

23. Mensor MC. Attachment fixation for overdentures. Part I. J Prosthet Dent 1977; 37: 366.

24. Mensor MC. Attachment fixation for overdentures. Part II. J Prosthet Dent 1978; 39: 16.

December 1982.

Sorbonnelaan 16,  
3584 CA Utrecht.

## DE 'KUNSTMOND', EEN MODEL VOOR PLAQUE- EN CARIËSONDERZOEK

W. D. NOORDA  
W. DE KONING  
D. J. PURDELL-LEWIS  
A. C. M. VAN DE POEL

*Uit de vakgroep Parodontologie-Prothetodontie-Sosiodontie van de rijksuniversiteit te Groningen.*

*Trefwoorden: Cariologie – Plaque – Cariës – Kunstmond*

### 1. Inleiding

Tandheelkundig wetenschappelijk onderzoek kan op twee manieren worden uitgevoerd: klinisch (bij patiënten, ook wel in vivo genoemd) of door middel van een laboratoriumopzet (veelal in vitro genaamd). Beide vormen van onderzoek kennen echter specifieke beperkingen. Zo is de experimentele situatie bij laboratoriumproeven vaak moeilijk te vergelijken met die zoals bijvoorbeeld aanwezig in de mond. Resultaten van laboratoriumonderzoek krijgen hierdoor een theoretisch karakter en zijn voor de klinische situatie maar beperkt toepasbaar. Bij het doen van klinisch onderzoek wordt de onderzoeker echter geconfronteerd met een zo groot aantal factoren, dat reproduceerbaar experimenteren moeilijk tot onmogelijk wordt. Om reproduceerbaar te kunnen experimenteren moet men de gehele situatie in de hand hebben en alle factoren kunnen controleren. Teneinde dit laatste mogelijk te maken, neemt een onderzoeker graag zijn toevlucht tot een model. Een model is hier dan een materiële voorstelling van de werkelijkheid. Het bestuderen van een model is eenvoudiger dan het bestuderen van de werkelijkheid, omdat het model de werkelijke situatie vereenvoudigt. De bedoeling van het modelgebruik is dat de onderzoeksresultaten, voortvloeiend

uit het model, ons iets leren over de werkelijkheid of althans delen daarvan. De mate van vergelijkbaarheid van het model met de werkelijkheid vindt zijn uitdrukking in het aantal aspecten dat in het model hetzelfde is als in de werkelijke situatie. De vraag of het model voldoet, is sterk afhankelijk van de eisen die de experimentator stelt: hoeveel aspecten van de werkelijkheid kunnen door het model 'juist' worden voorgesteld? En hoe juist is 'juist'?

Hier is een afweging nodig: hoe beter de overeenstemming op een aantal aspecten, des te gecompliceerder wordt het model.

Verscheidende onderzoekers hebben geprobeerd een model te ontwikkelen waarmee het mogelijk zou zijn in het laboratorium de omstandigheden uit de mond na te bootsen, waardoor het verschil tussen laboratoriumonderzoek en klinisch onderzoek zou kunnen worden overbrugd. Eén van de ontwikkelingen in die richting was het onderzoeksmodel dat door Pigman et al. de kunstmond werd genoemd.<sup>1</sup>

### 2. De 'kunstmond'

Onder een 'kunstmond' wordt een laboratoriumopstelling verstaan, waarin micro-organismen op glazuur geënt, in stand kunnen worden gehouden. De samenstelling en toevoer van voed-

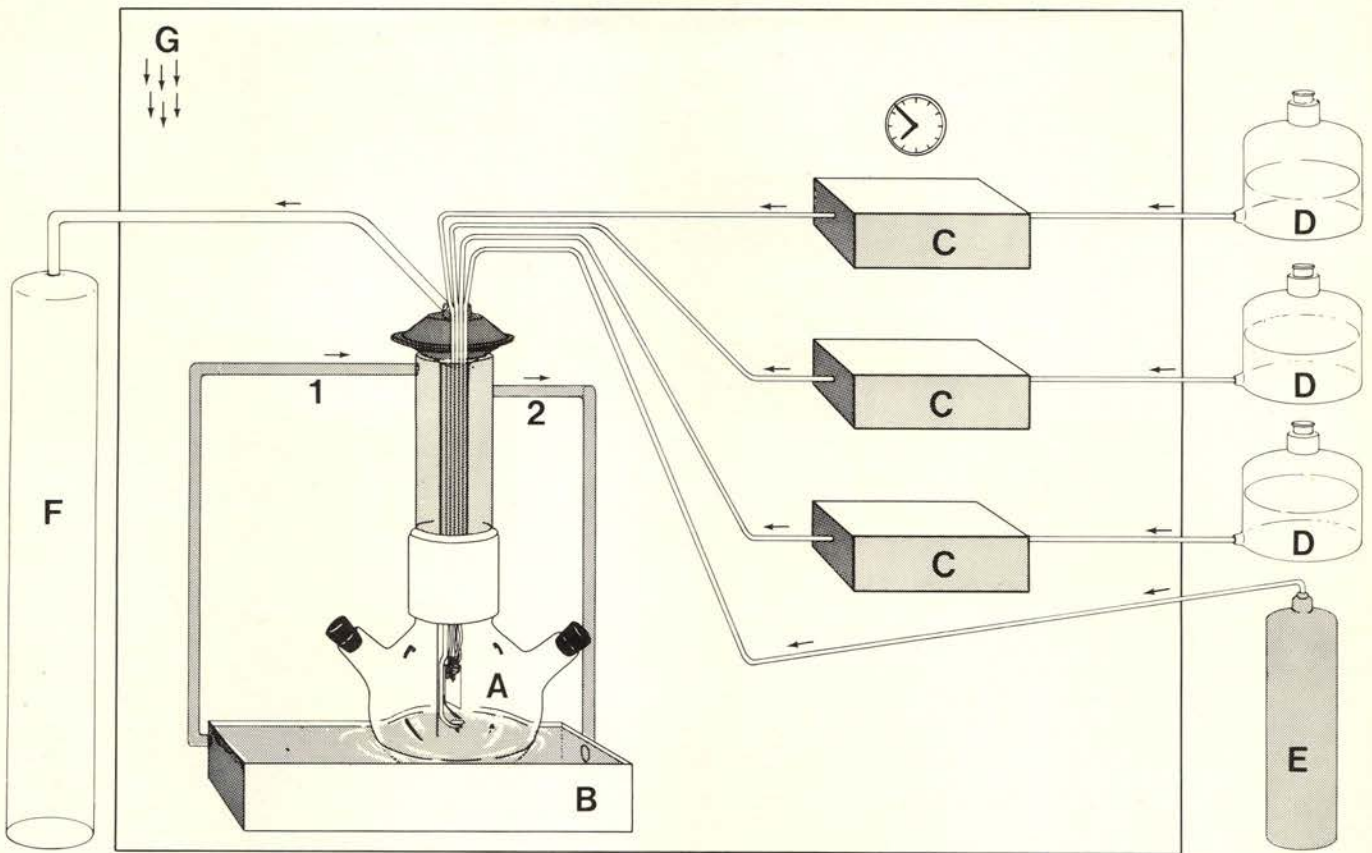
### Samenvatting:

Om het hiaat tussen laboratorium- en klinisch onderzoek te verkleinen kan een model worden ontwikkeld waarmee het mogelijk is om in het laboratorium de omstandigheden uit de mond na te bootsen. In dit kader wordt de gemodificeerde en deels nieuw ontwikkelde 'kunstmond' beschreven.

De opzet vormt een van de omgeving afgesloten systeem waarin gekozen factoren, die deel uitmaken van de omstandigheden in de mond, kunnen worden nagebootst. De opstelling wordt door de volgende punten gekenmerkt: 1. de opstelling is in zijn geheel steriliseerbaar en staat opgesteld in een 'laminar flow'-kast; 2. vloeistof en gastoevoer zijn regelbaar en gebeuren door middel van een gecombineerde inlaat; 3. het systeem kan zonder inmenging van buitenaf een experiment lang (= 28 dagen) functioneren. De aangesloten voorraden zijn voldoende voor de duur van het gehele experiment; 4. de experimenten worden verricht op humaan tandglazuur dat onder een hoek van 25° is ingebed; 5. de zuurgraad in de kunstmatige plaque en de reinheid van het systeem zijn op elk moment te controleren.

Voorts wordt de afweging gemaakt of door het model aspecten van de werkelijkheid 'juist' kunnen worden voorspeld en of het model op grond daarvan als onderzoeksopzet voldoende werkelijkheidswaarde bezit.

sel, speeksel en gas zijn beheersbaar en de temperatuur wordt zoveel mogelijk constant gehouden. Op deze manier wordt een micromilieu gecreëerd waarin kunstmatige plaquevorming en zuurproductie kunnen plaatsvinden. Een functionerende 'kunstmond' vormt een gesloten circuit, waarin alleen de voor het experiment gekozen micro-organismen aanwezig zijn. Met als doel een goed werkende 'kunstmond' te ontwikkelen hebben meerdere onderzoekers het uitgangsidee van Pigman et al. op eigen wijze uitge-



Afb. 1. Schematische weergave van de opstelling.

A = kolf; B = waterbad, vormt samen met de op de kolf geplaatste waterkolom een circuit waarin water van  $\pm 37^\circ\text{C}$  circuleert; C = klokgeschakelde pompunit; D = voorraadreservoirs voor medium, kunstspekkel en sucrose; E = gastoevoer vanuit cilinder; F = afvoervat met waterzuil; G = 'laminar flow'-kast (= een van de omgeving afgeschermd werkruimte, waarin gefilterde lucht naar beneden wordt geblazen). Voor details zie afbeelding 2 en 3.

werkt.<sup>1-5</sup> Ondanks verschillen met betrekking tot de mate en manier van beheersing van de proefomstandigheden benadrukken allen het belang van een model, waarmee proeven op identieke wijze kunnen worden herhaald (reproduceerbaarheid). Bij de uitwerking van hun plan stuiten ze evenwel vaak op moeilijkheden. Zo zagen Pigman et al. bij hun experimenten een moeilijk te controleren pH-verloop.<sup>1</sup> Dit werd onder meer toegeschreven aan de ongedefinieerde samenstelling van de plaquemodellen waarmee zij het glazuur beëntten.

Wagg et al. modificeerden het idee van Pigman et al. met als belangrijkste doel het hanteerbaar maken van de opstelling.<sup>6</sup> Hun resultaten bleven beperkt tot het vaststellen van de overlevingskansen van verschillende soorten micro-organismen in hun opzet. Rowles et al. ontwikkelden de mogelijkheid van intermitterende toevoer van voedsel en speeksel.<sup>7</sup> Een jaar later rapporteerde dezelfde groep over de resulta-

ten met de beschreven opzet: 'Ondanks technische problemen zijn in vele experimenten kunstmatige laesies lijkend op natuurlijke cariës ontwikkeld.'<sup>2</sup>

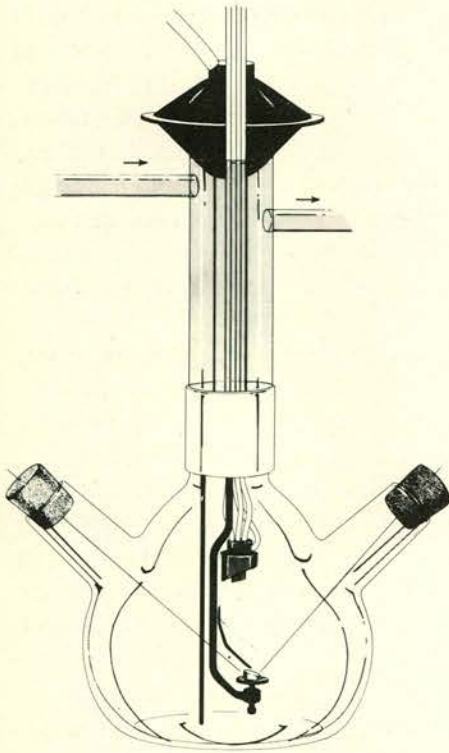
Wilson droeg aan de verdere ontwikkeling van de 'kunstmond' bij door peristaltische pompen te gaan gebruiken voor voedsel- en speekseltoevoer, het glazuur met zuivere stammen micro-organismen te beëntten en een constante gasstroom van bekende samenstelling door het systeem te leiden.<sup>8</sup> Diddin et al. formuleerden de volgende eisen voor de opzet van een 'kunstmond': a. de opstelling moet compact en eenvoudig steriliseerbaar zijn, b. de opstelling moet gedurende een langere proefperiode (één tot twee maanden) steriel kunnen worden gehouden, c. bevoorrading moet onder behoud van steriliteit plaatsvinden, d. voedsel- en speekseltoevoer moeten gecontroleerd plaatsvinden en e. de proefmodellen moeten gedurende het experiment goed bereikbaar zijn en

blijven.<sup>3</sup> In hun artikel benadrukten ze nogmaals het belang van standaardisatie van experimentele omstandigheden en toonden aan, dat het model van de 'kunstmond' daartoe geschikt kon worden gemaakt. Enkele auteurs onderschreven deze conclusie.<sup>4,5,9,10</sup> Uitgaande van de bevindingen van al de genoemde onderzoekers, hebben wij een aantal aanpassingen van het model uitgewerkt.

Bij de ontwikkeling is gestreefd naar een opstelling die eenvoudig van constructie is, die met minimale handelingen van buitenaf kan functioneren en waarmee reproduceerbare experimenten kunnen worden uitgevoerd.

### 2.1. De opstelling

De ontwikkelde opzet is schematisch weergegeven in afbeelding 1. De kern van de opstelling is een glazen kolf (A in afb. 1) (gemodificeerd naar Quickfit, 100 ml) met drie afsluitbare openingen. Rondom de middelste ope-



Afb. 2. De kolf uit afbeelding 1 met rondom de middelste opening zowel het inlaatsysteem als een waterkolom voor temperatuurregulatie van de inlaatslangen. De zijuitgangen van de kolf worden gebruikt voor het inbrengen van monsters en van de micro-elektroden voor de pH-meting. Voor details zie afbeelding 3.

ning is een dubbel slijpstuk aangebracht. Hierop worden zowel het inlaatsysteem als een waterkolom voor temperatuurregulatie aangesloten (zie afb. 2). De gecombineerde inlaat (afb. 3) bestaat uit: 1. een voedseltoevoer, 2. een kunstspeekseltoevoer, 3. een toevoer voor extra toevoegingen en 4. een gastoevoer. Door opening O gaat een constante naar beneden gerichte gasstroom. De uit de inlaat D afkomstige druppels worden opgevangen door druppelgeleider E. De vloeistof wordt hierlangs tot boven het monsteroppervlak geleid. De monsterhouder M is zodanig geconstrueerd dat het monster slechts in één positie in de houder kan worden geplaatst. De hoogte van de monsterhouder is instelbaar ten opzichte van de druppelaar via schroef S. Buis N is de afvoer uit de kolf. De zijuitgangen van de kolf worden gebruikt voor pH-meting met micro-elektrodes.

De toevoer van voedsel voor de micro-organismen, het kunstspeeksel en de

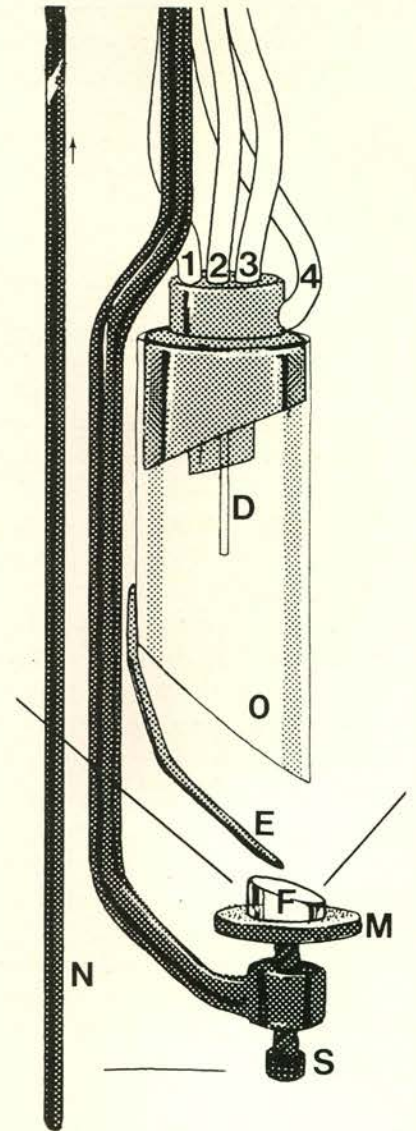
extra toevoegingen wordt geregeld door middel van tijdgeschakelde (schakelklokken TUN 23, Transtec) peristaltische pompen (Desaga, STA 131900). Als voedsel voor de micro-organismen wordt Todd-Hewitt broth (Oxoid, Birmingham, Eng.) gebruikt. Het kunstspeeksel heeft de volgende samenstelling: 1.3 g/l KCl; 0.85 g/l NaCl; 0.05 g/l MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O; 0.1 g/l CaCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O; 0.35 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.<sup>11</sup> De pH van de beschreven oplossing is 7. Als extra toevoeging werd een 0.1 M sucrose-oplossing gebruikt. De gastoevoer is regelbaar via een instelbare flowmeter (Hoekloos en Co. combinatiemodel, 8 AF).

Het gas heeft de volgende samenstelling: 95% N<sub>2</sub> en 5% CO<sub>2</sub> (C. van Loveren). De aangesloten hoeveelheden zijn voldoende voor de duur van het gehele experiment.

De afvoer vindt plaats onder invloed van de overdruk in de kolf door buis N. De vloeistof wordt opgevangen in een afvoervat waarvan de capaciteit voldoende is voor de duur van het gehele experiment. Om de gasoverdruk in het systeem te waarborgen wordt, na het passeren van het afvalvat, de gasafvoer door een waterzuil geleid. De hoogte van de waterzuil bepaalt de mate van overdruk.

De temperatuur in de kolf wordt op 37±0,5° C gehouden, daartoe staat de onderzijde van de kolf in direct contact met een waterbad, gevuld met een waterige oplossing van chloorhexidine (0.2%) waarvan de temperatuur via een inhangthermostaatpomp (Lauda, MGU) op 38±0,5°C wordt gehouden. Chloorhexidine is toegevoegd om bacteriële groei in het waterbad zoveel mogelijk tegen te gaan. Daarnaast wordt rondom de middelste opening van de kolf een waterkolom aangesloten. Met behulp van de inhangthermostaatpomp kan hierin verwarmd water in circulatie worden gebracht. De toevoerslangen met hun respectieve inhoud worden hierdoor voorverwarmd.

De verbindingen tussen de kolf en de pompen en tussen de pompen en de voorraadvaten worden tot stand gebracht met behulp van siliconenslang en op sterk belaste delen, zoals de



Afb. 3. De gecombineerde inlaat van de kolf uit afbeelding 2 bestaat uit: 1 = mediumtoevoer; 2 = speekseltoevoer; 3 = toevoer voor sucrose; 4 = gastoevoer.

Door opening O gaat een constante naar beneden gerichte gasstroom. D = druppelaar, hieruit vallen de druppels vloeistof op de druppelgeleider E, waarlangs de druppels tot boven het monsteroppervlak worden geleid. Het glazuurmonster (F) is onder een hoek van 25° ingebed, op deze manier ontstaat een hellend vlak waarlangs de druppels naar beneden kunnen vloeien en hopen zij zich niet op het oppervlak op. De hoogte van de monsterhouder ten opzichte van de druppelopvanger (E) is instelbaar door middel van schroef S. Buis N is de afvoer uit de kolf.

doorvoeringen door de peristaltische pompen, met tygonslang (Desaga, Heidelberg). De gekozen slang is autoclaveerbaar. De verbindingen tussen de verschillende delen slang worden gevormd met glazen koppelstukken (Elgebe, Leek).

Alle aansluitingen van slang op glas

worden met een draadwikkeling geze-kerd. De openingen van de kolf en de verschillende voorraadvaten worden met siliconenstoppen afgesloten. Deze zijn eveneens autoclaveerbaar.

## 2.2. Steriliteit

Voor het begin van een experiment wordt de gehele opstelling met uitzondering van het waterbad, de schakelklokken, de pompen en het glazuurmonster gesteriliseerd in een autoclaaf (Mindeno, Rotterdam). De voorraadflessen met hun respectieve inhoud worden ook geautoclaveerd. De oppervlakkige delen van de niet-gesteriliseerde apparatuur worden met een desinfecterende vloeistof afgenomen. Na het autoclavieren wordt de opstelling in een 'laminar flow'-kast (Clean Air, F33MVH) opgebouwd.

De verbindingen van de opzet met de voorraadflessen en de gascylinder worden door middel van glazen koppelstukken, boven een glasvlam, tot stand gebracht. In de gastoevoerleiding zijn twee steriliseerbare bacteriefilters opgenomen, om besmetting langs deze weg te voorkomen. Nadat de opstelling is opgebouwd, wordt het glazuurmonster in de kolf gebracht en in de monsterhouder geplaatst. Het monster wordt met behulp van ethyleenoxyde gesteriliseerd. Om ongewenste uitdroging van het monster tegen te gaan, wordt geen (na ethyleenoxyde-sterilisatie gebruikelijke) aëra-tieperiode in acht genomen. Wanneer

aan de opstelling in de 'laminar flow'-kast wordt gewerkt, worden steriele handschoenen gedragen.

## 2.3. Het in gebruik stellen

Nadat het beënte monster in de kolf is gebracht, wordt de toevoercyclus ingesteld. Over het algemeen zal een cyclus worden gekozen die zoveel mogelijk overeenkomt met het dagritme, bijvoorbeeld per 24 uur vijf maal medium-toevoer en drie maal sucrose telkens gedurende 30 minuten.

Kunstspeeksel en gastoevoer blijven tijdens het gehele experiment constant. Wanneer in de experimentele periode niet aan of bij de opstelling gemanipuleerd hoeft te worden dan is de 'laminar flow'-kast buiten werking. Er circuleert geen lucht langs de opstelling, hierdoor wordt afkoeling ten gevolge van de langstromende lucht zoveel mogelijk voorkomen. Eén keer per zeven dagen wordt de inhoud van de kolf op reinheid gecontroleerd. Van de kunstmatig verkregen plaque wordt dan één monster genomen en uitgeplaat op een bloedagarplaat. Enkele dagen na het begin van een experiment wordt de pH-elektrode geïnstalleerd en wordt er begonnen met de registratie van het pH-verloop.

## 3. Het glazuurmonster

De gebitselementen waarvan de glazuurmonsters worden vervaardigd,

worden voor gebruik met puimsteen in een rubbercup oppervlakkig gereinigd en in leidingwater bij 4 °C bewaard. Met behulp van een holle diamantboor worden vervolgens monsters met een diameter van 5 mm uit het glazuur genomen. Deze worden daarna met snelhardende kunsthars onder een hoek van 25° ten opzichte van een horizontaal vlak ingebed.

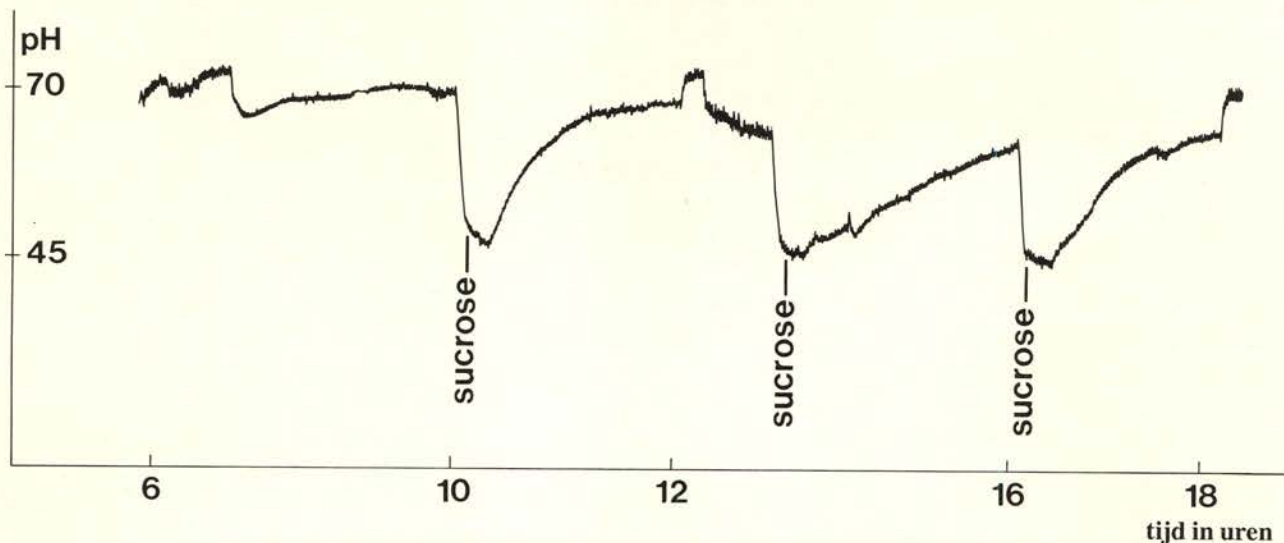
Op deze manier ontstaat een scheef vlak waarlangs de druppels naar beneden kunnen vloeien en hoopt de vloeistof zich niet op het oppervlak op.

De glazuurmonsters worden met ethyleenoxyde gesteriliseerd. Voordat ze in de kolf worden geplaatst worden ze gedurende 24 uur in contact gebracht met een goed groeiende bacteriecultuur.

## 4. De bruikbaarheid van de opstelling

Nadat de opstelling technisch was uitgetest en in orde bevonden, zijn een negental experimenten uitgevoerd om na te gaan of de opstelling als model aan de gestelde eisen voldeed.

De uitgevoerde experimenten hadden alle een gemiddelde duur van 28 dagen. Twee van de negen proeven moesten vroegtijdig worden afgebroken als gevolg van een defecte verbinding van twee slangen. Bij de experimenten werden de glazuurmonsters op de beschreven wijze beënt met *Streptococcus mutans* C67-1, verkregen van de vakgroep Preventieve Tandheelkunde van de rijksuniversiteit te Utrecht.



Afb. 4. Het pH-verloop in de kunstmatige plaque op het glazuurmonster, gedurende een toedieningscyclus in de kunstmond van afbeelding 1.

Voor ieder experiment werd uit de buffervoorraad een nieuwe cultuur opgekweekt. Deze monsters werden onder steriele condities in de kolven overgebracht en de toevoercyclus van medium (Todd-Hewitt broth), kunstspekkel<sup>11</sup> en sucrose (0.1 M-oplossing) ingesteld.

Twee dagen na het plaatsen van de glazuurmonsters in de kolven werden de pH-elektroden aangebracht en werd het pH-verloop gedurende een deel van de proefperiode geregistreerd. Eénmaal per zeven dagen werd de inhoud van de afvalkolf op reinheid gecontroleerd door een monster uit de kolf of uit het afvalvloeistofvat uit te platen op bloed-agarplaten.

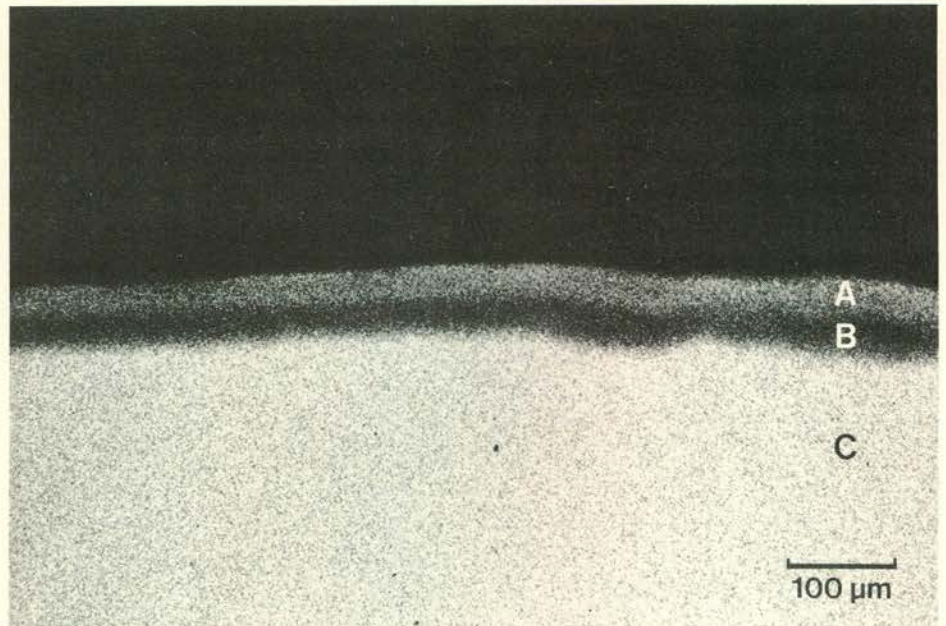
Bij een deel van de experimenten is eveneens het effect nagegaan van de optredende plaquevorming op huuman- en runderglazuur. Hiervoor werd de microradiografie als analyse-techniek gebruikt.

Als resultaten van de proeven kan worden vermeld, dat:

- er sprake was van zeer duidelijk macroscopisch waarneembare plaquevorming;
- er in de gevormde plaque variaties in de pH werden geregistreerd die waren gerelateerd aan de tijdstippen waarop fermenteerbare koolhydraten (sucrose) in het systeem werden gebracht (afb. 4);
- er bij de wekelijkse controles alleen *Streptococcus mutans* C67-1 kon worden aangetoond in de 'afval'-vloeistof;
- er zowel in het humane glazuur als in het runderglazuur sprake was van een duidelijke demineralisatie; in het runderglazuur manifesteerde die zich als een oppervlakkige 'softening', in het humane glazuur als een 'subsurface' laesie met oppervlakkige laag (afb. 5 en 6).

### 5. Slotbeschouwing

De afgelopen 30 jaar hebben vele onderzoekers geprobeerd een 'kunstmond' te ontwikkelen. Ze stuitten daarbij vaak op moeilijkheden. Uitgaande van de bevindingen van voormelde onderzoekers is door ons een aantal voorwaarden geformuleerd,



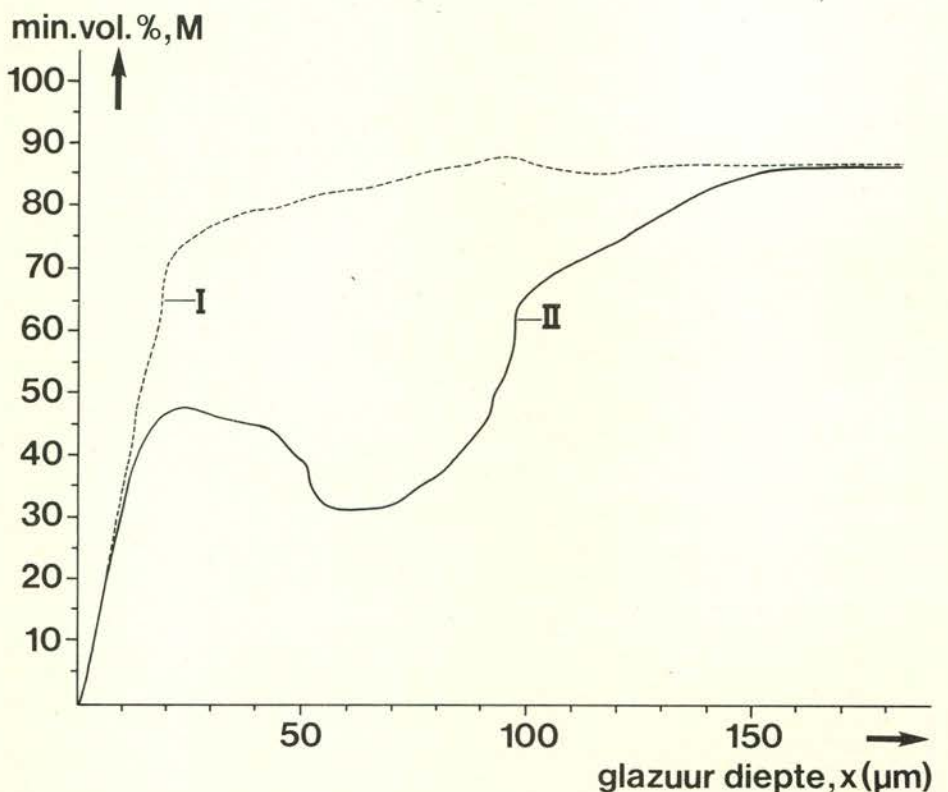
Afb. 5. Een foto gemaakt met behulp van een lichtmicroscop van een microradiografische opname van een na 28 dagen in de kunstmond van afbeelding I verkregen 'subsurface'-laesie. Waargenomen kunnen worden oppervlaktelaag (A), laesiekern (B) en onderliggend gezond huuman tandglazuur (C). (Vergroting 200 ×.)

waaraan een 'kunstmond'-model zou moeten voldoen:

1. Het systeem zou gedurende de gehele experimentele periode van  $\pm$  één maand van de omgeving afgesloten moeten kunnen functioneren.

2. Het systeem zou uit, in technisch opzicht, voldoende bedrijfzekere componenten moeten kunnen worden opgebouwd om de gehele experimentele periode storingsvrij te functioneren.

3. Het systeem zou het gehele experi-



Afb. 6. Curve van het mineraalvolume-percentage van de kunstmatig verkregen laesie in huuman glazuur (II) vergeleken met onbehandeld glazuur van hetzelfde element (I).

ment zonder verwisseling van voorraden moeten kunnen functioneren.

4. De proefomstandigheden zouden gedurende de gehele experimentele periode voldoende controleerbaar moeten zijn om reproduceerbare experimenten mogelijk te maken.

Het door ons ontwikkelde model lijkt aan deze voorwaarden te voldoen. Door te werken met een 'laminar flow'-kast is gekozen voor extra veiligheid bij het omgaan met de opstelling. Immers de gefilterde circulerende lucht wordt met overdruk van boven naar beneden geblazen. Hierdoor kunnen deeltjes die een infectie kunnen veroorzaken de opstelling niet door de lucht bereiken. Het kiezen voor voorraden die voldoende zijn voor de gehele duur van het experiment maakt het verwisselen van voorraden tijdens het experiment overbodig. Zo worden de momenten dat er sprake zou zijn van een doorbreking van het gesloten circuit en eventueel contact met de omgevingslucht (zelfs in de 'laminar flow'-kast) vermeden. De door ons ontwikkelde gecombineerde inlaat met constante gasstroom in de valrichting van de druppel minimaliseert de kans op 'teruggroei' van de bacteriën in de richting van de verbindingsslangen.

Zoals in de inleiding gesteld bestaat de gelijkvormigheid van model en werkelijkheid uit die aspecten die dezelfde zijn als in de werkelijke situatie. In dit geval is de werkelijkheid: de mond. De in onze opstelling overeenkomende aspecten zijn:

- glazuur - als onderzoeksmateriaal;
- aanwezigheid van bacteriën;
- langsstromende vloeistof met calci-

um- en fosfaationen;

- periodieke toediening van 'voedsel';
- beheersbare gasstroom en temperatuur.

Uit de mate van overeenstemming in een aantal aspecten met de werkelijkheid en onderbouwd door de resultaten uit de verrichte experimenten lijkt de conclusie gewettigd dat aldus een systeem beschikbaar is met vele mogelijkheden voor verder experimenteren op de grens van in vivo naar in vitro. Voor elk volgend experiment zal de experimentator evenwel zijn eisen opnieuw moeten stellen en moeten afwegen hoeveel aspecten van de dan modelmatig weer te geven werkelijkheid door het model als 'juist' kunnen worden voorspeld. Hoe dit zal uitvallen bij ons model zal de nabije toekomst leren wanneer de resultaten van de geplande serie experimenten bekend en geïnterpreteerd zijn.

#### Summary:

Title: An artificial mouth: A model for plaque and caries research.

Keywords: Cariology - Plaque - Caries - Artificial mouth

To diminish the gap between laboratory and clinical dental research, one can develop a model to imitate the oral conditions. A modified and partly new designed set-up for an artificial mouth is described. It forms a closed system where specific parameters present in the mouth can be studied. The apparatus is characterized by the following points: 1. the whole set-up can be sterilized and is assembled on a laminar flow bench; 2. the fluid and gas supply are controllable and are introduced through a combined inlet; 3. the set-up is self-sufficient for the duration of

one experiment; 4. the enamel sample is embedded at an angle of 25° to the horizontal; 5. the pH of the artificial plaque and the possible infection of the system are controllable at any moment. The results show that these new ideas combined with current design practice have led to a promising model suitable for further study.

#### Literatuur:

1. Pigman W, Elliott HC, Laffre RO. An artificial mouth for caries research. *J Dent Res* 1952; 31: 627-633.
2. Sidaway DA, Marsland EA, Rowles SL, McGregor AB. The artificial mouth in caries research. *Proc R Soc Med* 1964; 57: 1065-1069.
3. Dibdin GH, Shellis RP, Wilson CM. An apparatus for the continuous culture of microorganisms on solid surfaces with special reference to dental plaque. *J Appl Bact* 1976; 40: 261-268.
4. Yaari A, Bibby BG. Production of plaque and initiation of caries in vitro. *J Dent Res* 1976; 55: 30-36.
5. Klimek J, Hellwig E, Ahrens G. Fluoride uptake by plaque, by underlying enamel and by clean enamel from three fluoride compounds. *Caries Res* 1982; 16: 156-161.
6. Wagg BJ, Mellville TH, Hartles RL. A technique for studying micro-organisms associated with extracted teeth when under continuous irrigation. *Br Dent J* 1957; 103: 121-124.
7. Rowles SL, Sidaway DA, McGregor AB, Marsland EA. An apparatus for the production of dental caries in vitro. *Arch Oral Biol* 1963; 5: 311-318.
8. Wilson RF. Experimental plaque and caries system. *J Dent Res* 1970; 49: 180.
9. Levine RS, Coulter WA. A preliminary report on human enamel demineralization in an artificial mouth. *Arch Oral Biol* 1976; 21: 137-138.
10. Chia T, Huang, Little MF, Johnson R. Influence of carbohydrates on in vitro lesion production. *Caries Res* 1981; 15: 54-59.
11. 's Gravenmade EJ, Panders AK, Vermey A. Clinical applications of saliva substitutes. *Front Oral Physiol* 1981; 3: 154-161.

Juli 1982

Ant. Deusinglaan 1,  
9713 AV Groningen.