

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Morphogenetisch aktives Zahnersatzmaterial zur Förderung der Remineralisation
des Enamels bei Zahndefekten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Sophia Maria Alexandra Caspara Habsburg-Lothringen
aus Bad Soden

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.- Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 23. September 2024

Für meine Familie,

insbesondere meinen verstorbenen Vater, dessen Erkrankung und viel zu früher Tod mich bewogen haben, den Beruf der Ärztin zu wählen, und für meine Mutter, die immer hinter mir steht und an mich glaubt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	3
Tabellenverzeichnis.....	4
1 Einleitung / Ziel der Dissertation.....	1
2 Literaturdiskussion.....	3
2.1 Zahnhartsubstanz.....	3
2.1.1 Aufbau und Funktion von Enamel.....	3
2.1.2 Einflussfaktoren auf das Enamel.....	4
2.1.3 Aufbau des Dentins.....	5
2.2 Karies.....	7
2.2.1 Ätiologie der Karies.....	7
2.2.2 Enamelkaries.....	8
2.2.3 Dentinkaries.....	9
2.3 Nicht kariöse Zahnhartsubstanzdefekte.....	9
2.3.1 Erosion.....	9
2.3.2 Attrition.....	11
2.3.3 Abrasion.....	11
2.3.4 Abfraktion.....	13
2.4 HA als biomimetischer Wirkstoff.....	13
2.5 Calcium-Phosphat.....	15
2.5.1 Biologische Einflüsse.....	15
2.6 Calcium-Polyphosphat.....	15
2.6.1 Biomedizinische Anwendungsmöglichkeiten.....	16
2.7 Sintern.....	17
2.8 Knochenersatzmaterialien.....	17
2.8.1 Bedeutung und Einsatzgebiete.....	18
3 Material und Methoden.....	19
3.1 Material.....	19
3.1.1 Zahnmaterial.....	19
3.1.2 Ofen.....	20
3.1.3 Mikroskope.....	20
3.1.4 Messgeräte.....	22
3.1.5 Chemikalien.....	24
3.1.6 Verwendete Lösungen.....	24
3.2 Methoden.....	25
3.2.1 Vorbereiten der Proben.....	25
3.2.2 Sintern.....	26
3.2.3 Zahnproben.....	26
3.2.4 Inkubation in erhöhter Luftfeuchtigkeit.....	26
3.2.5 Kultivierung und Mineralisierung von Zellen.....	27

3.2.6	Analysemethoden.....	28
4	Ergebnisse.....	31
4.1	Sinterprotokoll.....	31
4.2	Härtemessung.....	37
4.3	Inkubation in erhöhter Luftfeuchtigkeit.....	38
4.4	Mineralisierung der Zellen.....	40
5	Diskussion.....	43
5.1	Kritische Betrachtung der eigenen Untersuchung.....	43
5.2	Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur.....	44
5.3	Ausblick in die Zukunft.....	52
6	Zusammenfassung.....	54
7	Literaturverzeichnis.....	56
8	Danksagung.....	63
9	Tabellarischer Lebenslauf.....	64
10	Erklärung.....	65

Abkürzungsverzeichnis

β -TCP	Beta-Tri-Calcium-Phosphat
Ca	Calcium
ca.	Circa
CaP	Calciumphosphat
Ca-PolyP	Calciumpolyphosphat
CaCl ₂	Calciumchlorid
°C	Grad Celsius
E	Elastizitätsmodul
GPa	Gigapascal
h	Stunden
H	Höhe
HA	Hydroxylapatit
HM	Martens-Härte
KHN	Knoop Härte
kN	Kilo Newton
M	Molar
μ g	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mN	Milli Newton
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter

mM	Millimol
MP	Mikropartikel
MPa	Megapascal
MTT	Methylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromid
N	Newton
Na	Natrium
NaOH	Natriumhydroxid
Na-PolyP	Natriumpolyphosphat
nm	Nanometer
p	P-Wert Statistik
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen
PolyP	Polyphosphat
PVA	Polyvinylalkohol
r	Radius

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Die vier Grundvoraussetzungen für die Entstehung kariöser Läsionen
- Abb. 2 Wirkmechanismen HA (Enax *et al.*, 2019)
- Abb. 3 Extrahierte und geschnittene Zähne
- Abb. 4 LEICA SP 1600 Innenlochsäge
- Abb. 5 Sinterofen CARBOLITE RHF 1500
- Abb. 6 Keyence microscope vhx-1000
- Abb. 7 Rasterelektronenmikroskop ESEM XL-30.
- Abb. 8 NanoTest Vantage
- Abb. 9 Mecmesin MultiTest 2.5-xt
- Abb. 10 Durchmesser Tablette
- Abb. 11 Höhe Tablette
- Abb. 12 Tablettenoberflächen nach dem Sintern
- Abb. 13 Sinterreihe einer Mischung aus HA (80%) und Ca-PolyP (20%)
- Abb. 14 Sinterreihe einer Mischung aus β -TCP (80%) und Ca-PolyP (20%)
- Abb. 15 Ca-PolyP Sinterreihe
- Abb. 16 Härtemessung
- Abb. 17 Proben nach Inkubation in erhöhter Luftfeuchtigkeit
- Abb. 18 Lebensfähigkeit der Zellen 1-3 Tage
- Abb. 19 PolyP induzierte Mineralisierung von Zellen 3-8 Tage

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Chemikalien

Tabelle 2 Sinterprotokoll Ca-PolyP

Tabelle 3 Härte und Elastizitätsmodul

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

Seit mehr als 50 Jahren werden in der Medizin unterschiedliche Keramik-Werkstoffe verwendet, um krankes oder beschädigtes Hartgewebe zu ersetzen (Hench *et al.*, 1991). Da Kalziumphosphat eine ähnliche chemische Struktur wie das Knochenmineral aufweist (Dorozhkin *et al.*, 2002), ist das Interesse an diesem Stoff stetig gestiegen, um bessere biologische Eigenschaften der Ersatzmaterialien zu erzielen.

Auch für Zähne werden immer mehr synthetische Analoga gesucht, um Zahndefekte nachhaltig und langlebig versorgen zu können. Im besten Fall sollen sie ein Biomaterial darstellen, das eine hohe Biokompatibilität aufweist. Die komplexe Zusammensetzung und die Mikrostruktur, die organische und anorganische Bestandteile enthält, erschweren die Herstellung der Analoga. In der Zahnmedizin werden biomimetische Wirkstoffe in vielerlei Hinsicht verwendet und immer weiterentwickelt. Hierbei geht es um Zahnpasten, Mundspülungen und auch Ersatzmaterialien für Restaurationen. Die Remineralisation soll durch diese Stoffe gefördert und wiederhergestellt werden, sodass die Demineralisation nicht überwiegen kann (Fabritius *et al.*, 2019).

Da HA und Kollagen in Zähnen und Knochen jeweils Vorkommen, kam uns die Idee auf, ein Material, welches bei Knochenersatz bereits Erfolge hat, nun für die Versorgung von Zähnen zu verwenden. Als mineralischer Bestandteil eignet sich HA in einer synthetischen Herstellung gut, jedoch reicht ein mineralischer Bestandteil nicht aus um einen Verbundwerkstoff wie einen Zahn zu synthetisieren, denn dieser soll bestimmte physikalische Eigenschaften aufweisen, wie eine gewisse Flexibilität, welche nur mit Hilfe eines zusätzlichen Polymers erreichbar sind (Greish *et al.*, 2001).

Da amorphe Ca-Carbonate neuesten Studien zufolge eine unreife Vorläuferform von HA-Kristallen darstellen, welche bei der Reifung von Knochenmineral eine Rolle spielen, lässt sich eine Verbindung zwischen PolyP als Auslöser für Reifungsprozesse und der biologischen Hartschubstanz darstellen. (Müller *et al.*, 2015).

Demnach könnte der Remineralisierungsprozess an Zahnrestaurationen an einem Ca-Polyphosphat oder einem Koazervat von Ca-Polyphosphat stattfinden, wodurch sich die zahnärztlichen Arbeiten besser im Mund eingliedern könnten. Hierbei würde dann eine Karies keinen allzu großen Schaden anrichten und möglicherweise

Sekundärkaries reduziert werden, da diese in direktem Kontakt zu dem Stoff stehen, der die Remineralisation begünstigt.

Ziel der Arbeit ist demnach die Herstellung eines biomimetischen Werkstoffes, welcher in der Zahnmedizin im Umgang mit Zähnen verwendet werden kann, und bei welchem die Remineralisation gefördert wird. Grundlage hierfür sind die Ergebnisse einiger Versuchsreihen mit Knochenmaterialien (Müller *et al.*, 2015). Die Durchführung, Analyse und Bewertung der drei Hauptschritte zur Keramikherstellung sind Grundbausteine dieser Arbeit.

Grundsätzlich besteht die Herstellung von keramischen Objekten aus den drei großen Arbeitsschritten: Pulversynthese, Formgebung und das Sintern (Ravaglioli *et al.*, 1993). Die erste veröffentlichte Studie zur Herstellung von Keramiken mittels HA wurde 1970 von Monroe *et al.* publiziert, wobei er ebenfalls das Material gesintert hat, um es später als Keramik im medizinischen Bereich verwenden zu können (Monroe *et al.*, 1970).

Anhand von zahlreichen Versuchsreihen, in denen mit verschiedenen Konzentrationen und leicht unterschiedlichen Zusammensetzungen gearbeitet wurde, entstand ein Sinterprotokoll. Dies galt als Grundlage für die weiteren Versuchsreihen.

Als Hauptmaterial wurden Nanopartikel aus Ca-Polyphosphat verwendet, mit dem Ziel eine höhere Festigkeit und Dichte nachweisen zu können. Überprüft wurde das Ganze mittels Nanoindentierung und eines Rasterelektronenmikroskops.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Sinterprotokolle angefertigt, um die jeweiligen Eigenschaften der unterschiedlich gesinterten Tabletten darzustellen. Anschließend wurden humane Zähne verschiedenen Lösungen ausgesetzt, welche unterschiedliche Konzentrationen und Zusammensetzungen der zuvor untersuchten Stoffe aufweisen. Abschließend wurde die Härte bestimmt, und es wurde untersucht, inwieweit Zellen sich anlagern und vermehren können.

Idealerweise kann ein solches Material für die Zahnversorgung im Mund genutzt werden. Denkbar sind hier verschiedene Szenarien wie Implantate, Inlays, Onlays, Teilkronen oder Füllungen.

2 Literaturdiskussion

In der vorliegenden Arbeit wird vor allem Ca-Polyphosphat in Form von Nanopartikeln als Ersatzmaterial untersucht, um natürliche Füllstoffe und Implantatmaterialien für Zahndefekte zu erforschen. Bestenfalls entsteht ein natürlicher Verbund, zwischen dem Zahn und dem eingesetzten biologischen Werkstoff.

2.1 Zahnhartsubstanz

Humane Zähne werden in verschiedene Schichten und anatomische Strukturen eingeteilt, die alle unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Makroskopisch sind die Zahnwurzel und die Zahnkrone (corona dentis) zu unterscheiden, welche über die Enamel-Zement-Grenze voneinander getrennt werden. Die Krone, die der sichtbare Teil ist, nimmt ungefähr 1/3 der gesamten Zahnlänge in Anspruch und die Zahnwurzel, die im Knochen über einen Faserapparat verankert ist, 2/3 der gesamten Zahnlänge. Sowohl mikroskopisch als auch makroskopisch unterscheiden sich die unterschiedlichen Gewebestrukturen deutlich voneinander. Enamel, Dentin und der Wurzelzement stellen das Hartgewebe dar. Die Pulpa und das Desmodont stellen das Weichgewebe dar.

2.1.1 Aufbau und Funktion von Enamel

Das Enamel ist der äußere Mantel der humanen Zahnkrone und bietet den unterliegenden Strukturen einen Schutz vor chemischen und thermischen Einflüssen. Aufgebaut ist er aus Enamelprismen und aus wassergefüllten Kristallzwischenräumen, die mit Hilfe von Mikroporositäten mit dem Tubulifluid und der Mundhöhle kommunizieren (Allen *et al.*, 2001). Dadurch entstehen die Farbe, der Glanz sowie die Transluzenz des Zahns. Grundsätzlich ist er zu 95% aus anorganischen Apatitkristallen, zu 4% aus Wasser und zu einem Prozent aus einer organischen Matrix aufgebaut und wird von den Ameloblasten in der Zahnentwicklung gebildet (Lehmann *et al.*, 2010). Der anorganische Teil untergliedert sich überwiegend in Kalzium und Phosphat, wobei sich noch einige andere Bestandteile in kleineren Mengen vorfinden, wie Natrium, Kalium, Fluor, Magnesium und Chlor oder ihre Ionen. Die Mineralisation des Enamels wird durch die chemische Formel $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ zusammengefasst

und findet auf der Basis von Kalzium-HA, Fluorapatit und Carbonat-HA statt (Heidemann *et al.*, 1999).

Strukturelle Merkmale des Enamels sind die Enamelprismen, welche sich aus dem interprismatischen Enamel, Prismenscheiden und den Kristalliten zusammensetzen. Die Kristalle sind Stäbchen mit einer Länge von ca. 160 nm, einem Durchmesser von 40 bis 70 nm und 26 nm Dicke (Hellwig *et al.*, 1999). Zu finden sind sie von der Enamel-Zement-Grenze bis zur Enamel-Oberfläche, wobei sie am häufigsten in den Fissuren vorliegen. Die Prismenschicht ist dank der Wachstumsbewegung der Ameloblasten geschwungen. Grundsätzlich existiert pro Enamelprisma ein Ameloblast. Es gibt verschiedene Prismen, die sich wesentlich in ihrer Form unterscheiden. Dabei entstehen der „Schlüssellochtyp“, der „Pferdehuftyp“ oder der „zylindrische Typ“. Im Durchmesser liegen sie bei ca. 5-7 μm (Carrilho *et al.*, 2009, Schneider *et al.*, 1995). Im Enamel befinden sich keine Nerven und Gefäße. Als Prismenzahl wird 20.000 – 30.000 Stück/ mm^2 angegeben (Schroeder *et al.*, 2000). Im Enamel selbst befinden sich Hunter- Schreger - Streifen, die durch helle und dunkle Linien zu erkennen sind und den wellenförmigen Verlauf darstellen (Schneider *et al.*, 1995). Bei der Enameldicke liegt je nach Lokalisation eine Variation von einigen Mikrometern bis zu 2,5 mm vor. Die durchschnittliche Härte beträgt 272 KHN (Knoop Härte) an der Enamel-Zement-Grenze und 400 KHN an der Enameloberfläche (Meredith *et al.*, 1996).

Grundsätzlich ist Enamel dank seiner Strukturen ein sehr hartes und glattes Material. Im menschlichen Körper stellt es das härteste Material dar. Es ist jedoch für die Demineralisation anfällig und kann auch Risse ausbilden. Beim Enamelverlust kann nur mit Hilfe von künstlichem Ersatz der Schutz vor äußeren Reizen wiederhergestellt werden (Allen *et al.*, 2001).

2.1.2 Einflussfaktoren auf das Enamel

Speichel übt in seiner charakteristischen chemischen Zusammensetzung diverse Funktionen aus, die im Großen und Ganzen ein Schutzsystem darstellen. Die Kariesentstehung, sowie die Remineralisation sind stark abhängig vom Speichel und seiner Zusammensetzung. Die Pufferqualität und Remineralisation sind für die Enameleigenschaften von großer Bedeutung. Auch die Spülfunktion ist nicht zu vernachlässigen. Die Speichelfließrate im Allgemeinen entscheidet über Pufferkapazität und pH-Wert und steuert so einige Prozesse (Hellwig *et al.*, 2018).

Zahnfehlstellungen können sich aufgrund neuer Positionen negativ auf die Mundgesundheit auswirken. Fehlen einzelne Zähne, kommt es zu falschen Belastungen. Dadurch können natürliche Mechanismen nicht mehr wirken und das Parodont wird geschädigt. Es können mehr Angriffsflächen für Plaque entstehen, wodurch das Enamel geschädigt wird (Hellwig *et al.*, 2018). Zahnfehlstellungen können nach einigen Studien in einen direkten Zusammenhang mit Karies gesetzt werden. Hierbei wurden Studien vor allem bei Kindern durchgeführt, wie sie zum Beispiel bei Baskaradoss (Baskaradoss *et al.*, 2013) oder Mtaya (Mtaya *et al.*, 2009) zu finden sind. Sozio-demographische Faktoren spielen ebenfalls eine Rolle.

Ernährung spielt für die Zahngesundheit eine große Rolle, wobei es systemische und lokale Effekte zu beachten gibt. Bei systemischen Effekten kann es durch Mineralisation zu einer Veränderung des Speichels kommen, was auf eine Fehl- oder auch Mangelernährung zurückzuführen ist. Bei den lokalen Effekten versucht man die Aussetzung der Zähne gegenüber metabolisierenden Kohlenhydraten so gering wie möglich zu halten, da Zucker das Kariesrisiko bedeutend erhöht (Hellwig *et al.*, 2018). Säurehaltige Lebensmittel wie Zitrusfrüchte und andere Obstsorten, die als „gesunde Lebensmittel“ gelten, können dentale Läsionen hervorrufen, die durch Erosionen entstehen (Hellwig *et al.*, 2018).

2.1.3 Aufbau des Dentins

Das Dentin ist anders als das Enamel ein vitales, mineralisiertes Hartgewebe. Es hat eine Schichtdicke von 3-3,5 mm und stellt damit den größten Teil der Zahnhartsubstanz dar. Gebildet wird das Dentin von Odontoblasten, welche an der Grenze zwischen Dentin und Pulpa lokalisiert sind und sich mit ihren Fortsätzen durch das gesamte Dentin ziehen (Pashley *et al.*, 1991). Die Mineralisierung erfolgt schrittweise über die Kollagenmatrix. Dentin besteht aus einem ca. 45-50 vol-% großen anorganischen Teil, überwiegend Kalzium-HA und kleineren Mengen an Magnesiumphosphat, Kalziumfluorid und Kalziumkarbonat. Der organische Teil umfasst ca. 30 vol-%. Die restlichen 20-25 vol-% sind im Mineral gebundenes Wasser (Sano *et al.*, 1994). Den organischen Teil kann man in zwei Teile einteilen. Ca. 92% bestehen aus Typ I Kollagen und die restlichen 8% aus einer nicht kollagenen Grundsubstanz (Schroeder *et al.*, 1987). Diese Grundsubstanz der organischen Matrix

wird von Phosphoproteinen, Proteoglykanen, Carboxylglutamat enthaltenden Proteinen und einem geringen Teil von Lipiden gebildet (Schroeder *et al.*, 1991).

Ausgehend von der pulpennahen Schicht der Odontoblasten bildet sich das Dentin und gliedert sich mit den Fortsätzen der Odontoblasten in Prädentin, zirkumpulpaes Dentin und Manteldentin. Das zirkumpulpale Dentin stellt hierbei die Hauptmasse dar. Dentinkanälchen durchziehen das Dentin teilweise bis ins Manteldentin, in welchem sich noch Odontoblastenfortsätze befinden. An dieser Stelle sind zahlreiche Verzweigungen zu sehen, anders als im zirkumpulpaes Dentin (Schneider *et al.*, 1995). Dieser Struktur folgend lässt sich intertubuläres von hypermineralisiertem, peritubulärem Dentin unterscheiden, welches die Kanalwände in einer Schicht von ca. 5 μm ummantelt. Beim intertubulären Dentin ist eine geringere Mineralisierung vorhanden und es enthält mehr Kollagenfasern, welche Apatit Kristalle einbetten (Marshall *et al.*, 1993). Die Apatit Kristalle nehmen ca. 50% des Volumens des intertubulären Dentins ein, im peritubulären Dentin sind es 90%. Das intertubuläre Dentin wird mit den anderen 50% von Kollagenfasern gebildet. Diese stellen ein Geflecht her, welches die Dentintubuli ringförmig umfasst. Die Dentinkanälchen sind mit einem klaren und proteinarmen Dentinliquor gefüllt, der einem nach außen gerichteten Druck von ca 25-30 mm Hg-Säule unterliegt (Schäfer *et al.*, 1999).

Im Kronenbereich verlaufen die Dentinkanälchen eher s-förmig, während sie im Wurzelbereich geradlinig liegen. Der Durchmesser ist altersabhängig. Man unterscheidet zwischen pulpennah mit 2,9-4,0 μm und pulpenfern mit 0,8-1,8 μm (Pashley *et al.*, 1991). Mit zunehmendem Alter kann sich eine Retraktion der Odontoblastenfortsätze ausbilden, welche im Laufe des Lebens zu einem Ausfall von intratubulärem HA führt, die sich wandständig ablagert. Dadurch kann es zu einer Verengung bis hin zur Obliteration der Kanälchen kommen. Die Dichte wird je nach Lage unterschiedlich beschrieben, pulpennah mit 64.000 Stück/ mm^2 und pulpenfern mit 16.000 Stück/ mm^2 . Die enamelnahen Dentinoberfläche weist lediglich einen Anteil von 4% an Dentinkanälchen auf, während es an der pulpennahen Oberfläche 22% sind (Marshall *et al.*, 1993; Schäfer *et al.*, 1999). Durch diese Kanälchen besitzt das Dentin eine direkte Verbindung zur Pulpa, wodurch eine bidirektionale Diffusion ermöglicht wird. Für adhäsive Therapien ist eine dichte Versiegelung wichtig, um Pulpenirritationen durch Spaltbildung zu verhindern. Dies gilt besonders bei einer sehr dünnen Restdentinschicht, bei der die Pulpa leichter zugänglich ist (Pashley *et al.*,

1991). Dentin ist in seiner Grundfarbe eine gelblich/weißliche opake Struktur (Freitas *et al.*, 2012).

2.2 Karies

Karies nimmt immer noch eine große Stellung in der Zahnmedizin ein. Sie verursacht weiterhin viele Behandlungen. Es handelt sich um den akuten oder chronischen Zerfall der harten Zahnschubstanz und stellt eine der häufigsten Infektionskrankheiten der Welt dar.

2.2.1 Ätiologie der Karies

Karies ist der akute oder chronische Demineralisationsprozess der harten Substanz der Zähne. Die Übersetzung aus dem Lateinischen bedeutet „Morschsein“ und Fäulnis (Langenscheidt, 2017). Karies entsteht in den Bereichen, in welchen die Selbstreinigung durch Zunge, Wange und Speichel nicht oder nur schwer möglich ist (Lehmann *et al.*, 2011). Die Kariesätiologie stellt einen Prozess dar, an welchem mehrere Wissenschaftler gearbeitet haben. Die ersten drei Faktoren: Substrat, Mikroorganismen und Wirtsfaktoren sind relativ zeitnah entstanden. Den vierten und letzten Faktor für den Kariesursachenkomplex definierte König 1971; die „Zeit“.

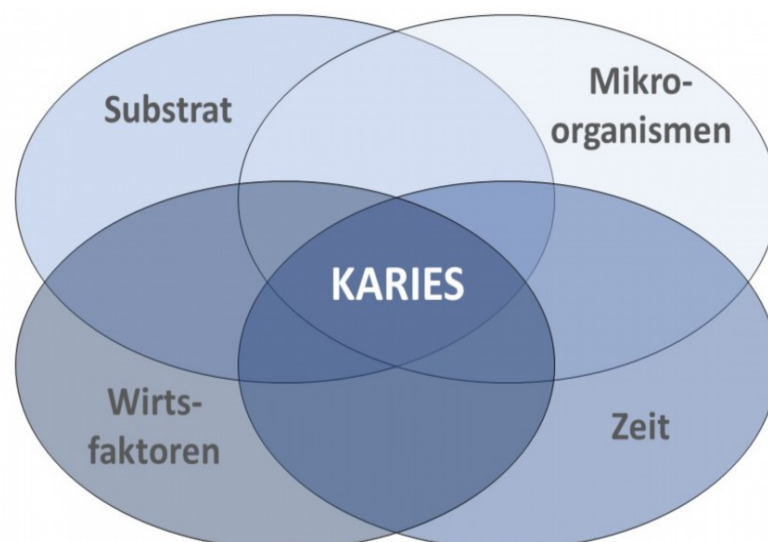


Abb. 1. Die vier Grundvoraussetzungen für die Entstehung kariöser Läsionen modifiziert nach König 1987.

Karies entsteht durch eine bakterielle Stoffwechselaktivität, welche organische Säuren produziert. Niedermolekulare Kohlenhydrate sind dafür von großer Bedeutung. Ist diese Säurefreisetzung von längerer Dauer und wiederholten Einwirkzeiten, kommt es zur Auflösung von HA-kristallen, was den Verlust von Enamel zur Folge hat. Grundsätzlich spielt auch die Mundhygiene der einzelnen Person eine große Rolle.

2.2.2 Enamelkaries

Karies entsteht durch zwei Hauptbakterien, *Streptococcus mutans* und *Streptococcus sorbinus*. Bei der dentalen Karies ist das Enamel der Zahnkrone betroffen. Sie kann sich in die Tiefe konisch ausbreiten. Schon lange bevor man Karies klinisch oder röntgenologisch erkennen kann, beginnt die Demineralisation des Enamels. Ohne Behandlung kann sich die Karies in das darunterliegende Dentin ausbreiten und demineralisiert dieses bis hin zur Infektion, welche sich in die Pulpa ausbreitet und dort zu einer Entzündung führt. Karies wird nach drei verschiedenen Merkmalen eingeteilt; sie ist nicht in allen Bereichen gleich ausgeprägt.

- | | | |
|------|------------------|--------------------------|
| I. | Verlauf: | A. akute Karies |
| | | B. chronische Karies |
| II. | Erkrankungsgrad: | A. primäre Karies |
| | | B. sekundäre Karies |
| | | C. rezidivierende Karies |
| III. | Ort: | A. Fissurenkaries |
| | | B. Glattflächenkaries |
| | | C. Wurzelkaries |

Akute Karies breitet sich schnell im Dentin aus und führt zu einem raschen Einbruch des Enamels. Die chronische Karies hingegen breitet sich sehr langsam zum Dentin aus. Bei der Primärkaries handelt es sich um die erste Läsion am Zahn.

Sekundärkaries beschreibt Karies an Restaurationen, zum Beispiel Füllungen und Kronen. Die rezidivierende Karies stellt eine mangelhafte Entfernung von kariösen Stellen dar. Die Erstbehandlung wurde hier nicht ideal ausgeführt. Eine Fissurenkaries befindet sich auf den Kauflächen der Backenzähne und startet in den Furchen und Zahngrübchen. Innen- und Außenseiten der Zähne, vor allem im Frontbereich, werden von Glattflächenkaries befallen. Freiliegende Zahnwurzeloberflächen entwickeln sich zu Wurzelkaries (Tschoppe *et al.*, 2012). Die ersten sichtbaren Befunde sind sogenannte „white spots“, diese sind opake, kalkig weiße Flecken auf der Enameloberfläche, welche eine intakte, leicht raue Oberflächenschicht besitzen.

2.2.3 Dentinkaries

Dentin ist ein vitales Hartgewebe des Zahns, das zusammen mit der Pulpa auf äußere Einflüsse reagieren kann. Im Dentin breitet sich die kariöse Läsion in Richtung Pulpa aus und verläuft dabei wie die Dentinkanälchen. Die Dentinkaries ist durch eine zelluläre Abwehr der Odontoblasten gekennzeichnet (Schroeder *et al.*, 1991). Neben dem Verlauf entlang der Dentinkanälchen in Richtung Pulpa kann die Karies sich auch unterminierend entlang der Enamel-Zement-Grenze ausbreiten (Schroeder *et al.*, 1991). Dentinkaries lässt sich in verschiedene Stadien einteilen, je nachdem in welcher Zone sie sich befindet (Transparenzzone, Subtransparenzzone, dunkle Zone, Zone des Zerfalls). Die Pulpa reagiert im Regelfall auch mit einer Entzündung.

2.3 Nicht kariöse Zahnhartsubstanzdefekte

Neben den kariösen Defekten gibt es eine Vielzahl von nicht kariösen Zahnhartsubstanzdefekten, die klinisch nicht immer eindeutig voneinander zu unterscheiden sind. Besonders häufig spricht man von Erosion und Abrasion der Zahnhartsubstanz (Attin *et al.*, 1999).

2.3.1 Erosion

Bei der Erosion handelt es sich um einen säurebedingten Verlust der Zahnhartsubstanz, welcher nicht durch Mikroorganismen verursacht wird (Lehmann *et al.*, 2011). Die beteiligten Säuren können extrinsisch über die Nahrung oder intrinsisch, zum Beispiel über die Magensäure, an das Enamel gelangen (Attin *et al.*, 1999). Bei

der Nahrung fördern hauptsächlich Zitrusfrüchte und Fruchtsäfte sowie zuckerhaltige Limonaden die Erosion. Auch Reflux Erkrankungen und Bulimie führen oft zu Erosionsdefekten (Gate *et al.*, 1996). Der Defekt ist scheibenförmig, was ihn leicht von einer Karies unterscheidet, welche sich unterhalb der Plaque befindet, stellt aber ebenso wie die Karies eine Demineralisation dar, die das Enamel zerstört (Lussi *et al.*, 1991). Voraussetzung ist, dass das Enamel über einen längeren Zeitraum den Säuren ausgesetzt wird (Hellwig *et al.*, 2018). Bei kürzeren Zeiten der Säurezufuhr remineralisiert sich das Enamel mit Hilfe des Speichels selbst. Chelatbildner können Remineralisationsprozesse durch Speichel herabsetzen, zum Beispiel durch Zitate, die Kalzium komplexieren (Imfeld *et al.*, 1996). Bei der Auflösung des Enamels sind überwiegend Glattflächen betroffen. Im klinischen Bild zeigt sich eine glatte, polierte Oberfläche an charakteristischen Stellen wie den labialen Glattflächen (Dugmore *et al.*, 2004). Damit erosive Prozesse überhaupt ablaufen können, muss eine Schutzschicht durchbrochen werden. Um das Enamel zu schädigen, muss die Säure zunächst durch die natürliche Barriere, den Pellikel, gelangen. Dieser ist auch unter dem Begriff „Zahnoberhäutchen“ bekannt und stellt einen dünnen Film aus Proteinen des Speichels dar, welcher sich auf die Zahnoberfläche legt. Dringt die Säure durch diese Schicht ein, kann sie Kristalle des Enamels auflösen. Die Stärke der natürlichen Schutzschicht hängt von den Pellikeln ab. Ist dieser noch jung und frisch, stellt er kein großes Hindernis dar. Als ausgereifter Pellikel bremst er jedoch durch seine Dicke die Säure beim Diffundieren aus und verlangsamt den Prozess der Demineralisation (Hellwig *et al.*, 2018). Der Abbau des Enamels geht mit einer pH-Wert Steigerung einher. Die Ionen, überwiegend Kalzium und Phosphat, lassen diesen steigen und stoppen somit den Säureangriff für das Erste. Der Abbau des Enamels startet erst wieder beim nächsten Prozess mit einem Abbau der Apatitkristalle.

Speichel spielt somit eine große Rolle bei der Hemmung von Erosionen. Fehlt dieser, wie zum Beispiel bei Xerostomie, wird die Erosionsausbildung eher begünstigt. Nicht nur das Fehlen des Speichels stellt ein Problem dar, denn auch die ionische Zusammensetzung ist maßgebend für die gewünschte Remineralisation. Führt man Säuren zu, üben diese eine stimulierende Wirkung auf die Speichelproduktion aus, wodurch dieser eine höhere Fließrate bekommt und durch seine eigene Pufferkapazität die Zähne schützt (Hellwig *et al.*, 2018). Die Speichelmuzine bilden darüber hinaus den Pellikel, der die erste Schutzbarriere für den Zahn darstellt (Imfeld *et al.*, 1996).

2.3.2 Attrition

Attrition beschreibt einen mechanischen Prozess, bei dem sich der Zahn abnutzt (Hellwig *et al.*, 2018). Die Zahnhartsubstanz reibt sich an den antagonistischen Zähnen ab, was sowohl an den Approximalkontakten als auch an den Zahnflächen stattfinden kann (Dugmore *et al.*, 2004). Hierbei handelt es sich um einen physiologischen Prozess, der lediglich durch einen Zahn-Zahn-Kontakt, ohne Einfluss einer weiteren Substanz stattfindet (Gatou *et al.*, 2011). Solche Prozesse passieren beim Kauen und Schlucken und auch bei anstrengenden Arbeiten, wie schwerem Heben oder starker Konzentration (Grippe *et al.*, 2004). Die Auswirkungen der Attrition machen sich meist erst im höheren Alter bemerkbar, denn die Abnutzung ist recht gering (Hellwig *et al.*, 2018). Neben der physiologischen Veränderung der Zähne im Alter, wie Beweglichkeit und einer physiologischen Mesialwanderung, entstehen flächige Approximalkontakte. Diese physiologischen Veränderungen triggern die Abnutzung der Zähne genauso wie falsche Restaurationen von Kauflächen und allgemeine Stellungsanomalien und führen zu einer pathologischen Abnutzung der Zähne (Hellwig *et al.*, 2018). Im klinischen Bild zeigen sich Schliiffacetten, welche zunächst am Enamel, später auch an freiliegenden Dentinflächen zu erkennen sind. Erkennbar sind solche Facetten bei einer Lateralbewegung des Unterkiefers, denn die antagonistischen Zähne gleiten wie auf Schienen. Im Regelfall lassen diese Schliiffacetten immer auf Attrition schließen (Gatou *et al.*, 2004). Durch die Attrition gehen über die Jahre große Teil des koronalen Zahns verloren, überwiegend sichtbar an den okklusalen und inzisalen Stellen (Hellwig *et al.*, 2018).

2.3.3 Abrasion

Die Abrasion beschreibt einen weiteren mechanischen Prozess, der Zahnhartsubstanz abträgt (Hellwig *et al.*, 2018). Beispiele dafür sind Knirschen, Reiben oder Pressen (Bruxismus) (Grippe *et al.*, 2004). Der Unterscheid zur vorher beschriebenen Attrition ist die Beteiligung eines Fremdkörpers (Dugmore *et al.*, 2004). Werden regelmäßig Fremdkörper in die Mundhöhle eingebracht, handelt es sich in der Regel um einen pathologischen Prozess.

Ist dieser Fremdkörper ein Nahrungsbestandteil, spricht man von Demastikation (Hellwig *et al.*, 2018). Dabei ist das Ausmaß der Abrasion abhängig von der jeweiligen Abrasivität der Nahrung, mit der Folge des Abriebs der Zähne (Grippe *et al.*, 2004).

Demastikation hingegen stellt einen physiologischen Prozess dar, der auf inzisalen und okklusalen Flächen auftritt. Dieser kann auch als pathologisch bezeichnet werden, sobald Fremdkörper wie Nüsse oder ähnliches in den Mundraum eingeführt werden und sich das Enamel dadurch abreibt (Imfeld *et al.*, 1996). Da die westlichen Länder der Welt die Ernährung auf überwiegend weichere Kost wie Fastfood umgestellt haben, tritt dieser Prozess nicht mehr so häufig auf.

Historisch gesehen besteht ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Zahnhartsubstanzverlust und bestimmten Berufsgruppen. Hierbei sind insbesondere der Staub in Bergwerken und heute auch auf Baustellen sowie das Mehl in Backstuben Faktoren, die die Abrasion fördern (Hellwig *et al.*, 2018). Heutzutage führen diese Berufsgruppen, sowie Näher und Schuster ihr Handwerk anders aus, sodass auch diese Komponente der Abrasion an Gewicht verloren hat (Grippio *et al.*, 2004).

Habits bezeichnen Angewohnheiten, die zu charakteristischen Abnutzungen der Zähne führen. Darunter versteht man zum Beispiel das Festhalten von Gegenständen mit denselben Zähnen in der immer gleichen Position oder aber auch das Aufbeißen auf Gegenstände (Imfeld *et al.*, 1996).

Mundhygiene, die falsch ausgeübt wird, kann auch zu Zahnhartsubstanzverlust führen. Dabei geht es vor allem um die richtige Putztechnik und das Vermeiden von „Schrubben“, sowie die richtige Auswahl der Zahnpasta, die durch zu große abrasive Putzkörper einen negativen Effekt auf die Zähne haben kann (Hellwig *et al.*, 2018). Die Abrasionsläsionen sind klinisch als zervikale Defekte zu sehen. Es wird vermutet, dass das falsche Putzen die Hauptursache darstellt (Dugmore *et al.*, 2004). Hierbei spielen die Technik, Dauer, Häufigkeit und Motivation für die Mundhygiene auf der einen Seite und die Materialauswahl wie Borstenhärte, Zahnpasta und ihr pH-Wert auf der anderen Seite eine entscheidende Rolle. Diese Differenzierung hilft wesentlich bei der Lokalisierung und Erkennung der Problematik (Hellwig *et al.*, 2018).

Auch diese Form von Zahnhartsubstanzverlust nimmt mit dem Alter zu, der Zahn verliert durch die Abrasion am Enamel (Hellwig *et al.*, 2018).

2.3.4 Abfraktion

Die Abfraktion ist ein vorwiegend im Enamel auftretender keilförmiger Defekt, der meistens in der Nähe der Enamel-Zement-Grenze zervikal auftritt (Hellwig *et al.*, 2018). Die nahezu dreieckige Form des Defekts besitzt eine kürzere Seite im koronalen Bereich und in der Tiefe und kann teilweise bis ins Dentin reichen. Da die Ätiologie der Abfraktion noch nicht ganz geklärt ist, geht man von verschiedenen Annahmen aus. Es handelt sich demnach um ein multifaktorielles Geschehen an bereits geschädigten Zähnen, das zu Fehlbelastungen durch Knirschen oder okklusale Störkontakte und Balancehindernissen führt. Die Schädigung kann in unterschiedlicher Form vorliegen, je nach dem vorausgegangenen Defekt bzw. dem Prozess. Als Folge entstehen Biege- und Zugbelastungen, die durch exzentrisch angesetzte okklusale Kräfte (Imfeld *et al.*, 1996) auf den Zahn in seinem Drehpunkt ausgeübt werden. Diese Kräfte führen zu einer mechanischen Überbelastung, der der Zahn nicht standhalten kann, was Mikrofrakturen zur Folge hat. Im Laufe der Zeit breiten sich diese senkrecht zur Längsachse des Zahns aus und führen zu mikro- wie makroskopisch sichtbaren Enamelaussprengungen (Hellwig *et al.*, 2008; Dugmore *et al.*, 2004). Überwiegend zu finden ist dieses Phänomen an einzelnen Zähnen, die durch den Verlust der Nachbarzähne auch an Stabilität verloren haben und insgesamt leichter durch Mal- oder Hyperokklusion mastikatorischen und parafunktionalen Kräften ausgesetzt sind (Imfeld *et al.*, 1996).

2.4 HA als biomimetischer Wirkstoff

Das dynamische Gleichgewicht in der Mundhöhle zwischen Demineralisation und Remineralisation wird durch die oben genannten Effekte und Defekte teilweise in Richtung der Demineralisation verschoben. HA kann an dieser Stelle zur Remineralisation genutzt werden. Es handelt sich um ein Kalziumphosphatmineral, das eine Quelle für Kalzium- und Phosphationen darstellt und durch Remineralisation der Demineralisation entgegenwirkt (Epple *et al.*, 2018).

HA ist ein Kalziumphosphat, welches Enamelkristallen humaner Zähne am ähnlichsten ist. Daher nutzt man diesen biomimetischen Wirkstoff in der Zahnpflege (Fabritius *et al.*, 2019; Enax *et al.*, 2020).

In verschiedenen Verfahren wie beispielsweise der Röntgenpulverdiffraktometrie wird die Ähnlichkeit von HA-Partikeln und der Zahnoberfläche deutlich (Peetsch *et al.*,

2011). In einigen Studien wird beschrieben, wie HA als Remineralisationsprodukt für Kariesläsionen eingesetzt wird (Tokumoto *et al.*, 1989). Auch in Zahnpasten wird es gerne als Putzkörper benutzt, da es durch die Ähnlichkeit zu gesunden Zähnen die Remineralisation fördert (Lv *et al.*, 2007).

Da Zahnpflegeprodukte lange auf Fluorid angewiesen waren, ist HA als Ersatzstoff seit mehr als einem Jahrzehnt ein wichtiger Baustein in der Zahnpasta Entwicklung. Als biomimetischer Wirkstoff ist es so möglich, die Fluoridkonzentration zu verringern und auch jüngere Altersgruppen sicher zu versorgen. Vermieden werden sollen die Nebenwirkungen wie Fluorose. Die fluoridhaltige Zahnpasta sollte nicht verschluckt werden, was bei kleinen Kindern und Säuglingen nicht immer ganz einfach ist. Hierfür gibt es besondere Zahnpflegeprodukte ohne Fluor als Bestandteil (Loveren *et al.*, 2005).

HA wirkt physikalisch als Schichtbildung an der Oberfläche und durch die Reinigungseigenschaft der Putzkörper. Darüber hinaus wirkt es biochemisch als Quelle für Kalzium- und Phosphationen, was Säureangriffe abwehren kann und biologisch in der Interaktion mit Mikroorganismen, die die bakterielle Anlagerung an der Oberfläche der Zähne verhindert (Enax *et al.*, 2019).

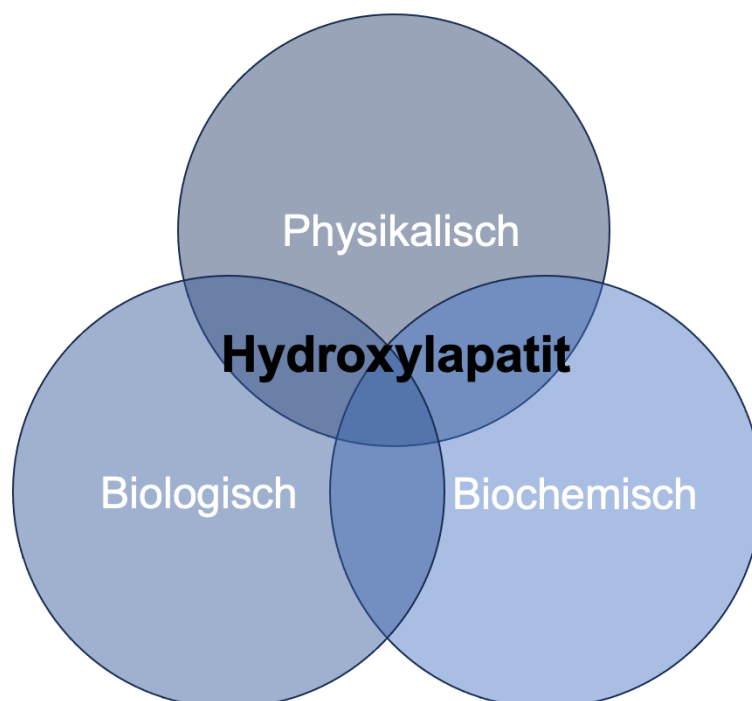


Abb. 2. Wirkmechanismen HA (Enax *et al.*, 2019).

2.5 Calcium-Phosphat

Der anorganische Teil des Hartgewebes (Knochen und Zähne) besteht aus Calciumphosphat, das eine apatische Struktur aufweist. Zahnkaries kann als *invivo*-Auflösung des Ca-Phosphat angesehen werden. Es ist biokompatibel und wird gerne in der Medizin verwendet, um verschiedene Materialien zu ersetzen (Dorozhkin *et al.*, 2002).

2.5.1 Biologische Einflüsse

Phosphat kommt in vielen Salzen und Mineralien vor und stellt die natürlich vorkommende Form des Elements Phosphor dar (Wall *et al.*, 2003). Phosphat kommt eine große Bedeutung in der Zellstruktur, dem Zellstoffwechsel, bei der Aufrechterhaltung des Säure-Base-Haushalts, bei der Regulierung subzellulärer Prozesse und bei der Knochenmineralisierung zu (Takeda *et al.*, 2004).

Im menschlichen Körper kommt Phosphat in großen Mengen vor und kann bis zu 1% des Körpergewichts ausmachen. Es befindet sich davon ein Großteil im Knochenskelett und in den Zähnen; dort macht es einen Anteil von 90% aus. Die restlichen Anteile verteilen sich auf weitere Gewebe und die extrazelluläre Flüssigkeit (Farrow *et al.*, 2010). Im Hartgewebe liegt es überwiegend als HA-Kristall vor, welches an Calcium gebunden ist, oder als amorphes Calciumphosphat (Alizadeh *et al.*, 2010).

2.6 Calcium-Polyphosphat

PolyP ist ein anorganisches Polymer, das aus Phosphatgruppen besteht, die über Sauerstoffatome als Brücke miteinander verbunden sind in Form einer energiereichen Phosphoranhydridverbindung. Diese Stoffe spielen eine wichtige Rolle in der biomedizinischen Anwendung (Kornberg *et al.*, 1999).

Als Biopolymer haben die chemischen Eigenschaften von PolyP für zahlreiche biomedizinische Anwendungen eine große Bedeutung. Es ist ein anorganisches Polymer, das durch die Polymerisation von monomeren Phosphat- oder Phosphorsäurederivaten entsteht (Wall *et al.*, 2003). Hierbei kommen zwei Phosphateinheiten in einer Kondensationsreaktion zusammen, die unter Wasserfreisetzung stattfindet. Dieser Prozess findet entweder bei hoher Temperatur

in Abwesenheit von Enzymen oder enzymatisch unter physiologischen Bedingungen statt (Kornberg *et al.*, 1999).

PolyP kommt in allen Säugetierzellen vor und bildet dort unterschiedlich lange Ketten, welche verschiedene Funktionen erfüllen (Thilo *et al.*, 1965). Evolutionär sind Polyphosphate alte Biopolymere, welche vom Bakterium zum Menschen in verschiedenen Lebensformen vorkommen (Müller *et al.*, 2019b). Die verschiedenen Verbindungen haben eine regulierende Funktion und sind dadurch an der Kontrolle und Korrektur des Stoffwechsels auf enzymatischer und genetischer Ebene beteiligt (Ault-Riché *et al.*, 1998). Durch das anorganische PolyP kann die Zellresistenz gegenüber schwierigen Umweltbedingungen erhöht werden, und auch die Regulierung einiger biochemischer Prozesse wird beeinflusst (Thilo *et al.*, 1965; Kualev *et al.*, 1999).

2.6.1 Biomedizinische Anwendungsmöglichkeiten

Die regenerative Aktivität von physiologisch vorkommenden hochenergetischen Polymeren in Form von anorganischen Polyphosphaten ist ausschlaggebend für die medizinischen Anwendungsmöglichkeiten.

Diese Biopolymere haben eine besondere Eigenschaft und sind in der Lage energiereiches Phosphat in den extrazellulären Raum zu geben. Dadurch können anabole Prozesse gefördert werden. Herausragend sind die Ergebnisse bei der Matrixsynthese in mineralisiertem Knochen und Knorpel. Diese Fähigkeiten besitzen andere Biomaterialien noch nicht, weswegen ich mich in dieser Arbeit für diese spezifisch formulierten intelligenten amorphen Nanopartikel/Mikropartikel mit verschiedenen Gegenionen entschieden habe (Wang *et al.*, 2018).

Es wurden bereits patientenspezifische osteo-artikuläre Implantate mit Hilfe von 3D-Zell-Bioprinting und dem 3D-Druck erstellt (Wang *et al.*, 2018). Diese innovative Technologie der biomedizinischen Anwendungsmöglichkeit soll in Hinblick auf die Zahnmedizin getestet und diskutiert werden.

Außer in der Zahnmedizin werden Polyphosphate zurzeit in vielen biomedizinischen Bereichen wie der Wundheilung, kontrollierter Wirkstofffreisetzung, Knochengewebe-Engineering und der Oberflächenbeschichtung eingesetzt.

2.7 Sintern

Das Sintern stellt den letzten Schritt der Keramikherstellung dar und ist essenziell für die Herstellung eines dichten und harten Werkstoffes. Es handelt sich um eine thermische Hochtemperaturbehandlung, bei welcher ein poröser Pulverpressling erhitzt wird. Hierbei ist darauf zu achten, dass der Schmelzpunkt nicht erreicht wird und sich die Höchsttemperatur nur knapp darunter befindet. Dabei werden je nach vorhandenem Protokoll Poren im Pressling beseitigt oder erhalten, was zu einer Verfestigung und Verdichtung des Körpers führt. Neben diesen beiden Aspekten kann der Formkörper sich auch in Größe und Form verändern und ähnelt dann nur noch zu Teilen seiner Ausgangsstruktur. Selbst chemische Zusammensetzungen und die Auftrennung verschiedener Phasen können durch den Sinterungsprozess beeinflusst werden (Akao *et al.*, 1984). Grundsätzlich kann die Sinterung nur stattfinden, wenn eine ausreichend hohe treibende Kraft vorhanden ist. Als treibende Kraft der Sinterung ist die Abnahme der Oberflächen- und Grenzflächenenergie des Systems durch den Transport von Materie definiert, welcher durch Diffusion in fester, flüssiger oder gasförmiger Phase erfolgen kann. Die Diffusion von den Atomen oder Ionen wird thermisch aktiviert. Das konventionelle Sintern ist eine Festkörperdiffusion, die ohne Druck in der Luft abläuft. Im Allgemeinen ist dieses Verfahren an der Verdichtung oder auch Konsolidierung des Stoffes beteiligt (Denoirjean-Deriu *et al.*, 1993; Rahaman *et al.*, 1991). Es können viele verschiedene Stoffe gesintert werden. In der heutigen Zeit liegt der Fokus auf Nanopartikeln, was aufgrund der Partikelgröße im Nanometerbereich gepaart mit dem Wachstum während der Hochtemperaturbehandlung einige Schwierigkeiten mit sich bringt. Das Sintern steht nicht umsonst an letzter Stelle in der Keramikherstellung. Es bestimmt die endgültige mikrostrukturelle Gestaltung sowie die chemische Zusammensetzung. Korngröße und auch -form, sowie die Gestaltung der Korngrenzen werden hierbei festgelegt. Dadurch werden das biologische Verhalten und die mechanische Leistung beeinflusst, was für den Einsatz in der Hartgewebeprothetik von besonderer Bedeutung ist (Champion *et al.*, 2013).

2.8 Knochenersatzmaterialien

Knochenersatzmaterialien und autologe Knochentransplantate werden verwendet, wenn es um schwer erkrankten und traumatisierten Knochen geht. Jedoch sind sie

nicht immer in ausreichender Menge vorhanden und teilweise auch nur von schlechter Qualität (Suchanek *et al.*, 1998). Unterscheiden lassen sie sich in autogene (von einem anderen Individuum derselben Spezies), isogene (vom selben Individuum), xenogene (von einer anderen Spezies) und alloplastische (körperfremd, künstlich hergestellt) Materialien. Synthetische Knochenersatzmaterialien hingegen haben einen großen Vorteil gegenüber den autologen. Man kann sie herstellen, wenn der Bedarf vorhanden ist, und sie sind unbegrenzt verfügbar (Agholme *et al.*, 2011). Gewebeentnahmen und die Suche nach Spendern sowie deren Überprüfung auf Krankheiten entfallen, was einen sehr kostspieligen und zeitintensiven Teil einspart.

Bildet man Knochenersatzmaterialien mit offenporigen Strukturen, besteht die Möglichkeit der Integration mit dem Wirtsknochen, da der Knochen in die Porositäten einwachsen kann. Das Ersatzmaterial sollte aus biologisch abbaubaren Biomaterialien bestehen, denn nur so kann es später durch natürlichen gesunden Knochen ersetzt werden, der nachwachsen kann (Clauss *et al.*, 2010). Problematisch ist der Einsatz jedoch in hochbelastbaren Skelettbereichen, da es eine zu geringe Festigkeit und Steifigkeit besitzt. Des Weiteren können pH Unterschiede zu einem Abbau des Knochenersatzmaterials führen (Fridén *et al.*, 1992; Tegnander *et al.*, 1994). Die Abbaugeschwindigkeit hängt unter anderem von der Sintertechnik und dem Glühverfahren ab (Grynpas *et al.*, 2002; Pilliar *et al.*, 2012).

2.8.1 Bedeutung und Einsatzgebiete

In der Medizin ist der Trend zu biologisch abbaubaren Biomaterialien klar zu sehen, unabhängig ob hydrolytisch oder enzymatisch abbaubar (Komatsu *et al.*, 2009). In den nächsten Jahren sollen die verwendeten Materialien und im Körper verbleibenden Strukturen durch biologisch abbaubare ersetzt werden. Das Ziel ist die Regeneration und eigene Heilung des geschädigten Körperteils, ohne dass man ein weiteres fremdes Material oder einen eingeführten Fremdkörper benutzen muss. So sind weitere Operationen zur Entfernung nicht notwendig (Dorozhkin *et al.*, 2010). Eine langfristige Biokompatibilität ist das grundlegende Ziel, gepaart mit weniger Revisionseingriffen (Dvir *et al.*, 2010).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zahnmaterial

Die in dieser Studie verwendeten Zähne wurden uns durch die Zahnklinik der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, den ethischen Richtlinien der Universitätsmedizin Mainz folgend, zur Verfügung gestellt. Die Patienten haben der Verwendung ihrer Zähne zur wissenschaftlichen Nutzung zugestimmt und diese Zahnproben werden anonymisiert verwendet.

Mit Hilfe der Innenlochsäge von Leica (Abb.4, Wetzlar, Deutschland) wurden die Zähne in gleichmäßige 2 mm dicke Scheiben geschnitten.



Abb. 3. Extrahierte und geschnittene Zähne.



Abb. 4. LEICA SP 1600 Innenlochsäge.

3.1.2 Ofen



Abb. 5. Sinterofen CARBOLITE RHF 1500.

Für die Verarbeitung der Proben wurde ein Ofen (Abb. 5, CARBOLITE RHF 1500, Neuhausen, Deutschland), der zum Sintern geeignet ist, benutzt. Die Temperatur, die Rampe und die Dauer der Erwärmung sowie die Höchsttemperatur können in einzelnen Minuten- und Gradschritten eingestellt werden, sodass die unterschiedlichen Materialien anhand des Sinterprotokolls mit verschiedenen veränderbaren Parametern hergestellt werden können. Nutzbar ist der Ofen bis 1500 °C.

3.1.3 Mikroskope

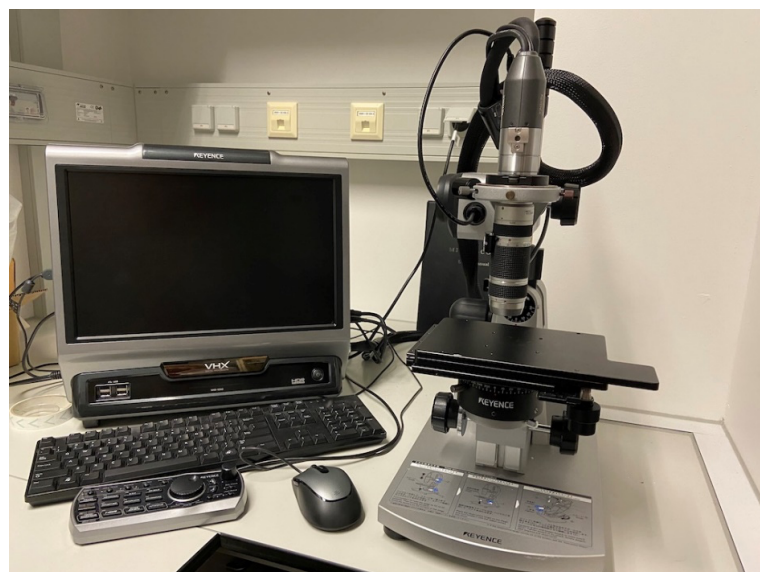


Abb.6. Keyence microscope vhx-1000.

Für die mikroskopische Analyse der Proben wurde ein vhx-1000-Digitalmikroskop (Abb. 6, Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland) verwendet. Hier war es möglich im Vergrößerungsbereich von 20 x bis 2500 x hochauflösende Bilddateien zu generieren und somit die Oberflächenbeschaffenheiten der einzelnen Proben exakt zu beurteilen und miteinander zu vergleichen.



Abb. 7. Rasterelektronenmikroskop ESEM XL-30.

Mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskop (Abb.7) konnten die Proben im Nanometerbereich untersucht werden. Besonders gut einsetzbar ist es für verschiedene Oberflächen und unterschiedliche Proben Geometrien. Bei dem verwendeten Rasterelektronenmikroskop ESEM XL-30 (Philips, Eindhoven, Niederlande) können auch nicht-leitende oder durch Trocknung veränderte Proben untersucht werden, da hierfür ein Niedrigspannungsmodus programmiert ist. In diesem Modus ist weiterhin ein sehr guter Kontrast mit einer hohen Abbildungsqualität gesichert.

3.1.4 Messgeräte



Abb. 8. NanoTest Vantage.

Nanoindenter zum Messen im Bereich von Nanometern bei Mikropartikeln. Für die Messung der mechanischen Oberflächeneigenschaften der behandelten Zähne und vorbereiteten Proben wurde ein Nano Test Vantage System (Abb. 8, Micromaterials, Wrexham, Vereinigtes Königreich) verwendet. Mit diesem System können die Härte und Bruchmessungen präzise durchgeführt werden. Der luftdicht verschließbare Raum ermöglicht verschiedene Parameter wie Temperatur- und Luftdruckunterschiede einzustellen, um eine Variation der Messung durchzuführen. Messbar sind verschiedene Werkstoffeigenschaften wie Nanohärte, das E-Modul, Kriechverhalten. Kleine und dünne Proben sowie Mehrphasenwerkstoffe können mit hoher Genauigkeit analysiert werden und die Mikrostruktur der Werkstoffe untersucht werden.

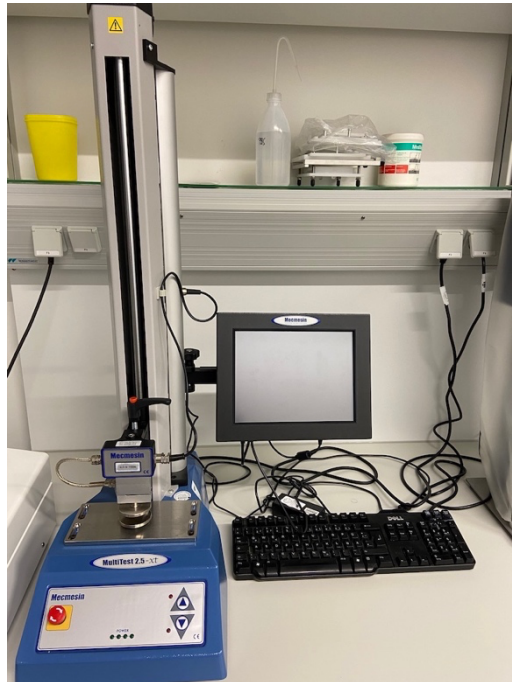


Abb. 9. Mecmesin MultiTest 2.5-xt.

Eine Einsäulenprüfmaschine (Abb. 9, Mecmesin, Freiburg, Deutschland); welche sowohl Zug als auch Druck prüfen kann. Anwendbar im Bereich bis 2,5 kN. Zunächst wurde die Maschine verwendet, um mit einer runden Form gleichmäßige und identische Tabletten zu pressen.

Die Druckfestigkeit der gesinterten Tabletten kann hiermit geprüft werden, somit wird die maximale Bruchfestigkeit der Proben ermittelt und verglichen. Anhand dieser ist festzustellen, ob das hergestellte Material biologischen Kräften im Körper aussetzbar ist.

3.1.5 Chemikalien

Chemikalie	Firma und Ort
Calcium polyphosphate microparticles (Ca-PolyP MP)	Nanotec MARIN GmbH Ingelheim, Deutschland
HEPES Puffer $C_8H_{18}N_2O_4S^-$ M 238,31 g/mol	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
b-tri-Calcium phosphate (sintered powder)	SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH Taufkirchen, Deutschland
Hydroxyapatite	SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH Taufkirchen, Deutschland
Natriumhypochloritlösung 12% Cl, techn. NaClO in H_2O – M 74,45 + aq g/mol – Dichte 1,22	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Fluka Chemie GmbH Buchs, Deutschland
PBS-Lösung	Bio-sell Nürnberg, Deutschland
Natrium Polyphosphat mit einer Phosphatkettenlänge von 40 Einheiten	Chemische Fabrik Budenheim Budenheim, Deutschland

Tabelle 1 Chemikalien.

3.1.6 Verwendete Lösungen

PolyP - Lösung: Hierbei wurde 1 g Na-PolyP mit 50 ml Wasser und 50 mM HEPES Puffer aufgelöst und auf einen pH- Wert von 7,4 gebracht.

HEPES Puffer mit einem pH - Wert von 7,4, wobei 6 g HEPES in 500 ml Wasser aufgelöst wurden. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von NaOH auf 7,4 eingestellt.

Ca -Lösung wurde mit HEPES Puffer angesetzt. 3 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ wurden mit 50 mM HEPES Puffer auf einen pH-Wert von 7,4 gebracht,

3.2 Methoden

3.2.1 Vorbereiten der Proben

3.2.1.1 Extrahierte Zähne

Die humanen Zähne wurden nach der Extraktion mit Natriumhypochlorit und H_2O_2 jeweils 50 Minuten gereinigt und von Gewebsresten befreit. Anschließend wurden sie mit Hilfe einer LEICA SP 1600 Innenlochsäge (LEICA, Wetzlar, Deutschland) in 2 mm dünne Scheiben geschnitten. Hierbei sind pro Zahn ca. drei Scheiben entstanden, welche nahezu denselben Durchmesser haben, da ausschließlich einwurzlige untere Canini (Eckzähne) und obere Incisivi (Frontzahn) verwendet wurden. Die Versuche haben direkt im Anschluss stattgefunden.

3.2.1.2 Tabletten

Zum Aufstellen des Sinterprotokolls wurden Tabletten über die Einsäulenprüfmaschine Mecmesin Multi Test 2,5 xt (Mecmesin, Freiburg, Deutschland) mit Hilfe einer runden Form gepresst. Hierbei wurden entweder

250 mg HA,

125 mg Ca-Polyphosphat

oder 250 mg β -TCP benutzt.

Zur besseren Verarbeitung von HA wurde es mit einigen Tropfen Polyvenylalkohol (PVA) versehen, und anschließend im Mörser zu einem Pulver gemischt, welches sich pressen lässt und nicht direkt auseinanderfällt und in seine ursprüngliche Form zurück geht.

In weiteren Versuchen wurde Ca-Polyphosphat vorher für 6 h bei einem Anstieg von $20\text{ }^\circ\text{C}$ pro Minute mithilfe eines Sinterverfahrens auf $200\text{ }^\circ\text{C}$ getrocknet, bevor es unter Druck zu Tabletten gepresst wurde.

3.2.2 Sintern

Die gepressten HA, β -TCP und Ca-PolyP Proben wurden bei verschiedenen Temperaturanstiegen und Zeiteinheiten gesintert, wobei eine Reihe erstellt wurde. Die gepressten Tabletten wurden in keramischen Schmelzriegeln gesintert.

Verwendet wurden hier die Zieltemperaturen: 500 °C, 650 °C, 800 °C, 950 °C, 1250 °C, wobei sich die Werte an den bekannten Schmelzpunkten der einzelnen Stoffe orientieren und diese nicht überschreiten, sondern bestenfalls knapp untertreffen sollen. Für die jeweiligen Zieltemperaturen liegen mehrere Messungen vor, da die aufgestellte Sinterreihe auch die Variation der Temperaturanstiege vorsieht. Pro Stoff wurden die Anstiege von 2 °C, 5 °C, 10 °C und 50 °C verwendet. Im Anschluss an die 30-minütige Sinterphase bei entsprechender Zieltemperatur folgte eine passive Abkühlphase bis auf die Umgebungstemperatur. Im Anschluss an den Sintervorgang wurden die Proben licht- und elektronenmikroskopisch analysiert, ihre Härte, sowie das E-Modul wurden mit Hilfe eines Nanoindenters gemessen und die Druckfestigkeit/Bruchfestigkeit dokumentiert.

3.2.3 Zahnproben

Im Anschluss an die Vorbereitung der humanen Zahnproben und Befreiung von Gewebsresten, kam der nächste Schritt zur speziellen Vorbereitung der Härtemessung. Die Zahnproben wurden in zwei Hälften geteilt. Eine wurde 24 h lang mit PBS umspült, und die andere Hälfte der Proben mit der angesetzten PolyP Lösung. Bevor die Proben Trocknen konnten, wurden alle mit destilliertem Wasser gespült, um die Reste der Lösungen zu entfernen.

Ein Teil der Proben aus der PolyP Lösung wurde nach dem Trocknen für weitere 2 h von einer Ca-Lösung umspült. Anschließend wurde auch diese Lösung mit destilliertem Wasser abgewaschen und die Probe erneut getrocknet.

3.2.4 Inkubation in erhöhter Luftfeuchtigkeit

Für den Versuch in erhöhter Luftfeuchtigkeit wurden 100 mg HA mit 100 mg β -TCP gemischt. Anschließend wurden 0,3 ml Na-PolyP Lösung (5 mg/ml) hinzugefügt.

Eine Probe wurde über Nacht mit der Na-PolyP-Lösung inkubiert. Bei den anderen beiden Proben wurde der Versuch nach 5 min Einwirkzeit direkt fortgeführt. Die Proben wurden anschließend für 5 min Calciumchlorid ausgesetzt.

Die drei Probengruppen wurden jeweils halbiert, wobei die eine Hälfte nach der Einwirkzeit getrocknet wurde und die andere Hälfte für 24 h in erhöhter Luftfeuchtigkeit inkubiert wurde. Die Untersuchung im Anschluss erfolgte demnach an einer feuchten und einer trockenen Probe.

3.2.5 Kultivierung und Mineralisierung von Zellen

Für die Zellkulturversuche wurden humane osteogene Sarkomzellen (SaOS-2-Zellen) (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) verwendet. Diese wurden in McCoy's 5A Medium (mit 1 mM CaCl_2) (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) mit 5% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 2 mM L-Glutamin (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und Gentamicin (50 $\mu\text{g/L}$) (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in 6-Well-Platten (Greiner-Bioone, Kremsmünster, Österreich) in einem befeuchteten Brutschrank mit 5% CO_2 kultiviert. Als die Zellen eine Konfluenz von mehr als 90% erreicht hatten, wurde das Kulturmedium verworfen und mit Hilfe von PBS wurde die Zellschicht dreimal vorsichtig gewaschen.

Die Zellen wurden in einer Dichte von 2×10^4 Zellen pro 3 ml Vertiefung ausgesät und 3 Tage lang in Medium/FCS kultiviert. Die Kulturen blieben unbehandelt (Kontrollen) oder wurden bis zu 8 Tage lang mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Na-PolyP oder Ca-PolyP-MP behandelt.

Bei den Versuchen mit PolyP wurden die Kulturen mit 2 mM CaCl_2 angereichert, um eine Verarmung an Ca^{2+} -Ionen zu vermeiden, die für die Ablagerung von HA erforderlich sind. Da PolyP ein Polyanion ist bindet es natürlicherweise an Ca^{2+} -Ionen. Ca^{2+} -Ionen wird für die Synthese von HA gebraucht und sollte deswegen ausreichend vorhanden sein.

Für die Mineralisierungsstudien wurden SaOS-2-Zellen in Kulturmedium/Serum in Abwesenheit oder Anwesenheit von PolyP (50 $\mu\text{g/ml}$ Na-PolyP oder Ca-PolyP-MP) 3 Tage lang inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen mit dem Mineralisierungsaktivierungscocktail (MAC) ergänzt, der für die Einleitung der Mineralisierung (HAp Bildung) erforderlich ist. Die Inkubation wurde für weitere 3-8

Tage fortgesetzt. Die zwei folgende Induktoren 50 mM Ascorbinsäure und 10×10^{-9} M Dexamethason sind im Cocktail enthalten.

Zur Visualisierung der Mineralisation wurden die Kulturen mit 10% Alizarinrot S (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) (Färbung für Ossifikation), angefärbt. Die Intensität der Alizarinrot S-Färbung wurde mit Hilfe eines spektrophotometrischen Tests quantitativ bewertet. Die optische Dichte wurde bei 405 nm bestimmt. Die Menge an gebundenem Alizarinrot S, angegeben in Mol, wurde anhand einer Kalibrierungskurve bestimmt. Die Angabe in nM/ μ g DNA entspricht dabei der Zellzahl in der Probe. Anhand des MTT-Tests mit 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid wurden die Proben auf ihre Stoffwechselaktivität geprüft (Müller *et al.*, 2019a).

3.2.6 Analysemethoden

Je nachdem wie die Proben ausgewertet werden sollten, kamen verschiedene Verfahren und Geräte zum Einsatz. Im Regelfall wurde zusätzlich zu den Messungen alles bildlich festgehalten, um einen ersten Eindruck von der Struktur des Stoffes und den Aufbau des Versuchs zu erhalten.

3.2.6.1 Aufnahmen

Die Tabletten für die Sinterreihe wurden zunächst mit Hilfe eines vhx-1000-Digitalmikroskop (Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland) von verschiedenen Seiten fotografiert und anschließend vermessen. Anhand dieser Daten konnte der durch das Sintern bedingte Volumenverlust quantifiziert werden. Die Aufnahmen vor und nach dem Sintern beinhalten eine Aufnahme der Struktur als Überblick, sowie eine Messung des Durchmessers und eine Messung der Höhe, wie es in der nächsten Abbildung beispielhaft dargestellt wird. Verwendet wurde die Formel $\pi \cdot r^2 \cdot H$ für die Berechnung des Volumens.

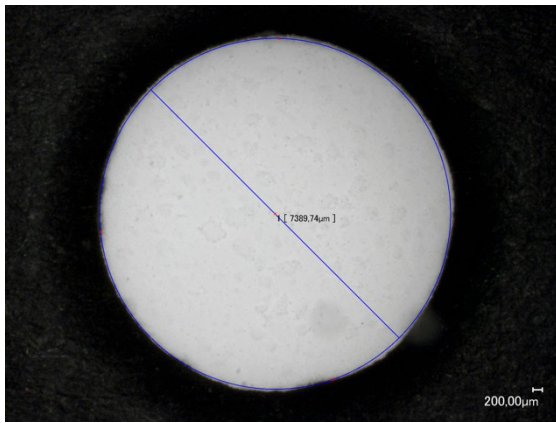


Abb. 10. Durchmesser Tablette.

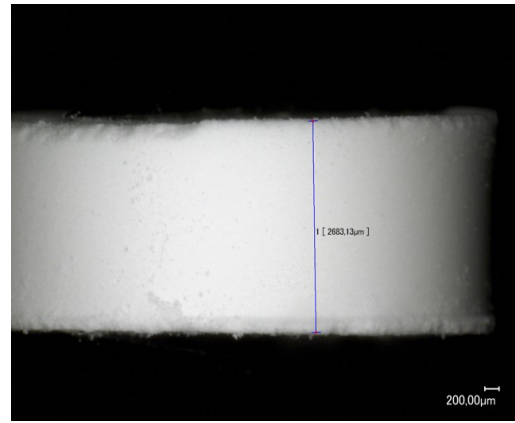


Abb. 11. Höhe Tablette.

3.2.6.2 *Gewicht*

Zur Ermittlung des Gewichtsverlustes wurden die Proben vor und nach dem Sinterungsprozess auf einer Feinwaage (Ohaus, Nänikon, Schweiz) gewogen. Die Tabletten wurden immer mit derselben Menge an Pulver gepresst, sodass sich das Ausgangsgewicht nicht verändert und sich die Proben untereinander leichter vergleichen lassen.

3.2.6.3 *Mechanische Eigenschaften*

Im nächsten Schritt wurden die mechanischen Eigenschaften der gesamten Tablette mittels der Einsäulenprüfmaschine Mecmesin MultiTest 2.5-xt (Mecmesin, Freiburg, Deutschland) ermittelt. Hierbei hat ein Kolben mit einer planen Oberfläche auf die bereits gesinterte Tablette mit einer stetig steigenden Kraft bis maximal 2,5 kN gedrückt. Der Moment des Bruchs wurde graphisch dargestellt, denn der Graph der aufgewendeten Kraft macht einen deutlichen Ausschlag an dem Punkt, an welchem die Tablette nachgegeben hat. Die bis dahin aufgebrauchte Kraft bricht im Moment des Bruchs ein und ist deutlich niedriger. Aus dieser Messung konnte man die Kraft in N ablesen, die es benötigt, um die Tablette zu brechen. Umgerechnet wurde das Ganze in Megapascal, um die Belastbarkeit darzustellen. Hierfür wurde folgende Formel verwendet: $\frac{\text{Kraft in N}}{\text{Oberfläche in mm}^2}$, in welcher die Kraft, der Oberfläche gegenübergestellt wird. Die Oberfläche ist als Flächeninhalt eines Kreises ermittelbar, da alle Tabletten kreisrund gepresst sind. Flächeninhalt Kreis: $\pi \cdot r^2$.

3.2.6.4 *Proben Geometrie*

Abschließend wurde eine Aufnahme mit dem Rasterelektronenmikroskop *LEO Gemini 1530 Scanning Electron Microscope* (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt, um im Nanometerbereich Unterschiede zu sehen. Hierbei ging es vor allem um die Verschmelzung der einzelnen Kristalle untereinander und die daraus resultierende Proben Geometrie.

3.2.6.5 *Nanoindentationsmessung*

Die Zahnproben wurden mit Hilfe einer Nanoindentationsmessung ausgewertet. Hierbei sind repräsentative Belastungs- und Verschiebungskurven entstanden, welche im Ergebnisteil abgebildet sind und besprochen werden. Die Proben wurden jeweils am Enamel gemessen, sodass es zu vergleichbaren und reproduzierbaren Ergebnissen kommt. Es geht um die mechanischen Eigenschaften der Proben. Mit Hilfe des Softwarepakets Nano-test Platform Four V.40.08 (Micromaterials, Wrexham, Vereinigtes Königreich) wurden das Elastizitätsmodul (E) und die Martens-Härte (HM) berechnet. Ein Berkovich-Diamanteindringkörper braucht unterschiedlich viel Kraft, um in die jeweilige Probe einzudringen. Es handelt sich um eine kontinuierliche Nanoindentation, die in dieser Messung aufgezeichnet wird. Wichtig ist die richtige Raumtemperatur von 25 °C und die Umgebung der Proben, um eine einwandfreie Messung durchzuführen. Dafür werden diese mindestens 24 h vorher in die Maschine gestellt, um ihre Raumtemperatur von 25 °C und die Luftfeuchtigkeit anzunehmen und konstant zu halten.

4 Ergebnisse

4.1 Sinterprotokoll

Wie im Methodenteil beschrieben wurde das Sinterprotokoll für verschiedene Stoffe durchgeführt. Die nachstehende Tabelle zeigt die Ergebnisse von Ca-PolyP beim Sintern mit variabel eingestellten Parametern von Temperatur und Temperaturanstieg. Zum Vergleich sind die Parameter Volumenänderung, Endvolumen, Belastbarkeit sowie das Elastizitätsmodul zu Hilfe gezogen worden.

#	max. Temperatur [°C]	Temperaturanstieg [°C]	Volumenänderung [%]	Volumen Ende [cm ³]	Belastbarkeit [MPa]	Elastizitätsmodul [MPa]
1.	nur gepresst	0	0	113,1	8,6	72,1
2.	500	50	20,6	89,8	26,8	77,8
3.	650	50	31,3	77,7	29,1	68,7
4.	650	5	25,1	84,7	62,5	74,4
5.	650	2	27,2	82,3	62,5	68
6.	800	50	47	59,5	67,2	62,7
7.	800	10	45,5	61,6	82,2	70,4
8.	800	5	45,84	61,3	79,4	69,1
9.	800	2	54,1	51,9	87,8	68,4
10.	950	50	59,7	45,6	100,8	70,3

Tabelle 2 Sinterprotokoll Ca-PolyP.

Anhand der Daten lässt sich erkennen, dass das Volumen mit jedem Temperaturanstieg schrumpft. Nicht nur die Endtemperatur spielt dabei eine Rolle. Je kleiner der Temperaturanstieg pro Minute, desto größer ist die Volumenänderung, da die Kristalle sich besser aneinander anlagern können, wenn sie länger erhitzt werden. Demzufolge ist das Endvolumen auch kleiner, da die Volumenänderung und das Endvolumen in direktem Zusammenhang stehen.

Die Belastbarkeit der gepressten und gesinterten Tabletten steigt signifikant mit jeder kleineren Temperatursteigerung und jeder größeren Endtemperatur an. Der Unterschied von der gepressten zur ersten gesinterten Tablette ist dabei mit einer Differenz von 18,2 MPa stark erkennbar. Auch wird der beschriebene Zusammenhang des Temperaturanstiegs und der Endtemperatur deutlich sichtbar. Je höher die Temperatur und geringer der Temperaturanstieg, desto größer die Belastbarkeit der Probe. Die maximale Belastbarkeit ist demnach bei der Tablette mit der höchsten Endtemperatur von 950 °C und liegt bei 100,8 MPa.

Das Elastizitätsmodul lässt sich kaum in eine Relation zu den vorher genannten Parametern setzen. Es pendelt zwischen 62 und 77 MPa. Demnach sind die Rückstellkräfte durch den Sinterungsprozess nicht signifikant beeinträchtigt.

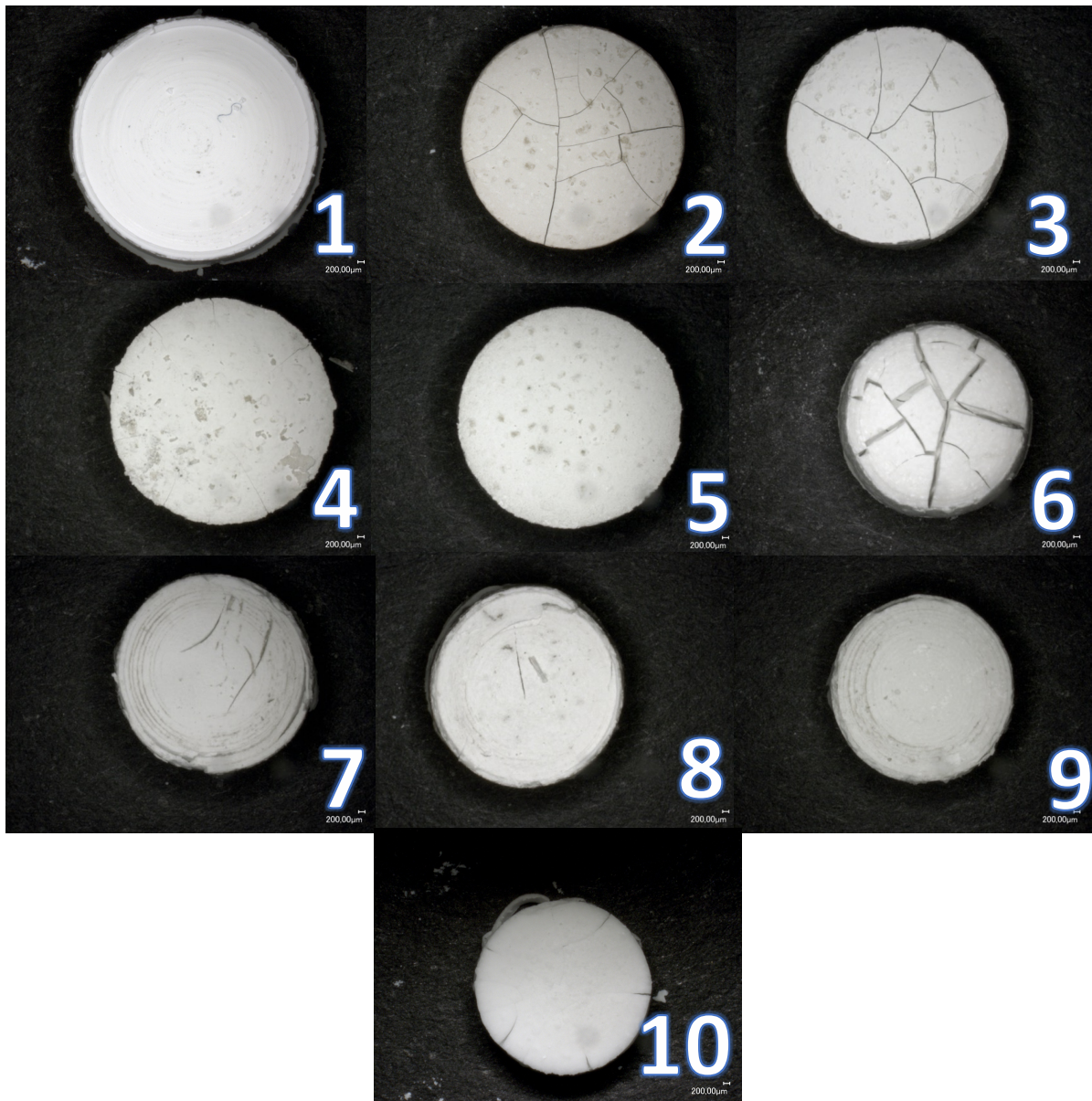


Abb. 12. Tablettenoberflächen nach dem Sintern. Mit jeweils verschiedenen maximalen Temperaturen (A) und Temperaturanstiegen (B) in °C.

- | | | | |
|-------------|-------------|-------------|---------------|
| 1: A0 B0 | 2: A500 B50 | 3: A650 B50 | |
| 4: A650 B5 | 5: A650 B2 | 6: A800 B50 | |
| 7: A800 B10 | 8: A800 B5 | 9: A800 B2 | 10: A 950 B50 |

Die Abbildung 12 zeigt die jeweiligen Oberflächen der gesinterten Tabletten. Erkennbar sind teilweise leichte Verschmelzungen oder eine eher rissige Oberfläche. Nummer 2 und 3 sehen brüchig aus. Hierbei handelt es sich um eine Endtemperatur von 500 und 650 °C, bei der die Kristalle noch nicht verschmelzen können. Die Tablette Nummer 6 sieht extrem brüchig aus. Sie hat eine Endtemperatur von 800 °C und einen Anstieg von 50 °C pro Minute. Im Gegensatz dazu ist eine nahezu glatte Oberfläche bei der Tablette Nummer 9 zu sehen, welche zwar auch eine Endtemperatur von 800 °C hat, jedoch lediglich einen Anstieg von 2 °C pro Minute aufweist. Hierbei wird es besonders deutlich, dass der Temperaturanstieg einen signifikanten Unterschied bei der Erhitzung darstellt. Je geringer der Temperaturanstieg pro Minute, desto homogener die Oberfläche.

Die folgenden Bilderreihen stellen verschiedene Sintertemperaturen sowie unterschiedliche Stoffe dar. Diese wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop in unterschiedlich hoher Auflösung aufgenommen, um sie so besser miteinander vergleichen zu können. Die Fusion, das heißt die Verschmelzung der Kristalle miteinander soll insbesondere verglichen werden.

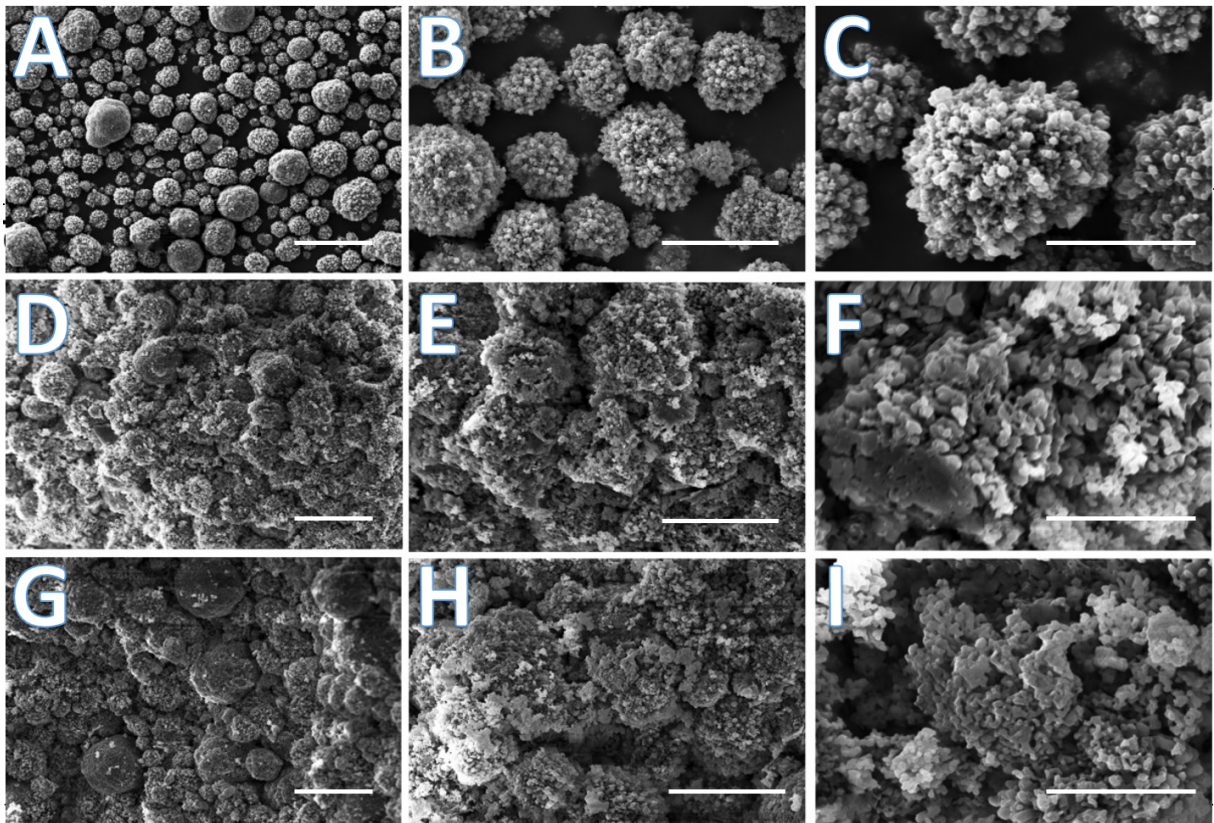


Abb. 13. Sinterreihe einer Mischung aus HA (80%) und Ca-PolyP (20%); ESEM. A-C wurde bei einem Anstieg von 2 °C auf eine Endtemperatur von 800 °C gebracht. D-F wurde bei einem Anstieg von 5 °C auf eine Endtemperatur von 800 °C gebracht. G-I wurde bei einem Anstieg von 2 °C auf eine Endtemperatur von 1250 °C gebracht. Die zunehmende Verschmelzung der beiden Ausgangsmaterialien ist in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbar. Bei der linken Spalte entspricht der Messbalken 20 μm , in der Mitte 5 μm , und rechts 2 μm .

Die Abbildung 13 zeigt HA bei verschiedenen Sinter Temperaturen. Die Probe enthält zu 80% HA und zu 20% Ca-PolyP, wobei einige Tropfen Polyvinylalkohol (PVA) hinzugegeben wurden, damit sich die Stoffe verbinden können.

Bei einer Temperatur von 1250 °C (G-I) ist das HA sehr porig und es bildet sich keine homogene Oberfläche. Bei einer Endtemperatur von 800 °C sieht man einen Unterschied zwischen dem Anstieg von 2 °C und 5 °C. Bei einem Anstieg von 5 °C (D-F) sind die HA-Kristalle kaum von den Ca-PolyP Nanopartikeln bedeckt; sie hängen eher an dem Layer. Im Gegensatz dazu sieht man bei der Probe mit dem Anstieg von 2 °C runde glatte HA-Kristalle (A-C), welche vollständig von Ca-PolyP Nanopartikeln umgeben und daher als reine Kristalle kaum erkennbar sind. Hier fusioniert das Ca-PolyP mit dem HA.

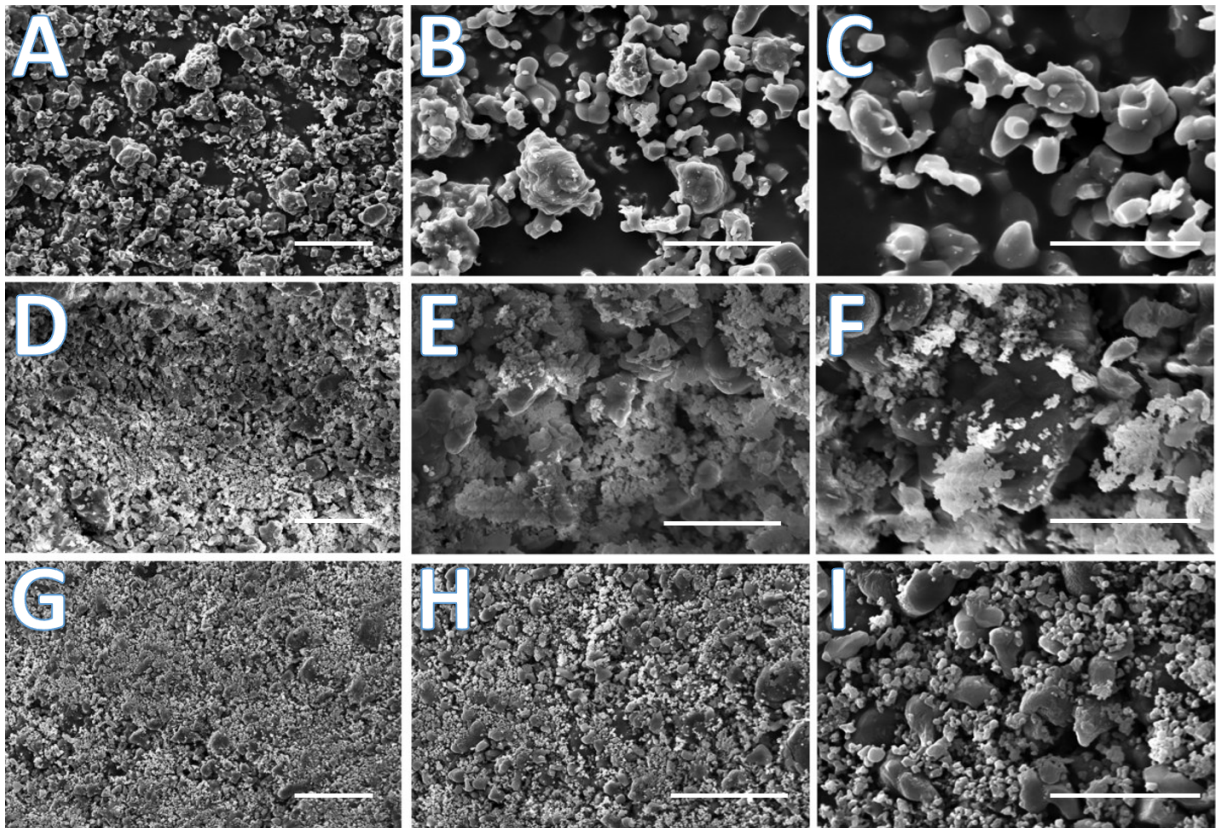


Abb. 14. Sinterreihe einer Mischung aus β -TCP (80%) und Ca-PolyP (20%); ESEM. A-C wurde bei einem Anstieg von 2 °C auf eine Endtemperatur von 800 °C gebracht. D-F wurde bei einem Anstieg von 5 °C auf eine Endtemperatur von 800 °C gebracht. G-I wurde bei einem Anstieg von 2 °C auf eine Endtemperatur von 1250 °C gebracht. Die Aufnahmen zeigen, dass es bei den beiden oben genannten Materialien ebenfalls zu einer Zunahme der Verschmelzung kommt. Bei der linken Spalte entspricht der Messbalken 20 μm , in der Mitte 5 μm , und rechts 2 μm .

Abbildung 14 zeigt die Sinterreihe von β -TCP im Rasterelektronenmikroskop. Hierbei besteht die Probe aus 80% β -TCP und 20% Ca-PolyP. In Bezug auf das Mischungsverhältnis ist sie genauso wie die HA Probe aufgebaut. Bei 1250 °C (G-I) ist die Probe zwar porös, die Kristalle sind jedoch auch miteinander fusioniert. Hier wurde dieselbe Unterscheidung im Temperaturanstieg genutzt wie bei der vorherigen Probe, um beide Proben miteinander vergleichen zu können. Der Anstieg von 5 °C (D-F) zeigt „nackte“ Nanopartikel aus Ca-PolyP auf dem TCP; sie sind jedoch völlig isoliert voneinander. Beim 2 °C Anstieg (A-C) sind die Nanopartikel aus Ca-PolyP auch nicht fest auf mit dem TCP verbunden, sie lagern sich jedoch darauf an. Im Vergleich zu HA und Ca-PolyP fusionieren die Nanopartikel schlechter mit TCP.

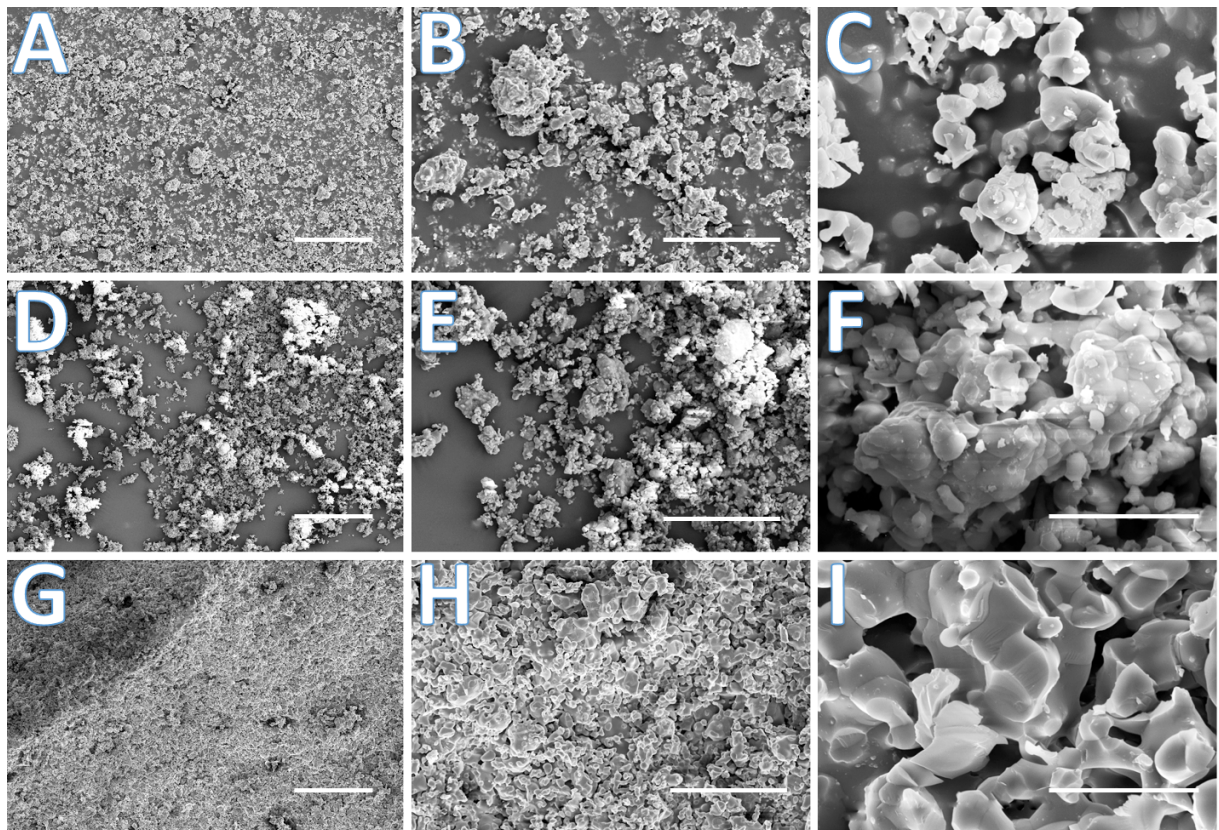


Abb. 15. Ca-PolyP Sinterreihe ESEM. A-C wurde bei einem Anstieg von 2 °C auf eine Endtemperatur von 800 °C gebracht. D-F wurde bei einem Anstieg von 5 °C auf eine Endtemperatur von 800 °C gebracht. G-I wurde bei einem Anstieg von 2 °C auf eine Endtemperatur von 1250 °C gebracht. Bei den Aufnahmen von Ca-PolyP tritt bei Zunahme der Temperatur eine höhere Fusion der Partikel auf. Bei der linken Spalte entspricht der Messbalken 20 µm, in der Mitte 5 µm, und rechts 2 µm.

Auf Abbildung 15 sieht man die Sinterreihe von Ca-PolyP bei verschiedenen Temperaturen und unterschiedlichen Anstiegen. Bei vorher getrocknetem Ca-PolyP lassen sich die Nanopartikel sehr gut erkennen; es sieht aus wie unbehandeltes, nicht getrocknetes Ca-PolyP. Bei einer Endtemperatur von 800 °C und einem Anstieg von 2 °C (A-C) erkennt man ein eher poröses Bild, bei dem die Nanopartikel nicht fusioniert sind, sondern in ihrer Struktur klar erkennbar sind. Im Gegensatz dazu steht die Probe mit dem Anstieg von 5 °C pro Minute (D-F). Hierbei sieht man eine stärkere Fusion der Nanopartikel als bei dem geringeren Anstieg; es zeigt sich eine homogenere Struktur, die keine Porositäten aufweist. Bei der höchsten Messung von 1250 °C (G-I) sieht man eine komplette Verschmelzung.

4.2 Härtemessung

Die Härtemessung wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt und mit Hilfe eines Nanoindentators am Enamel gemessen. In der folgenden Abbildung 17 befinden sich repräsentative Belastungs- sowie Verschiebungskurven für die Zahnproben in den unterschiedlichen Medien. Zur Unterstützung der Berechnung der jeweiligen Werte für die Martens-Härte und das Elastizitätsmodul wurde das Softwarepaket Nano-Test Platform Four V.40.08 benutzt.

Die Abbildung zeigt, dass die Na-PolyP Beschichtung des Zahns eine höhere Härte im Vergleich zur Ca-PolyP und PBS Kontrolle aufweist. Dies lässt sich mit Hilfe des Diamanteindringkörpers erklären, welcher eine höhere Kraft braucht, um die gewünschte Eindringtiefe von 1000 nm zu erreichen. Bei Ca-PolyP und der PBS Kontrolle wird weniger Kraft benötigt, wobei für die Ca-PolyP Probe noch mehr Kraft benötigt wird als für die PBS Kontrolle.

Unterstützt werden die Beobachtungen durch die Tabelle 3, die die berechneten Werte für die Martens Härte und das Elastizitätsmodul darstellt.

	PBS	Na-PolyP	Ca-PolyP
HM (GPa)	0,56±0,11	0,66±0,11	0,6±0,08
Er (GPa)	25,8±2,79	23,57±3,56	22,29±1,82

Tabelle 3 Härte (HM) und Elastizitätsmodul (Er) des Zahnenamels nach Behandlung mit Na-PolyP und Ca-PolyP im Vergleich zur Kontrolle (PBS)

Die Entlastungsabschnitte der einzelnen Belastungs- und Verschiebungskurven laufen nahezu rechtwinklig zur X-Achse, der Abszisse. Daraus lässt sich ableiten, dass die drei Materialien minimale elastische Rückstelleigenschaften aufweisen. Auch diese Beobachtung lässt sich anhand der Werte aus Tabelle 2 für das Elastizitätsmodul bestätigen. Die Werte liegen alle in einem ähnlichen Bereich. Die Oberflächeneigenschaften der Proben mit PolyP verändern sich nicht signifikant, jedoch ist deutlich erkennbar, dass die Härte bei vorheriger Inkubation mit verschiedenen PolyP ansteigt.

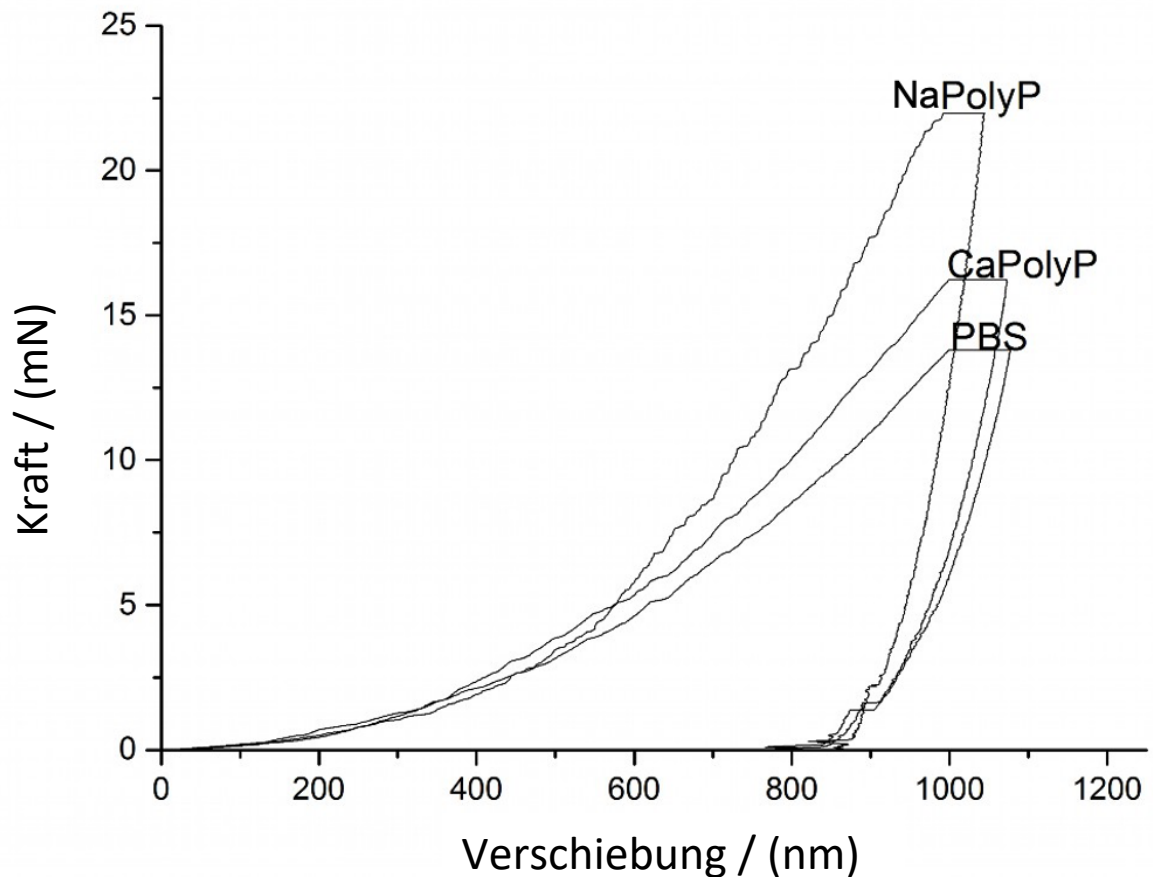


Abb. 16. Härtemessung des Zahnenamels nach Behandlung mit Na-PolyP (PolyP) und Ca-PolyP im Vergleich zur Kontrolle (PBS)

4.3 Inkubation in erhöhter Luftfeuchtigkeit

Für den Versuch mit der Inkubation in erhöhter Luftfeuchtigkeit wurden die Proben 24 h feucht gehalten. Der detaillierte Hergang ist dem Methodenteil zu entnehmen.

Die Abbildung 17 zeigt drei verschiedene Proben, die unterschiedlich behandelt wurden. Links wurde jeweils eine etwas größer Menge genommen und anschließend zerdrückt, um das Bruchverhalten zu beurteilen. Auf der rechten Seite sieht man die ausgestrichene Probe nach dem Trocknen.

Probe 1: Na-PolyP 24 h eingewirkt, 20 min CaCl_2 dann trocknen 24 h

Probe 2: Na-PolyP 5 min eingewirkt, 5 min CaCl_2 dann in die feuchte Kammer 24 h

Probe 3: Na-PolyP 5 min eingewirkt, 5 min CaCl_2 dann trocknen 24 h

Probe 1 ist fest, zerfällt auf leichten Druck in größere Brocken, jedoch zerbröseln es nicht direkt. Bei Probe 2, welche in der feuchten Kammer war, kann man von einer, kneteartigen Konsistenz sprechen. Die Probe zerbröseln zwar auch bei leichtem Druck, jedoch lässt sie sich wieder zu einer homogenen Masse zusammenpressen. Im Vergleich zu Probe 1 ist sie auch stabiler. Im Gegensatz zu den anderen beiden ist die dritte Probe die instabilste. Sie zerbröseln bei leichtem Druck direkt, ohne vorher in Brocken zu zerfallen und lässt sich auch nicht wieder zusammenfügen.

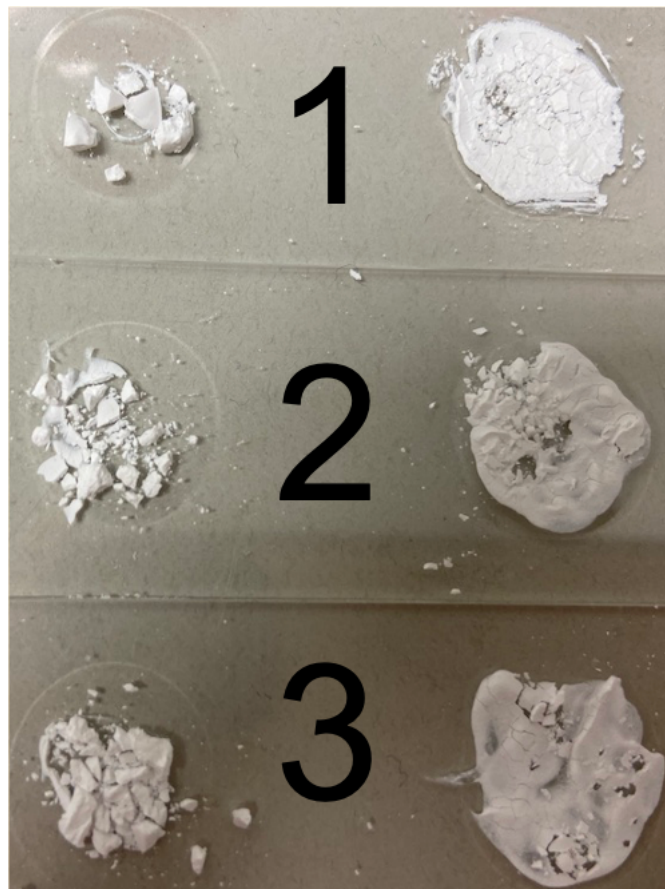


Abb. 17. Proben nach Inkubation in erhöhter Luftfeuchtigkeit. Auf der linken Seite ist die zerbrochene Probe, auf der rechten Seite die ausgestrichene Probe zu sehen, beide jeweils nach dem Trocknen.

Probe 1: Na-PolyP 24 h eingewirkt, 20 min CaCl_2 dann trocknen 24 h

Probe 2: Na-PolyP 5 min eingewirkt, 5 min CaCl_2 dann in die feuchte Kammer 24 h

Probe 3: Na-PolyP 5 min eingewirkt, 5 min CaCl_2 dann trocknen 24 h

Als Ergänzung wurde Na-PolyP direkt mit CaCl_2 gemischt und einmal in der feuchten Kammer und einmal an der Luft trocknen lassen. Ohne lange Inkubationszeiten

unterscheiden sich die beiden Konsistenzen hierbei deutlich. Beide sind anfangs pastenartig, jedoch bröseln die Probe, die an der Luft getrocknet ist, stark, wobei die Probe aus der feuchten Kammer nach dem Trocknen ihre pastenartige Konsistenz beibehält. Sie ist sehr gut verformbar.

4.4 Mineralisierung der Zellen

Wie bereits im Methodenteil beschrieben wurde eine Kultivierung in SaOS-2-Zellen durchgeführt, für die Wirkung von PolyP auf das Wachstum der Zellen oder den Erhalt der bisherigen Anzahl der Zellen. Hierbei ist auch die Bildung von enamelähnlichem Mineral möglich, da dieses HA ähnelt. In besagtem Zellsystem ist es möglich, quantitative Ergebnisse hervorzubringen. Am Zahn selbst wäre dies nicht möglich.

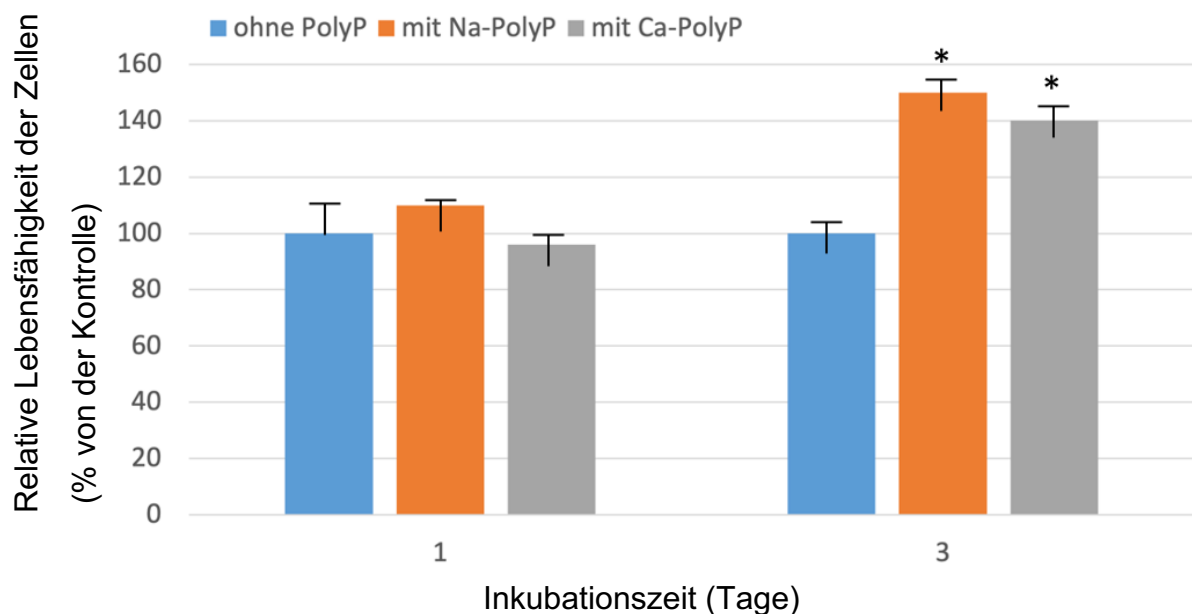


Abb. 18. Lebensfähigkeit der Zellen nach Inkubation für 1-3 Tage. Die Kontrolle (ohne PolyP) wurde auf 100% Lebensfähigkeit der Zellen gesetzt. PolyP wurde bei einer Konzentration von 50 µg/ml zugefügt. Signifikanz $p \leq 0,05$ (n=5)

Um die Lebensfähigkeit und das Wachstum der Zellen beurteilen zu können, wurde der (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) (MTT) - Test durchgeführt. Als 100% Marke wurden, die nicht vorhandenen Werte von PolyP der Messung definiert.

Anhand der ermittelten Daten lässt sich erkennen, dass es keinen signifikanten Unterschied der Proben mit oder ohne PolyP bei einer Inkubationszeit von einem Tag gibt. Es sind also nahezu keine Zellen gewachsen oder gestorben.

Betrachtet man die Abbildung 18, ist eine deutliche Vermehrung der Zellen in den PolyP haltigen Proben nach drei Tagen erkennbar. Ungefähr 40% mehr Zellwachstum lässt sich beobachten.

Die Zellen wurden zu Beginn des Experiments zunächst drei Tage lang ohne MAC inkubiert. Hierbei gab es eine Probe ohne PolyP, eine mit Ca-PolyP und eine mit Na-PolyP. Verwendet wurden jeweils 50 µg/ml des PolyP.

Anschließend wurde MAC hinzugefügt, und es erfolgte eine Fortsetzung der Inkubation für weitere 3-8 Tage. Zur Bestimmung wurde der Anthrachinon-Farbstoff Alizarinrot S (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) mit Hilfe einer spektroskopischen Technik verwendet. Bewertet werden soll die Produktion von hydroxylapatitähnlichen Ablagerungen in den SaOS-2-Zellen.

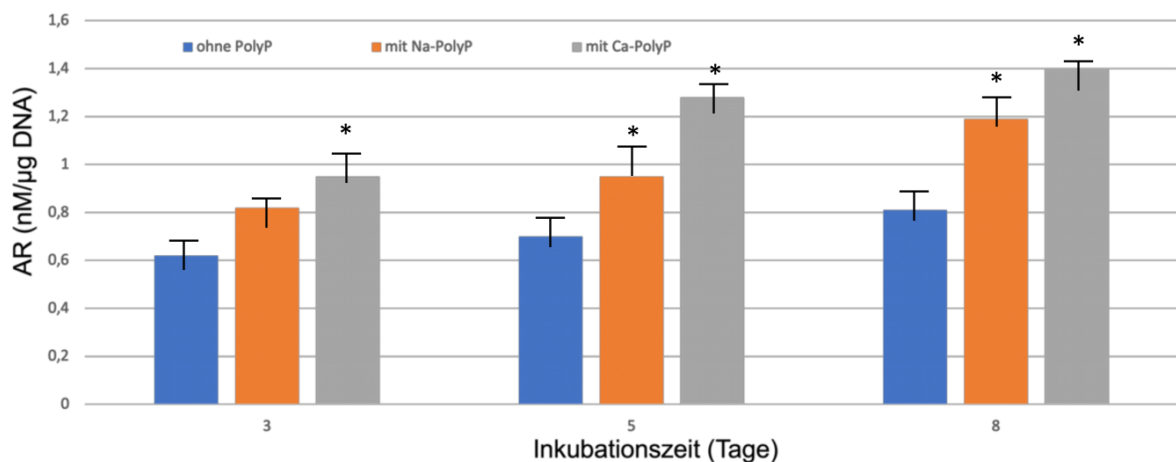


Abb. 19. PolyP induzierte Mineralisierung von Zellen nach 3-8 Tagen. Die Kontrolle (ohne PolyP) wurde auf 100% Lebensfähigkeit der Zellen gesetzt. PolyP wurde bei einer Konzentration von 50 µg/ml zugefügt. Signifikanz $p \leq 0,05$ ($n=5$).

Der Wert für das Alizarinrot S bei der Probe ohne PolyP weist keine signifikante Veränderung über die 3-8-tägige Inkubation auf und pendelt sich bei $0,61 \pm 0,12$ nM/µg DNA ein.

Deutlich mehr hydroxylapatitartige Ablagerungen sind bei den beiden anderen Proben erkennbar, die beide jeweils PolyP ausgesetzt waren.

Die PolyP Kulturen unterscheiden sich jedoch im Verlauf und dem Ergebnis nach der achttägigen Inkubation. Na-PolyP hat einen signifikanten Anstieg nach acht Tagen auf $1,17 \pm 0,14$ nM/ μ g DNA, wobei er nach fünf Tagen noch nicht signifikant höher war.

Ca-PolyP hingegen weist bereits nach drei Tagen einen signifikant höheren Anstieg im Vergleich zu den anderen beiden Proben auf, der nach acht Tagen dann bei $1,41 \pm 0,13$ nM/ μ g DNA liegt. Er hat demnach konstant zugenommen, und die Zellen haben sich vermehrt.

5 Diskussion

5.1 Kritische Betrachtung der eigenen Untersuchung

Die Ergebnisse der vorliegenden Versuche fügen sich grundsätzlich in die Erkenntnisse bereits abgeschlossener Studien ein und bestätigen frühere Untersuchungen im Wesentlichen.

Sie unterstreichen, dass der Einfluss von PolyP eine wichtige Rolle auf das Enamel hat. PolyP ist unter bestimmten Bedingungen ein Stoff, der das Enamel unterstützt und in seinen Eigenschaften variieren kann. Das Phänomen von PolyP lässt sich durch unterschiedliche Versuche und Messmethoden veranschaulichen. Messdaten und Bildmaterial verdeutlichen dies.

Der Idee der Arbeit ein „neues“ Material zu finden, um Zähne restaurieren zu können, sind wir ein großes Stück nähergekommen. Viele Eigenschaften konnten wir quantitativ belegen und nachweisen, sodass wir der Gestaltung des idealen Werkstoffs einen Schritt nähergekommen sind.

Die Anzahl der Proben reicht, um zu einigen wichtigen Aussagen zu kommen. Eine Studie mit einer größeren Probenanzahl noch durchgeführt werden. Bei einer größer angelegten Studie würden kleinere Messfehler und Veränderungen sowie Kontaminationen und Abweichungen aufgrund von Fehlern bei der Durchführung statistisch nicht so stark ins Gewicht fallen, wie es in dieser Arbeit passiert sein könnte.

Ein weiterer Punkt ist die nicht eindeutige Herkunft der Zähne, welche im Idealfall bekannt sein sollte. Es gibt keine Angaben zu der Person, welche die Zähne extrahiert bekommen hat. Weder sind Geschlecht, Alter, Zustand des restlichen Gebisses und die allgemeine Mundhygiene bekannt. Externe Fluoridierungen, Essgewohnheiten und die Speichelzusammensetzung haben einen Einfluss auf das Enamel und können in der vorliegenden Untersuchung zu ungenauen Ergebnissen geführt haben, da Zähne von verschiedenen Probanden entnommen wurden.

Darüber hinaus wäre es sinnvoll, Zähne verschiedener Zahnkategorien zu untersuchen, denn Inzisiven und Molaren sind in ihrem Aufbau und der Struktur nicht identisch und weisen unterschiedlich dicke Enamelschichten auf.

Die Art der Entnahme und die Lagerung der Proben sowie der Transport zum Labor können nur vermutet werden, denn auch hierbei können Abweichungen vom

vorgegebenen Protokoll entstanden sein, die einen Einfluss auf das jeweilige Ergebnis haben.

Bei der finalen Probenherstellung ist eine Kontamination mit anderen Partikeln nicht auszuschließen, denn es bedarf einiger Schritte, vom Schneiden über das Einbetten in Kunststoff und die unterschiedlichen Inkubationen, sowie das Trocknen an der Luft.

Temperatur und Luftfeuchtigkeit spielen bei einigen Messmethoden eine große Rolle, die zwar beachtet wurden, jedoch bei kleinen Fehlern einen großen Einfluss auf die Proben haben können.

Das Bildmaterial der Mikroskope zeigt jeweils nur einen Ausschnitt der Probe, sodass ein anderer Teil gegeben falls nicht abgebildet und diskutiert wird.

5.2 Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur

Es wurden schon viele Studien zu Zahnersatzmaterialien durchgeführt, die als Grundlage dienen, einen idealen Werkstoff herzustellen. Mittlerweile ist die Biokompatibilität von großer Bedeutung, und es wird immer mehr daran geforscht, ein nahezu körpereigenes Produkt zu entwickeln, um eine deutlich bessere Anpassung zu erzielen. Bereits in den 1970er Jahren wurde versucht, eine biokompatible Keramik herzustellen. Hierzu hat Hench 1991 erste Studien veröffentlicht (Hench *et al.*, 1991).

Zur Herstellung eines biokompatibel hergestellten Zahnersatzmaterials verwendeten wir Zahnproben aus dem menschlichen Mundraum und biologisierten sie mit PolyP. Neben vielen anderen biologischen Funktionen ist seit langem bekannt, dass Phosphat eine wichtige Rolle bei der Mineralisierung von Hartgewebe spielt. Orthophosphat (PO_4^{3-}) und Kalziumionen (Ca^{2+}) bilden zusammen die biologische Mineralphase Apatit, die in Knochen und Zähnen zu finden ist.

Dieses physiologische anorganische Polymer, das in jedem Zelltyp des Menschen vorkommt (Morrissey *et al.*, 2012), ist als morphogenetisches Additiv für die bearbeiteten Zahnproben zu verwenden. Phosphat kann auch als anorganisches lineares PolyP vorkommen. Seine chemische Struktur ist sehr einfach und besteht aus linear angeordneten Phosphateinheiten, die durch energiereiche Phosphoanhydridbindungen verbunden sind.

Frühere Studien haben gezeigt, dass PolyP morphogenetisch aktiv ist. Es induziert die Expression von Proteinen und Enzymen, die für anabole Wege in der Zellproliferation, -differenzierung und -funktion erforderlich sind. Wang beschreibt diesen Vorgang detailliert (Wang *et al.*, 2018).

Weitere Arbeiten haben gezeigt, dass Polyphosphate an HA binden. Dies stützt die Annahme, dass die Hemmung der Kalzifizierung durch PolyP durch Adsorption des anorganischen Polymers an die Wachstumsstellen der Kristalle mit gleicher oder besserer Wirksamkeit als Pyrophosphat erfolgen könnte (Fleisch *et al.*, 1961). Die daraus resultierende Schlüsselrolle von Pyrophosphat bei der Regulierung der physiologischen und pathologischen Mineralisierung ist inzwischen sowohl beim Menschen als auch bei Tieren gut erforscht. Das Pyrophosphat ermöglicht hierbei das Fortschreiten der Mineralisierung (Fleisch *et al.*, 1966).

Ein Bestandteil stellt die alkalische Phosphatase (ALP) dar (Müller *et al.*, 2011), ein Enzym, das in einer prozessiven Weise das Polymer hydrolytisch spaltet (Lorenz *et al.*, 2001). ALP ist zusätzlich das Enzym, das Pyrophosphat hydrolysiert, welches sich während der Knochenbildung anreichert (Orimo *et al.*, 2010). Dass es bei der Zahnbildung auch eine wichtige Rolle spielen kann, liegt nahe, da beide eine ähnliche Struktur aufweisen und grundsätzlich ein ähnliches Verhalten in Studien nachweisbar ist.

Wichtig ist, dass Na-PolyP in einem biomimetischen Prozess zu amorphen Ca-PolyP-Nano-/Mikropartikeln verarbeitet wurde (Müller *et al.*, 2015). Nach Kontakt mit Peptiden und Proteinen wird diese Speicherform koazerviert und dadurch funktionell aktiv (Müller *et al.*, 2018a). Ca-PolyP hat sowohl in vivo als auch in vitro eine wachstumsstimulierende Wirkung auf Knochenzellen, weshalb es in unserem Versuch auch für die Stimulierung des Wachstums von Zellen auf Zähnen genutzt wird (Müller *et al.*, 2019a).

Bei unserer Studie hat man Na-PolyP-Lösungen benutzt, um die Zahnproben zu inkubieren, wodurch eine Beschichtung dieser entstehen soll. Es ist davon auszugehen, dass sich das Na-PolyP über Salzbindungen an den Zahn heften kann, da die negative Phosphatgruppe mit den positiv geladenen Calciumionen an der HA Schicht wechselwirken kann (Pearce *et al.*, 1981). In einer Umgebung mit physiologischem pH-Wert weist jedes Polymer eine einwertige negative Ladung auf, was aus dem Polymer ein stark anionisches Polymer macht. Hierbei wird

angenommen, dass eine Infiltration mit Na^+ durch das Eintauchen in die Lösung und die daraus resultierende Schicht stattfindet.

Die Versuche werden auf der Grundlage durchgeführt, dass Natriumionen im Gegensatz zu Kaliumionen nicht nur in der Lage sind, Ionen in der Hydratationsschicht von HA-Kristallen zu verdrängen, sondern auch in die Kristalloberflächen einzudringen und mit Ca^{2+} -Ionen auszutauschen (Neuman *et al.*, 1956).

Grundsätzlich könnten die Na^+ -Ionen für den Austausch aus dem Na-PolyP sowohl mit Ca^{2+} -Ionen aus der Hydratationshülle als auch aus der Oberfläche oder dem Inneren der HA-Kristallstruktur verantwortlich sein. Es besteht die Annahme, dass dieser Ionenaustausch höchstwahrscheinlich die Hydratationsschale und die Oberfläche der HA-Kristalle betrifft (Neuman *et al.*, 1956).

Da PolyP in großen Mengen beim Menschen besonders in osteoblastenähnlichen Zellen vorkommt, geht man davon aus, dass es eine bedeutende Rolle in der Knochenbiologie spielen kann und somit auch bei der Zahnbildung (Arcos *et al.*, 2020).

Ein Ca^{2+} -Ion müsste durch zwei Na^+ -Ionen ersetzt werden, um die Elektroneutralität aufrechtzuerhalten. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass aus Platzgründen (beide Ionen haben ähnliche Radien) die Position eines Ca^{2+} -Ions durch weniger als zwei Na^+ -Ionen ersetzt wird, welche in die Kristalloberfläche eindringen, was anschließend zu einer Änderung der Nettoladung des HA-Kristalls führt (Neuman *et al.*, 1953).

Die PolyP-infiltrierten Zahnproben wurden in einem weiteren Schritt mit CaCl_2 inkubiert. Auffällig ist die Bildung von Ca-PolyP-Mikropartikeln auf der Oberflächenschicht (Ca-PolyP-MP-Beschichtung), die eine ähnliche Morphologie und Größe aufweisen wie die Partikel ohne Zahn. Sie lagern sich in Teilen richtig an und verbinden sich mit dem Zahn. Die Partikel aus reinem Na-PolyP und CaCl_2 sind etwas kleiner als jene, bei denen Ca-PolyP hinzugefügt werden.

Bemerkenswert war die Feststellung, dass die Martens-Härte der mit Ca-PolyP-MP ummantelten Zahnproben geringfügig, aber nicht signifikant niedriger war als diese mit Na-PolyP. Bei menschlichem Knochen wurde ein ähnliches Experiment durchgeführt. Hier war die Probe mit Ca-PolyP härter. In diesem Beispiel zeigt sich wieder ein Unterschied zwischen allogenen humanen Knochen und dem Enamel, der zwar chemisch eine sehr ähnliche Struktur aufweist, jedoch auch durch signifikante Unterschiede geprägt ist (Dorozhkin *et al.*, 2002).

Wie bereits andere Studien belegen, zeigten die Untersuchungen mit den SaOS-2-Zellen auch in unserer Studie eine um etwa 30% höhere Wachstumsrate als die Kontrolle. Hierbei wurden diese zusammen mit Na-PolyP oder Ca-PolyP-MP kultiviert und nach einer dreitägigen Inkubationszeit gezählt (Müller *et al.*, 2015). Die Bildung mineralischer Ablagerungen der SaOS-2-Zellen nahm nach der Exposition gegenüber Na-PolyP und Ca-PolyP-MP über die Zeit der dreitägigen bis achttägigen Inkubationszeit deutlich zu.

Neben der Erhöhung Wachstumsraten der Zellen wurde in einem weiteren Versuch das Anheftungsverhalten mikroskopisch festgehalten. Auch hier zeigen Na-PolyP und Ca-PolyP eine positive Wirkung. Nach drei Tagen sind deutlich mehr anhaftende Zellen zu sehen als bei der Kontrollprobe. Die Beschichtung, die bereits beschrieben wurde, hat hier stattgefunden und ist so nachweisbar.

Bereits nach 2-4 h Inkubationszeit der Zahnprobe wandelt sich die PolyP Ummantelung in eine Koazervatschicht um. Bekannt ist diese Umwandlung bereits aus früheren Studien und wurde hier erneut dokumentiert (Müller *et al.*, 2018a). Das Phänomen der Umwandlung funktioniert jedoch nur, wenn die Partikel oder die vollständige Ummantelungsschicht aus PolyP in ein wässriges, protein- und peptidhaltiges Milieu überführt werden. Diese Phase aus Koazervaten stellt das funktionelle aktive morphogenetische Stadium von PolyP dar.

Dieses funktionelle aktive morphogenetische Stadium ist für den medizinischen Einsatz von großer Bedeutung, da es das Material „aktiviert“.

Einen Tag nach der Inkubation der Proben in das Serum lässt sich nachweisen, dass sich in den kristallinen Hohlräumen die SaOS-2-Zellen als kugelförmige Morphologie an den Zahn anlagern.

Bei den Proben, die vorher mit PolyP bearbeitet wurden, zeigt sich ein Gegensatz zu der Kontrollprobe. Es lassen sich zwar Zellen erkennen, jedoch sind diese in ihrer Morphologie unterschiedlich. Ein aktiv metabolisierendes Ausbreitungsmuster wird hierbei sichtbar (Cavalcanti-Adam *et al.*, 2007), wobei lange Ausstülpungen und eingestreute Einziehungen prominent vertreten sind.

Auffällig ist die Probe mit Ca-PolyP. Man kann die Umhüllung durch die PolyP-Koazervatschicht vermuten. Drei Tage nach dem Beginn der Inkubation ist die eben beschriebene Koazervatschicht verschwunden, und es besteht die Möglichkeit für die

Zellen, ihre kugelförmige Morphologie anzunehmen. Dadurch können sie sich in den kristallinen Hohlräumen etablieren und wachsen.

Bei der Anwendung von kristallinem HA muss man auf einige Faktoren achten. Es ist zwar biokompatibel, jedoch aufgrund der nachteiligen physikalischen und mechanischen Eigenschaften, wie die geringe Löslichkeit und die Sprödigkeit, derzeit auf Pulver, Beschichtungen und poröse Körper sowie nicht tragende Implantate beschränkt (Wang *et al.*, 2015). Synthetisiert man CaP auch in der Hybridform, kann es in einer amorphen Phase synthetisiert und die bereits beschriebenen Eigenschaften können umgangen werden.

Sobald man eine ACP-Schicht auf das Implantat aufbringt, ist jetzt eine bessere Implantatfixierung bewiesen. Nicht nur ist die Fixierung besser, sondern auch die Reaktion des umliegenden Gewebes bei der Aufnahme. Im vorliegenden Beispiel wurde es an humanem Knochen getestet, was dank der ähnlichen Eigenschaften zu Zähnen auf eine gleiche Reaktion hindeutet (Yokota *et al.*, 2014). Polyphosphatiertes CaP kann laut den vorliegenden Daten dieser Studie in Kombination mit einer zellwachstumsfördernden Aktivität eine ausgeprägte morphogenetische Aktivität aufweisen. ALP, das als Enzym den Osteoblasten Orthophosphat liefert durch welches Biomaterialien gebildet werden können, und für die Differenzierung und Proliferation von Zellen verantwortlich ist, wird in diesem Versuch hochreguliert und findet sich in dem Medium aus SaOS-2-Zellen vermehrt wieder (Golub *et al.*, 2007).

Auffällig ist die morphogenetische Aktivität, die durch kristallines und gesintertes HA ausgelöst wird, wenn zum Beispiel ALP induziert wird. Sichtbar ist das besonders in Gerüsten mit Wachstumsfaktoren. Wird diesem Substrat PolyP und CaCl_2 hinzugefügt, verändert sich die HA-Partikel-Bildung, und die Ablagerungen erhalten eine andere Morphologie.

Die Zunahme der HA-Partikel steht mit veröffentlichten Daten im Einklang, die zeigen, dass Zusatzstoffe zu HA in der Regel zu einer Zunahme der Kristallablagerungen führen, (Sadat-Shojai *et al.*, 2013). An der Oberfläche von HA-Kristallen befinden sich ionische Phosphatgruppen (Harding *et al.*, 2005), die es Ca^{2+} ermöglichen, Brücken zu den Phosphatgruppen innerhalb der PolyP-Kette zu bilden und sich so zu binden. Daraus ließe sich schließen, dass sich PolyP an der Oberfläche der einzelnen CaP-Ablagerungen, -Kugeln oder -Kristallen anreichert.

Aktuellen Studien zufolge kann angenommen werden, dass die HA-Oberfläche PolyP und Orthophosphat die Möglichkeit gibt zu fusionieren und so miteinander zu verschmelzen (Rivas *et al.*, 2015).

Dieses Phänomen bringt uns zu der Annahme, dass PolyP sich über Ca^{2+} dank der ionischen Phosphatgruppen des PolyP an ebendiese Kristalle binden kann. Diese Verbindung besitzt eine morphogenetische Aktivität und ist daher für den Einsatz und die Weiterentwicklung künstlicher Implantate von großer Bedeutung, denn dieses wird aus physiologischen Polymeren und Stoffwechselprodukten hergestellt.

Die unterschiedlichen Sinterreihen liefern wichtige Aufschlüsse für die weitere Entwicklung des Werkstoffs. Ein klarer Zusammenhang zwischen den Endtemperaturen und dem Anstieg pro Minute ist zu verzeichnen. Die anschließenden Messungen und Untersuchungen zeigen, dass ein geringer Anstieg der Temperatur sehr wichtig für die feste und glatte Struktur ist. Die Endtemperatur von 800 °C hat sich in unseren Versuchen als sehr gut erwiesen. Wir erhalten eine glatte und homogene Oberfläche, die das Verarbeiten des Materials vereinfacht und eine deutlich größere Stabilität mit sich bringt als eine bereits beschädigte, rissige Oberfläche. 1250 °C fusioniert teilweise zu stark, sodass jede kristallene Struktur zerstört wird.

Möglicherweise kann man das Material direkt mittels eines dreidimensionalen Druckers in Form bringen und anschließend sintern. Daher ist die Volumenänderung von großer Bedeutung, denn diese ist während der Erhitzung verhältnismäßig stark. Es müssten weitere Studien durchgeführt werden, um zu sehen, ob die Volumenschrumpfung immer konstant ist. Um das gewünschte Ergebnis zu erzielen, könnte man die ermittelte Schrumpfung des Materials mit der geplanten Form verrechnen; Dadurch erhielte man eine passgenaue Form nach dem Sintern.

Neben den vorangegangenen Studien zu biokompatiblen Zahnersatzmaterial sind für diese Arbeit auch jene wichtig, die sich mit der Problematik der Mineralisation von Enamel beschäftigen und auf die Bekämpfung von Kariesschäden Bezug nehmen.

Bei etlichen Studien geht es um die allgemeine Struktur und Mineralisation der Zahnhartsubstanz, was wichtig für uns ist, um einen passenden chemischen Werkstoff zu produzieren, der der Struktur gleichkommt.

Bei vielen weiteren Studien geht es um die verschiedenen Faktoren, die einen großen Einfluss auf die Zahnhartsubstanz haben. Hierbei wird der Einfluss von Fluoriden (Huang *et al.*, 1998) und dem Lebensalter (He *et al.*, 2011) auf das Enamel untersucht.

Die allgemeine Säureanfälligkeit (Johnston *et al.*, 1996) sowie die Fähigkeit zur Remineralisation (Hariri *et al.*, 2013) werden gerne genauer betrachtet. Grundsätzlich wird der strukturelle Aufbau von Enamel und seinen Bestandteilen analysiert und dokumentiert (Braly *et al.*, 2007).

Der Zusammenhang zwischen der Kariesanfälligkeit und der Erziehung zur Mundhygiene (Riyat *et al.*, 2009) wird genauso untersucht wie unterschiedliche Ethnien und hieraus resultierende verschiedene medizinische Versorgungsmöglichkeiten (Hanc *et al.*, 2013). Klassische Umweltfaktoren in unterschiedlichen Ausprägungen als Einfluss auf die Zahnhartsubstanz sind auch Bestandteil bereits bestehender Studien zum Thema Enamel (Shashikiran *et al.*, 2007).

Wie bereits von Weatherell (Weatherell *et al.*, 1974) beschrieben, hat der Fluoridgehalt einen großen Stellenwert. Er beschreibt in seiner Studie „Variation des Fluoridgehalts in Oberflächenenamel“ eine deutliche Variation im Laufe des Lebens. Durch Abnutzung und erneuter Einbringung durch den Speichel ist die Mineralisation in einem stetigen Wandel, was sich daraus im Fluoridgehalt zeigt. Hierbei sind auch die unterschiedlichen Zähne von anderem Ausmaß betroffen, da sich zum einen die Abnutzung voneinander unterscheidet, und auch die Nähe zu den Ausgängen der Speicheldrüsen eine Rolle spielt. Ist die Abnutzung gravierend, kann der Wert an Fluorid auf den in den inneren Zahnschichten üblichen Wert sinken.

Demzufolge sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kritisch zu betrachten, denn die von Weatherell als wichtig herausgestellten Fakten wie Alter, Mundhygiene und Fluorideinwirkung sind in unserem Fall unbekannt. Auch die Belastung der einzelnen Zähne ist nicht dokumentiert, jedoch nach Weatherell von Bedeutung in Bezug auf das Fluoridvorkommen. Unsere Proben können demnach unterschiedliche Oberflächenbeschaffenheiten am Enamel aufweisen, was zu ungleichen Grundvoraussetzungen für die Proben führen kann.

Die Position unserer Proben bei der Härtemessung spielt laut einer Studie von Hirose aus dem Jahr 1996 eine wichtige Rolle (Hirose *et al.*, 1996). Er untersucht Fluoridprofile und ihre Unterschiede auf der bukkalen sowie lingualen Seite. In seiner Studie werden zwar nur erste Molaren im Oberkiefer untersucht. Hier zeigt sich bereits ein signifikanter Unterschied.

Die Fluoridkonzentration nimmt in der Reihenfolge von distobukkal über mesiobukkal und distolingual nach mesiolingual ab. Die Belastung auf den Zahn ist an der lingualen Seite größer und der Zungenkontakt stärker. Da die Glandula parotidea auf der bukkalen Seite ihren Austrittspunkt hat, ist eine Aufnahme von Fluoriden aus dem Speichel auf dieser Seite begünstigt. Dadurch entsteht auch eine größere Plaque Belastung; dennoch ist die Fluoridkonzentration an dieser Stelle höher.

In unserer vorliegenden Versuchsreihe müsste demnach der Zahn immer an derselben Stelle gemessen worden sein, was nicht zutrifft. Da die einzelnen Zähne in Scheiben geschnitten wurden, befinden wir uns immer in einer anderen Ebene des Zahnes, und es ist nicht auszuschließen, dass sowohl bukkal als auch lingual Messungen vorgenommen wurden.

Die Studie von Takagi aus dem Jahr 2000 (Takagi *et al.*, 2000) beschreibt den Unterschied von bereits angegriffenen Zähnen. Wenn diese sich danach remineralisieren, ist weniger loses, dafür aber mehr zahngebundenes Fluorid vorhanden. Bereits beschädigte Zähne weisen demzufolge eine höhere Resistenz gegenüber neuen Angriffen auf.

Auch diese Aussage konnte in der durchgeführten Versuchsreihe nicht berücksichtigt werden. Die Zahnproben wurden extern von Zahnärzten extrahiert. Daher können weder die Mundhygiene noch die Fluoridanamnese beurteilt werden. Ob vor der Extraktion bereits Remineralisationsprozesse durch einen Angriff stattgefunden haben, ist nicht bekannt.

Hanc überprüft in seiner Studie (Hanc *et al.*, 2013), inwieweit heute aktuelle Füllungsmaterialien einen Einfluss auf die Mineralisation des Zahns nehmen. Untersucht wurden verschiedene Spurenelemente mit Hilfe eines Verfahrens, das durch Laserablation gestützt ist. Fremde Stoffe wie zum Beispiel Lanthanum sind nach einer Füllungstherapie am Zahn messbar und vorhanden. Andere Spurenelemente, wie Aluminium und Barium, sind nach der Füllung in deutlich höheren Konzentrationen vorhanden.

Die Informationen sind für unser Vorhaben, ein restauratives Material zu finden, das biokompatibel ist und gleichzeitig eine gute Anpassung und Zellwachstumsfähigkeit hat, von keiner geringen Bedeutung. Der chemische Prozess am Zahn nach der Restauration muss klinisch untersucht werden, um mögliche unerwünschte

Wechselwirkungen der unterschiedlichen Stoffe ausschließen zu können und eine lange Haltbarkeit zu gewährleisten.

5.3 Ausblick in die Zukunft

Grundsätzlich bringt diese Arbeit sehr gute Erkenntnisse im Hinblick auf die verschiedenen Werkstoffe. Die Versuchsreihen sollten jedoch erneut durchgeführt werden, um die daraus entstandenen Ergebnisse noch einmal zu bestätigen. In der vorliegenden Arbeit konnte aufgrund des Umfangs jeweils nur eine kleine Anzahl an Proben untersucht werden. Diese haben zwar signifikante Ergebnisse hervorgebracht, jedoch sind viele Fehlerquellen, die bereits in der kritischen Betrachtung der Arbeit detailliert beschrieben wurden, nicht auszuschließen.

Die einzelnen Werkstoffe wurden geprüft und einige Eigenschaften durch Versuche besonders herausgestellt. Für die Verwendung im medizinischen Bereich ist dies ein wichtiger Baustein. Es sind jedoch noch sehr viele Versuche und Studien notwendig, um ein solches Produkt herstellen zu können.

Die morphogenetische Aktivität von Ca-PolyP, um Zellen im Wachstum zu steigern, ist vielversprechend für die Zahnmedizin. Um diese These zu bestärken, sollten ähnliche Versuche mit längeren Inkubationszeiten durchgeführt werden, da das geplante Ersatzmaterial eine langfristige Lösung darstellen soll. Untersucht werden müsste auch die Fähigkeit des Werkstoffs bearbeitet zu werden, insbesondere das Fräsen oder Beschneiden der gesinterten Tabletten. Eine Möglichkeit wäre auch, das Material so zu bearbeiten, dass es mittels eines modernen dreidimensionalen Druckers direkt in die passende Form gedruckt wird. Hierfür könnte man die zuvor entstandene Kavität, die durch den Defekt am Enamel entstanden ist, scannen und so einen digitalen Datensatz erhalten.

In weiteren Studien wäre es interessant zu sehen, inwieweit eine solche Restauration Karies vermeiden kann oder sich mit dem Enamel verbindet und diesen remineralisiert. Möglicherweise kann das Risiko der Entstehung von Sekundärkaries verringert werden, wenn ein Stoff permanent für eine stärkere Remineralisation sorgt und den Defekt durch das Verschmelzen mit der Oberfläche besser verschließt.

All diese Überlegungen sind am besten nach der ersten Erstellung eines Prototyps der Restauration in Studien am Menschen zu untersuchen. Hierbei sollte ein besonderes

Augenmerk auf das Alter, die Mundhygiene, die Speichelzusammensetzung und die externe Fluoridierung gelegt werden, da diese Faktoren einen besonders großen Einfluss auf das Enamel haben.

6 Zusammenfassung

Hintergrund der vorliegenden Arbeit war das zunehmende Interesse an biokompatiblen Materialien, die für Zahnersatzmaterialien genutzt werden können. Menschliches Enamel ist immer wieder einer Demineralisation ausgesetzt, die bestenfalls durch eine Remineralisation aufgefangen werden kann. In der vorhandenen Literatur wird dieses Phänomen öfters beschrieben und ist für viele weitere Untersuchungen als Grundlage genutzt worden.

Ca-PolyP wurde bereits in früheren Versuchen zur Anwendung in Knochenersatzmaterialien verwendet, um eine bessere biologische Wirkung von Werkstoffen, die als Implantatmaterialien verwendet werden, zu erzielen.

Ziel dieser Arbeit war es, einen morphogenetisch aktiven Stoff zu finden, der zur Regeneration der Zahnhartsubstanz dienen kann. Als Vorbild wurden Studien zur Regeneration von Knochen genutzt, die bereits sehr erfolgreiche Ergebnisse erbracht hatten.

In einem ersten Abschnitt wurde zunächst ein Sinterprotokoll von Ca-PolyP aufgestellt, um die beste Einstellung der Vorbehandlung zu ermitteln. Für vergleichbare Werte wurden hier auch HA und β -TCP verwendet. Mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops konnte ein bildlicher Vergleich der unterschiedlichen Stadien der Verschmelzung und Diffusion gezogen werden.

Sinterversuche von Mischungen aus HA und β -TCP mit PolyP (Na-PolyP/Ca-PolyP) waren bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Die neu erbrachten Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen jedoch die an anderen Systemen gewonnenen Ergebnisse in der Literatur, die zeigen, dass die ideale Temperatur sehr stark vom Temperaturanstieg pro Minute während des Sintervorgangs abhängt.

Im nächsten Arbeitsabschnitt wurden frisch extrahierte, weitestgehend gesunde Zähne ein und derselben Zahngruppe verwendet. Aus diesen Zähnen wurden Proben geschnitten, welche scheibenförmig mit einer Dicke von 2 mm vorliegen. Anschließend wurden sie mit Lösungen von Na-PolyP, sowie Suspensionen von Ca-PolyP für einige Tage inkubiert und anschließend ihre mechanischen Eigenschaften mit Hilfe eines Nanoindenters bestimmt. In diesem Versuch ging es um die Härte der einzelnen Proben und ihr Elastizitätsmodul.

Um die morphogenetische Aktivität des hergestellten Materials zu dokumentieren, wurde eine weitere Versuchsreihe mit SaOS-2-Zellen durchgeführt. Das Zellwachstum sowie das allgemeine Verhalten unter physiologischen Bedingungen können bei diesem Versuch sehr gut beobachtet werden. Die Ergebnisse dieser Zellkulturuntersuchung zeigten, dass es in Gegenwart von Na-PolyP und insbesondere von CA-PolyP nicht nur zu einem deutlichen Anstieg des Zellwachstums und der Zellvitalität kommt, sondern auch zu einer starken Erhöhung der Mineralisierung (Hydroxylapatitbildung).

Insgesamt zeigten die Ergebnisse der hier dargestellten Arbeit, dass PolyP entweder in Form von löslichem PolyP, oder als Suspension von Ca-PolyP in Nanopartikeln hervorragende Eigenschaften aufweist um herkömmlichen Materialien, die in der Zahnmedizin verwendet werden, morphogenetische Eigenschaften zu verleihen, und deren mechanische Eigenschaften zu verbessern.

7 Literaturverzeichnis

- Agholme, F., Andersson, T., Tengvall, P., Aspenberg, P. (2012). Local bisphosphonate release versus hydroxyapatite coating for stainless steel screw fixation in rat tibiae. *Journal of Materials Science. Materials in medicine*, 23(3), 743–752. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4539-5>
- Akao, M., Miura, N., Aoki, H., (1984). Fracture toughness of sintered hydroxyapatite and .BETA.-tricalcium phosphate. *Journal of the Ceramic Association, Japan*, 92(1071), 672–674, [online] [doi:10.2109/jcersj1950.92.1071_672](https://doi.org/10.2109/jcersj1950.92.1071_672).
- Alizadeh Naderi, A. S., Reilly, R. F. (2010). Hereditary disorders of renal phosphate wasting. *Nature reviews. Nephrology*, 6(11), 657–665. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2010.121>
- Allen, E. P., Bayne, S. C., Brodine, A. H., Cronin, R. J., Jr, Donovan, T. E., Kois, J. C., Summitt, J. B. (2001). Annual review of selected dental literature: report of the committee on scientific investigation of the american academy of restorative dentistry. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 86(1), 33–56. <https://doi.org/10.1067/mpr.2001.116232>
- Arcos, D., Vallet-Regí, M. (2020). Substituted hydroxyapatite coatings of bone implants. *Journal of Materials Chemistry. B*, 8(9), 1781–1800. <https://doi.org/10.1039/c9tb02710f>
- Attin, T., Deifuss, H., Hellwig, E. (1999). Influence of acidified fluoride gel on abrasion resistance of eroded enamel. *Caries research*, 33(2), 135–139. <https://doi.org/10.1159/000016507>
- Ault-Riché, D., Fraley, C. D., Tzeng, C. M., Kornberg, A. (1998). Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 180(7), 1841–1847. <https://doi.org/10.1128/JB.180.7.1841-1847.1998>
- Baskaradoss, J. K., Geevarghese, A., Roger, C., Thaliath, A. (2013). Prevalence of malocclusion and its relationship with caries among school children aged 11 - 15 years in southern india. *Korean journal of Orthodontics*, 43(1), 35–41. <https://doi.org/10.4041/kjod.2013.43.1.35>
- Braly, A., Darnell, L. A., Mann, A. B., Teaford, M. F., Weihs, T. P. (2007). The effect of prism orientation on the indentation testing of human molar enamel. *Archives of Oral Biology*, 52(9), 856–860. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.03.005>
- Carrilho, M. R., Tay, F. R., Donnelly, A. M., Agee, K. A., Carvalho, R. M., Hosaka, K., Reis, A., Loguercio, A. D., Pashley, D. H. (2009). Membrane permeability properties of dental adhesive films. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied biomaterials*, 88(2), 312–320. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30968>
- ten Cate, J. M., Imfeld, T. (1996). Dental erosion, summary. *European Journal of Oral Sciences*, 104(2 (Pt 2)), 241–244. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1996.tb00073.x>
- Cavalcanti-Adam, E. A., Volberg, T., Micoulet, A., Kessler, H., Geiger, B., Spatz, J. P. (2007). Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophysical Journal*, 92(8), 2964–2974. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.089730>
- Champion E. (2013). Sintering of calcium phosphate bioceramics. *Acta biomaterialia*, 9(4), 5855–5875. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.11.029>
- Clauss, M., Trampuz, A., Borens, O., Bohner, M., Ilchmann, T. (2010). Biofilm formation on bone grafts and bone graft substitutes: comparison of different materials by a standard in vitro test and microcalorimetry. *Acta biomaterialia*, 6(9), 3791–3797. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.03.011>

- Denoirjean-Deriu, P., Bernache-Assollant, D., Gauthier, G. (1993) Cinétique de frittage d'une poudre agglomérée: le nitrure d'aluminium. *Journal de Chimie Physique*. 90 2083–2101, [online] doi:10.1051/jcp/1993902083.
- Dorozhkin S. V. (2010). Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*, 31(7), 1465–1485. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.050>
- Dorozhkin, S. V., Epple, M. (2002). Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 41(17), 3130–3146. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020902\)41:17<3130::AID-ANIE3130>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020902)41:17<3130::AID-ANIE3130>3.0.CO;2-1)
- Dugmore, C. R., Rock, W. P. (2004). A multifactorial analysis of factors associated with dental erosion. *British Dental Journal*, 196(5), 283–273. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4811041>
- Dvir, T., Timko, B. P., Kohane, D. S., Langer, R. (2011). Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature Nanotechnology*, 6(1), 13–22. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.246>
- Enax, J., Fabritius, H.O., Amaechi, B.T., Meyer, F. (2020) Hydroxylapatit als biomimetischer Wirkstoff für die Remineralisation von Zahnschmelz und Dentin. *ZWR - Das Deutsche Zahnärzteblatt*, 129(6) 277–283, [online] doi:10.1055/a-1167-4888.
- Enax, J., Fabritius, H.O., Fabritius-Vilpoux, K., Amaechi, B.T., Meyer, F. (2019). Modes of action and clinical efficacy of particulate hydroxyapatite in preventive oral health care – state of the art. *The Open Dentistry Journal*. 13(1) 274–287, [online] doi:10.2174/1874210601913010274.
- Epple, M., Enax, J. (2018). Moderne Zahnpflege aus chemischer Sicht. *Chemie in unserer Zeit*, 52(4) 218–228, [online] doi:10.1002/ciuz.201800796.
- Fabritius-Vilpoux, K., Enax, J., Herbig, M., Raabe, D., Fabritius, H.O. (2019). Quantitative affinity parameters of synthetic hydroxyapatite and enamel surfaces in vitro. *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials*. 8(2) 141–153, [online] doi:10.1680/jbibn.18.00035.
- Farrow, E. G., White, K. E. (2010). Recent advances in renal phosphate handling. *Nature Reviews. Nephrology*, 6(4), 207–217. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2010.17>
- Fleisch, H., Russell, R. G., Straumann, F. (1966). Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature*, 212(5065), 901–903. <https://doi.org/10.1038/212901a0>
- Fleish, H., Neuman, W. F. (1961). Mechanisms of calcification: role of collagen, polyphosphates, and phosphatase. *The American Journal of Physiology*, 200, 1296–1300. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1961.200.6.1296>
- Freitas, M.S., Shinohara, M.S., De Goes, M.F. (2012). Effect of enamel pre-etching on bond strength of self-etching adhesives. *Dental Materials*, 28 e8–e9, [online] doi:10.1016/j.dental.2012.07.026.
- Fridén, T., Rydholm, U. (1992). Severe aseptic synovitis of the knee after biodegradable internal fixation. A case report. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 63(1), 94–97. <https://doi.org/10.3109/17453679209154859>
- Gatou, T., Mamai-Homata, E. (2012). Tooth wear in the deciduous dentition of 5-7-year-old children: risk factors. *Clinical Oral Investigations*, 16(3), 923–933. <https://doi.org/10.1007/s00784-011-0586-z>
- Golub, E., Boesze-Battaglia, K. (2007). The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics*. 18(5) 444–448, [online] doi:10.1097/bco.0b013e3282630851.
- Greish, Y. E., Brown, P. W. (2001). Chemically formed HAp-Ca poly(vinyl phosphonate) composites. *Biomaterials*, 22(8), 807–816. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00243-x](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00243-x)

- Grippo, J. O., Simring, M., Schreiner, S. (2004). Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited: a new perspective on tooth surface lesions. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 135(8), 1109–1165. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2004.0369>
- Grynepas, M. D., Pilliar, R. M., Kandel, R. A., Renlund, R., Filiaggi, M., Dumitriu, M. (2002). Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications in vivo studies. *Biomaterials*, 23(9), 2063–2070. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(01\)00336-2](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(01)00336-2)
- Hanć, A., Barańkiewicz, D. (2013): Quantitative analysis of elements migration in human teeth with and without filling using LA-ICP-MS, in: *Microchemical Journal*, Bd. 110, S. 61–69, [online] [doi:10.1016/j.microc.2013.02.006](https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.02.006).
- Harding, I. S., Rashid, N., Hing, K. A. (2005). Surface charge and the effect of excess calcium ions on the hydroxyapatite surface. *Biomaterials*, 26(34), 6818–6826. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.060>
- Hariri, I., Sadr, A., Nakashima, S., Shimada, Y., Tagami, J., Sumi, Y. (2013). Estimation of the enamel and dentin mineral content from the refractive index. *Caries Research*, 47(1), 18–26. <https://doi.org/10.1159/000342416>
- He, B., Huang, S., Zhang, C., Jing, J., Hao, Y., Xiao, L., Zhou, X. (2011). Mineral densities and elemental content in different layers of healthy human enamel with varying teeth age. *Archives of Oral Biology*, 56(10), 997–1004. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.02.015>
- Heidemann, D.(1998). *Praxis der Zahnheilkunde*, 14(2). *Kariologie und Füllungstherapie*, 4. Aufl., München, Deutschland. Urban & Fischer Verlag.
- Hellwig, E., Schäfer, E., Klimek, J., Attin, T. (Hrsg) (2018). *Einführung in die Zahnerhaltung: Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie*, überarbeitet, Köln, Deutschland. Deutscher Ärzteverlag.
- Hench, L., Wilson, J. (1991). Bioceramics. *MRS Bulletin*. 16(9) 62–74, [online] [doi:10.1557/s0883769400056086](https://doi.org/10.1557/s0883769400056086).
- Hirose, M. N., Tange, T., Igarashi, S., Hirose, Y., Nakagaki, H. (1996). In vivo fluoride profiles at different sites of buccal and lingual enamel surfaces obtained by enamel biopsy of human maxillary first permanent molars in young adults. *Archives of Oral Biology*, 41(12), 1187–1190. [https://doi.org/10.1016/s0003-9969\(96\)00089-1](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(96)00089-1)
- Huang, A., Nakagaki, H., Tsuboi, S., Ji, H., Ohno, N., Chen, R., Nguyen, T. T., Kim, J. B. (1998). Fluoride profiles of perikymata in enamel surfaces of human premolars. *Archives of Oral Biology*, 43(9), 669–677. [https://doi.org/10.1016/s0003-9969\(98\)00059-4](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(98)00059-4)
- Imfeld T. (1996). Dental erosion. Definition, classification and links. *European Journal of Oral Sciences*, 104(2 (Pt 2)), 151–155. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1996.tb00063.x>
- Johnston, C. D., Hussey, D. L., Burden, D. J. (1996). The effect of etch duration on the microstructure of molar enamel: an in vitro study. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*, 109(5), 531–534. [https://doi.org/10.1016/s0889-5406\(96\)70138-5](https://doi.org/10.1016/s0889-5406(96)70138-5)
- Johnston, C. D., Hussey, D. L., Burden, D. J. (1996). The effect of etch duration on the microstructure of molar enamel: an in vitro study. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*, 109(5), 531–534. [https://doi.org/10.1016/s0889-5406\(96\)70138-5](https://doi.org/10.1016/s0889-5406(96)70138-5)
- Tokumoto, T., Isozaki, A., Shiiki, M., Ohashi, T., Nishida, A., Shintani, H., Ishizu, E., Kani, M., Kani, T. (1989). *Gifu Shika Gakkai zasshi = The Journal of Gifu Dental Society*, 16(2), 603–617.

- Komatsu, D. E., Warden, S. J. (2010). The control of fracture healing and its therapeutic targeting: improving upon nature. *Journal of Cellular Biochemistry*, 109(2), 302–311. <https://doi.org/10.1002/jcb.22418>
- König K. G. (1987). Ätiologie der Karies, insbesondere die Rolle von Zuckern [Etiology of caries with emphasis on the role of sugars]. *Deutsche zahnärztliche Zeitschrift*, 42(10 Suppl 1), S20–S29.
- Kornberg, A., Rao, N. N., Ault-Riché, D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 89–125. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.89>
- Kulaev, I., Vagabov, V., Kulakovskaya, T. (1999). New aspects of inorganic polyphosphate metabolism and function. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(2), 111–129. [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(99\)80189-3](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(99)80189-3)
- Langenscheidt bei PONS, Langenscheidt bei PONS (2017). *Caries. Langenscheidt*, München, Deutschland. Langenscheidt. [Wörterbucheintrag].
- Lehmann, K., Hellwig, E., Wenz, H.J.(Hrsg.) (2011). *Zahnärztliche Propädeutik: Einführung in die Zahnheilkunde*, 12., vollständig überarbeitete und erweiterte, Köln, Deutschland. Deutscher Ärzteverlag.
- Lorenz, B., Schröder, H. C. (2001). Mammalian intestinal alkaline phosphatase acts as highly active exopolyphosphatase. *Biochimica et Biophysica acta*, 1547(2), 254–261. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(01\)00193-5](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(01)00193-5)
- van Loveren, C., Moorer, W. R., Buijs, M. J., van Palenstein Helderma, W. H. (2005). Total and free fluoride in toothpastes from some non-established market economy countries. *Caries Research*, 39(3), 224–230. <https://doi.org/10.1159/000084802>
- Lussi, A., Schaffner, M., Hotz, P., Suter, P. (1991). Dental erosion in a population of Swiss adults. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 19(5), 286–290. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.1991.tb00169.x>
- Lv, K. L., Zhang, J.Z., Meng, X.C., Li, X.Y. (2007). Remineralization effect of the nano-HA toothpaste on artificial caries. *Key Engineering Materials*, 330–332. 267–270, [online] doi:10.4028/www.scientific.net/kem.330-332.267.
- Marshall, G. W., Jr, Balooch, M., Tench, R. J., Kinney, J. H., Marshall, S. J. (1993). Atomic force microscopy of acid effects on dentin. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*, 9(4), 265–268. [https://doi.org/10.1016/0109-5641\(93\)90072-x](https://doi.org/10.1016/0109-5641(93)90072-x)
- Meredith, N., Sherriff, M., Setchell, D. J., Swanson, S. A. (1996). Measurement of the microhardness and young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique. *Archives of Oral Biology*, 41(6), 539–545. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(96\)00020-9](https://doi.org/10.1016/0003-9969(96)00020-9)
- Monroe, E. A., Votava, W., Bass, D. B., McMullen, J. (1971). New calcium phosphate ceramic material for bone and tooth implants. *Journal of Dental Research*, 50(4), 860–861. <https://doi.org/10.1177/00220345710500041201>
- Morrissey, J. H., Choi, S. H., Smith, S. A. (2012). Polyphosphate: an ancient molecule that links platelets, coagulation, and inflammation. *Blood*, 119(25), 5972–5979. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-306605>
- Mtaya, M., Brudvik, P., Astrøm, A. N. (2009). Prevalence of malocclusion and its relationship with socio-demographic factors, dental caries, and oral hygiene in 12- to 14-year-old tanzanian schoolchildren. *European Journal of Orthodontics*, 31(5), 467–476. <https://doi.org/10.1093/ejo/cjn125>

Müller, W. E. G., Neufurth, M., Huang, J., Wang, K., Feng, Q., Schröder, H. C., Diehl-Seifert, B., Muñoz-Espí, R., Wang, X. (2015). Nonenzymatic transformation of amorphous CaCO₃ into calcium phosphate mineral after exposure to sodium phosphate in vitro: implications for in vivo hydroxyapatite bone formation. *ChemBiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 16(9), 1323–1332. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500057>

Müller, W. E. G., Wang, S., Ackermann, M., Gerich, T., Neufurth, M., Wiens, M., Schröder, H. C., Wang, X. (2019a). Biologization of allogeneic bone grafts with polyphosphate: a route to a biomimetic periosteum. *Advanced Functional Materials*, 29(44), 19–20, [online] doi:10.1002/adfm.201905220.

Müller, W. E. G., Wang, S., Tolba, E., Neufurth, M., Ackermann, M., Muñoz-Espí, R., Lieberwirth, I., Glasser, G., Schröder, H. C., Wang, X. (2018). Transformation of amorphous polyphosphate nanoparticles into coacervate complexes: an approach for the encapsulation of Mesenchymal Stem Cells. *Small*, 14(27), e1801170. <https://doi.org/10.1002/sml.201801170>

Müller, W. E. G., Schröder, H. C., Wang, X. (2019). Inorganic polyphosphates as storage for and generator of metabolic energy in the extracellular matrix. *Chemical Reviews*, 119(24), 12337–12374. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00460>

Müller, W. E. G., Wang, X., Diehl-Seifert, B., Kropf, K., Schlossmacher, U., Lieberwirth, I., Glasser, G., Wiens, M., Schröder, H. C. (2011). Inorganic polymeric phosphate/polyphosphate as an inducer of alkaline phosphatase and a modulator of intracellular Ca²⁺ level in osteoblasts (SaOS-2 cells) in vitro. *Acta Biomaterialia*, 7(6), 2661–2671. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.007>

Müller, W. E. G., Neufurth, M., Wang, S., Ackermann, M., Muñoz-Espí, R., Feng, Q., Lu, Q., Schröder, H. C., Wang, X. (2018). Amorphous, smart, and bioinspired polyphosphate nano/microparticles: A biomaterial for regeneration and repair of osteo-articular impairments in-situ. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 427. <https://doi.org/10.3390/ijms19020427>

Neuman, W. F., Neuman, M. W. (1953): The nature of the mineral phase of bone. *Chemical Reviews*, 53(1) 1–45, [online] doi:10.1021/cr60164a001.

Neuman, W. F., Toribara, T.Y., Mulryan, B. J. (1956). The surface chemistry of bone. IX. carbonate: Phosphate exchange. *Journal of the American Chemical Society*, 78(17) 4263–4266, [online] doi:10.1021/ja01598a023.

Orimo H. (2010). The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku zasshi*, 77(1), 4–12. <https://doi.org/10.1272/jnms.77.4>

Pashley D. H. (1991). Clinical correlations of dentin structure and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 66(6), 777–781. [https://doi.org/10.1016/0022-3913\(91\)90414-r](https://doi.org/10.1016/0022-3913(91)90414-r)

Pearce E. I. (1981). Ion displacement following the adsorption of anionic macromolecules on hydroxyapatite. *Calcified Tissue International*, 33(4), 395–402. <https://doi.org/10.1007/BF02409462>

Peetsch, A./M. Epple (2011): Characterization of the solid components of three desensitizing toothpastes and a mouth wash. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 42(2) 131–135, [online] doi:10.1002/mawe.201100744.

Pilliar, R. M., Kandel, R. A., Grynpas, M. D., Hu, Y. (2013). Porous calcium polyphosphate as load-bearing bone substitutes: in vivo study. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 101(1), 1–8. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32832>

Rahaman, M. N., Hu, C-L. (1991). Solid solution additives and the sintering of ceramics. *MRS Proceedings*, 249 200–423, [online] doi:10.1557/proc-249-427.

- Ravaglioli, A. (1993). Bioceramics. *Biomaterials*14(2) 110, [online] doi:10.1016/0142-9612(93)90219-r.
- Rivas, M., Casanovas, J., del Valle, L. J., Bertran, O., Revilla-López, G., Turon, P., Puiggali, J., Alemán, C. (2015). An experimental-computer modeling study of inorganic phosphates surface adsorption on hydroxyapatite particles. *Dalton Transactions*, 44(21), 9980–9991. <https://doi.org/10.1039/c5dt00209e>
- Riyat, M., Sharma, D. C. (2009). Analysis of 35 inorganic elements in teeth in relation to caries formation. *Biological Trace Element Research*, 129(1-3), 126–129. <https://doi.org/10.1007/s12011-008-8305-6>
- Sadat-Shojai, M., Khorasani, M. T., Dinpanah-Khoshdargi, E., Jamshidi, A. (2013). Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*, 9(8), 7591–7621. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012>
- Sano, H., Ciucchi, B., Matthews, W. G., Pashley, D. H. (1994). Tensile properties of mineralized and demineralized human and bovine dentin. *Journal of Dental Research*, 73(6), 1205–1211. <https://doi.org/10.1177/00220345940730061201>
- Schäfer, E. (1999). Geschichtliche Entwicklung, Klassifizierung und Haftmechanismen der Dentinadhäsive: Teil 1: Grundlagen der Dentinadhäsion und Adhäsive der 1. bis 3. Generation. *Zahnärztliche Welt. Zahnärztliche Rundschau. Zahnärztliche Reform. Das Deutsche Zahnärzteblatt*, 108, 218–225.
- Schneider, H. (1995). *Konservierende Zahnheilkunde*, 6. Aufl., Linnich, Deutschland. Apollonia Verlag.
- Schroeder, H. (2000). *Orale Strukturbiologie*, 5. Aufl., Stuttgart, Deutschland. Thieme, Stuttgart.
- Schroeder, H. (1987): *Orale Strukturbiologie: Entwicklungsgeschichte, Struktur und Funktion normaler Hart- und Weichgewebe der Mundhöhle und des Kiefergelenks*, Stuttgart, Deutschland. Georg Thieme Verlag.
- Schroeder, H. (1991): *Pathobiologie oraler Strukturen: Zähne, Pulpa, Parodont*. Basel, Schweiz. Karger.
- Shashikiran, N. D., Subba Reddy, V. V., Hiremath, M. C. (2007). Estimation of trace elements in sound and carious enamel of primary and permanent teeth by atomic absorption spectrophotometry: an in vitro study. *Indian Journal of Dental Research : official publication of Indian Society for Dental Research*, 18(4), 157–162. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.35824>
- Suchanek, W., Masahiro (1998). Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *Journal of Materials Research*, 13(1) 94–117, [online] doi:10.1557/jmr.1998.0015.
- Takagi, S., Liao, H., Chow, L. C. (2000). Effect of tooth-bound fluoride on enamel demineralization/ remineralization in vitro. *Caries Research*, 34(4), 281–288. <https://doi.org/10.1159/000016603>
- Takeda, E., Taketani, Y., Sawada, N., Sato, T., Yamamoto, H. (2004). The regulation and function of phosphate in the human body. *BioFactors (Oxford, England)*, 21(1-4), 345–355. <https://doi.org/10.1002/biof.552210167>
- Tegnander, A., Engebretsen, L., Bergh, K., Eide, E., Holen, K. J., Iversen, O. J. (1994). Activation of the complement system and adverse effects of biodegradable pins of polylactic acid (Biofix) in osteochondritis dissecans. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 65(4), 472–475. <https://doi.org/10.3109/17453679408995495>

Thilo, E. (1965): The Structural Chemistry of Condensed Inorganic Phosphates, in: *Angewandte Chemie International Edition in English*, Bd. 4, Nr. 12, S. 1061–1071, [online] doi:10.1002/anie.196510611.

Tschoppe, P., Meyer-Lueckel, H. (2012). Effects of regular and highly fluoridated toothpastes in combination with saliva substitutes on artificial enamel caries lesions differing in mineral content. *Archives of Oral Biology*, 57(7), 931–939. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.02.010>

Wall, F. (2003): M.J. Kohn, J. Rakovan and J.M. Hughes (Eds) Phosphates - geochemical, geobiological, and materials importance. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, 48, Washington, D.C. (Mineralogical Society of America and Geochemical Society), 2002. *Mineralogical Magazine*, 67(4) 823–824, [online] doi:10.1180/0670823.

Wang, X., Schröder, H.C., Müller, W.E.G. (2018). Amorphous polyphosphate, a smart bioinspired nano-/bio-material for bone and cartilage regeneration: towards a new paradigm in tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(16) 2385–2412, [online] doi:10.1039/c8tb00241j.

Weatherell, J. A., Robinson, C., Hallsworth, A. S. (1974). Variations in the chemical composition of human enamel. *Journal of Dental Research*, 53(2), 180–192. <https://doi.org/10.1177/00220345740530020501>

Yokota, S., Nishiwaki, N., Ueda, K., Narushima, T., Kawamura, H., Takahashi, T. (2014). Evaluation of thin amorphous calcium phosphate coatings on titanium dental implants deposited using magnetron sputtering. *Implant dentistry*, 23(3), 343–350. <https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000098>

8 Danksagung

Meinem Doktorvater [REDACTED] danke ich für die Themenvergabe und die Betreuung, sowie Unterstützung über die Jahre.

Ein besonders großer Dank gilt meinen Betreuer [REDACTED]. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ein weiterer Dank geht an [REDACTED] [REDACTED], für die Korrektur meiner Arbeit.

Die Arbeitsgruppe [REDACTED] hat einen beachtlichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet. Sie standen mir alle immer mit Rat und Tat zur Seite und konnten mir so das Arbeiten im Labor vereinfachen.

Herzlichen Dank auch an [REDACTED] aus dem anatomischen Institut, für die Bilder vom Rasterelektronenmikroskop.

Der größte Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie, insbesondere meiner Mutter.

9 Tabellarischer Lebenslauf

10 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich bei der Verfassung der Dissertation keine KI-Software verwendet habe.