusent	pH	Farge	Temp.	Tid
Coca Cola®	The Coca Cola Company	2,4	Brun	37 °C	<b>Gruppe 1:</b> 96 timer
					<b>Gruppe 2:</b> 144 timer
Syreløsning 1	Sigma Aldrich	2,4	Fargeløs	37 °C	<b>Gruppe 3:</b> 96 timer
					<b>Gruppe 4:</b> 144 timer
Syreløsning 2	Sigma Aldrich	4,6	Fargeløs	37 °C	<b>Gruppe 5:</b> 96 timer
					<b>Gruppe 6:</b> 144 timer
Fosforsyre 36,95%	Invoclar Vivadent Total Etch	< 1	Fargeløs	37 °C	<b>Gruppe 7:</b> 30 minutter
					<b>Gruppe 8:</b> 6 timer

*Tabell 2 – Informasjon om syreløsninger.*

Som vist i tabell 2 ble forsøket utført med 8 grupper, hvor hvert materiale ble testet ved to ulike tidsintervaller.

**Coca Cola ®:** Coca Cola ® har lav pH og høyt sukkerinnhold. Ved forforsøk gjort sommeren 2019 viste Coca Cola ® lovende resultater av demineralisering på rotoverflaten (dette er data som ikke er publisert). På grunn av dette ønsket vi å inkludere Coca Cola ® i vår studie.

*Innholdsfortegnelse:* Kullsyreholdig vann, sukker, fargestoff (karamell E150d), surhetsregulerende middel (E338), naturlige aromaer (inkl. koffein). Coca Cola ® inneholder 17mg/ml fosforsyre, 10mg/ml koffein (43).

**Syreløsninger:** Syreløsningene vi har valgt å benytte er fremstilt med utgangspunkt fra en annen studie utført av E. B. Kucuk et. al (9). I denne artikkelen er det benyttet en syreløsning

som innehar pH rundt 4,4 på emalje. Under preforsøket sommeren 2019 hadde vi problemer med å skape gode nok resultater med denne syreløsningen, og vi valgte derfor å inkludere en syreløsning med en ytterligere lavere pH på 2,4. Da vår studie ble utført med fragmenter av rotoverflaten valgte vi å justere syreløsning 2 til pH 4,6, da den kritiske pH verdien for rotoverflaten er høyere.

*Innholdsfortegnelse:* 1 liter med deionisert vann. 2,2 mM CaCl<sub>2</sub> (kalsiumklorid) (cas nummer: 10043-52-4) tilsvarende 0,244 gram/liter. 2,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O (natrium dihydrogen fosfat monohydrat) (cas nummer: 10049-21-5) tilsvarende 0,303 gram/liter. 50mM CH<sub>3</sub>COOH (eddiksyre) (cas nummer: 64-19-7) tilsvarende 3 ml. pH ble så justert med ytterligere tilsetning av eddiksyre, CH<sub>3</sub>COOH, (cas nummer: 64-19-7) til pH 2,4/pH 4,6 for respektive løsninger. Alle kjemikaliene til syreløsningene er fra Sigma Aldrich (9).

**Fosforsyre:** Fosforsyre 36,9% (Total Etch fra Ivoclar Vivaden AG, Schaan, Liechtenstein) er et preparat som vi benytter oss av i klinisk praksis, og som vi kjenner til at har en demineraliseringseffekt. Vi ønsket å inkludere dette materialet i studien for å kunne vurdere og sammenlikne effekt med de øvrige materialene fra denne studien.

*Innholdsfortegnelse:* 36,98% fosforsyre (cas nummer: 7664-38-2) og 5-9% polyetylenglykol (cas-nummer: 25322-68-3).

## **Tidsskjema og temperatur**

Tiden som ble benyttet for å eksponere rotoverflaten for syreløsninger, ble valgt utfra E. B. Kucuk et al. sin artikkel (9) som viser til vellykket demineralisering ved 96 timer (pH 4,4). I tillegg har vi valgt å ha en eksponeringstid på 144 timer, da vi ved forforsøkene møtte på utfordringer med å skape gode resultater etter kun 96 timer. Tiden for eksponering med fosforsyre ble satt med bakgrunn i dens sterkt etsende effekt, og vi reduserte eksponeringstiden for denne gruppen til 30 minutter og 6 timer.

Temperatur ble satt til 37 grader i inkubator (stillestående) og standardisert for alle materialene. Denne temperaturen ble valgt for å kunne tilnærmet gjenskape temperaturen i det orale miljøet (se tabell 1).

### 4.3. Etisk vurdering av prosjektet

Etter Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK) sin vurdering, faller masteroppgaven utenfor helseforskningslovens virkeområde (vedlegg 1).

Framleggingsplikten gjaldt derfor ikke vår masteroppgave. Instituttet stilte seg ansvarlig for at studien ble gjennomført på en forsvarlig måte med hensyn til regelverk om håndtering og bruk av biologisk materiale, taushetsplikt og personvern. Se vedlegg 1 for nærmere informasjon.

### 4.4. Analyse med mikro-CT

Mikrocomputertomografi (SkyScan 1272, Bruker, Kontich, Belgium) ble benyttet til preskanning og postskanning i vår studie. Rådata ble først opprettet med SkyScan 1272 og rekonstruert med programmet NRecon (versjon 2.0.2.6). Skanningen ble utført med en pikselstørrelser på 10 mikrometer. Filtrering av røntgenstrålingen med 0,5 mm aluminium og 0,038 mm kobber. Parametre for strålingen var 90 kV, 111 mA og 1090 ms integrasjonstid. Rotasjonssteget var satt til 0,4° og en rotasjon på 180° ble valgt. Beam hardening var satt til 33%. Skannetiden for de ulike tennene varierte grunnet ulik størrelsen på rotfragmentene (mellom 10-15 minutter).

De samme parametrene ble brukt for preskanning og postskanning. Deretter ble bildene overført til Dataviewer (versjon 1.5.0.0). DataViewer ble benyttet for å kunne legge bildene overlappende i tre plan (sagittalt, transversalt og koronalt) for å muliggjøre en sammenligning før og etter eksponering med de kjemiske løsningene. Overlappingen ble gjennomført manuelt av respektive tannlegestudenter. Rotfragmentene ble benyttet som visuell hjelp for å lokalisere plasseringen på eksponeringsvindue.

### 4.5. Visuelle vurderinger

Med mikro-CT ble det gjennomført preskanning og postskanning av alle rotfragmentene i hver gruppe. Preskanningen og postskanningen skulle sammenlignes med hensyn til overflatekontur og radiolusens. Forandring i overflatekonturen viser til et fullstendig mineraltap mens økt radiolusens viser til en delvis demineralisering (demineraliseringsone).



I tillegg til en visuell vurdering av pre- og postskanningene, ble det gjort en sammenligning med et mikro-CT bilde av en ekte karieslesjon. Karieslesjonen er presentert i figur 5 under resultater.

Forhåndsbestemte kriterier for vurdering av demineralisering:

1. Demineraliseringen skal vurderes som tilstedeværende i de tilfeller der det er en reduksjon av gråhetsskalaen. De eksponerte vinduene (2x2mm) skal vise forskjeller i radiologisk tetthet på rotoverflaten mellom pre- og postskanning.
2. Demineraliseringene må kun involvere sement og den ytre halvdel av dentinet for å kunne etterligne en initial karieslesjon.
  - a. Økt radiolusens viser til en delvis demineralisering (demineraliseringszone).
  - b. Forandring i overflatekontruren viser til et fullstendig mineraltap.
3. Dersom demineraliseringen involverer den indre delen av dentinet vil den ikke etterligne en initial karieslesjon og vil derfor bli utelukket.

Bildene ble sammenlignet av respektive tannlegestudenter og førsteamanuensis i kjeve- og ansiktsradiologi ved institutt for klinisk odontologi ved universitetet i Tromsø, Napat Limchaichana Bolstad. Flere personer ble benyttet til tolkning av bilderesultatene for å begrense observasjonsskjevhet.

## 5. Resultat

Figurene 1-5 viser en oversikt over resultatene for ett rotfragmentene fra hver av de åtte gruppene. I hver gruppe ses et sagittalt og et transversalt bildeutsnitt fra før og etter kjemisk syrepåvirkning.

### 5.1. Beskrivelse av resultater

#### Coca Cola® – pH 2,4:



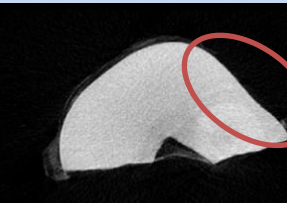

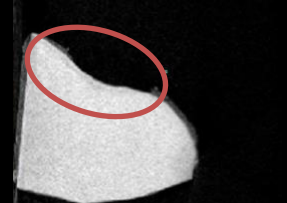
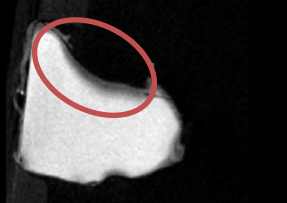
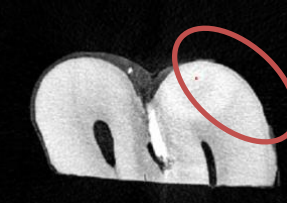

Bildesnittene fra Coca Cola®-gruppen (Fig. 1) viser en liten, men synlig endring i overflatekontur i det valgte eksponeringsvinduet. Resultatet er en forandring med tap av opprinnelig overflate (se markerte områder med røde ringer). Bildesnittene viser ingen demineraliserte soner. Det er ingen tydelig forskjell i resultater mellom 96 og 144 timer.

Coca Cola® pH 2,4	Preskanning	Postskanning	Preskanning	Postskanning
	Sagittalt bilde snitt	Sagittalt bilde snitt	Transversalt bilde snitt	Transversalt bilde snitt
96 timer Gruppe 1				
144 timer Gruppe 2				

**Figur 1-** Pre- og postskanning av gruppe 1 og 2. Demonstrasjon av mest tydelige snittbilder. Sett i to plan (sagittalt, transversalt) av pre- og postskann. Gruppe 1 Coca Cola®. pH 2,4, 96 timer og gruppe 2 Coca Cola®. pH 2,4, 144 timer. Røde ringer viser vindu 2x2 mm før og etter syrepåvirkning.

**Syreløsning 1 – Sigma Aldrich, pH 2,4:**



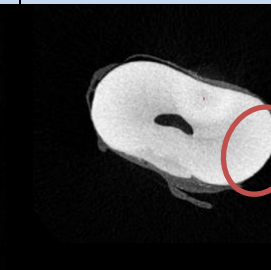
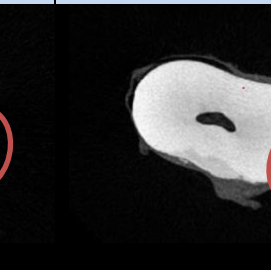

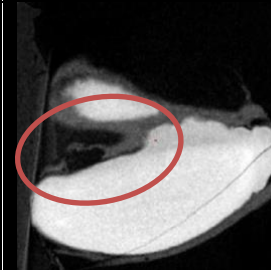

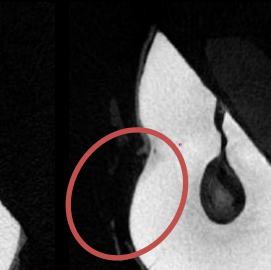
I eksponeringsvindue (Fig. 2) ses tydelige effekter av syrepåvirkningen. Syrepåvirkningen ses i tillegg utenfor det eksponerte vinduet på rotfragmentet. Resultatet viser en forandring i overflatekonturen, med tap av opprinnelig overflate (se markerte områder med røde ringer). Under den nyoppståtte overflatekonturen ses økt radiolusens (demineraliseringsone). Det kan se ut som den demineraliserte sonen er litt bredere ved 144 timer sammenlignet med 96 timer.

Syreløsning 1 pH 2,4	Preskanning	Postskanning	Preskanning	Postskanning
	Sagittalt bildesnitt	Sagittalt bildesnitt	Transversalt bildesnitt	Transversalt bildesnitt
96 timer Gruppe 3				
144 timer Gruppe 4				

**Figur 2-** Pre- og postskanning av gruppe 3 og 4. Demonstrasjon av mest tydelige snittbilder. Sett i to plan (sagittalt, transversalt) av pre- og postskann. Gruppe 3 Sigma Aldrich. pH 2,4, 96 timer og gruppe 4 Sigma Aldrich. pH 2,4, 144 timer. Røde ringer viser vindu 2x2 mm før og etter syrepåvirkning.

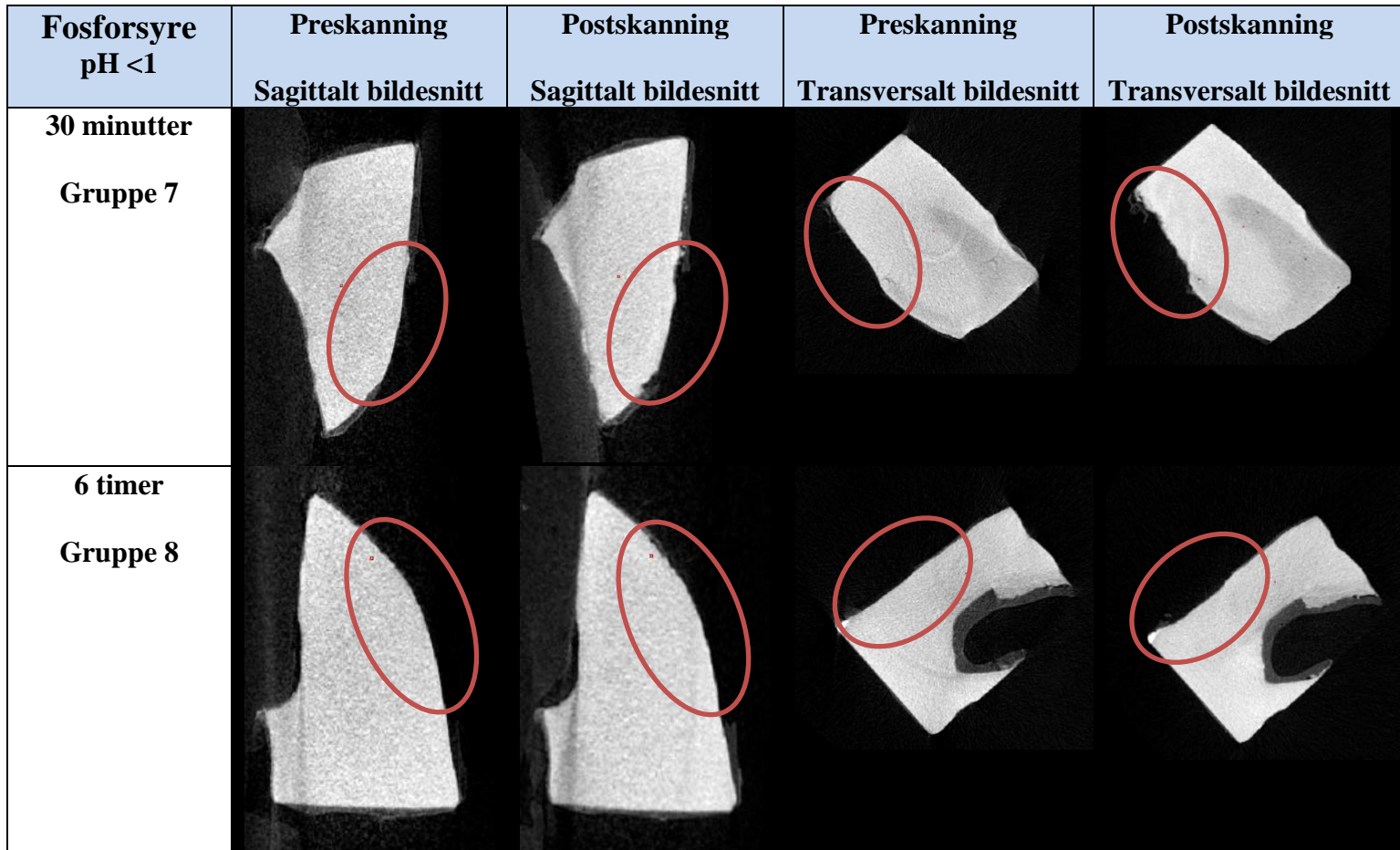
**Syreløsning 2 – Sigma Aldrich, pH 4,6:**

I eksponeringsvinduene (Fig. 3) ses ingen synlige forandringer i overflatekonturen etter henholdsvis 96 og 144 timer (se markerte områder med røde ringer).

Syreløsning 2 pH 4,6	Preskanning	Postskanning	Preskanning	Postskanning
	Sagittalt bildesnitt	Sagittalt bildesnitt	Transversalt bildesnitt	Transversalt bildesnitt
96 timer Gruppe 5				
144 timer Gruppe 6				

**Figur 3** - Pre- og postskanning av gruppe 5 og 6. Demonstrasjon av mest tydelig snittbilder. Sett i to plan (sagittalt, transversalt) av pre- og postskann. Gruppe 5 Sigma Aldrich, pH 4,6, 96 timer og gruppe 6 Sigma Aldrich, pH 4,6, 144 timer. Røde ringer viser vindu 2x2 mm før og etter syrepåvirkning.

**Fosforsyre pH <1 (Ivoclar Vivadent):** I eksponeringsvinduene i gruppene som ble behandlet med fosforsyre ses forandringer i overflatekonturen etter syrepåvirkningen. Overflatekonturen i det valgte vinduet har fått en ruglete og ujevn struktur sammenlignet med resterende overflate. Dette kommer tydeligst frem på bildene i gruppe 7.

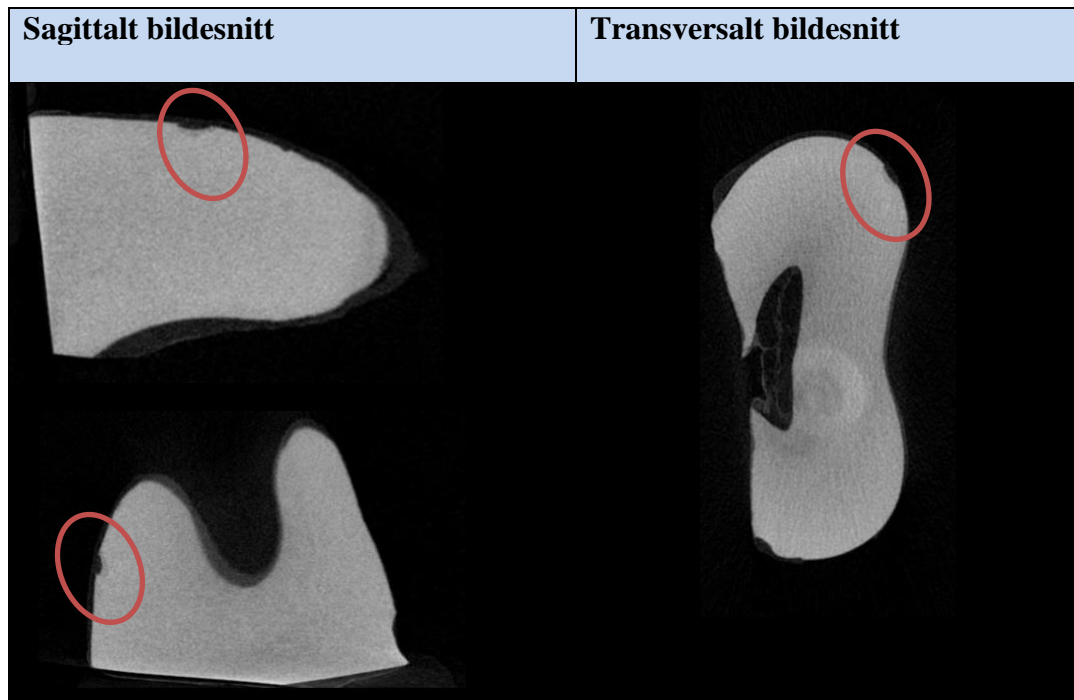


**Figur 4** - Pre- og postskanning av gruppe 7 og 8. Demonstrasjon av mest tydelig snittbilder. Sett i to plan (sagittalt og transversalt) av pre- og postskann. Gruppe 7 Ivoclar Vivadent. pH<1, 30 minutter og gruppe 8 Ivoclar Vivadent. pH<1, 6 timer. Røde ringer viser vindu 2x2 mm før og etter syrepåvirkning.



**Skanning av ekstrahert tann med naturlig rotkaries til sammenlikning**

Nedenfor (Fig. 5) ser vi et mikro-CT skann av en ekstrahert tann med naturlig rotkaries (detektert klinisk etter ekstraksjon). I de innringede områdene ses overflatekontur med en innbuktning. Under overflatekonturen ses et mer radiolusent område. Bildet er tatt med for å kunne sammenligne våre resultater med naturlig karies skapt i munnhulen.



**Figur 5-** Tre snittbilder av naturlig rotkaries i forskjellige plan, skannet av mikro-CT (Skyscan 1272, Bruker, Kontich, Belgium).

## 6. Diskusjon

### 6.1. Diskusjon av metode

#### Inklusjonskriterier

Studien er en pilotstudie og vi har derfor kun benyttet oss av tre rotfragmenter per gruppe. Vi har valgt å ikke utelukke noen tanntyper i denne studien.

Vinduets plassering på roten var ikke bestemt på forhånd, og beslutningen ble tatt av en sommervikar som fikk i oppgave å lage vinduer på rotoverflaten i kariesfrie områder. Derfor er plasseringen av eksponeringsvinduet tilfeldig plassert utfra hvor på roten vinduet best kunne plasseres.

De åtte gruppene med rotfragmenter består derfor av ulike typer tenner. Fragmentene i hver av gruppene kommer heller ikke nødvendigvis fra samme tann, og vi satte ingen krav for hvor på rotoverflaten vinduene skulle befinne seg. Det eneste kriteriet vi hadde var en visuelt intakt rotoverflate der vinduet ble laget.

#### Bruk av materiale for fremstilling av vindu

Ved visuell vurdering av mikro-CT-bildene før og etter syrepåvirkning ser vi at det også i områder utenfor våre valgte vinduer har skjedd en demineralisering. Dette kan indikere at neglelakken ikke har beskyttet mot syrepåvirkningen i den grad vi forventet. Andre studier vi har sett på som også har benyttet neglelakk til å lage vinduer, har ikke nevnt noe om negative konsekvenser i sine artikler (9, 34). I vår studie så vi at etter syrepåvirkningen hadde neglelakken skallet av på noen av rotfragmentene. På flere mikro-CT-bilder ser vi også at laget av neglelakk virker uregelmessig. Demineralisering utenfor vinduene er best synlig på resultatene i gruppe 3 og 4 (Fig. 2), der man på bildesnittene ser en tydelig syrepåvirkning på store deler av rotfragmentet. Sammenlignet med nevnte studier har vi i vår studie brukt en syreløsning med lavere pH-verdi og noen av våre rotfragmenter har blitt utsatt for syreløsning over en lengre periode. Å benytte neglelakk til å lage vinduer har derfor ikke vært ideelt for vår studie. Vi har siden tenkt at det kunne vært mer hensiktsmessig å benytte en form for tyntflytende resin for å markere vinduer for fremtidige studier (36).

### Analyse av resultatene

Da neglelakken ikke beskyttet godt mot syrepåvirkning utenfor eksponeringsvinduene, kunne vi ikke analysere variabelendring i volum, overflatevolum og tetthet, slik vi i utgangspunktet hadde planlagt i dataprogrammet CT-An. Neglelakken hadde løsnet i varierende grad på de forskjellige rotfragmentene, dermed kunne ikke hele rotfragmentet benyttes i en sammenligningsanalyse mellom preskanning og postskanning. En slik analyse ville gitt feilaktige resultater i form av større mineraltap. Det lot seg heller ikke gjøre å begrense analysen til de spesifikke eksponeringsvinduene. Resultatene ble dermed analysert visuelt, i form av endring i overflatekontur og radiolusente soner, men uten konkrete tall på forandring av volum og tetthet.

### Mikro-CT

Fordelen med mikro-CT til sammenligning med mikroskopi av histologiske tannsnitt er at det gir en hurtig analyseprosess og en prosess uten ødeleggelse av rotfragmentene. Metoden gjør at man kan følge samme tann gjennom demineraliseringsprosessen og sammenligne snittene før og etter demineralisering. Det betyr at rådata kan lagres på datamaskiner og vurderes, og at skanning kan foregå på forskjellige tidspunkt med samme rotfragment. En annen fordel med mikro-CT er at man kan lage digitale snitt og analysere rotfragmentene i en 3D-oppløsning (44, 45). Det ville man ikke fått til med histologiske snitt som kun kan analysere en tredimensjonal prosess i 2D. En viktig feilkilde som kan oppstå i bruk av histologiske snitt er forskjellen i hvordan demineraliseringen blir seende ut ettersom hvor i tannen de ulike snittene legges. Ved lavere oppløsning gir histologiske snitt vanligvis en mer tydelig og eksakt lesjon enn det man kan se med mikro-CT. Men så lenge oppløsningen på mikro-CT er så høy som 10 mikrometer per piksel, sees ingen forskjell mellom detaljnivået på de histologiske snittene og mikro-CT (44, 46).

### Kjemisk modell versus biofilm-mediert modell

En studie fra 2013 undersøkt den strukturelle og molekylære oppbygningen av rotkaries fra ekstraherte tenner med tenner som *in vitro* har fått kunstige karies-lignende lesjoner med enten en biofilm-mediert modell eller en kjemisk modell. Studien viste at lesjonene hadde lignende mengder med fosfat og karbon i de demineraliserte områdene, men i *in vitro* forsøkene som bruker kjemisk modell så de en lavere mengde med kollagen type I fibre. Dette kan ha betydning for graden av remineralisering som kan oppnås. Forskerne i denne studien diskuterer også enda en styrke med en biofilm-mediert demineralisering, nemlig at man vil

oppnå et ytre infisert lag i dentinet og et indre affisert lag. Dette er en av grunnene til at en biofilm-mediert modell, selv om den er *in vitro*, trolig vil være mer lik naturlig karies (47).

Å lage kunstig karies *in vitro* med en biofilm-mediert modell er en langt mer omfattende prosess sammenlignet med en kjemisk modell slik vi har gjort i vårt forsøk. En biofilm-mediert modell ønsker å simulere de kliniske forholdene i munnhulen på best mulig måte *in vitro*. Utfordringer med metoden er blant annet den komplekse mikrobielle sammensetningen i munnhulen samt bakterienes kompliserte metabolske aktivitet som det vil være vanskelig å gjenskape. En biofilm-mediert modell gjøres ved å danne en kariogen biofilm som man periodevis tilsettes sukrose, eller andre karbohydrater, for å skape en pH-svingning. Sammenlignet med en kjemisk modell er denne metoden en mer kostbar og tidkrevende prosess (31).

Den mest brukte *in vitro* metoden for kariesforskning er en kjemisk modell. Fordelene med en kjemisk modell sammenlignet med en biofilm-mediert modell er blant annet lavere kostnad, tidsbesparing og reproduserbarhet. Lesjonene dannet med en kjemisk modell vil på den andre siden ikke være biologiske (12).

Som sagt, verken den ene eller andre metoden vil fullt ut simulere kariesdannelse i munnhulen. Dette kan ikke oppnås *in vitro*. For å på best mulig måte kunne forske på remineralisering av karieslesjoner vil vi tro at en biofilm-mediert modell er å foretrekke.

## 6.2. Diskusjon av resultater

Hensikten med forsøket vårt var å undersøke om vi kunne lage demineraliserte lesjoner på rotoverflaten ved hjelp av kjemiske løsninger, som vi visuelt kunne evaluere ved hjelp av mikro-CT.

Resultatene av demineraliseringen varierte i de ulike gruppene. Sammenlikner vi gruppe 3 og 4 (syreløsning 1) og gruppe 5 og 6 (syreløsning 2) ses en tydelig forskjell i grad av demineralisering hvor syreløsning 1, med pH 2,4, har gitt størst effekt i begge tidsintervallene. Syreløsning 2 viser ingen tydelig forandring i overflatekontur. Utfra de to syreløsningene tyder det på at det er pH som er den avgjørende faktor for at demineralisering skal forekomme. Men ser man nærmere på resultatet fra gruppe 1 som har vært utsatt for Coca Cola®, samsvarer det ikke med denne teorien. Coca Cola® som vi benyttet oss av under

forsøket hadde en målt pH på 2,4. Denne pH-en er tilsvarende som i syreløsning 1, men omfanget av demineraliseringen for de to gruppene er ikke i nærheten av å samsvare. Da tidsintervallene og temperaturen er like i disse to gruppene, tyder det på at også andre faktorer enn pH har betydning for demineraliseringseffekten på rotoverflaten. Studier viser at bufferkapasitet og mineralinnhold er andre faktorer som kan påvirke en syres erosjonspotensiale (48, 49). Dette kan være mulige årsaker til at vi ser ulike resultater mellom Coca Cola® og syreløsning 1, da pH-verdiene er tilnærmet like og resultatene allikevel er ulike. Ytterligere diskusjon av disse eventuelle faktorer er begrenset av vår oppgaves størrelse.

Fosforsyre med pH under 1 viser endring i overflatekontur, men i mindre grad enn hva vi forventet med tanke på at pH er svært lav. Da tennene var eksponert ferdig for fosforsyre og ble tatt ut av inkubatoren, ble det bemerket at fosforsyren hadde endret tekstur og konsistens. Materialet virket til å være uttørket. Det er mulig at denne endringen kan ha påvirket dens evne til å demineralisere overflaten. Vi finner ikke forskning som diskuterer fosforsyrens endrede effekt ved uttørking.

Det er vanskelig å bedømme om tidsintervallene på 96 og 144 timer har hatt betydning for grad av demineralisering i gruppe 1-8. Vi kan kun skille resultatene visuelt fra hverandre, noe som begrenser mulighetene vi har til å evaluere forskjeller i resultatene. Når demineraliseringene i tillegg er foretatt på ulike rotoverflater, er det umulig å vurdere demineraliseringsgrad uten faktiske verdier av mineraltap. Av de samme grunnene kan vi heller ikke vurdere om de to tidsintervallene i gruppe 7 og 8 har gitt ulikt resultat.

Metoden bak denne oppgaven har bygget på en artikkel skrevet av E. B. Kucuk et al. om *Microcomputed tomography evaluation of whitespot lesion remineralization with various procedures* (9). Under metode beskriver de fremgangsmåte for å skape demineralisering på tannoverflaten ved hjelp av en laboratorieprodusert syreløsning. Denne syreløsningen hadde en pH på 4,4 og ble benyttet i et tidsintervall på 96 timer. De viser til gode demineraliseringsresultater, men vi har ikke klart å gjenskape den samme suksessen ved hjelp av vår løsning med tilnærmet lik pH og tidsintervall (gruppe 5 og 6). Til forskjell fra oss gjøres demineraliseringene i denne studien på emaljeoverflaten, men man skulle i utgangspunktet tro at rotoverflaten også ville hatt effekt, om ikke større effekt, av syreløsningen, da sementen og dentinet har et lavere mineralinnhold enn emaljen (50).



## 7. Konklusjon

Målet for studien vår var å lage en kjemisk modell for demineralisering av rotoverflaten som kunne benyttes ved fremtidige remineraliseringsstudier. Vi testet fire ulike syreløsninger på rotoverflaten på ekstraherte tenner og så at vi fikk varierende resultater. I gruppe 3 og 4 (Fig. 2) med syreløsning pH 2,4 fikk vi både en endring i overflatekontur og en demineraliseringssone under rotoverflaten.

På grunn av en manglende evne til å eksakt gjenskape de forhold man har i munnhulen i et laboratorium, har forskere over hele verden forsøkt å lage modeller som likevel kan brukes til kariesforskning. Sammenlikner man den kjemiske modellen og den biofilm-medierte modellen som benyttes i denne typen *in vitro* studier, er det tydelig at en biofilm-mediert demineralisering i større grad kan simulere en naturlig forekommende karieslesjon fra den faktiske munnhule. Når man skal forske videre på dette området vil det lønne seg å komme til enighet om hvilken metode man skal bruke for å kunne sammenligne ulike studier og deres resultat. Vår mening er derfor at det vil være mer hensiktsmessig å jobbe videre med en biofilm-mediert modell. Dersom man ønsker å jobbe med dette i fremtiden må man prøve å finne en metode som minsker svakheter som kostbarhet, reproduserbarhet og den store mengden tid som kreves.

Dette er en kvalitativ studie som inkluderer et begrenset antall prøver, hvilket gir et noe mangelfullt resultat. Vi ser et behov for ytterligere kvantitative analyser for å kunne gi en mer utfyllende beskrivelse av resultatene. Flere studier er også av behov for å kunne finne den mest effektive og korrekte metoden for å lage demineraliseringer på rotoverflater.

## 8. Referanser

1. World Health Organization. World report on ageing and health. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2015. XII, 246 pagina's p.
2. Bartlett D. A new look at erosive tooth wear in elderly people. *J Am Dent Assoc.* 2007;138 Suppl:21S-5S.
3. Pentapati KC, Siddiq H, Yeturu SK. Global and regional estimates of the prevalence of root caries - Systematic review and meta-analysis. *Saudi Dent J.* 2019;31(1):3-15.
4. Smith BG, Robb ND. The prevalence of toothwear in 1007 dental patients. *J Oral Rehabil.* 1996;23(4):232-9.
5. Gavriilidou NN, Belibasakis GN. Root caries: the intersection between periodontal disease and dental caries in the course of ageing. *British Dental Journal.* 2019;227(12):1063-7.
6. Dong YM, Pearce EI, Yue L, Larsen MJ, Gao XJ, Wang JD. Plaque pH and associated parameters in relation to caries. *Caries Res.* 1999;33(6):428-36.
7. Sebastian G, Ciansio DDS. Medications' impact on oral health. *The Journal of the American Dental Association.* 2004;135(10):9.
8. Fjæra BW, T. Eide, H. Tannhelse hos eldre pasienter i hjemmesykepleien. *Sykepleien Forskning.* 2010;2.
9. Kucuk EB, Malkoc S, Demir A. Microcomputed tomography evaluation of white spot lesion remineralization with various procedures. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2016;150(3):483-90.
10. Fejerskov O, Nyvas, B., Kidd, E. *Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management.* 3rd ed. Oxford: Wiley Blackwell; 2015. p. 7-9.
11. Kutsch VK. Dental caries: an updated medical model of risk assessment. *J Prosthet Dent.* 2014;111(4):280-5.
12. Yu OY, Zhao IS, Mei ML, Lo EC, Chu CH. A Review of the Common Models Used in Mechanistic Studies on Demineralization-Remineralization for Cariology Research. *Dent J (Basel).* 2017;5(2).
13. Li J, Parada C, Chai Y. Cellular and molecular mechanisms of tooth root development. *Development.* 2017;144(3):374-84.
14. Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000.* 1997;13:41-75.
15. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed).* 2011;3:711-35.
16. Nanci A. Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 8th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Moseby; 2013. p. 205-18.
17. Yamamoto T, Hasegawa T, Yamamoto T, Hongo H, Amizuka N. Histology of human cementum: Its structure, function, and development. *Jpn Dent Sci Rev.* 2016;52(3):63-74.
18. Gupta P, Kaur H, Shankari GSM, Jawanda MK, Sahi N. Human age estimation from tooth cementum and dentin. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(4):ZC07-10.
19. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000.* 2006;40:11-28.
20. McIntyre JM, Featherstone JD, Fu J. Studies of dental root surface caries. 2: The role of cementum in root surface caries. *Aust Dent J.* 2000;45(2):97-102.
21. Burgess JO, Gallo JR. Treating root-surface caries. *Dent Clin North Am.* 2002;46(2):385-404, vii-viii.
22. Fejerskov O, Nyvas, B., Kidd, E. *Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management.* 3rd ed: Wiley Blackwell; 2015. p. 156-60.

23. Dame-Teixeira N, Parolo CCF, Maltz M. Specificities of Caries on Root Surface. *Monogr Oral Sci.* 2017;26:15-25.
24. Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res.* 2019;1-8.
25. Fejerskov O, Nyvas, B., Kidd, E. *Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management.* 3rd ed. Oxford: Wiley Blackwell; 2015. p. 155-69.
26. Fejerskov O, Nyvas, B., Kidd, E. *Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management.* Oxford: Wiley Blackwell; 2015. p. 77-80.
27. Johansson AK, Omar R, Carlsson GE, Johansson A. Dental erosion and its growing importance in clinical practice: from past to present. *Int J Dent.* 2012;2012:632907.
28. Buzalaf MA, Charone S, Tjaderhane L. Role of host-derived proteinases in dentine caries and erosion. *Caries Res.* 2015;49 Suppl 1:30-7.
29. Tjaderhane L, Buzalaf MA, Carrilho M, Chaussain C. Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of 'dentin degradomics'. *Caries Res.* 2015;49(3):193-208.
30. Femiano F, Femiano R, Femiano L, Jamilian A, Rullo R, Perillo L. Dentin caries progression and the role of metalloproteinases: an update. *Eur J Paediatr Dent.* 2016;17(3):243-7.
31. Maske TT, van de Sande FH, Arthur RA, Huysmans M, Cenci MS. In vitro biofilm models to study dental caries: a systematic review. *Biofouling.* 2017;33(8):661-75.
32. Featherstone JD. Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J.* 2008;53(3):286-91.
33. Pires PM, Santos TPD, Fonseca-Goncalves A, Pithon MM, Lopes RT, Neves AA. A dual energy micro-CT methodology for visualization and quantification of biofilm formation and dentin demineralization. *Arch Oral Biol.* 2018;85:10-5.
34. Zamperini CA, Bedran-Russo AK. Remineralization Potential of Mints Containing Bioactive Agents in Artificially Induced Root Caries. *Caries Res.* 2018;52(4):331-8.
35. Epasinghe DJ, Yiu C, Burrow MF. Effect of flavonoids on remineralization of artificial root caries. *Aust Dent J.* 2016;61(2):196-202.
36. Bachli K, Schmidlin PR, Wegehaupt F, Paque F, Ramenzoni L, Botter S. Remineralization of Artificial Dentin Caries Using Dentin and Enamel Matrix Proteins. *Materials (Basel).* 2019;12(13).
37. Arnold WH, Heidt BA, Kuntz S, Naumova EA. Effects of fluoridated milk on root dentin remineralization. *PLoS One.* 2014;9(8):e104327.
38. Dietz W, Kraft U, Hoyer I, Klingberg G. Influence of cementum on the demineralization and remineralization processes of root surface caries in vitro. *Acta Odontol Scand.* 2002;60(4):241-7.
39. Mohd Said SN, Ekambaram M, Yiu CK. Effect of different fluoride varnishes on remineralization of artificial enamel carious lesions. *Int J Paediatr Dent.* 2017;27(3):163-73.
40. Understanding qualitative research in health care. *Drug Ther Bull.* 2017;55(2):21-4.
41. Sung YH, Son HH, Yi K, Chang J. Elemental analysis of caries-affected root dentin and artificially demineralized dentin. *Restor Dent Endod.* 2016;41(4):255-61.
42. Humel MMC, Oliveira MT, Cavalli V, Giannini M. Effect of storage and disinfection methods of extracted bovine teeth on bond strength to dentin. *Braz J Oral Sci.* 2007;6(22):1402-6.
43. Aghili HA, Hoseini SM, Yassaei S, Fatahi Meybodi SA, Zaeim MH, Moghadam MG. Effects of carbonated soft drink consumption on orthodontic tooth movements in rats. *J Dent (Tehran).* 2014;11(2):123-30.

44. Boerckel JD, Mason DE, McDermott AM, Alsberg E. Microcomputed tomography: approaches and applications in bioengineering. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5(6):144.
45. Pereira-Oliveira S, Chaiben LC, Ando M, Freitas CF. Micro CT settings for caries detection: how to optimize. *Int Journal of Engineering Research and Applications.* 2015;5(11):78-82.
46. Boca C, Truyen B, Henin L, Schulte AG, Stachniss V, De Clerck N, et al. Comparison of micro-CT imaging and histology for approximal caries detection. *Sci Rep.* 2017;7(1):6680.
47. Pacheco LF, Banzi E, Rodrigues E, Soares LE, Pascon FM, Correr-Sobrinho L, et al. Molecular and structural evaluation of dentin caries-like lesions produced by different artificial models. *Braz Dent J.* 2013;24(6):610-8.
48. Larsen MJ, Nyvad B. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res.* 1999;33(1):81-7.
49. de Carvalho Sales-Peres SH, Magalhaes AC, de Andrade Moreira Machado MA, Buzalaf MA. Evaluation of the erosive potential of soft drinks. *Eur J Dent.* 2007;1(1):10-3.
50. Ehlen LA, Marshall TA, Qian F, Wefel JS, Warren JJ. Acidic beverages increase the risk of in vitro tooth erosion. *Nutr Res.* 2008;28(5):299-303.

# Vedlegg 1



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

Prosjekter som faller utenfor helseforskningslovens virkeområde kan gjennomføres uten godkjenning fra REK. Det er institusjonens ansvar å sørge for at prosjektet gjennomføres på en forsvarlig måte med hensyn til for eksempel regler om håndtering og bruk av biologisk materiale, taushetsplikt og personvern.

Dersom prosjektet hadde falt innenfor de prosjekter som skal vurderes av REK ville det vært et krav om at bruken var basert på informert samtykke fra pasientene som avga tennene. Alternativt ville det måtte søkes om dispensasjon fra samtykke. Ett av vilkårene som da må være oppfylt er at de som har avgitt det biologiske materialet skal ha fått anledning til å reservere seg mot at det benyttes til forskning, jf. helseforskningsloven § 28. Dersom pasientene som de aktuelle tennene stammer fra ikke har fått mulighet til dette vil det ikke kunne innvilges dispensasjon for bruk av biologisk materiale i forskning.

Vi gjør oppmerksom på at vurderingen er å anse som veiledende jf. forvaltningsloven § 11.

Vi ber om at alle henvendelser sendes inn via vår saksportal: <http://helseforskning.etikkom.no> eller på e-post til: [post@helseforskning.etikkom.no](mailto:post@helseforskning.etikkom.no).

Vennligst oppgi vårt referansenummer i korrespondansen.

Med vennlig hilsen

May Britt Rossvoll  
Sekretariatsleder

Veronica Sørensen  
seniorrådgiver

**Kopi til:** [apat.l.bolstad@uit.no](mailto:apat.l.bolstad@uit.no); [postmottak@uit.no](mailto:postmottak@uit.no)