

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde,  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Hannig

# **Homogenisierung von Nanohydroxylapatitsuspensionen mittels Ultraschall**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde*  
**der Medizinischen Fakultät**  
**der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2025

vorgelegt von:  
Melanie Kugland  
geb. am: 26.09.1995 in Ruthweiler

Tag der Promotion: 15.07.2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Matthias Hannig

1. Berichterstatter: Univ.- Prof. Dr. Matthias Hannig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Emmanouil Liodakis

*Meiner Großmutter Anita Kugland in  
Liebe und Dankbarkeit gewidmet.*

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>- 3 -</b>
1.1 Deutsche Zusammenfassung .....	- 3 -
1.2 Abstract .....	- 5 -
<b>2 EINLEITUNG .....</b>	<b>- 6 -</b>
2.1 Literaturübersicht .....	- 11 -
2.1.1 Zusammensetzung und Aufbau der Zahnschmelz.....	- 11 -
2.1.2 Hydroxylapatit .....	- 13 -
2.2 Ziel der Arbeit/ Fragestellung .....	- 20 -
<b>3 MATERIAL UND METHODE .....</b>	<b>- 21 -</b>
3.1 Materialien .....	- 21 -
3.1.1 Herstellung der Prüfkörper.....	- 21 -
3.1.2 Prüfkörpertrageschienen .....	- 22 -
3.1.3 Montage der Prüfkörper .....	- 23 -
3.1.4 Materialübersicht .....	- 23 -
3.1.5 Herstellung der Spüllösungen .....	- 25 -
3.1.6 Ultraschallbehandlung der Spüllösungen.....	- 26 -
3.1.7 REM und Bruchpräparate .....	- 26 -
3.2 Versuchsabläufe .....	- 27 -
3.2.1 Extraorale Vorversuchsreihe.....	- 27 -
3.2.2 Intraorale Hauptversuchsreihe .....	- 29 -
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>- 32 -</b>
4.1 Vorversuchsreihen.....	- 32 -
4.1.1 Vorversuche REM-Teller.....	- 32 -

4.1.2	Vorversuche Schmelzprüfkörper .....	- 46 -
4.2	Hauptversuchsreihe- Intraorale Versuchsreihe .....	- 55 -
4.2.1	Einfluss der Pellikel .....	- 55 -
4.2.2	Einfluss einer Ultraschallbehandlung .....	- 60 -
4.3.	Bruchpräparate .....	- 64 -
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>- 69 -</b>
5.1	Diskussion von Material und Methode .....	- 69 -
5.1.1	Bovine Prüfkörper und Lagerung .....	- 69 -
5.1.2	Prüfkörper, Probanden .....	- 71 -
5.1.3	Unterschiede in Form und Größe von Hydroxylapatit-Partikeln und deren Bedeutung für die Biokompatibilität.....	- 73 -
5.1.4	Einsatz von Ultraschall-Homogenisatoren und Alternativen in der Probenvorbereitung.....	- 74 -
5.1.5	REM.....	- 76 -
5.2	Diskussion der Ergebnisse .....	- 77 -
5.2.1	Die Rolle der Pellikel und der Applikationsformen .....	- 77 -
5.3	Schlussfolgerung .....	- 79 -
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>- 80 -</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>- 88 -</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	- 88 -
7.2	Tabellenverzeichnis.....	- 91 -
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>- 92 -</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>- 93 -</b>

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Deutsche Zusammenfassung

Mit Hydroxylapatit versetzte Mundhygieneprodukte gewinnen in der Zahnmedizin als biomimetische Alternative zu den gängigen fluoridhaltigen Produkten immer mehr an Bedeutung. Die Vorteile von Hydroxylapatiten gegenüber Fluoriden wurden bereits in verschiedenen Studien belegt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen in besagten Studien zeigen jedoch meist eine inhomogene Verteilung von agglomeriertem Hydroxylapatit auf den verwendeten Testoberflächen. Diese experimentelle Arbeit befasst sich daher mit der Fragestellung, ob eine Ultraschallbehandlung von Hydroxylapatit-Suspensionen eine homogenere Auflagerung der Nanopartikel auf diversen Testoberflächen ermöglicht. Es ist anzunehmen, dass eine homogenere Verteilung die Effektivität der Hydroxylapatit-Behandlung sowie die Reproduzierbarkeit von Versuchsreihen erhöht.

Aus vier verschiedenen Hydroxylapatit-Produkten und zwei Lösungsmitteln wurden Suspensionen hergestellt. Diese Suspensionen wurden anschließend mit Ultraschall behandelt und danach sowohl direkt auf die Haftfolien von REM- Probenhalter, als auch auf bovine Schmelzprüfkörper aufpipettiert. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden die Testoberflächen mit sterilem entionisiertem Wasser gespült und dann getrocknet. Um die Auflagerung von Hydroxylapatit auf der Oberfläche zu untersuchen, wurden rasterelektronenmikroskopische Bilder aufgenommen. Als Kontrollgruppe dienten nicht-beschallte Suspensionen der Hydroxylapatit-Produkte, mit denen ansonsten identisch verfahren wurde. Das Hydroxylapatit, welches die kleinste Partikelgröße der getesteten Produkte aufweist, gelöst in sterilem H<sub>2</sub>O, erzielte in allen Versuchsreihen das beste Ergebnis. Diese Suspensionen wurden daher für weiterführende *in vivo* Tests verwendet.

Hierfür wurde eine Schiene mit bovinen Schmelzprüfkörpern angefertigt und im Selbstversuch getragen. Mit der Hydroxylapatit-Suspension wurde 1 min bzw. 30 s gespült und die Prüfkörper anschließend untersucht. Da der Biofilm im Mundraum allgegenwärtig ist, wurde auch eine 3 min inkubierte Pellikel mit in die Versuchsreihen aufgenommen. Das Ergebnis zeigt, dass eine Pellikel als Haftsicht auf den Schmelzprüfkörpern für die homogene Auflagerung von Hydroxylapatit-Partikeln unabdingbar ist. Die Prüfkörper ohne Pellikel wiesen wenig bis kein Hydroxylapatit-Material auf ihren Oberflächen auf. Eine Spüldauer von 30 s war bei allen Versuchen ausreichend.

Fazit der Arbeit ist somit, dass mittels Ultraschalls die Hydroxylapatit-Partikel aus ihren Agglomeraten gelöst und eine homogene Verteilung erzielt werden kann. Die kleinsten Hydroxylapatit-Partikel erzielten die besten Ergebnisse. Intraoral ist eine Pelikel notwendig, um eine Anhaftung der Nanopartikel zu garantieren und somit den Effekt der Homogenisierung sichtbar zu machen.

## 1.2 Abstract

Oral hygiene products containing hydroxyapatite are becoming more and more important in dentistry as a biomimetic alternative to the common fluoride-containing products. The advantages of hydroxyapatite over fluorides have already been proven in various studies. However, scanning electron micrographs studies usually show an inhomogeneous distribution of agglomerated nanoparticles on the test surfaces used. This experimental work therefore addresses the question of whether ultrasonic treatment of hydroxyapatite suspensions enables a more homogeneous deposition of hydroxyapatite particles on various test surfaces. It can be assumed that a more homogeneous distribution increases the effectiveness of the hydroxyapatite treatment as well as the reproducibility of test series.

Suspensions were prepared from four different hydroxyapatite products and two solvents. These suspensions were treated with ultrasonic and then pipetted directly onto the adhesive foils of the SEM plates as well as onto bovine enamel test specimens. After different incubation times, the test surfaces were rinsed with sterile deionised water and then dried. Scanning electron microscopy images were taken to investigate the position of hydroxyapatite on the surface. The control group consisted of non-sonicated suspensions of the hydroxyapatite products, which were otherwise treated identically. The hydroxyapatite, which has the smallest particle size of the tested products, dissolved in sterile H<sub>2</sub>O, achieved the best result in all test series. Eprui 20 suspensions were therefore used for further *in vivo* tests.

For this purpose, a splint with bovine enamel test specimens was prepared and worn in the self-test. The hydroxyapatite suspension was rinsed for 1 min or 30 s and the test specimens were then examined. Since a pellicle is ubiquitous in the oral cavity, a 3 min incubated pellicle was also included in the test series. The result shows that a pellicle is indispensable as an adhesive layer on the enamel test specimens for the homogeneous deposition of hydroxyapatite particles. The test specimens without pellicles had little to no hydroxyapatite material on their surfaces. A rinsing time of 30 s was sufficient for all tests.

The conclusion of the work is thus that ultrasound can be used to loosen the hydroxyapatite particles from their agglomerates and achieve a homogeneous distribution. The smallest particles achieved the best results. Intraorally, a pellicle is necessary to guarantee adhesion of the hydroxyapatite particles and thus make the effect of homogenisation visible.

## 2 Einleitung

Karies ist noch immer die bakterielle Infektionskrankheit mit der höchsten Prävalenz weltweit [15, 51]. Grundvoraussetzung für die Ausbildung einer Karies ist die bakterielle Besiedelung der Mundhöhle. Dies erfolgt schon im Säuglingsalter, sei es durch vertikale Transmission zwischen Eltern und Kind oder durch horizontale Transmission über Mitmenschen [85]. Die Ausbildung einer Karies ist multifaktoriell und ist vor allem von den Mediatoren Speichel, Biofilm, Mundhygiene und Ernährung beeinflusst.

### Speichel

Der Speichel in der Mundhöhle wird als exokrines Sekret zu 90 % von den drei großen Mundspeicheldrüsen (Glandula parotis, Glandula submandibularis, Glandula sublingualis) gebildet. Die restlichen 10 % werden von kleinen Speicheldrüsen in der Mundschleimhaut produziert [4, 23]. Der Hauptbestandteil ist Wasser, allerdings finden sich im restlichen Anteil sowohl anorganische Bestandteile (z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ), als auch organische Bestandteile (z.B. Harnstoff, Harnsäure, freie Aminosäuren) und Makromoleküle (z.B. Proteine, Amylase, Lysozym) [87]. Dass der Speichel für die Vorverdauung der Nahrung (z.B. durch Amylase, Lipase) und die letztendliche Bolusbildung verantwortlich ist, steht außer Frage. Mittlerweile weiß man auch, dass der Speichel durch seine Verteilung von Geschmacksstoffen und deren in Lösung bringen, essentiell für die Geschmacksempfindung ist [62]. Darüber hinaus ist der Speichel mit seiner Pufferkapazität ein sehr wichtiger Mediator bei pH-Wert Schwankungen in der Mundhöhle. Säuren können durch beispielsweise Bicarbonate oder Phosphate abgepuffert werden und so einer Demineralisation der Zahnoberfläche entgegenwirken [11, 68]. Speichel führt durch seine Spülfunktion zudem dazu, dass Essensreste unter anderem auch z.B. Zucker aber auch in der Plaque produzierte Säuren schneller abtransportiert werden [20]. Auch antibakterielle Wirkungen der Speichelbestandteile werden diskutiert und auch Vorteile fürs Immunsystem werden untersucht [4]. Somit ist Speichel ein extrem wichtiger Faktor und kann zum Beispiel durch Erkrankungen oder Medikamente, welche Einfluss auf die Speichelsekretion und Fließrate haben, große Auswirkungen auf die orale Gesundheit haben. Der Speichel ist somit die erste Barriere für Keime und toxische Stoffe.

### Pellikel und Biofilm

Die Bildung einer Pellikel und ihre anschließende Entwicklung zu einem Biofilm verläuft in mehreren aufeinanderfolgenden Phasen. Auf einer gereinigten Zahnoberfläche findet zunächst eine Adsorption von Speichelproteinen statt. Dieses erste Häutchen (acquired pellicle) bildet eine semipermeable Schicht. Die Proteine binden aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen an Kalzium- und Phosphatgruppen in der Zahnoberfläche [24]. Wichtige Proteine, die an der Pellikelbildung beteiligt sind, umfassen Phosphoproteine wie Statherine, Histatine und prolinreiche Proteine. Innerhalb der ersten Minuten binden auch andere Proteine wie Muzine, Amylase, Cystatine und Lysozym an die Pellikel [21]. Die Bindung dieser Speichelproteine an die Zahnoberfläche reduziert die Oberflächenspannung und sorgt dafür, dass die Zahnoberfläche für die Ansiedlung von Mikroben zugänglich wird [39, 40].

Diese erste Schicht wird in der zweiten Phase durch Pionierkeime besiedelt (Initiale Adhäsion). Diese Keime interagieren und verknüpfen sich in der Proliferationsphase durch Adhäsions- und Kohäsionsphänomene untereinander und bilden so eine Ansatzstelle für viele weitere Bakterien [24]. Dabei entsteht ein zäher zunehmend anaerober Biofilm, mit dicht gepackten Bakterien und einer Matrix aus extrazellulären, polymeren Substanzen, wie z.B. Proteinen, Polysacchariden, Nukleinsäuren und Lipiden [24]. Diese Gemeinschaft ist in ihrer Struktur sehr komplex, da die Bakterien nicht nur durch mechanische Bindung zusammengehalten werden, sondern auch durch die Bildung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), die von den Bakterien selbst produziert und in die Umgebung abgegeben werden. Diese EPS verankern die Bakterien und schaffen eine stabile, strukturierte Matrix, die den Biofilm bildet [32]. Die EPS-Matrix ist entscheidend für die Aufrechterhaltung der Biofilmstruktur und schützt die Bakterien vor äußeren Einflüssen wie Antibiotika oder dem Immunsystem. In der Reifungsphase des Biofilms bilden die Bakterien komplexe, dreidimensionale Strukturen, die als Mikrokolonien bezeichnet werden und durch Kanäle miteinander verbunden sind. Diese Struktur ermöglicht einen effizienten Austausch von Nährstoffen und Abfallstoffen [74].

Ein wichtiger Aspekt der Biofilmbildung ist die Bildung von „Zwischenschichten“, in denen Bakterien mit unterschiedlichem Stoffwechselzustand existieren. In den oberflächennahen Schichten des Biofilms haben die Bakterien besseren Zugang zu Sauerstoff und Nährstoffen, während die Bakterien in den tieferen Schichten unter geringeren Sauerstoff- und Nahrungsbedingungen leiden. Diese Schichtbildung führt dazu, dass die Zellen in den tieferen Schichten häufig in einen ruhenden Stoffwechselzustand übergehen, was zur Resilienz des Biofilms beiträgt [7].

### Aufbau der Zahnschmelz- Kariesentstehung

Die Zahnhartsubstanz besteht im Dentin zu ca. 70 Gew.% und im Schmelz zu ca. 95 Gew.% aus Hydroxylapatit,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  [44], der härtesten Substanz im menschlichen Körper [15]. Meist liegt das Hydroxylapatit nicht als Reinform vor, sondern als Mischform wie Calciumhydroxylapatit, Fluorapatit, Magnesiumapatit [54].

Die Besiedelung der kindlichen Mundhöhle mit Keimen ist nicht gleichzusetzen mit der Entstehung einer Karies. Die Ursache ist multifaktoriell [85]. Entscheidend ist dabei das Verhältnis zwischen säureproduzierenden Bakterien und körpereigenen Regulationsmechanismen von Zähnen und Speichel [15]. Von besonderer Relevanz sind vor allem *Streptococci* und *Lactobazillen*. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist der *Streptococcus mutans*. Dieses Bakterium verstoffwechselt niedermolekulare Kohlenhydrate zu Säure und verursacht dadurch eine Demineralisation der Zahnhartsubstanz. Im Genaueren gehen durch die Einwirkung der Säure und damit der  $\text{H}^+$ -Ionen,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{HPO}_4^{2-}$  in Lösung [59]. Es entstehen primär so genannte *white-spot* Läsionen. Aufgrund der dabei entstehenden pseudointakten Oberflächenschicht bleibt ein Austausch von Ionen weiterhin vorhanden. Im Speichel vorhandene Puffer wie Bikarbonat oder Phosphat können die Säurewirkung abpuffern. Aber auch eine Remineralisation ist im geringen Maße durch z.B. Calciumionen im Speichel möglich [24]. Im besten Fall können erosive Stellen remineralisiert werden.

Aufgrund der modernen Ernährungsweise, welche reich an Kohlenhydraten ist, kommt es allerdings schon im jungen Alter zu einer einseitigen Verlagerung des ursprünglichen Gleichgewichtes. Zwei wichtige Parameter sind dabei, ab welchem Alter Zucker konsumiert wird und in welcher Frequenz [17, 29]. Ab einer gewissen Schwelle überwiegt die Säureproduktion und aus einer Plaque entsteht eine Karies. Vor allem Zähne der ersten Dentition sind anfällig [57]. Der Begriff „Early childhood caries (ECC)“ beschreibt dabei das Vorhandensein einer oder mehrerer Zahndefekte, fehlender Zähne aufgrund von Karies oder das Vorhandensein von einer oder mehrerer Füllungen in einem Alter unter 3 Jahren.

Heutzutage sind es vor allem die Fluoride, die in den meisten Mundhygieneprodukten der Festigung und Stärkung der Zahnhartsubstanz dienen. Dabei werden die Fluoridionen zu Fluorapatit um- und in die Zahnoberfläche eingebaut [14, 56]. Fluorapatit ist deutlich säureresistenter als Hydroxylapatit, weshalb sich diese Methode seit Jahren sowohl in zahlreichen Studien als auch in der täglichen Mundhygiene bewährt hat [12, 78, 81, 82].

Es gibt allerdings auch kritische Stimmen zur Anwendung der Fluoride. Die Gefahr einer Fluorose steht hier im Vordergrund [67]. Dabei kommt es durch die zu hohe Konzentration an Fluoriden zur irreversiblen Schädigung der schmelzbildenden Zellen und dadurch zu Schmelzdefekten während der Schmelzbildung. Das größte Risiko besteht dabei in einem Alter unter 3 Jahren, da in diesem Alter die Kinder nicht in der Lage sind Zahnpasta auszuspucken [84]. Um die Dosierung der Fluoride genau zu kontrollieren, ist es wichtig, sämtliche Fluoridquellen mit einzubeziehen [37]. Erwähnenswert ist dabei die regional meist unterschiedliche Fluoridierung des Trinkwassers oder die Verwendung von fluoridiertem Speisesalz. Eine weitere häufige Fluoridquelle ist die Gabe von Vitamin D Präparaten, welche häufig in Kombination mit Fluoriden durch Kinderärzte verordnet werden. Dabei geht es primär um das Verhindern einer Rachitis, die Auswirkungen auf die Zahnbildung stehen meist im Hintergrund. Einige Studien sollen auch eine neurotoxische Wirkung der Fluoride belegen [18, 27, 37].

Aufgrund zahlreicher kritischer Stimmen rücken daher seit Jahren verstärkt körpereigene, biomimetische Substanzen in den Fokus und dabei vor allem das Hydroxylapatit an sich. Biomimetische Substanzen ähneln chemisch körpereigenem Gewebe, wie beispielsweise Knochen oder Zähnen. Künstlich hergestelltes Hydroxylapatit findet schon seit Jahrzehnten Anwendung in der Knochenersatztherapie, sei es beim Auffüllen großer Knochendefekte oder beim Sinuslift. Der Vorteil bei der Verwendung liegt in deren Biokompatibilität, ihrer nichttoxischen Eigenschaften und ihrer positiven Wechselwirkung mit lebendem Gewebe [41, 83].

Zunehmend rücken die Partikel auch in den Fokus der modernen Mundhygiene. Untersuchungen an prähistorischen Schädeln von Primaten zeigen keine kariösen Läsionen [38]. Dafür allerdings hohe Verluste von Zahnhartsubstanz durch Attrition und Abrasion. Zurückzuführen ist dies auf die abrasive und kohlenhydratarme Ernährungsweise der Primaten [38]. Durch diese Erkenntnis hat sich eine Theorie etabliert. Diese geht davon aus, dass die Mikro- und Nanoapatit Partikel, die sich aus den Primatenzähnen durch die Attrition und Abrasion gelöst haben, eine entscheidende Rolle in der oralen Gesundheit gespielt haben müssen [38]. Dabei liegt der Fokus vielmehr auf der Bedeutsamkeit der Hydroxylapatitpartikel im Speichel und dementsprechend auch deren Effekt in anderen Lösungsmitteln z.B. in Mundspüllösungen.

In zahlreichen Studien tauchen immer wieder rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Zahnoberflächen mit exogen zugefügtem Hydroxylapatit auf [64, 65, 72, 79]. Dabei lässt sich

eine sehr inhomogene Verteilung der Hydroxylapatit Partikel feststellen. Da eine gleichmäßigere Verteilung und ein Herauslösen der einzelnen Nanopartikel aus ihren Agglomeraten die potentielle Effektivität der Mundhygieneprodukte steigern könnte, beschäftigt sich diese Doktorarbeit mit der Homogenisierung dieser Suspensionen.

## 2.1 Literaturübersicht

### 2.1.1. Zusammensetzung und Aufbau der Zahnschmelz

Die Grundvoraussetzung für die Verwendung von künstlich hergestelltem Hydroxylapatit ist das Verständnis des Aufbaus und der Zusammensetzung der Zahnhartsubstanz. Diese setzt sich im Wesentlichen aus einem variierenden Verhältnis zwischen anorganischen und organischen Anteilen zusammen. Die menschliche Zahnschmelz besteht aus zwei Hartgewebekomponenten, dem Zahnschmelz und dem Dentin (Zahnbein) und der zentral liegenden organischen weichen Bindegewebskomponente, der Pulpa. Dabei besteht der anorganische Mineralanteil hauptsächlich aus Calcium-Phosphat Verbindungen. Dieser Anteil beträgt im Schmelz zwischen 93 und 98 Gew.% und im Dentin ca. 70 Gew.% [24]. Der verbleibende Anteil wird im Schmelz vor allem durch Wasser und im Dentin durch Proteine (v.a. Kollagen) gebildet. Die Pulpa übernimmt formative, nutritive, protektive und reparative Funktionen [6]. Sie ist der bindegewebige, vaskularisierte und innervierte Teil des Zahnes. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den anorganischen Bestandteilen der Hartgewebekomponenten.

Direkt angrenzend an die Pulpa befindet sich das Dentin, welches in seiner gesamten Dicke mit radial verlaufenden Tubuli durchzogen ist und den Großteil des Zahnes ausmacht. Diese Tubuli sind Erweiterungen der Dentin bildenden Zellen, der Odontoblasten, und entstehen dementsprechend bei der Dentinbildung. Die Körper der Odontoblasten liegen an der Pulpa-Dentingrenze, deren Ausläufer bis ins äußere Manteldentin ziehen. Sie sind unter anderem der sensorische Teil des Zahnbeins und können auf Reize hin erneut Dentin (Tertiärdentin) als Schutzreaktion bilden. Zudem ist das Dentin mit weitaus mehr Kollagen und Proteinen wie Glykoproteinen oder Matrixproteinen durchzogen als der Zahnschmelz. Dadurch stützt das Dentin den Zahnschmelz und gleicht dessen Sprödigkeit aus [6]. Die Mineralisation des Dentins unterscheidet sich. Dabei kann man zwischen verschiedenen Zonen differenzieren. Zusammenfassend ist die Mineralisation im Randbereich ausgeprägter und verringert sich zur Pulpa hin. Zudem ist das peritubuläre Dentin stärker mineralisiert als die intertubulären Bereiche [86].

Der Schmelz wird von den Ameloblasten gebildet, welche bei der Zahneruption zugrunde gehen. Dadurch ist eine posteruptive Bildung anders als beim Dentin ausgeschlossen. Im Zahnschmelz liegen Calcium und Phosphor als kleine Kristalle in einem Verhältnis von 1 : 1.2 als Apatitverbindungen  $(Ca_{10-x}PO_6-x) \times X_2 \times H_2O$  vor [24]. Man findet außerdem Karbonat, Magnesium, Natrium und bis zu 40 weitere Spurenelemente. Die häufigste Apatitverbindung

ist das Calcium-Hydroxylapatit  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , welches eine ganz klar definierte Struktur aufweist [42]. Die Kristalle sind durchschnittlich 160 nm lang, 40-70 nm breit und 26 nm dick und sind damit erheblich größer als in anderen biologischen Hartgeweben [24, 49]. Diese Apatitkristalle bilden zusammengelagert im Querschnitt hexagonale Schmelzprismen. Diese sind nicht wie im Dentin radial, sondern in horizontal und vertikal geschwungenen Wachstumslinien angeordnet. Der Zahnschmelz ist die härteste Substanz des menschlichen Körpers, welche an der Schmelzoberfläche eine Härte bis zu 390 KHN (Knoop-hardness-numbers) erreicht [2, 24].

Die Verhältnisse der organischen zu den anorganischen Anteilen in der Zahnhartsubstanz schwanken. Vergleicht man den Anteil der Calcium Phosphat Verbindungen zwischen Knochen und Zahnschmelz, so zeigt sich ein größerer Anteil im Schmelz. Zu der Festigkeit beitragend ist aber auch der prozentuale Anteil der anorganischen Masse im Zahnschmelz, welcher mit 97% ganze 32% über der des Knochens liegt. Vergleicht man die Zusammensetzung des humanen Zahnschmelzes mit künstlich erzeugtem reinem Hydroxylapatit, findet man nur geringe organische Anteile in der Zahnhartsubstanz.

*Tabelle 1: Zusammensetzung hydroxylapatithaltiger Hartgewebe beim Menschen [2]*

<b>Composition wt%</b>	<b>Enamel</b>	<b>Dentine</b>	<b>Bone</b>	<b>HA</b>
Calcium	36.5	35.1	34.8	39.6
Phosphorous	17.1	16.9	15.2	18.5
Ca/P ratio	1.63	1.61	1.71	1.67
Total inorganic (%)	97	70	65	100
Total organic (%)	1.5	20	25	-
Water (%)	1.5	10	10	-

Chemischer und struktureller Vergleich zwischen humanem Zahn, Knochen und Hydroxylapatit.

Zusammenfassend ist es also ein Unterschied, ob man von der Zahnhartsubstanz spricht oder von reinem Hydroxylapatit. Dies ist wichtig für die Vergleichbarkeit. Tabelle 1 zeigt zusammenfassend den Vergleich der Zusammensetzung zwischen humanem Zahn, Knochen und Hydroxylapatit.

### 2.1.2 Hydroxylapatit

Hydroxylapatit (HAP) ist die wohl wichtigste Calcium-Phosphat Verbindung des anorganischen Hartgewebes von Säugetieren [22]. Das Biomineral bildet die Grundlage für die Härte, Stabilität und Funktion der Knochen und Zähne. Es handelt sich meist um Nanokristalle, welche durch Fremdionen wie Fluorid oder Chlorid in ihrem Kristallgitter in ihrer hexagonalen Struktur stabilisiert werden. Somit liegt immer eine Symmetrie vor, wobei stöchiometrisch reines Hydroxylapatit nicht vorkommt [22]. „Biologische Apatite“ sind allerdings vergleichbar. Spricht man also von Hydroxylapatit, so ist es streng genommen immer ein künstliches Erzeugnis, welches allerdings biologischen Apatiten sehr nahekommt.

Hydroxylapatitversetzte Mundhygieneprodukte werden schon lange klinisch getestet. Vor allem im Zusammenhang mit potentiellen Remineralisationsprozessen werden sie erwähnt [5]. Es gibt zahlreiche klinische Studien, welche keine Nachteile aufzeigen im Vergleich zu den Fluoriden [13, 45]. Die *in vitro* Versuchsergebnisse werden allerdings häufig diskutiert, da keine chemische Reaktion zwischen den Partikeln und der Schmelzoberfläche stattfindet. Die Partikel haften meist nur aufgrund eines Biofilms/Pellikel bzw. aufgrund elektrostatischer Kräfte auf der Oberfläche. Es werden bakteriostatische und bakterizide Effekte diskutiert [48, 76], aber ob eine Remineralisation im Sinne einer neuen Schmelzschichtauflagerung mit festem Verbund des Zahnschmelzes mit dem exogen beigeführten HAP passieren kann, ist fraglich. In dieser Arbeit wurden 4 verschiedene HAP-Produkte getestet (Abb. 1).

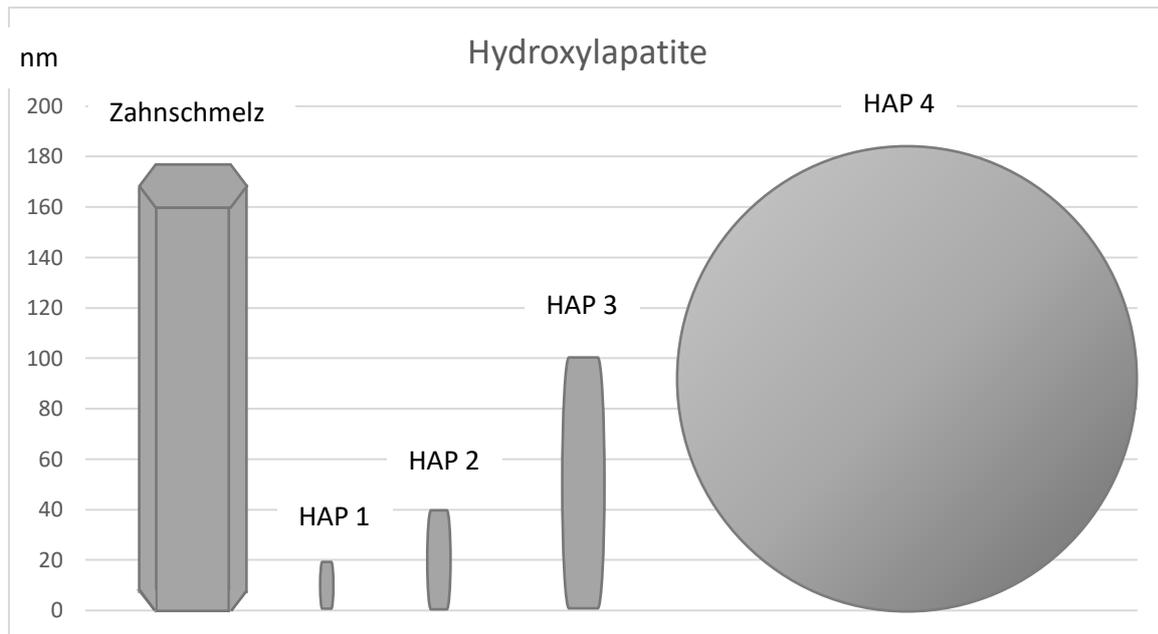


Abbildung 1: Form und Größe der getesteten HAP-Partikel im Vergleich zu Hydroxylapatitkristall aus menschlichem Zahnschmelz. Y-Achse: Länge bzw. Durchmesser in nm. X-Achse: HAP- Kristalle aus Zahnschmelz, HAP 1 (Eprui 20), HAP 2 (Eprui 40), HAP 3 (Kalident), HAP 4 (HAP Sigma-Aldrich).

Calcium Phosphat Verbindungen werden bereits seit den 1920ern zur Knochenersatztherapie verwendet [1]. 1971 wurde die erste mit Hydroxylapatit versetzte Keramik von E. A. Monroe und Kollegen zur prothetischen Versorgung von Zahndefekten entwickelt [61]. Die industrielle Herstellung von HAP wird demnach schon lange betrieben. Die Firma SANGI gibt an, 1980 die erste mit Hydroxylapatit versetzte Zahnpasta auf den Markt gebracht zu haben [75]. 1989 wurde die dazu gehörige Studie von Kani *et al.* veröffentlicht [46].

Es gibt zahlreiche Studien, welche sich mit der klinischen Evidenz von HAP-basierten Mundhygieneprodukten beschäftigt haben. 2021 wurde von Limeback *et al.* eine Metaanalyse veröffentlicht, die eine Übersicht und eine systematische Überprüfung aller Studien als Ziel hatte [53]. Dabei wurden insgesamt 291 Studien zusammengetragen und systematisch nach Relevanz und Qualität aussortiert. Nur 22 der Studien waren brauchbar und lediglich 5 wiesen einen hohen Grad an Evidenz auf (nach Richards).

Die älteste der fünf Studien ist 1989 von Kani *et al.* veröffentlicht worden [46]. Sie soll eine kariesprotektive Wirkung von HAP versetzter Zahnpasta zeigen. Sie entstand nach der Entwicklung der Zahnpasta APADENT der Firma SANGI. Dadurch ist eine Voreingenommenheit nicht auszuschließen. In dieser Studie sollten 181 Grundschul Kinder 3 Jahre lang nach dem Essen in der Schule durch Lehrer kontrolliert ihre Zähne putzen. Dabei

wurde die APATO Zahnpasta (5% HAP) verwendet. Die Kontrollgruppe erhielt eine Placebo-Zahnpasta ohne HAP und ohne Fluoride. Die genauen Zusammensetzungen gehen allerdings aus der Publikation nicht hervor. Auch sonstige Zahnputzinstruktionen fehlten. Die Zahnpasta soll eine Kariesinhibitionsrate bei Jungen von 35,86% und bei Mädchen von 55,93% zeigen. Der Evidenzgrad der Studie ist den anderen Studien jedoch unterlegen, da keine Verblindung und Randomisierung (RCTs = Randomized controlled trials) belegt werden konnte. Zudem wird kritisiert, dass bei den initialen Untersuchungen in Bezug auf den angegebenen DMFT-Wert (Decayed Missing Failed Teeth) nicht eindeutig klar wird, ob diese von medizinischem Fachpersonal durchgeführt wurden. Es wird außerdem zwischen Mädchen und Jungen unterschieden, wobei ein geschlechtsspezifischer Einfluss ausgeschlossen werden sollte.

Eine deutlich aktuellere doppelt verblindete und randomisierte Multicenterstudie wurde 2019 von Schlagenhaut *et al.* veröffentlicht [77]. Es sollte der kariesprotektive Effekt von Hydroxylapatit versetzter Zahnpasta im Vergleich zu fluoridierter Zahnpasta untersucht werden. Dabei wurden 133 Probanden im Alter zwischen 12 und 25 Jahren mit hohem Kariesrisiko und einer kieferorthopädischen Behandlung mit festsitzenden Apparaturen inkludiert. Es wurden die Vestibulärflächen der Zähne 15-25 betrachtet, weshalb die Grundvoraussetzung Brackets für mindestens 6 Monate an diesen Zähnen war. Zu Beginn wurde bei allen Probanden eine Professionelle Zahnreinigung durchgeführt. Es wurde ein zweimaliges Zähneputzen pro Tag mit einer standardisierten elektrischen Zahnbürste vorausgesetzt sowie eine initiale Keimzahl von *Streptococcus mutans*  $\geq 10^5$  c.f.u./mL. Angewendet wurde das ICDAS II (International Caries Detection and Assessment System), welches eine standardisierte klinische Methode zur Klassifizierung von kariösen Läsionen darstellt.

Der primäre Endpunkt der Studie bestand in der Feststellung von kariösen Läsionen an den Vestibulärflächen der Zähne 15-25 mit einem ICDAS Code  $\geq 1$  über einen Zeitraum von 168 Tagen. Dabei wurden in festgelegten Intervallen (28, 64, 168 Tagen) die Probanden untersucht und der ICDAS Code nach Desinfektion mit einem Chlorhexidin Gel erhoben. Diese Desinfektion fand auch in Zwischenuntersuchungen (Tag 56, 112, 140) statt. Der Zweite Endpunkt beinhaltet zusätzlich den Plaqueindex (PI) und den Gingivaindex (GI) und einen ICDAS Code  $\geq 2$ . Verwendet wurde eine mit 10% Hydroxylapatit versetzte Zahnpasta. Die Kontrollgruppe erhielt eine fluoridierte Zahnpasta mit 350 ppm Amin- und 1050 ppm Zinnfluorid. Das Ergebnis war, dass 54,7% der Patienten aus der Hydroxylapatit-Gruppe und 60,9% der Patienten aus der Kontrollgruppe nach 168 Tagen die Bildung mindestens einer

kariösen Läsion ICDAS-Code  $\geq 1$  aufwiesen. Die Schlussfolgerung der Autoren lautete daher, dass es bei Probanden mit sehr hohem Kariesrisiko keinen signifikanten Unterschied gibt zwischen der Verwendung einer fluoridhaltigen oder einer mit Hydroxylapatit versetzten Zahnpasta. Kritisch zu bewerten ist allerdings die mehrmals stattfindende Anwendung von Chlorhexidin zur Desinfektion, da dieses keimmindernde Effekte aufweist.

Eine weitere einfach verblindete Studie, die sich mit einem ähnlichen Thema auseinandergesetzt hat, lieferte Badiee *et al.* 2020 im Iran [10]. Hier ging es jedoch um den Zeitraum nach einer kieferorthopädischen Behandlung mit festsitzenden Apparaturen. Bei 50 Probanden (Alter 10-35) wurde nach Ablösen der Brackets vestibulär eine Initialkaries/ Läsion festgestellt. Dabei wurde ein Gerät zur Laserfluoreszenz basierten Kariesdetektion (Kavo pen DIAGNOdent) verwendet. Die Läsionen wurden mittels ICDAS klassifiziert und ein Plaqueindex erhoben. Lediglich Läsionen von Grad 2 und 3 wurden in die Studie aufgenommen. Eine gute Mundhygiene war dabei Grundvoraussetzung für die Teilnahme an der Studie. Die genaue Definition guter Mundhygiene geht allerdings nicht hervor. Es wurden Bilder mit hochauflösenden Kameras von den Fazialflächen der Zähne gemacht, um die Größe der Läsionen mittels Pixelanzahl anzugeben. Zudem wurde der Fluoreszenzgrad der Läsionen mittels Kavo pen DIAGNOdent festgelegt. Das Gerät wurde nur auf den getrockneten vestibulären Flächen verwendet. Da man davon ausgeht, dass sich die Fluoreszenz der Zähne jedes Individuums unterscheidet, wurde jeweils ein Vergleichswert jedes Probanden erhoben. Zunächst wurde ein gesunder Referenzzahn getestet, welcher sich in unmittelbarer Nähe des kariösen Zahnes befand und als Vergleichswert galt. Dann erst wurde die Fluoreszenz der kariösen Läsion ermittelt. Diese Schritte wurden bei allen folgenden Untersuchungen alle 1-, 3-, 6- Monate wiederholt. Die Probanden wählten sich nach Entfernen der Brackets ihre Zahnpasta verblindet aus. Ihnen wurden Putzinstruktionen gegeben. Es wurde zweimal täglich morgens und abends geputzt. Verwendet wurde eine mit 6,7% HAP versetzte Zahnpasta, die speziell angefertigt wurde. Als Kontrolle wurde eine Fluoridversetzte Zahnpasta verwendet. In den ersten Monaten wurden keine großen Unterschiede zwischen den Zahnpasten ausgemacht, ein generell positiver Effekt war aber deutlich sichtbar. Nach 6 Monaten konnte festgehalten werden, dass beide Zahnpasten zu einer Remineralisation der Initialläsionen geführt haben, wobei die HAP-Zahnpasta eine geringfügig bessere Performance lieferte.

Die vierte Studie befasst sich nicht mit dem Vergleich zwischen HAP-Produkten und fluoridierten Produkten sondern vergleicht die Anwendung von HAP-Gel mit und ohne einer zusätzlichen Verwendung einer Ozon Gas Therapie. In der Studie von Grocholewicz *et al.*

wurde nicht wie bei den bisherigen Studien die Fazialfläche der Zähne untersucht, sondern der Approximalbereich [35]. Getestet wurde ein Nano-Hydroxylapatit-Gel, eine reine Ozon Gas Therapie und eine Kombination aus beidem. Die Ozon Gas Therapie kam in der Zahnmedizin 1934 das erste Mal zum Einsatz. Durch die irreversible Oxidation durch Sauerstoffradikale kommt es zu einer bakteriziden Wirkung. Da die Ozon Gas Therapie lediglich zu einer Keimreduktion und einer Desinfektion einer Initialkaries dient und dadurch auch nicht die alleinige Wirkungsweise des Hydroxylapatits belegt, ist diese Studie irrelevant für diese Promotionsarbeit. Die Anwendung der Ozon Therapie ist lediglich sinnvoll mit einer anschließenden Remineralisation mittels Applikation entsprechender Produkte. Die Studie zeigt, dass eine Kombination aus beidem die beste Wirkung erzielt, was zu erwarten ist.

Die letzte der fünf Studien wurde 2021 von Paszynska *et al.* veröffentlicht und stellt eine ebenfalls doppelt verblindete, randomisierte Kontrollstudie dar, die sich mit dem Vergleich von HAP versetzten Zahnpasten und fluoridhaltiger Zahnpasten beschäftigte [66]. Ziel war es zu zeigen, dass die Verwendung von fluoridfreien hydroxylapatitversetzten Zahnpasten keinesfalls den fluoridhaltigen unterlegen ist. Hierfür wurden 207 Kinder im Alter zwischen 3 und 7 Jahren über 1 Jahr betreut, wobei nur 177 Kinder die Studie Protokollgerecht abschlossen. Grundvoraussetzung war ein vollständiges Milchzahngebiss mit mindestens einer Füllung an einem Milchmolaren aufgrund einer vorherigen Karies aber mit mindestens einem ungefüllten Molar. Betrachtet wurden alle Flächen der Milchmolaren außer approximal. Die verwendeten Produkte waren die Kinder Karex Zahnpasta (Kinder Karex Zahnpasta, Dr. Kurt Wolff GmbH & Co. KG, Bielefeld, Germany) mit 10% HAP und die Elmex Kinderzahnpasta (Elmex Kinderzahnpasta CP GABA GmbH, Hamburg, Germany) mit 500 ppm Aminfluorid. Geputzt wurde mit einer standardisierten elektrischen Zahnbürste (Braun Oral-B Stage Power, P&G, Schwalbach, Germany). Die Eltern der Probanden wurden instruiert, den Kindern morgens und abends jeweils 3 min die Zähne zu putzen über einen Zeitraum von 336 Tagen. Zusätzlich durften die Kinder 1 mal pro Tag selbst mit einer Handzahnbürste (Elmex Kinder-Zahnbürste, CP GABA GmbH, Hamburg, Germany) ihre Zähne unter Aufsicht der Eltern 3 min putzen. Insgesamt wurden also 3 mal pro Tag die Zähne geputzt. Sowohl der Plaqueindex als auch der Gingivaindex wurden dokumentiert. Sonstige Fluoridquellen oder antiseptische Produkte wurden ausgeschlossen. Diese Studie weist somit sehr detaillierte und kontrollierte Rahmenbedingungen auf und hat einen sehr hohen Evidenzgrad. Als Parameter wurde wieder das ICDAS II verwendet. Primärer Endpunkt bestand in der Detektion mindestens einer neuen Kariesläsion mit  $\geq$  ICDAS Code 1 oder einem Fortschreiten einer bereits bestehenden Kariesläsion in einen nächst höheren Grad. Dazu wurde jeder Proband zu Beginn untersucht

und alle kariösen Stellen und Füllungen wurden detektiert. Die Kontrollen fanden am 1. Studientag statt, sowie an den Tagen 84, 168, 252 und 336. Sekundäre Endpunkte bestanden im Vorhandensein mindestens einer kariösen Läsion mit  $\geq$  ICDAS Code 2, einem veränderten Plaqueindex und einem veränderten Gingivaindex. Betrachtet man sich die Auswertung der 177 Probanden in der PP-Population (Per Protocol Population), welche sich gemäß des Studienprotokolls verhalten haben, so traten bei 72,7% der HAP-Probanden ein ICDAS Code  $\geq 1$  auf und bei den Fluorid Probanden bei 74,2%. Selbst bei der ITT-Population (Intention-to-Treat Population) wurde bei den zwei Gruppen nur ein Unterschied von 0,2% detektiert. Die Ergebnisse zeigen also insgesamt, dass sowohl bei der Untersuchung des Primären Endpunktes als auch des Sekundären Endpunkte keine signifikanten Unterschiede der beiden Zahnpasten zu finden sind.

Somit kommt die Metaanalyse von Limeback *et al.* zur Schlussfolgerung, dass HAP versetzte Mundhygieneprodukte den Fluorid versetzten Produkten nicht unterlegen sind. In allen Studien wurden allerdings immer Zahnpasten getestet. Ein weiterer Bestandteil der täglichen Mundhygiene sind Mundspüllösungen.

Eine für diese Arbeit sehr wichtige Studie wurde 2020 von Weidan Luo *et al.* in *Dental Materials* veröffentlicht [55]. Diese befasste sich mit dem Effekt von disaggregiertem Nanohydroxylapatit in Suspensionen auf den oralen Biofilm [55]. Dabei wurden verschiedene Ziele verfolgt. Es sollte gezeigt werden, dass eine Ultraschallbehandlung kombiniert mit Natrium Hexametaphosphat (SHMP, Natriumhexametaphosphat) effektiv zu einer Homogenisierung führt. Es ging dabei nicht hervor, welche Schallintensität oder Beschallungsdauer verwendet wurde. Zusätzlich sollte dann der Effekt auf ausgewählte Bakterienstämme und deren Mischung getestet werden. Es wurden verschiedene Suspensionen als Testsuspensionen definiert. Es wurde ein Nano Hydroxylapatit ( $\sim 167.1$  nm) (Sigma-Aldrich, Amerika) und ein Micro Hydroxylapatit ( $\sim 1870$  nm) (Sigma-Aldrich, Amerika) getestet. Als Lösemittel wurde DDW (sterile deionized water) verwendet. Zur Stabilisierung der mit Ultraschallbehandelten Lösungen wurde dabei das DDW durch SHMP (Natrium Hexametaphosphat) ausgetauscht. SHMP (dt. Natriumhexametaphosphat) wird häufig in der Lebensmittelindustrie als stabilisierender Zusatzstoff verwendet, welcher eine gute Biokompatibilität aber keinen bakteriziden Effekt aufweist [63].

Als Bakterienstämme wurden *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* und *Streptococcus gordonii* verwendet. Diese Proben wurden bei 37 °C in einer anaeroben Kammer inkubiert und für die weiteren Versuche präpariert. Die verschiedenen Suspensionen wurden

vorbereitet und in Well Platten gegeben (je 1 ml). Die Proben mit den Bakterienstämmen wurden mit PBS gespült, um nicht befestigte Bakterien zu entfernen. Dann wurden die Proben 30 min in die jeweilige Suspension gegeben. Danach wurde sowohl die Milchsäureproduktion gemessen als auch die Extrazellulären Polymeren Substanzen (EPS) zusammen mit den Bakterien mittels CLSM (confocal scanning microscope) dargestellt. Die Zusammensetzung der Suspensionen zeigt Tabelle 2.

*Tabelle 2: Test-Suspensionen der Studie „The effect of disaggregated nano-hydroxyapatite on oral biofilm in vitro“ von Weidan Luo et al. [55]*

Nano HA 1 (Sigma-Aldrich, Amerika)	Nano HA 2 = Nano HA 1 unbehandelt (Sigma-Aldrich, Amerika)	Micro HA (Sigma-Aldrich, Amerika)	DDW (sterile deionized Water)
10 % (w/v) Nano HA in SHMP + Ultrasonic	10% (w/v) Nano HA in DDW	10 % (w/v) Micro HA in DDW	

Test Suspensionen der Studie und deren Zusammensetzung

Die Ergebnisse zeigen, dass die metabolischen Aktivitäten in den Versuchen mit HA 1 signifikant gesunken sind ( $p < 0.05$ ). Die restlichen Suspensionen zeigen keinerlei Veränderung im Vergleich zu reinem sterilem Wasser ( $p > 0.05$ ). Auch in der Darstellung der EPS und der Bakterien ist ein Unterschied erkennbar. Die Suspensionen ohne Homogenisierung der HAP-Partikel zeigen deutlich mehr Bakterien und EPS als mit. Diskutiert wurde allerdings, dass in dieser Studie nur ausgewählte Bakterienstämme verwendet wurden, diese zwar starke Repräsentanten sind, aber keineswegs einem oralen Biofilm im Aufbau und der Zusammensetzung ähneln. Außerdem ist SHMP unter anderem ein Calcium Chelator, welcher zwar schnell an die Oberfläche des Nano-HAP binden kann, damit die Oberfläche negativ lädt und so eine erneute Agglomeration verhindert, dadurch aber eine Interaktion mit den Bakterien potentiell beeinflusst.

## 2.2 Ziel der Arbeit/ Fragestellung

Die Grundvoraussetzung reproduzierbarer Ergebnisse und effizienter Mundhygieneprodukte ist die homogene Verteilung der entsprechenden Partikel in der Suspension und somit auch auf der Zahnoberfläche. Da bei der Darstellung der HAP-Partikel auf Zahnoberflächen mittels Rasterelektronenmikroskop eine Agglomeratbildung von HAP-Nanopartikeln beobachtet wurde, stellte sich damit die Frage, ob es möglich wäre diese Partikel homogener auf der Oberfläche zu verteilen, um damit möglicherweise noch bessere Effekte zu erzielen. Die Homogenisierung von Suspensionen und Emulsionen mittels Ultraschalles wird sowohl in der Lebensmittelindustrie (bspw. Milch) als auch in der Medizin bei der Herstellung von z.B. Nasensprays oder Mundsprays verwendet. Auch in der Zellforschung ist es schon lange ein bewährtes Verfahren zur schonenden Desagglomeration von Zellclustern [33]. In dieser Arbeit wird dabei auf sonstige Zusätze verzichtet und lediglich mit sterilem entionisiertem Wasser oder PBS gearbeitet um eventuelle Einflüsse auszuschließen. Auch werden Hydroxylapatite verschiedener Anbieter getestet, um einen Einfluss der Form und Größe der Partikel auf eine Homogenisierung zu untersuchen. Da hydroxylapatitversetzte Mundhygieneprodukte zunehmend Bekanntheit und Interesse erlangen und als biomimetische Produkte im Fokus der oralen Gesundheit stehen, hat diese Arbeit folgende Fragestellungen untersucht:

1. Welche der vorhandenen Nanohydroxylapatitpartikel-Größen und -Formen zeigen den besten Effekt bei der Homogenisierung und welches Lösungsmittel eignet sich?
2. Welche Beschallungsintervalle zeigen eine Wirkung und wie viele sind nötig?
3. Bleibt der Effekt einer Homogenisierung auch nach 24 h Lagerung beständig?
4. Welche Rolle spielt die Pellikel bzw. der Biofilm bei der Anhaftung der HAP-Produkte?

## 3 Material und Methode

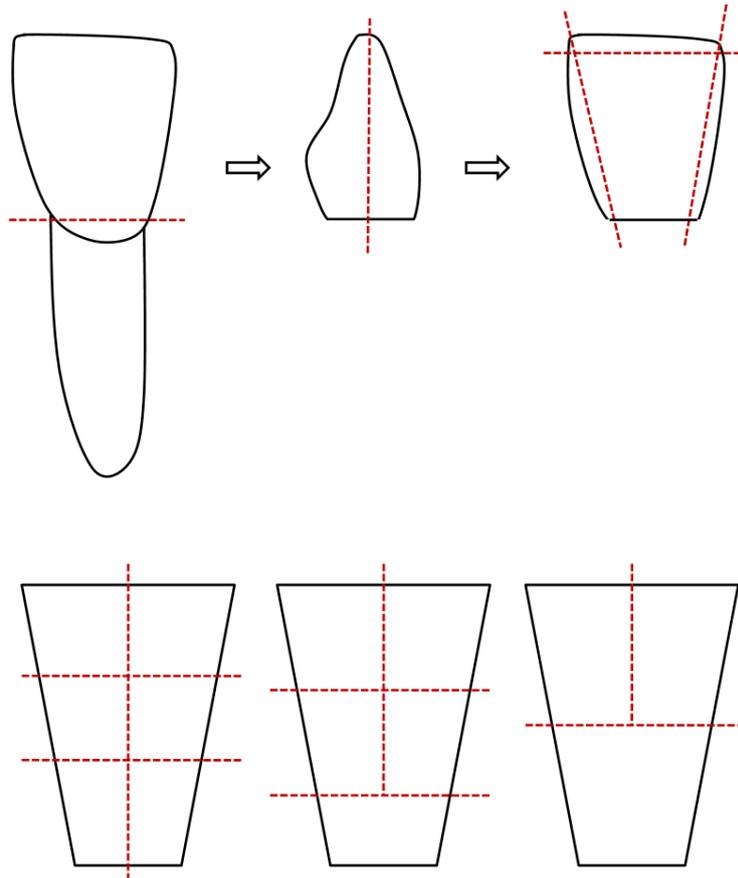
### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Herstellung der Prüfkörper

Die bovinen Prüfkörper wurden aus kariesfreien, unbeschädigten Frontzähnen der zweiten Dentition hergestellt. Nach der Extraktion folgte eine kontinuierliche, konservierende Lagerung in einer 0,1% Thymollösung bei 4 °C. Die Zähne wurden dann mittels Säge unter Wasserkühlung geteilt. Dabei wurden zunächst die Wurzeln abgetrennt und die koronalen Segmente in der Frontalebene halbiert. Die zwei Rohlinge wurden dann (in allen Dimensionen) approximal, inzisal und apikal zu glatten Kanten eingekürzt. Danach konnten die Rohlinge größenabhängig in mehrere kleinere unterteilt werden (siehe Abb. 2).

Es folgte die Bearbeitung der Rohlinge mit der Schleifmaschine (Buehler, Phoenix 3000) bei 300 rpm. Zur Formgebung wurden Körnungen mit P240 (Buehler, CarbiMet SiC Abrasive Paper) und P600 verwendet. Dabei wurde zunächst der Prüfkörper rechtwinklig und dann auf der Schmelz- und Dentinseite plan geschliffen. Zur weiteren Oberflächenglättung und Politur der Prüfkörper wurden Körnungen von P800, P1200 und P2500 verwendet. Es wurde immer darauf geachtet, eine vollständige Schmelzdicke beizubehalten sowie eine dünne Schicht Dentin zu belassen. Nach der Herstellung wurden die Prüfkörper weiterhin kontinuierlich in einer 0,1% Thymollösung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Die Vorbereitung der Prüfkörper zur Schienenmontage erfolgte nach einem standardisierten Protokoll. Dabei wurden die Prüfkörper zunächst nochmals mit einer Körnung von P2500 aufpoliert. Danach wurden sie für eine Dauer von 2 min in 3% NaOCl inkubiert und mit vollentsalztem Wasser gespült bis geruchlos. Es folgte eine 5 minütige Behandlung im Ultraschallbad in vollentsalztem Wasser und daraufhin eine 15 minütige Inkubation in 70% Isopropylalkohol. Die gereinigten Prüfkörper wurden dann zweimal mit sterilem Wasser (Fresenius, Ampuwa Spüllösung 1000 ml Plastipur, steril und endotoxinfrei) gespült und in Wasser bei 4 °C für mindestens 6 h (max. 3 d) gelagert.



*Abbildung 2:* Sägeschema für die bovinen Unterkieferfrontzähne in der Prüfkörperherstellung [34].

### 3.1.2 Prüfkörpertrageschienen

Der Oberkiefer des Probanden wurde mittels Alginat (Bluepint X-creme, Dentsply Sirona) abgeformt und der Abdruck mit Superhartgips ausgegossen. Mit Hilfe eines Tiefziehverfahrens wurden aus Duran (Scheu GmbH) Miniplastschienen mit einer Stärke von 1 mm hergestellt. Die Ausdehnungen der Schienen erstreckten sich im ersten und zweiten Quadranten jeweils vom zweiten Molaren bis zum Eckzahn. Es wurden bukkal kleine Perforationen im Sinne kleiner Löcher angelegt, um den Halt des Montagesilikons (President, Coltene) zu gewährleisten. Im Bereich der Okklusionsfläche wurde das Kunststoffmaterial der Schiene abgetragen, um den physiologischen Biss möglichst gering zu sperren. Nur im Bereich der Eckzähne und der zweiten Molaren wurde der Kunststoff belassen.

### 3.1.3 Montage der Prüfkörper

Die gereinigten Prüfkörper wurden dem sterilen Wasser entnommen und mit Präzisionswischtüchern (Kimtech Science Professional, Precision Wipes) entfuchtet. Das Montagesilikon Presitent (Coltene) wurde mittels Mischkanülen auf die Vestibulärfläche der Schienen in Höhe der ersten Molaren aufgetragen. Unmittelbar danach wurden die Prüfkörper per Pinzette auf die Silikonmasse gelegt und mit Holzstäbchen in das Material bis hin zur Schmelzfläche gedrückt. Überschüsse wurden entfernt.

### 3.1.4 Materialübersicht

Im Folgenden werden alle Materialien und Geräte der Übersicht wegen tabellarisch aufgeführt. Da die Hydroxylapatitpräparate von besonderer Wichtigkeit waren, wurden sie zu Beginn aufgelistet. Es wurden 4 verschiedene Hydroxylapatitpräparate zur Herstellung der Spüllösungen verwendet. Sie unterschieden sich vor allem in ihrer Form und Partikelgröße (siehe Tabelle 3). Die verschiedenen verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 4 aufgelistet. Zusätzlich verwendete Geräte und Materialien finden sich in Tabelle 5.

*Tabelle 3: Die Hydroxylapatitpräparate*

HAP-Nr.	Herstellerbezeichnung	Hersteller	Partikelform	Partikelgröße in (nm)
1	Eprui 20	Eprui (China)	Nadelförmig	20
2	Eprui 40	Eprui (China)	Nadelförmig	40
3	Kalident	Kalichem Italia Srl, Rezzato BS, Italien	Nadelförmig	100
4	Hydroxylapatite 677418	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Eschenstrasse 5D-82024 TAUFKIRCHEN	Kugel	< 200 nm

Verschiedene Hydroxylapatitprodukte, deren Hersteller, Partikelform und -größe

*Tabelle 4: Die Chemikalien*

Chemikalien	Hersteller
AMPUVA Spüllösung steriles H <sub>2</sub> O	Fresenius KABI Fresenius Kabi Deutschland GmbH D-61346 Bad Homburg v.d.H.
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7.4, 500 ml, 1X-Konzentration, flüssige Form, ohne Calcium, Magnesium, Phenolrot	Gibco™ 10010056
Chemikalien	Hersteller
NaOCl	3% - Lösung DAC 2015/1/ HEDINGER Aug. Hedinger GmbH & Co. KG, 70327 Stuttgart
Isopropylalkohol	70% (V/V) Biozid/GMP HEDINGER Aug. Hedinger GmbH & Co. KG, 70327 Stuttgart

Übersicht der verwendeten Chemikalien

*Tabelle 5: Geräte und zusätzliche Materialien*

Geräte und Materialien	Hersteller	Verwendete Einstellungen/ Verwendung
Schleifmaschine Phoenix 3000	BUEHLER	Schmelzprüfkörperherstellung bei 300 rpm
Schleifpapier, CarbiMet SiC Abrasive Paper	BUEHLER	Verwendete Körnungen: P120, P240 , P600, P800, P1200, P2500
Ultraschall homogenizor Sonoplus 2200	BANDELIN	Amplitude: 20% Ohne Pulsation
Sonotrode Ultraschall homogenizor	BANDELIN	M73
Ultraschallbad SONOREX, Typ RK 31	BANDELIN electronic, Heinrichstraße 3-4, 12207 Berlin, Germany	5 min bei Prüfkörperreinigung

Geräte und Materialien	Hersteller	Verwendete Einstellungen/ Verwendung
Rasterelektronenmikroskop (SEM und EDX) XL30 ESEM FEG	FEI, Eindhoven, Niederlande	SEM bei 5 kV mit folgenden Vergrößerungen: 25 x, 500 x, 1000 x, 2000 x, 5000 x, 10000 x, 20000 x EDX bei 10 kV
REM- Teller Aluminium Specimen Stubs	Agar Scientifics Unit 7, M11 Business Link, Parsonage Lane Stansted, Essex CM24 8GF UK	Positionierungsteller für REM
REM- Haftaufkleber (Leitfähig); 12 mm <sup>2</sup>	PLANO GmbH	Klebefolie für REM-Teller
Kohlegarn ca. 0,7 g/m	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland	Material zum Besputtern der getrockneten Proben
Sputtercoater Model SCD 030	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland	Zum Beschichten (Sputtern) der Proben
Alginat	Dentsply Sirona, Bluepint X-creme	Abformung zur Schienenherstellung
Duran Platten	Scheu GmbH	Miniplastschienen
Montagesilikon President	Coltene	Prüfkörpermontage

Übersicht der verwendeten Geräte und Hilfsmaterialien

### 3.1.5 Herstellung der Spüllösungen

Es wurden zwei verschiedene Lösungsmittel getestet: steriles entionisiertes H<sub>2</sub>O und PBS. Die vier verschiedenen Hydroxylapatite (HAP) wurden jeweils zu 5% in Lösung gebracht. Bei den Versuchen wurde immer eine 10 ml Spüllösung (siehe Tabelle 6) hergestellt. Nach der Herstellung der Lösungen wurden sie dann beschallt. Die Kontrollgruppe wurde nicht beschallt.

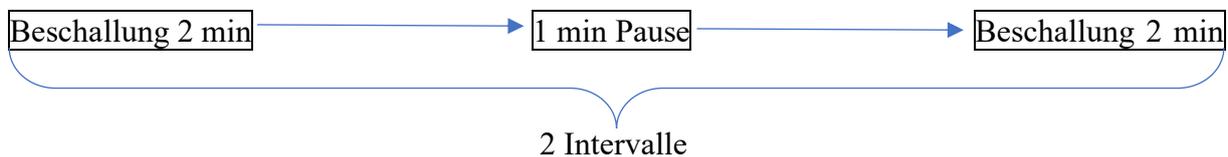
*Tabelle 6: Die Spüllösungen*

Nummerierung	Zusammensetzung
1	Eprui 20 (5%) in H <sub>2</sub> O
2	Eprui 20 (5%) in PBS
3	Eprui 40 (5%) in H <sub>2</sub> O
4	Eprui 40 (5%) in PBS
5	Kalident (5%) in H <sub>2</sub> O
6	Kalident (5%) in PBS
7	HAP Sigma-Aldrich (5%) in H <sub>2</sub> O
8	HAP Sigma-Aldrich (5%) in PBS

Liste der verwendeten Hydroxylapatite.

### 3.1.6 Ultraschallbehandlung der Spüllösungen

Zur Homogenisierung wurde der Ultraschall homogenizor Sonoplus 2200 mit der Ultraschallspitze M73 verwendet. Die 15 ml Zentrifugenröhrchen mit den 10 ml Spüllösungen wurden eisgekühlt unter der Ultraschallspitze positioniert und bis kurz vor dem Gefäßboden eingetaucht. Dann wurden bei einer Amplitude von 20% ohne Pulsation verschieden lange Beschallungszeiten getestet. Zur Wärmereduktion wurde eine Beschallungsdauer von 2 min mit einer Pause von 1 min gewählt. Es wurden 2, 3, 4 und 5 Wiederholungen untersucht, sprich die Proben wurden für 2 Intervalle genau 2 min beschallt, dann 1 min ruhen gelassen und dann abermals 2 min beschallt (siehe Abb. 3). Nach dem Prozess wurden die Spüllösungen unmittelbar angewendet.



*Abbildung 3:* Veranschaulichung der Definition von Intervallen bei der Beschallung von Suspensionen.

### 3.1.7 REM und Bruchpräparate

Nach den entsprechenden Versuchsabläufen wurden die Prüfkörper bzw. die reinen REM-Teller getrocknet und vor äußeren Einflüssen geschützt in Wellplatten transportiert. Sie wurden dann mittels Kohlefaden besputtert und mittels Rasterelektronenmikroskop bei 25-facher, 500-facher, 1.000-facher, 2.000-facher, 5.000-facher, 10.000-facher, 20.000-facher Vergrößerung

an verschiedenen Stellen mikroskopiert. Ausgewählte Schmelzprüfkörper wurden dann durch zwei Zangen gebrochen und auf neuen REM-Tellern mit der Bruchkante nach oben positioniert. So konnte ein Querschnitt mikroskopiert werden.

## 3.2 Versuchsabläufe

### 3.2.1 Extraorale Vorversuchsreihe

Extraoral wurden die Suspensionen sowohl auf die reinen Haftfolien der REM- Teller, als auch auf bovine Schmelzprüfkörper aufpipettiert (siehe Abb. 4).

Die REM- Teller wurden stabil gelagert und mit den Kohlestoffklebepads bestückt. Die Schutzfolien wurden jeweils unmittelbar vor dem Auftragen/Anbringen der Probe bzw. der Schmelzprüfkörper entfernt, um mögliche Kontaminationen zu verhindern.

Zunächst wurden die Spüllösungen fertig gestellt, sprich beschallt oder unbeschallt belassen. Kurz vor dem Pipettieren, wurden die Lösungen manuell nochmals kurz aufgeschüttelt. Mit einer Pipette wurden dann 50 µl auf den jeweiligen REM-Teller pipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Tropfen vorsichtig mit der Pipettierspitze auf der ganzen Fläche des Tellers verteilt wurde. Nun wurden die Inkubationszeiten (1 min, 3 min, 5 min) abgewartet. Dann wurde die Probe mit sterilem Wasser und einer Enghalsflasche 3 s gewässert und geschützt trocknen gelassen.

Bei den Versuchen mit den Schmelzprüfkörpern wurden diese nach dem Reinigungsprozess in Wellplatten positioniert. Dann wurden die Spüllösungen aufpipettiert, und zwar genau so viel, dass der Tropfen auf dem jeweiligen Prüfkörper nicht vom Prüfkörper herunterfloss. Dann wurden die Prüfkörper mittels Pinzette entnommen und wie oben beschrieben gewässert. Anschließend wurden die Schmelzprüfkörper geschützt getrocknet und auf REM-Tellern fixiert.

Aufgrund der Tatsache, dass im späteren Verlauf auch intraorale Tests gemacht wurden und dazu unausweichlich Speichel dazugehört, wurden im weiteren extraoralen Versuchsablauf den Spüllösungen Vollspeichel 1:1 untergemischt. Dieser wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn eines jeden Durchgangs gewonnen und auf Eis bis zum Einsatz gekühlt. Mindestens zwei Stunden vor jeder Speichelentnahme wurde auf Nahrungsmittel und Getränke außer stillem Wasser verzichtet. Mindestens 30 min vor der Entnahme wurden die Zähne mit einer Zahnbürste ohne Zahnpasta geputzt. Dadurch sollte der Speichel weniger Kontaminationen mit körperfremden Stoffen aufweisen.

Da die Mischung von Spüllösung und Speichel 1:1 in der Endkonzentration statt 5% nur noch 2,5% Hydroxylapatit enthielt, wurde die Konzentration der Spüllösung auf 10% angehoben.

Das Ziel bestand dabei aus der Aufrechterhaltung der gleichen Materialmenge HAP auf den Haftfolien bzw. den Schmelzprüfkörpern.

Der Versatz mit dem Vollspeichel fand in einem möglichst passenden Reaktionsgefäß statt. Dabei wurde nacheinander Spüllösung und Vollspeichel in dieses hinein pipettiert und durch Auf- und Abpipettieren suspendiert. Danach wurden die Suspensionen auf die Objektträger pipettiert und wie oben beschrieben weiter verfahren.

Zeitgleich wurden immer Kontrollproben aus Vergleichsgründen erstellt. Die angefertigten 10% Spüllösungen wurden dabei mit H<sub>2</sub>O auf 5% hochverdünnt und sowohl auf die Haftfolie direkt als auch auf Prüfkörper aufgetragen. Es wurde eine Inkubationszeit von 1 min und 3 min untersucht.

Ein weiterer Faktor, der sich auf die Schmelzprüfkörper auswirkt, ist die Pellikel. Da im Mundraum eine Pellikel unabdingbar ist und es zu keinem Zeitpunkt keine Pellikel auf der Zahnoberfläche geben kann, wurden die Schmelzprüfkörper zusätzlich mit einer Pellikel versehen. Dabei wurde eine 3 min Pellikel gewählt. Die Prüfkörper wurden vor dem extraoralem Versuchsablauf für 3 min in die Umschlagfalte der Testperson gelegt und danach entnommen. Kontrollgruppe war hier die Gruppe der Schmelzprüfkörper ohne Pellikel.

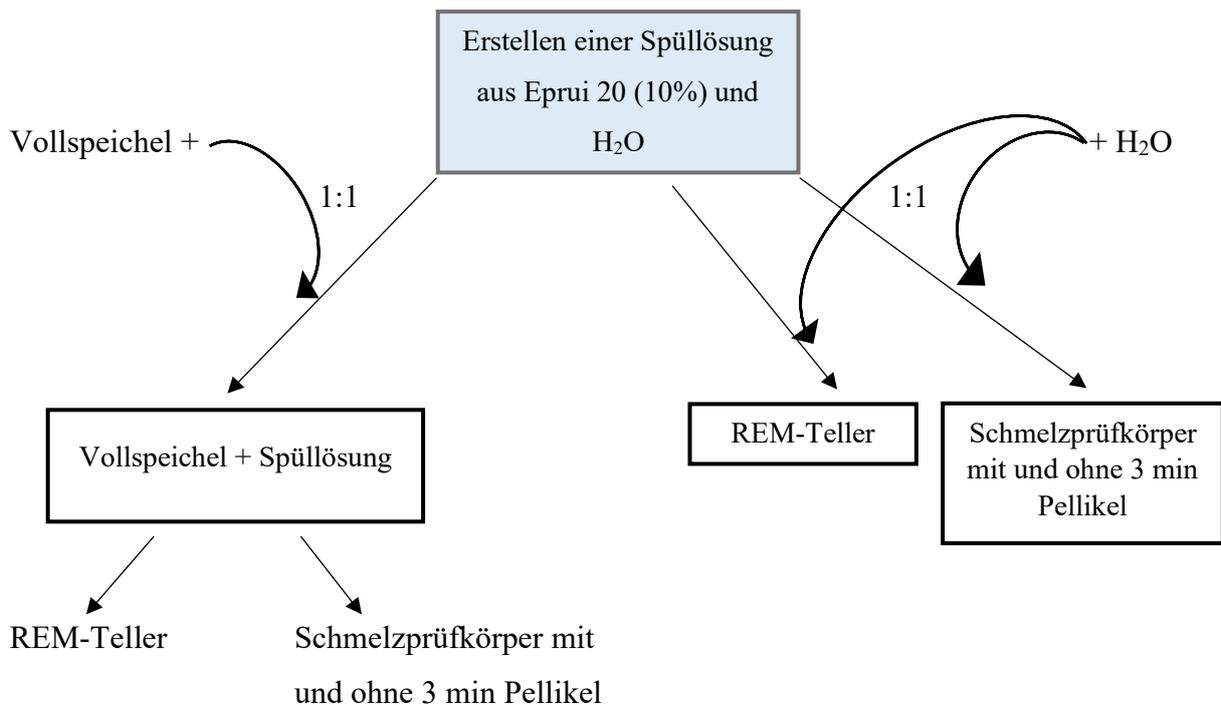


Abbildung 4: Versuchsaufbau Extraorale Vorversuchsreihe beispielhaft für das Apatitmaterial Eprui 20 dargestellt

### Petrischalenversuch

Im Laufe der Versuchsreihen entwickelte sich ein weiterer Versuchsaufbau. Dabei wurden die Spüllösungen und der Vollspeichel in Petrischalen gemischt und kurz per Hand in Bewegung gebracht. Dann wurde der Prüfkörper mit der Schmelzseite nach oben hinzugelegt. Die Petrischale wurde dann eine Minute weiter per Hand schwenkend bewegt. Dann wurde der Prüfkörper entnommen und 5 Sekunden gewässert (siehe Abb. 5). Das weitere Verfahren entsprach dem bisherigen.

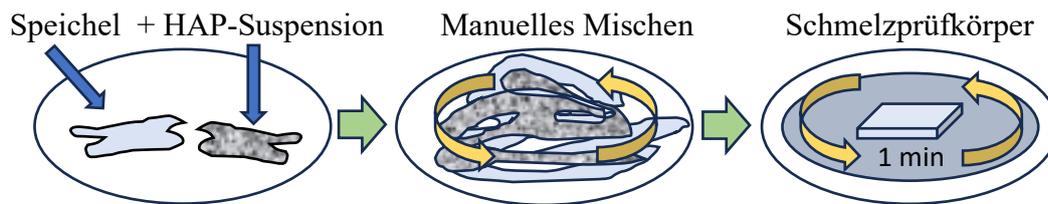


Abbildung 5 : Ablauf des Petrischalenversuches

### 3.2.2 Intraorale Hauptversuchsreihe

Bei den Intraoralen Versuchen wurden die Prüfkörper wie in 3.1.3 beschrieben an den Miniplastschienen fixiert. Die jeweilige Spüllösung (beschallt/ unbeschallt) wurde vorbereitet. In der intraoralen Hauptversuchsreihe wurde nur mit dem HAP der kleinsten Partikelgröße, Eprui 20 weitergearbeitet.

Da intraoral die Zahnschicht permanent mit einer Pellicel bzw. einem Biofilm überzogen ist, wurden Tests mit einer 3 min Pellicel durchgeführt. Dazu wurden die Schienen mit den Schmelzprüfkörpern 3 min intraoral belassen und es wurde dann mit der Spüllösung gespült. Als Kontrolle wurden, während sich die Schiene für die Bildung einer 3 min Pellicel intraoral befand, auch immer 2 Schmelzprüfkörper nicht fixiert in die Umschlagfalte gelegt. Ein Prüfkörper rechts und einer links. Diese wurden vor dem Spülen wiederum entfernt. So konnten die reinen 3 min Pellicel verglichen werden. Um die Vergleichbarkeit weiter zu steigern, wurden die Versuche so koordiniert, dass immer eine Schiene für 3 min intraoral platziert wurde, danach die zweite Schiene hinzukam und dann erst gespült wurde. So konnte man innerhalb eines Spülprotokolls zwei verschiedene Ausgangssituationen simulieren. Trotz der Tatsache, dass es zu keinem Zeitpunkt intraoral KEINE Pellicel geben kann, wurde sich jedoch für die Bezeichnung „ohne Pellicel“ entschieden. Die Ergebnisse wurden dann miteinander verglichen.

Die Spülzeiten wurden variiert. Da bei Spüllösungen oft zu einer 30 sekundigen Spülzeit geraten wird, wurde diese Inkubationszeit (Spülzeit) mit in die Versuchsreihe aufgenommen. Zusätzlich wurde weiterhin 1 min getestet. Die Anamnese der Testperson wies keinerlei Vorerkrankungen oder Medikamenteneinnahmen auf. Die Testperson wies ein parodontal ungeschädigtes, entzündungsfreies und vollbezahntes Gebiss auf.

Nach der intraoralen Spülzeit, wurden die Prüfkörper 3 s mit sterilem H<sub>2</sub>O gewässert und auf den REM-Tellern fixiert. Zwischen jeder intraoralen Spülung lagen mind. 24 h. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden zur Darstellung der Oberfläche angefertigt. Zusätzlich wurden von einigen ausgewählten Präparaten Brüche erstellt und die Bruchkanten mikroskopiert.

Eine vollständige Übersicht der extraoralen und intraoralen Hauptversuchsreihe zeigt die Abbildung 6.

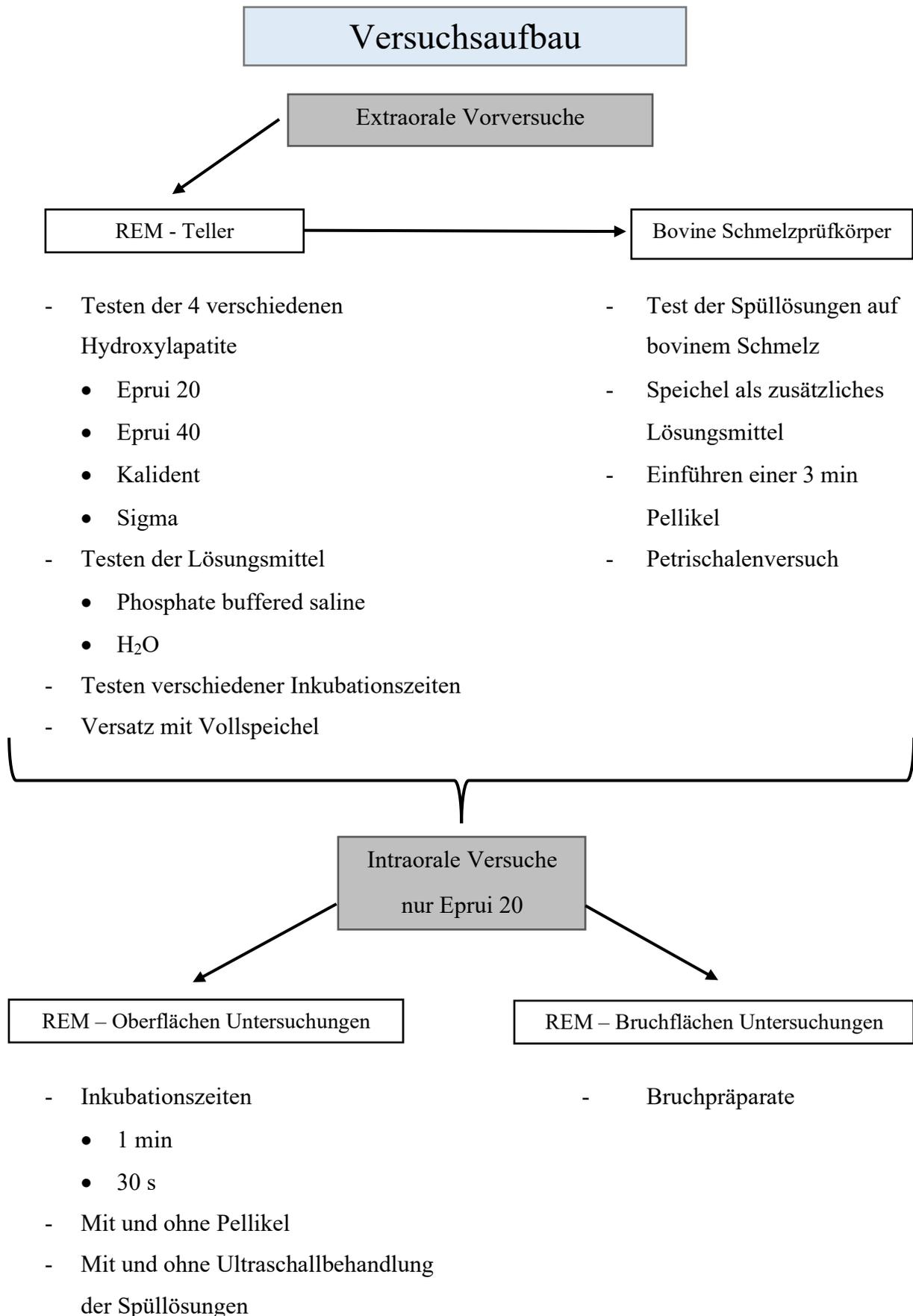


Abbildung 6: Übersicht des extraoralen und intraoralen Versuchsaufbaus

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vorversuchsreihen

#### 4.1.1 Vorversuche REM-Teller

Ziel der extraoralen Versuche war es zunächst, die verschiedenen Hydroxylapatit- Produkte in Suspension zu bringen und die effektivste Lösung auszumachen. Effektiv bedeutete, dass eine Ultraschallbehandlung zu einer Homogenisierung der HAP-Nanopartikel auf der Prüfoberfläche beigetragen hat. Es wurden 4 Hydroxylapatit- Produkte getestet:

Eprui 20, Eprui 40, Kalident und ein Hydroxylapatit von Sigma Aldrich (siehe Tabelle 3). Diese wurden zu jeweils 5 % in Lösung gebracht. Verwendet wurden zwei verschiedene Lösungsmittel: steriles Wasser und PBS (Phosphat buffered saline). PBS ist isotonisch, nicht zellschädigend und wird in der Biochemie häufig für Reinigungsprozesse verwendet. Es sollte in den extraoralen Versuchen ein speichelähnliches Milieu nachsimuliert werden. Die Produkte wurden wie in 3.1.5 zu Spüllösungen verarbeitet und außer der Kontrollgruppe wie in 3.1.6 beschallt. Hervorzuheben war in den ersten Versuchen die Testung verschiedener Intervalle der Beschallung, um die Zeit, nach der ein Effekt erkennbar war, auszumachen.

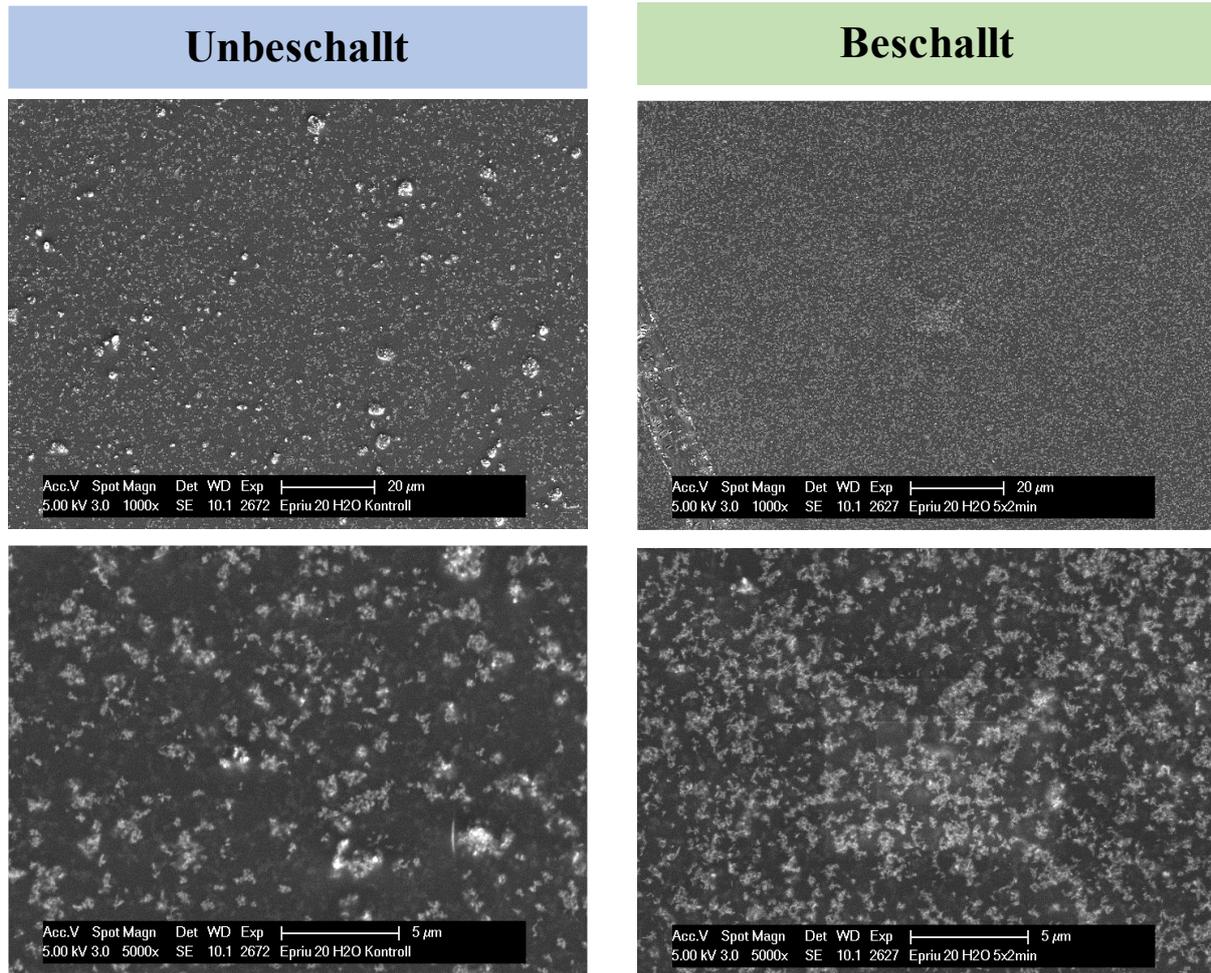
Im ersten Durchlauf wurden die Proben rein nur auf die Haftfolien der REM-Teller aufgetragen. Dabei wurde wie in 3.2.1 verfahren. Es wurden unbehandelte Lösungen als Kontrolle ebenfalls getestet.

Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder zeigten bei annähernd allen Lösungen, die beschallt wurden, eine bessere Verteilung der Partikel auf den Haftfolien (Abb. 7,8,12). Eine Ausnahme war hierbei Sigma (5%) in H<sub>2</sub>O, welches von der Form der Nanopartikel her den einzigen kugelförmigen Vertreter darstellte (Abb. 9). Nach der Beschallung konnte man in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen große kugelförmige Partikel ausmachen, welche von der Größe sehr viel größer als die ursprünglichen Nanopartikel waren. EDX-Analysen zeigten keine Auffälligkeiten bei der Zusammensetzung im Vergleich zu Bereichen mit den ursprünglichen Sigma Nanopartikeln (Abb. 10,11). Eine Erklärung für die Bildung dieser großen kugelförmigen Strukturen konnte nicht gefunden werden. Da dadurch ein homogenes Bild nicht zustande kam, wurden keine weiteren Test mit Sigma durchgeführt.

Bei allen anderen Suspensionen waren die Agglomerate der Nanopartikel deutlich kleiner und zum Teil ganz aufgelöst. Teilweise ließen sich kleine Partikel einzeln auf den Testoberflächen ausmachen. Unterschiede gab es vor allem bei der Effektivität der Beschallung der verschiedenen HAP-Produkte. So war der Effekt einer Homogenisierung bei Kalident (5%) in H<sub>2</sub>O (Abb. 12) sichtbar, aber nicht so deutlich zu erkennen wie bei Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O

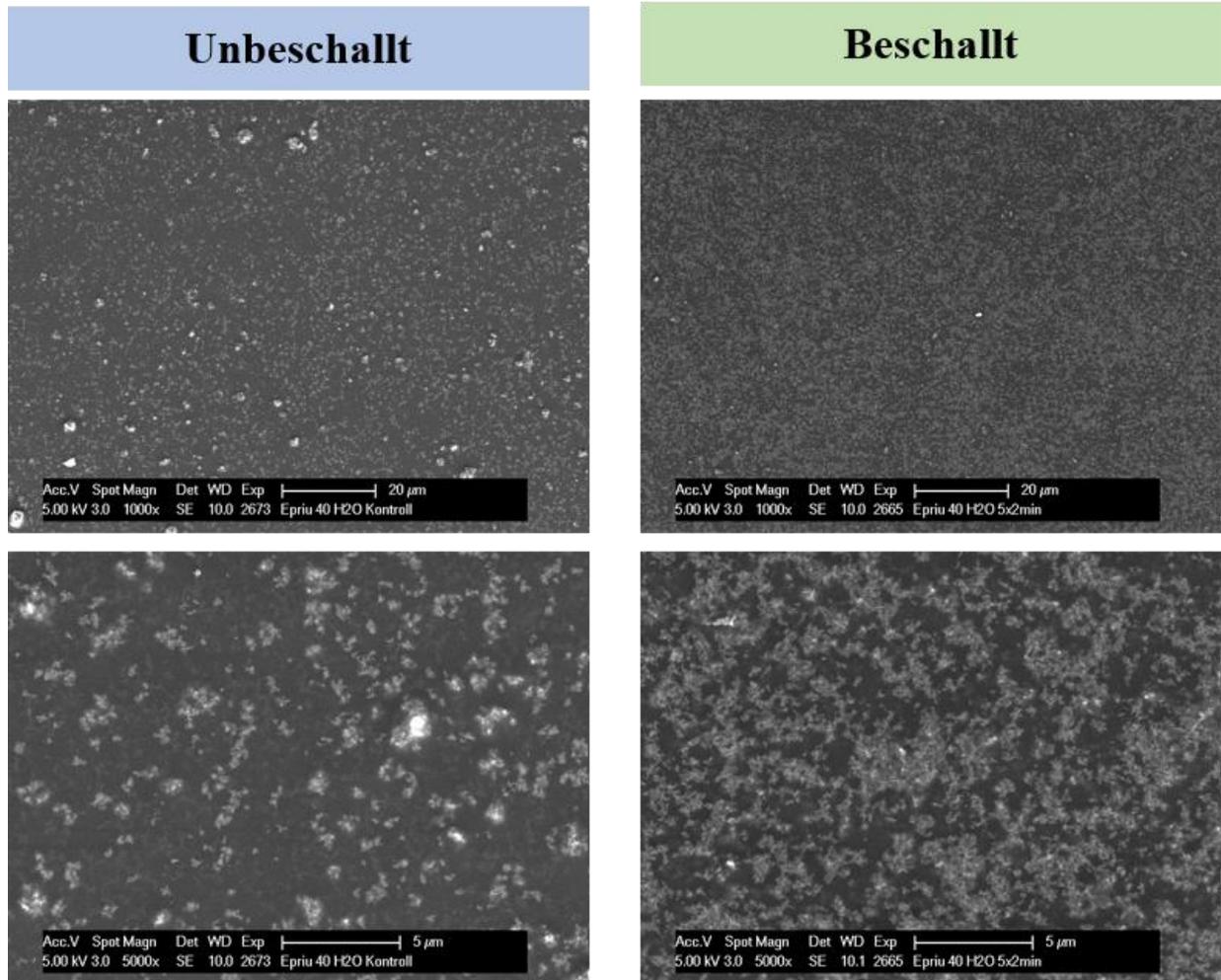
(Abb. 7). Auch die Zeit der Beschallung, nachdem ein solcher Effekt sichtbar war, unterschied sich. So musste man die Lösungen 5, 7, 8 mit 5 Intervallen (siehe Tabelle 6) beschallen. Bei allen anderen Lösungen genügten 2 Intervalle. Die Inkubationszeiten zeigten zwischen 1 min und 3 min einen deutlichen quantitativen Unterschied an Material auf den Haftfolien, zwischen 3 und 5 min jedoch keine nennenswerten Unterschiede (Abb. 13). Daher einigte man sich auf die weitere Testung der Inkubationszeiten von 1 min und 3 min.

# Eprui 20



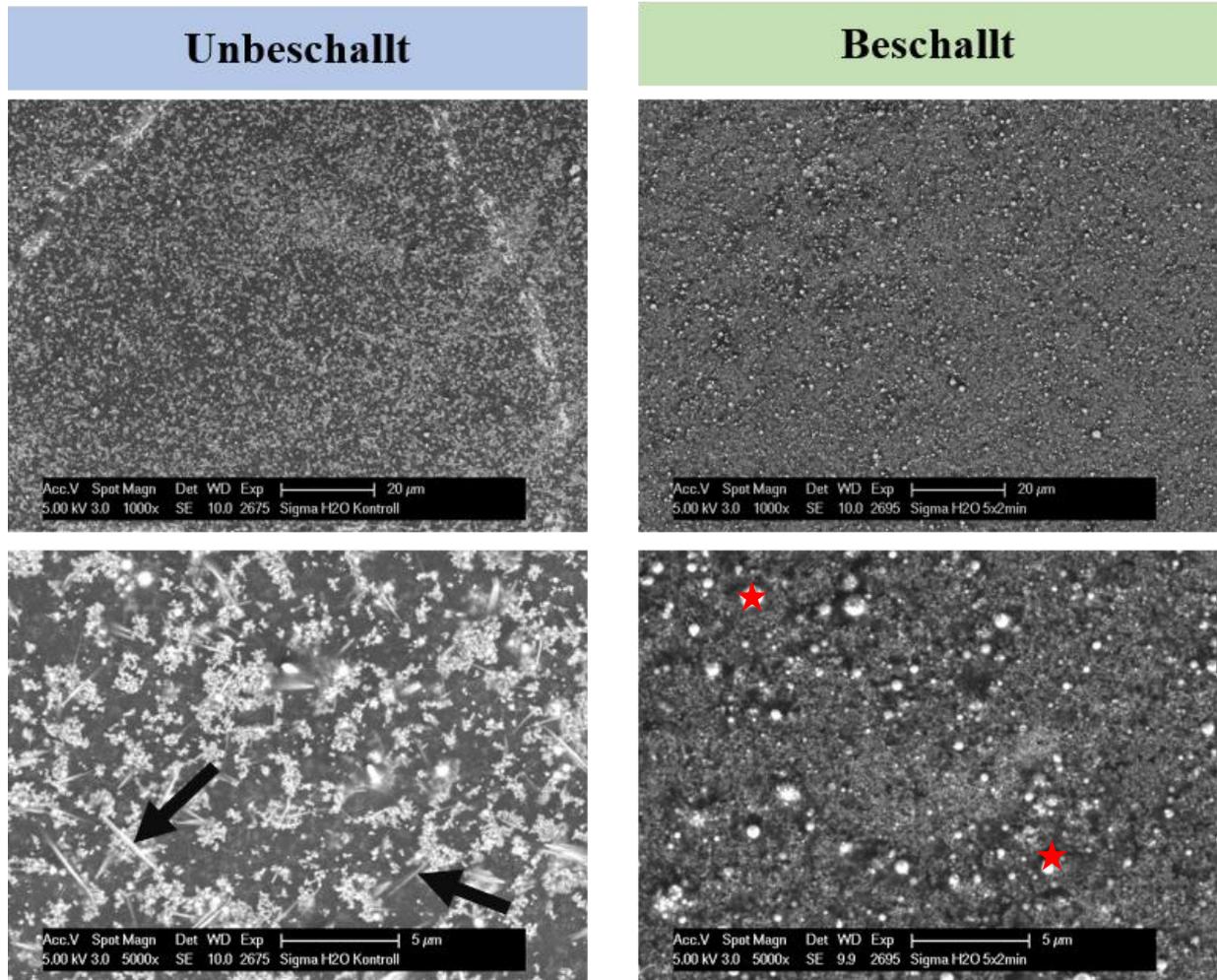
*Abbildung 7:* Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der unbeschallten und beschallten (5 Intervalle) Spüllösung von Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O auf den Haftfolien der REM-Teller. Oben in 1.000-facher und unten in 5.000-facher Vergrößerung. Vor allem in der 1.000-fachen Vergrößerung ist ein deutlicher Effekt der Homogenisierung zu erkennen. Größere Agglomerate sind durch die Beschallung aufgelöst worden.

# Eprui 40



*Abbildung 8:* Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der unbeschallten und beschallten (5 Intervalle) Spüllösung von Eprui 40 (5%) in H<sub>2</sub>O auf den Haftfolien der REM-Teller. Oben in 1.000-facher und unten in 5.000-facher Vergrößerung. Es sind nach der Ultraschallbehandlung weniger Agglomerate sichtbar.

# HAP Sigma



*Abbildung 9:* Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der unbeschallten und beschallten (5 Intervalle) Spüllösung von dem HAP Sigma (5%) in H<sub>2</sub>O auf den Haftfolien der REM-Teller. Oben in 1.000-facher und unten in 5.000-facher Vergrößerung. Die Pfeile markieren kristalline Strukturen, welche sich in manchem Proben fanden. Auffällig sind auch die großen kugelartigen Agglomerate im beschallten Zustand (rote Sterne). Generell lässt sich kein deutlicher Homogenisierungseffekt ausmachen.

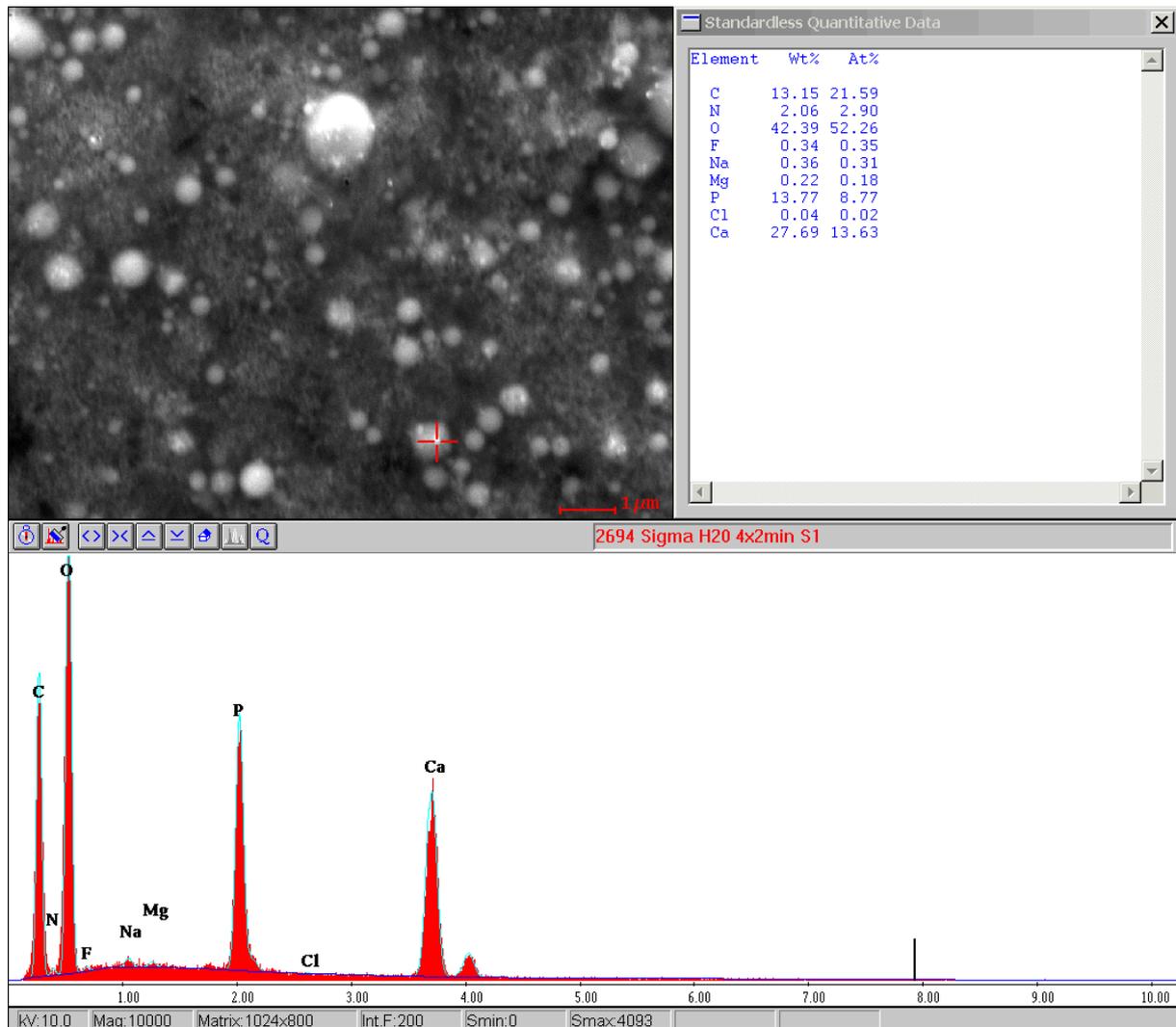


Abbildung 10: EDX-Analyse einer Suspension von dem HAP Sigma (5%) in H<sub>2</sub>O nach 4 Intervallen Ultraschallbehandlung. Untersucht wurde die Zusammensetzung der großen kugelförmigen Partikel, welche sich nach Ultraschallbehandlung bildeten (rotes Kreuz). Der geringere Kohlenstoffanteil lässt sich auf den kleineren Untersuchungsbereich der Probe und die erhöhte Auflagerungsmenge auf dem Kohlenstoffklebepad zurückführen.

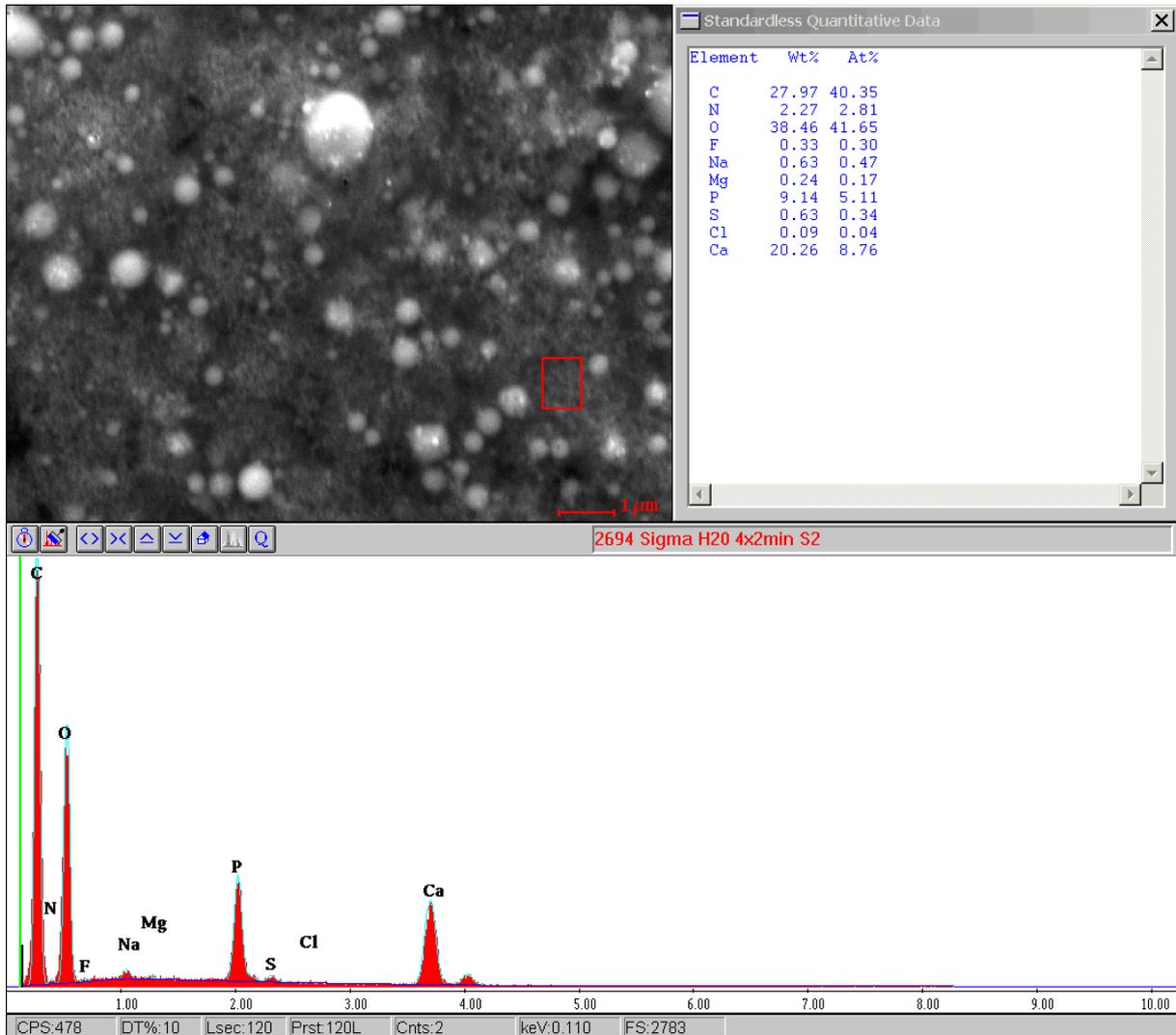
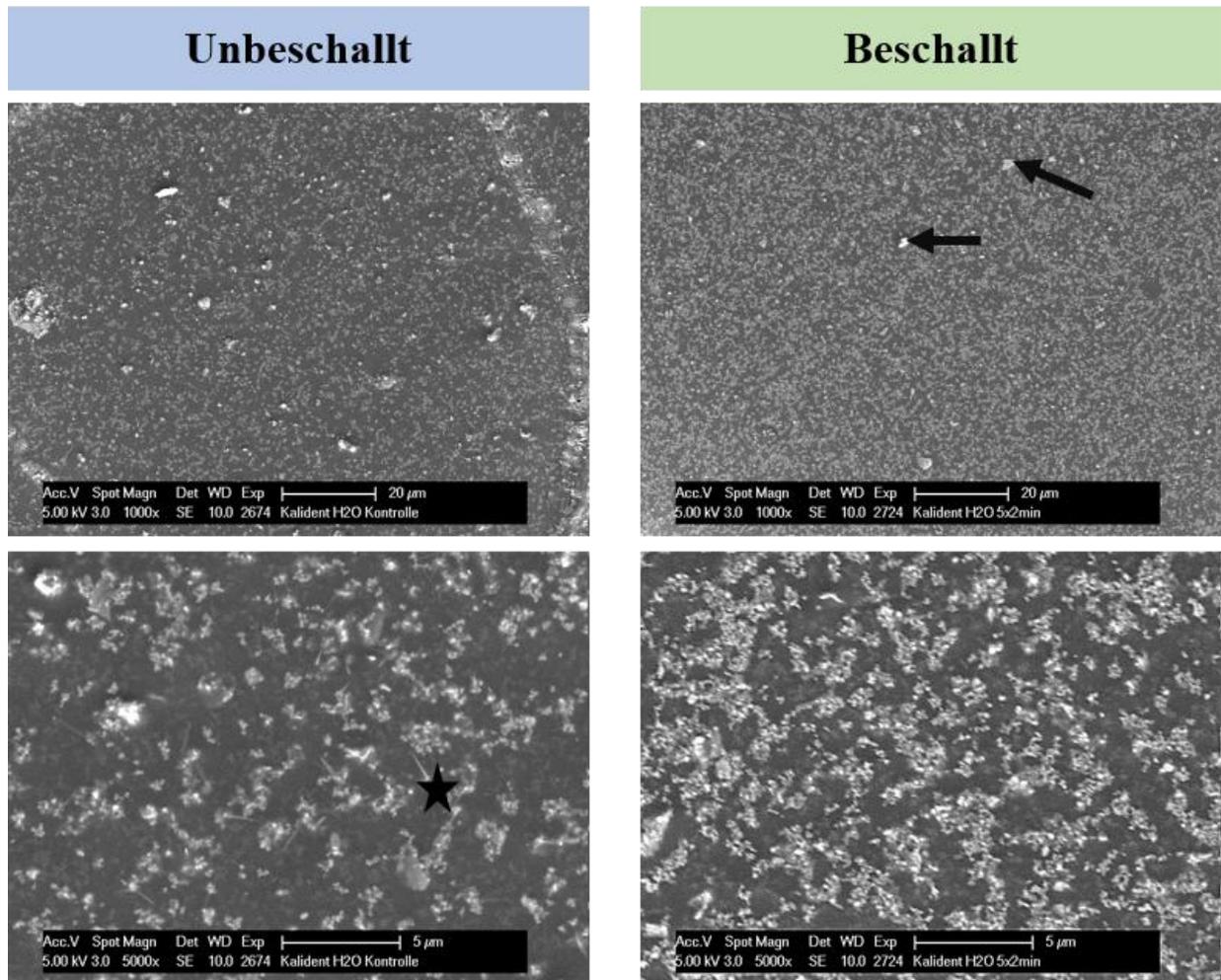
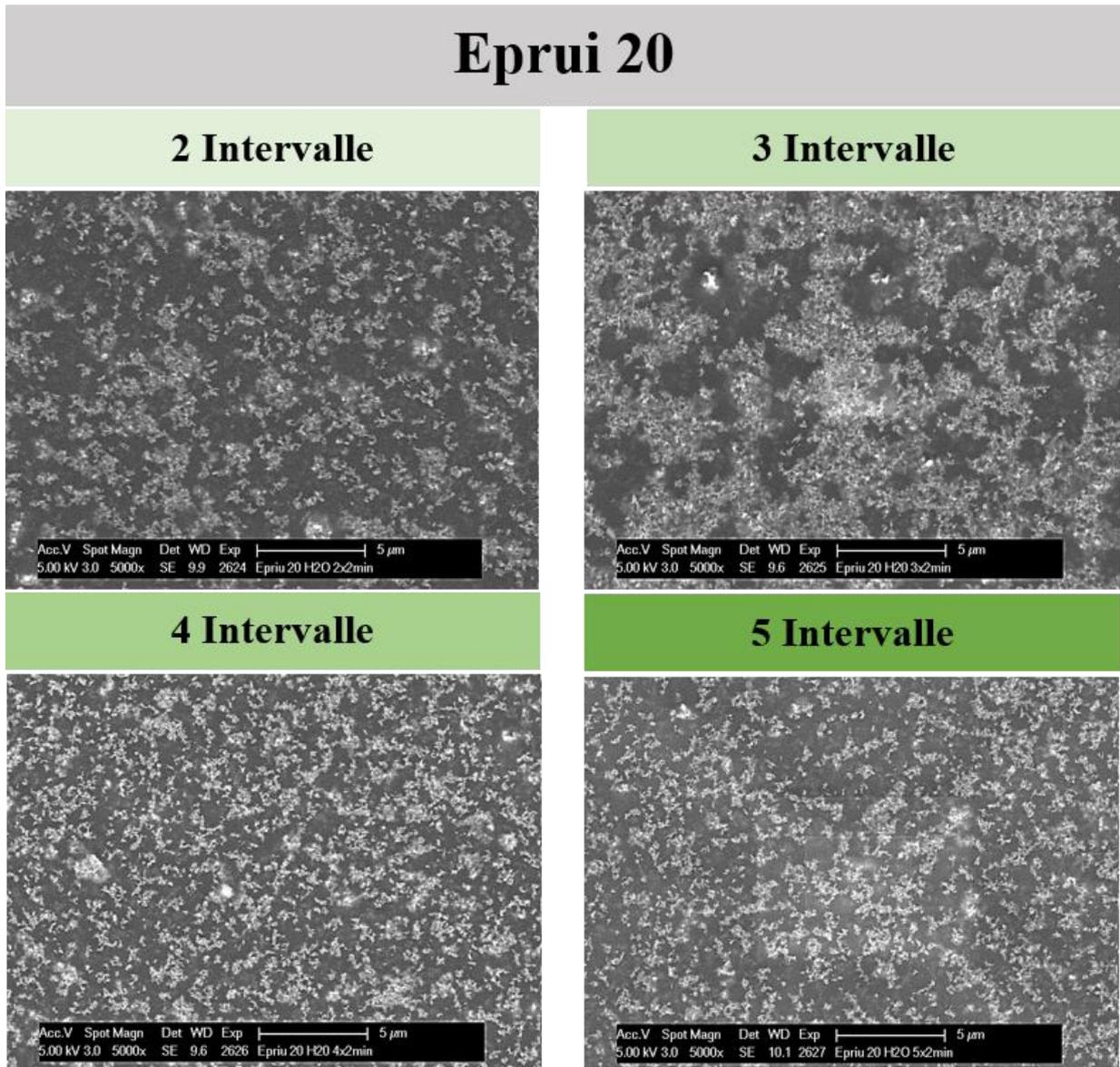


Abbildung 11: EDX-Analyse einer Suspension von dem HAP Sigma (5%) in H<sub>2</sub>O nach 4 Intervallen Ultraschallbehandlung. Untersucht wurde ein Bereich neben den großen kugelförmigen Partikeln, welche sich nach der Ultraschallbehandlung gebildet haben. Die Zusammensetzung ist unauffällig. Der HAP-Anteil ist im Vergleich zu den großen Partikeln kleiner, da weniger Material aufgelagert ist. Der Kohlenstoffanteil ist höher, da das Kohlenstoffklebebad freiliegt.

# Kalident



*Abbildung 12:* Vergleich der unbeschallten und beschallten (5 Intervalle) Spüllösung von Kalident (5%) in H<sub>2</sub>O auf den Haftfolien der REM-Teller. Es sind nach der Ultraschallbehandlung vereinzelt Agglomerate sichtbar (Pfeile). Beschallt zeigt sich ein homogenerer "Rasen". In der Kontrollprobe finden sich bei 5.000-facher Vergrößerung bereits kristalline Strukturen (Stern). Oben sieht man die Probe in 1000-facher und unten in 5.000-facher Vergrößerung.

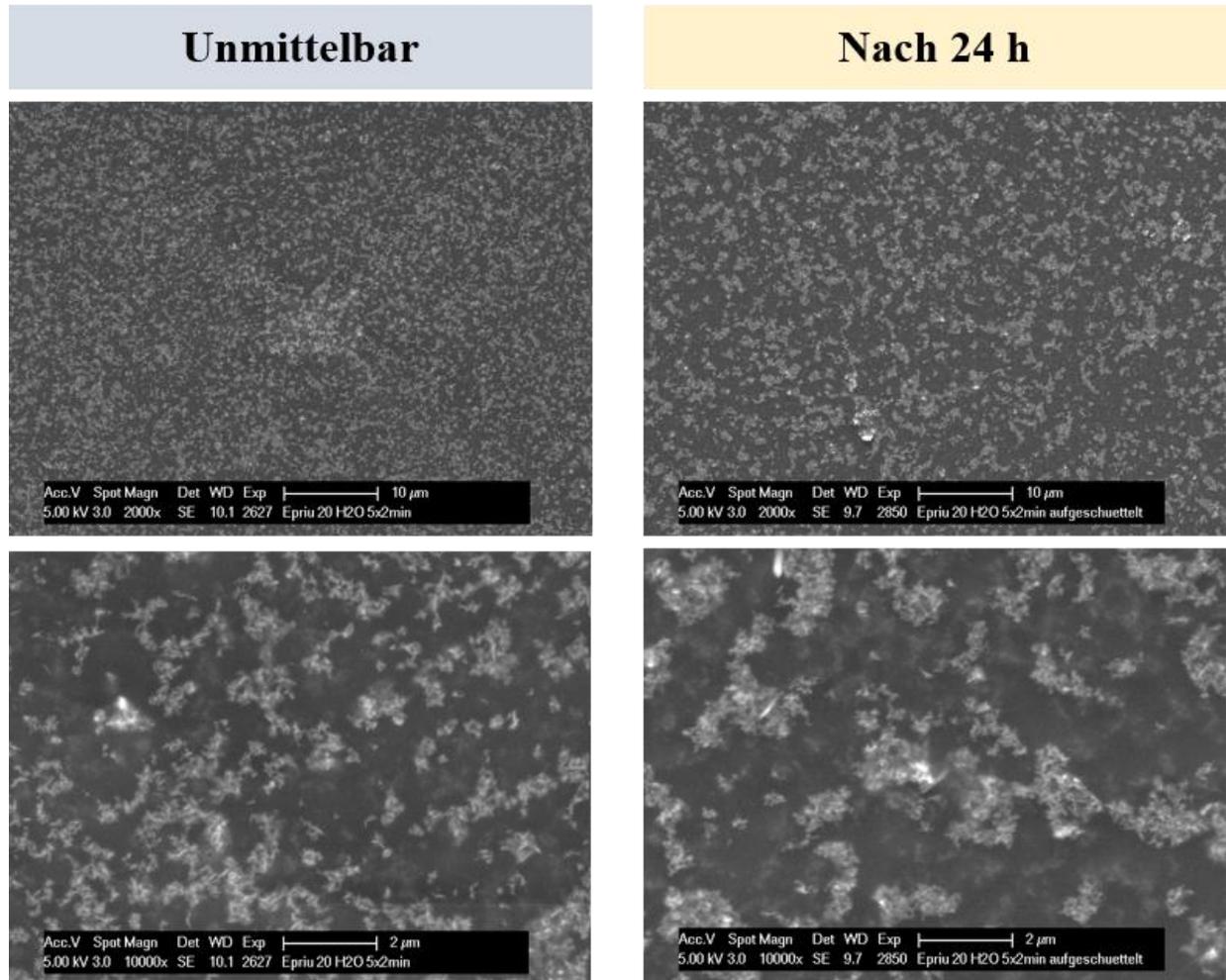


*Abbildung 13:* Vergleich der Beschallungsintervalle von Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O auf den Haftfolien der REM-Teller. Es lassen sich keine Unterschiede ausmachen. Die Bilder sind alle bei 5000-facher Vergrößerung erstellt.

Ein weiterer Faktor, der untersucht wurde, war die Lagerstabilität der beschallten Lösungen. Die Homogenisierung wurde nach 24 h Lagerung nochmals per REM kontrolliert. Dabei wurden die gleichen Lösungen nach 24 h manuell aufgeschüttelt und auf die Haftfolien aufgetragen. Es kam bei den Lösungen 2,3,7,8 zur Bildung kristalliner Strukturen und die Lösungen 2,3,4,5,6 zeigten eine verminderte oder nicht mehr vorhandene Homogenität der Partikel (Abb. 15,16,17). Somit war lediglich das Eprui 20 (5%) in sterilem Wasser (Abb. 14) geeignet für weitere Versuche, also das Produkt mit der kleinsten Nanopartikelgröße (~20 nm).

Die verwendeten Lösungsmittel zeigten keine nachweisbaren Effekte. Daher wurde nur mit sterilem entionisiertem H<sub>2</sub>O weiter verfahren.

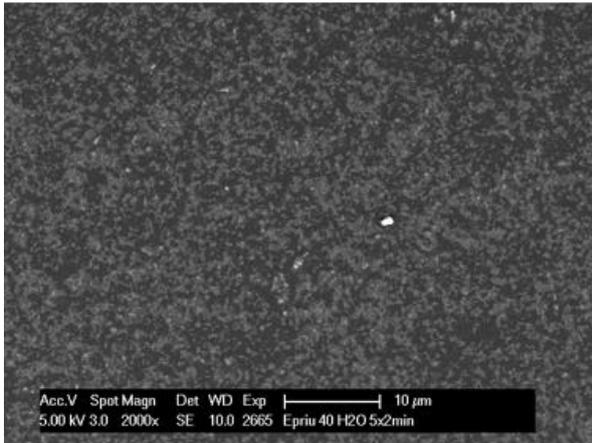
## Eprui 20



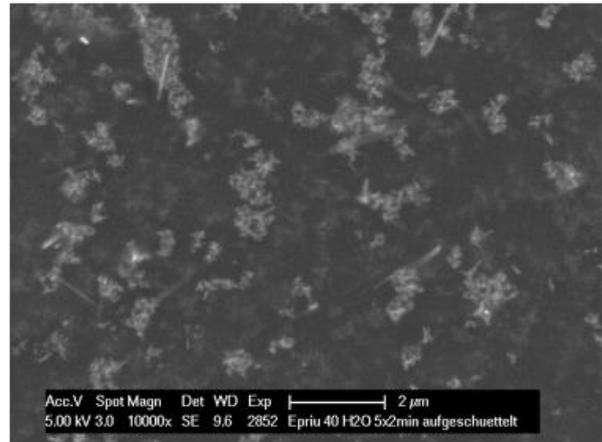
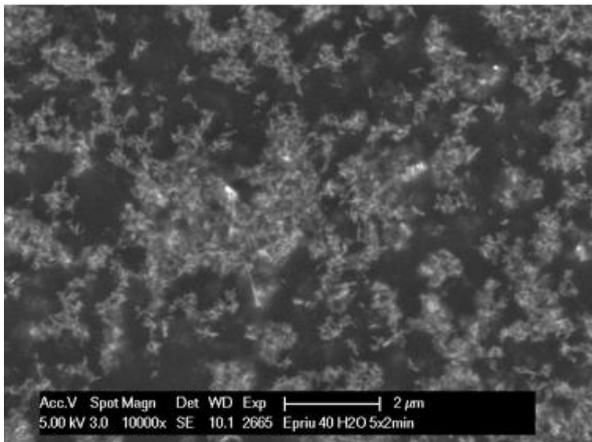
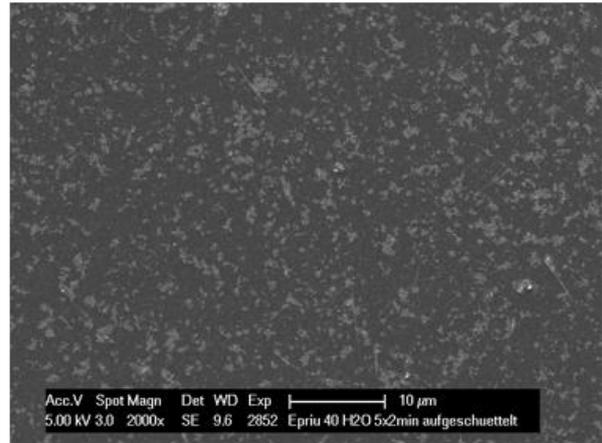
*Abbildung 14:* Vergleich der unmittelbar nach Beschallung pipettierten Spüllösung Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O mit der manuell aufgeschüttelten Spüllösung nach 24 h auf den Haftfolien der REM-Teller (5 Intervalle der Beschallung). Oben sieht man die Proben in 2.000-facher und unten in 10.000-facher Vergrößerung. Es lassen sich nur im geringen Umfang kleine Agglomerate nach 24 h Lagerung erkennen. Trotz allem ist die Homogenisierung beständig.

# Eprui 40

## Unmittelbar



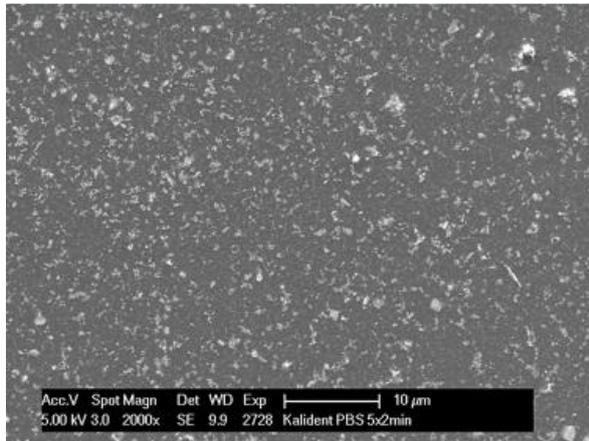
## Nach 24 h



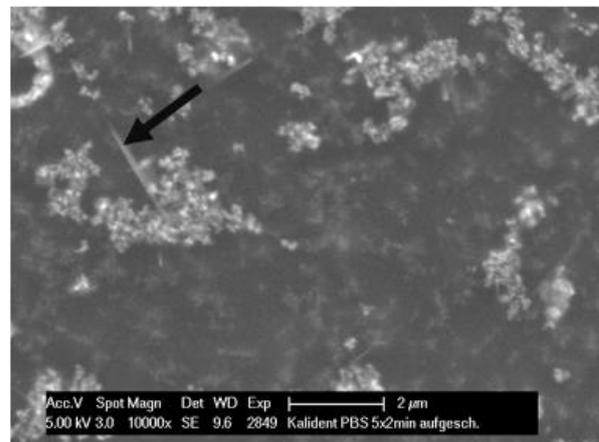
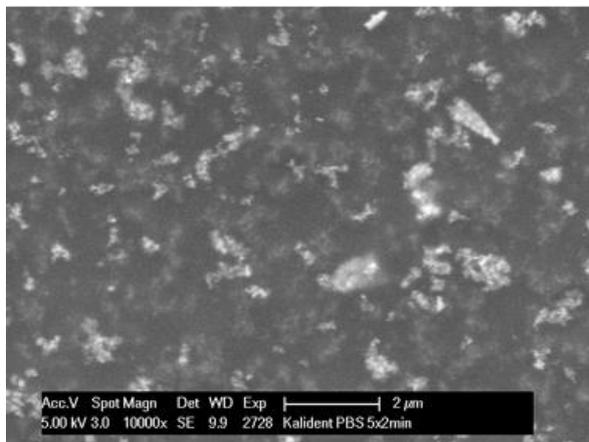
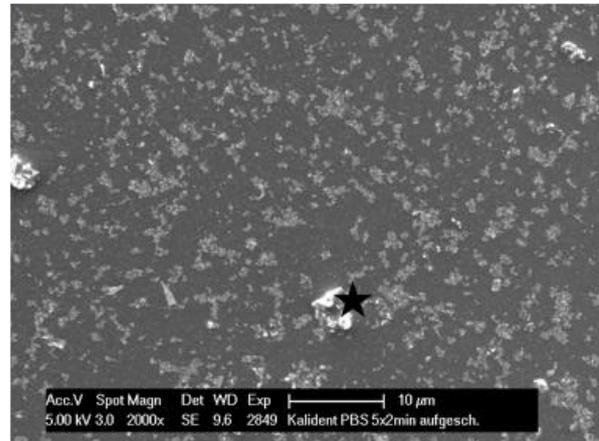
*Abbildung 15:* Vergleich der unmittelbar nach Beschallung pipettierten Spüllösung Eprui 40 (5%) in H<sub>2</sub>O mit der manuell aufgeschüttelten Spüllösung nach 24 h auf den Haftfolien der REM-Teller (5 Intervalle der Beschallung). Oben sieht man die Proben in 2.000-facher und unten in 10.000-facher Vergrößerung. Es lassen sich nur im geringen Umfang kleine Agglomerate nach 24 h Lagerung erkennen. Trotz allem ist die Homogenisierung beständig.

# Kalident

## Unmittelbar

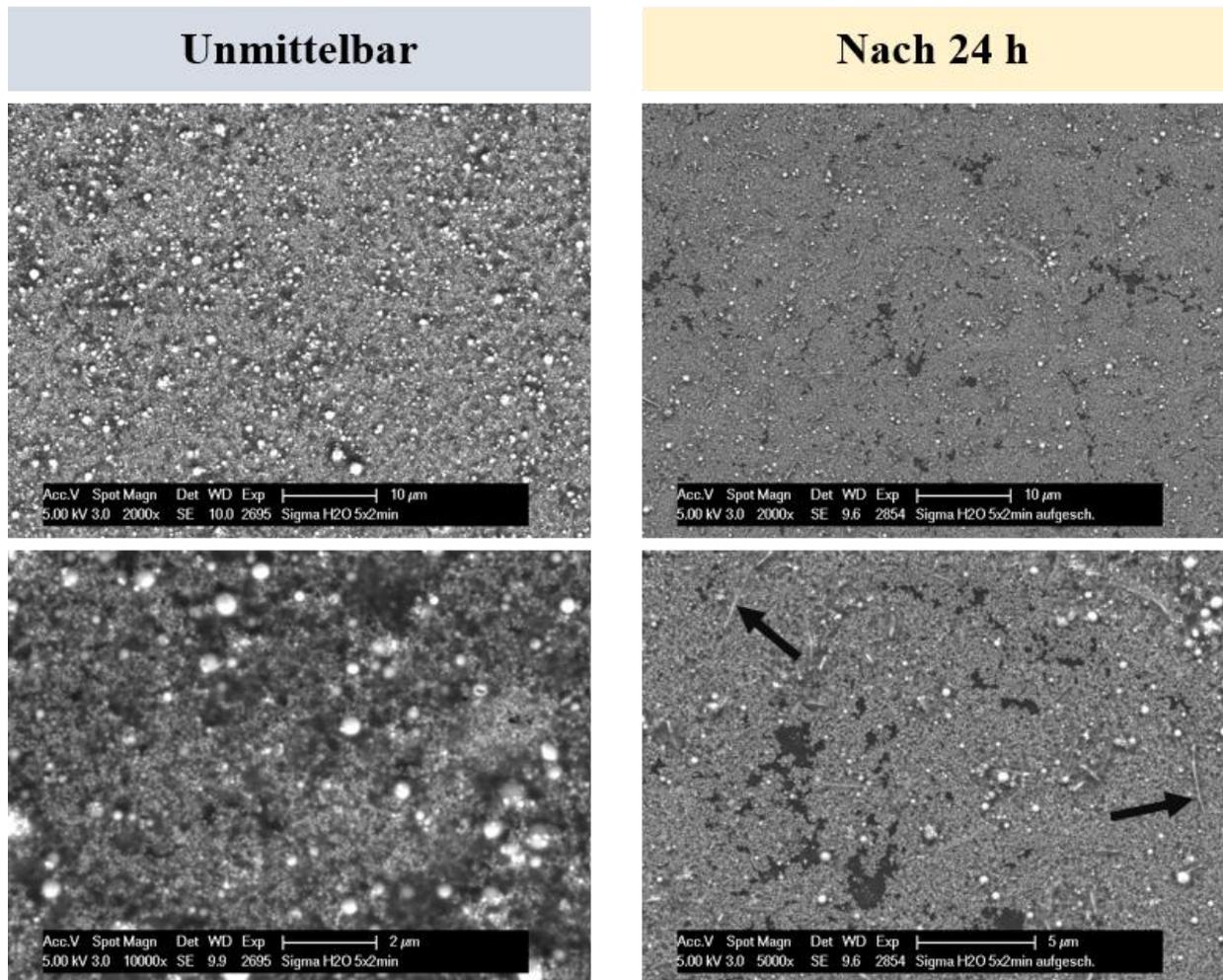


## Nach 24 h



*Abbildung 16:* Vergleich der unmittelbar nach Beschallung pipettierten Spüllösung Kalident (5%) in PBS mit der manuell aufgeschüttelten Spüllösung nach 24 h auf den Haftfolien der REM-Teller (5 Intervalle der Beschallung). Oben in 2.000-facher und unten in 10.000-facher Vergrößerung. Nach 24 h sind größere Agglomerate (Stern) und kristalline Strukturen (Pfeil) erkennbar.

# HAP Sigma



*Abbildung 17:* Vergleich der unmittelbar nach Beschallung pipettierten Spüllösung vom HAP Sigma (5%) in H<sub>2</sub>O mit der manuell aufgeschüttelten Spüllösung nach 24 h auf den Haftfolien der REM-Teller (5 Intervalle der Beschallung). Oben in 2.000-facher und unten in 10.000-facher Vergrößerung. Nach 24 h sind kristalline Strukturen (Pfeile) erkennbar und die Partikel sind nicht mehr gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt.

Alle Faktoren (optimale Intervallanzahl, HAP-Produkt, Lösungsmittel, Lagerbeständigkeit) wurden berücksichtigt und analysiert. Tabelle 7 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse.

Tabelle 7: Auswertung der Vorversuche

5% Lösungen							
Eprui 20		Eprui 40		Kalident		Sigma	
H <sub>2</sub> O	PBS	H <sub>2</sub> O	PBS	H <sub>2</sub> O	PBS	H <sub>2</sub> O	PBS
				Beschallung mit Sonoplus homogenizor			
Zusammen- setzung:	Zeit der Beschallung bis Effekt sichtbar		Homogenisierung		Zeitstabilität Nach 24 h		
Eprui 20 (5 %) in H <sub>2</sub> O	2 x 2 min		sehr deutlich sichtbar		Stabil		
Eprui 20 (5 %) in PBS	2 x 2 min		deutlich sichtbar		instabil, kristalline Strukturen		
Eprui 40 (5 %) in H <sub>2</sub> O	2 x 2 min		sehr deutlich sichtbar		instabil, kristalline Strukturen		
Eprui 40 (5 %) in PBS	2 x 2 min		sichtbar		gering stabil		
Kalident (5 %) in H <sub>2</sub> O	5 x 2 min		sichtbar		instabil		
Kalident (5 %) in PBS	2 x 2 min		leicht sichtbar		instabil		
HAP Sigma- Aldrich (5 %) in H <sub>2</sub> O	5 x 2 min		sehr deutlich sichtbar		stabil, kristalline Strukturen		
HAP Sigma-Aldrich (5 %) in PBS	5 x 2 min		sehr deutlich sichtbar		stabil, kristalline Strukturen		

Tabelle 7 zeigt eine Übersicht der verschiedenen Suspensionen, welche in den Vorversuchen getestet wurden und welche Ergebnisse in der REM-Auswertung damit erzielt wurden. Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O zeigt dabei die besten Ergebnisse.

#### 4.1.2 Vorversuche Schmelzprüfkörper

Nachdem sich im Rahmen der Vorversuche Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O als geeignet erwiesen hatte, wurde nun diese Spüllösung auf den bovinen Rinderprüfkörpern getestet. Die Vorgehensweise war zunächst identisch mit dem Vorgehen der Vorversuche. Abb. 18 zeigt zunächst einen komplett unbehandelten Schmelzprüfkörper als Vergleichsprobe. Die Oberfläche zeigt trotz der feinkörnigen Bearbeitung der Schmelzflächen Unebenheiten im Mikro- und Nanobereich und auch Schleifspuren.

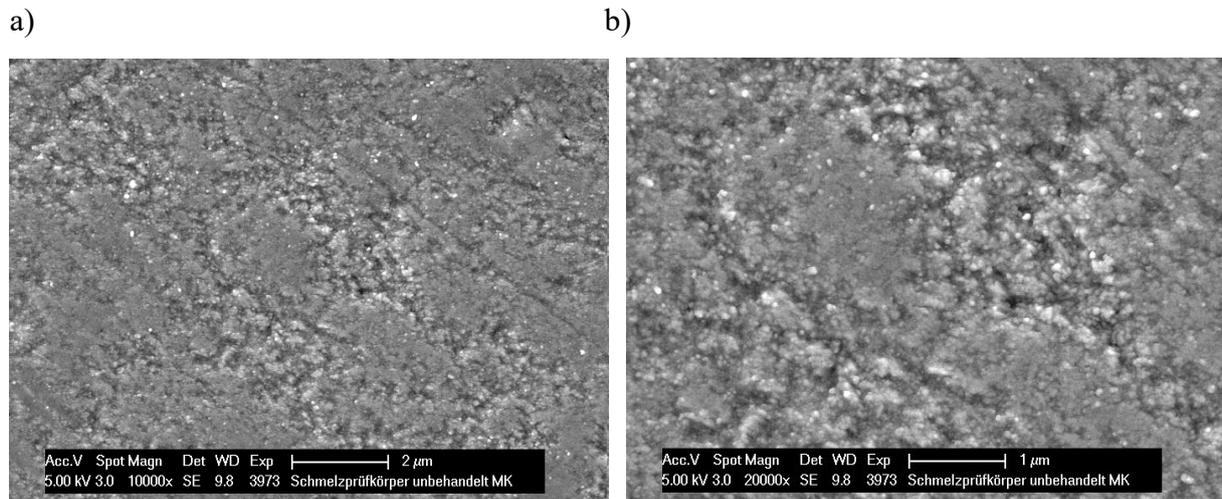


Abbildung 18: Reine Schmelzprüfkörper ohne Spülprotokoll.

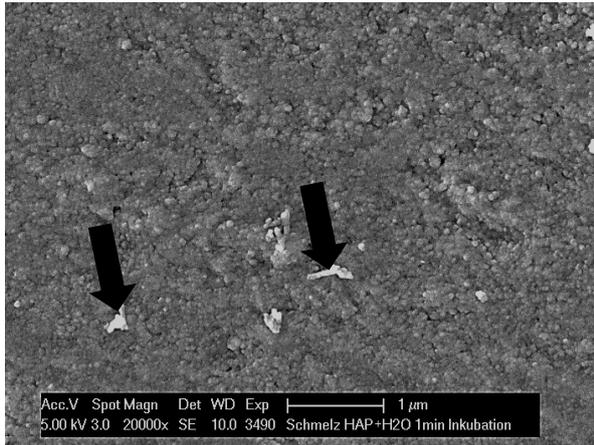
- a) 10.000-fache Vergrößerung
- b) 20.000-fache Vergrößerung

Dann wurden die beschallten Suspensionen auf den Oberflächen der Prüfkörper angewendet. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der behandelten Proben zeigten sehr wenig Material auf den Prüfkörpern. Zunächst wurde vermutet, dass es an der geringen Menge an aufpipettiertem Material auf der sehr viel kleineren Probenoberfläche lag. Da die Flächen zum Aufpipettieren des Probematerials deutlich kleiner waren als die der REM-Teller, konnte deutliche weniger Material aufgebracht werden und somit kam auch verhältnismäßig weniger HAP-Produkt in Kontakt mit der Schmelzoberfläche, sowohl bei einer Inkubationszeit von 1 min als auch von 3 min (Abb. 19). Daher war hier ein Vergleich einer Ultraschallbehandlung zur Kontrolle nicht möglich.

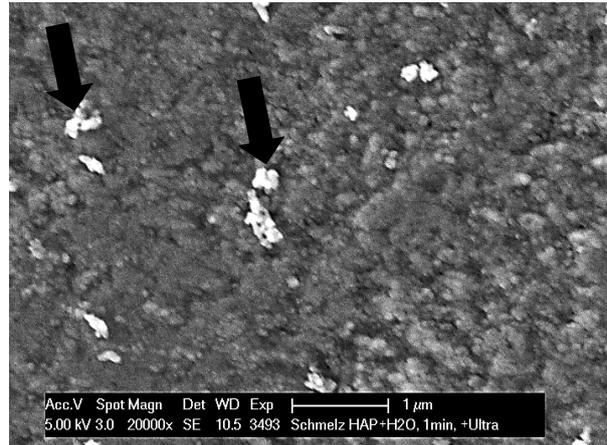
Es wurden im gleichen Versuchsablauf auf den Haftfolien der REM-Teller Kontrollproben mit den gleichen Spüllösungen angefertigt. Hier konnten eindeutig wie in den Vorversuchen HAP-Partikel auf den Oberflächen nachgewiesen werden. Somit kann ausgeschlossen werden, dass

die angefertigten Spüllösungen Ursache für die mangelnden HAP-Partikel auf der Schmelzoberfläche waren.

a )



b)



*Abbildung 19:* Schmelzprüfkörper mit Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O 1 min inkubiert. Die Pfeile markieren die HAP-Partikel. Generell ist sehr wenig Materialauflagerung zu finden.

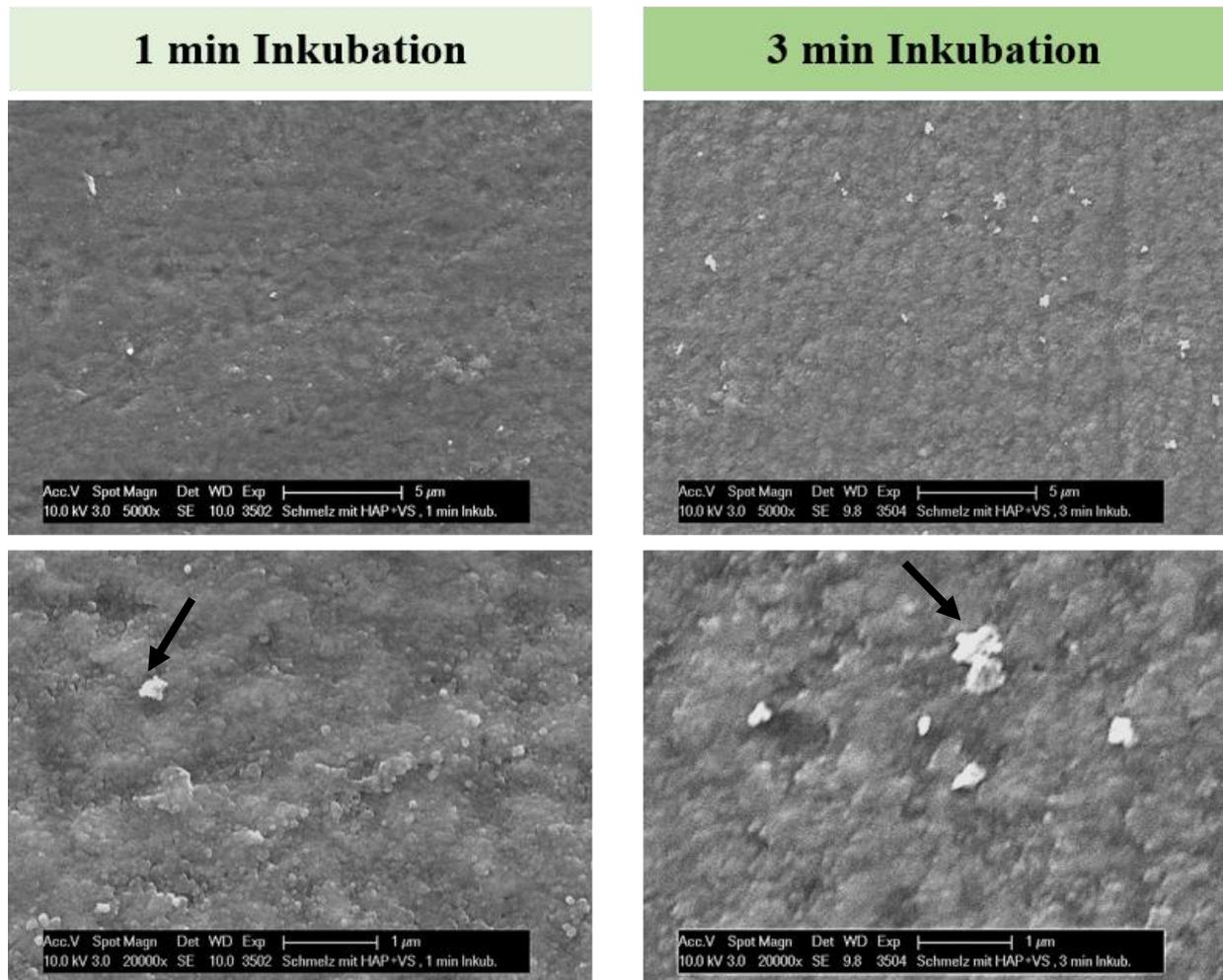
- a) 1 min Inkubationszeit, 20.000-fache Vergrößerung
- b) 3 min Inkubationszeit, 20.000-fache Vergrößerung

#### Addition von Vollspeichel

Um die Versuche der intraoralen Situation noch näher zu bringen, wurde zudem Speichel als neuer Mediator mit eingebracht. Da eine *in vivo* angewendete Spüllösung unausweichlich Kontakt mit dem Speichel hat, wurde versucht die intraorale Situation so gut wie möglich *in vitro* nach zu simulieren. Da man keinen genauen Ansatzpunkt hatte, in welchem Mischungsverhältnis sich die Spüllösung im Mundraum mit dem Speichel mischt und man generell erstmal den Einfluss des Speichels auf die Ergebnisse darstellen wollte, ist man von einem Verhältnis 1:1 ausgegangen.

Wie in Abb. 20 zu erkennen, zeigen sich kaum aufgelagerte HAP-Partikel auf der Schmelzoberfläche. Auch eine längere Inkubation von 3 min zeigt keinen Effekt auf die Menge der aufgelagerten Partikel. Damit lässt sich keine Aussage über den Effekt einer Homogenisierung durch die Ultraschallbehandlung der Suspensionen treffen.

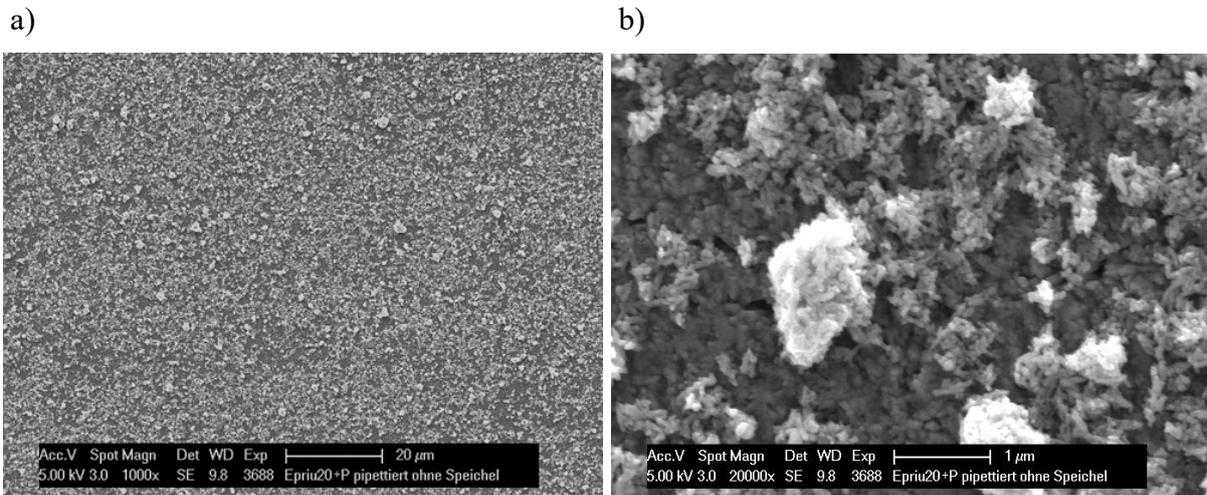
## Eprui 20 in H<sub>2</sub>O und Vollspeichel (1:1)



*Abbildung 20:* Die Abbildungen zeigen Schmelzprüfkörper inkubiert in HAP und Vollspeichel mit einem Mischungsverhältnis von 1:1. Links 1 Minute Inkubation, rechts 3 min Inkubation. Es sind so gut wie keine HAP-Partikel auf der Oberfläche sichtbar (Pfeile).

### Einfluss einer Pellikel

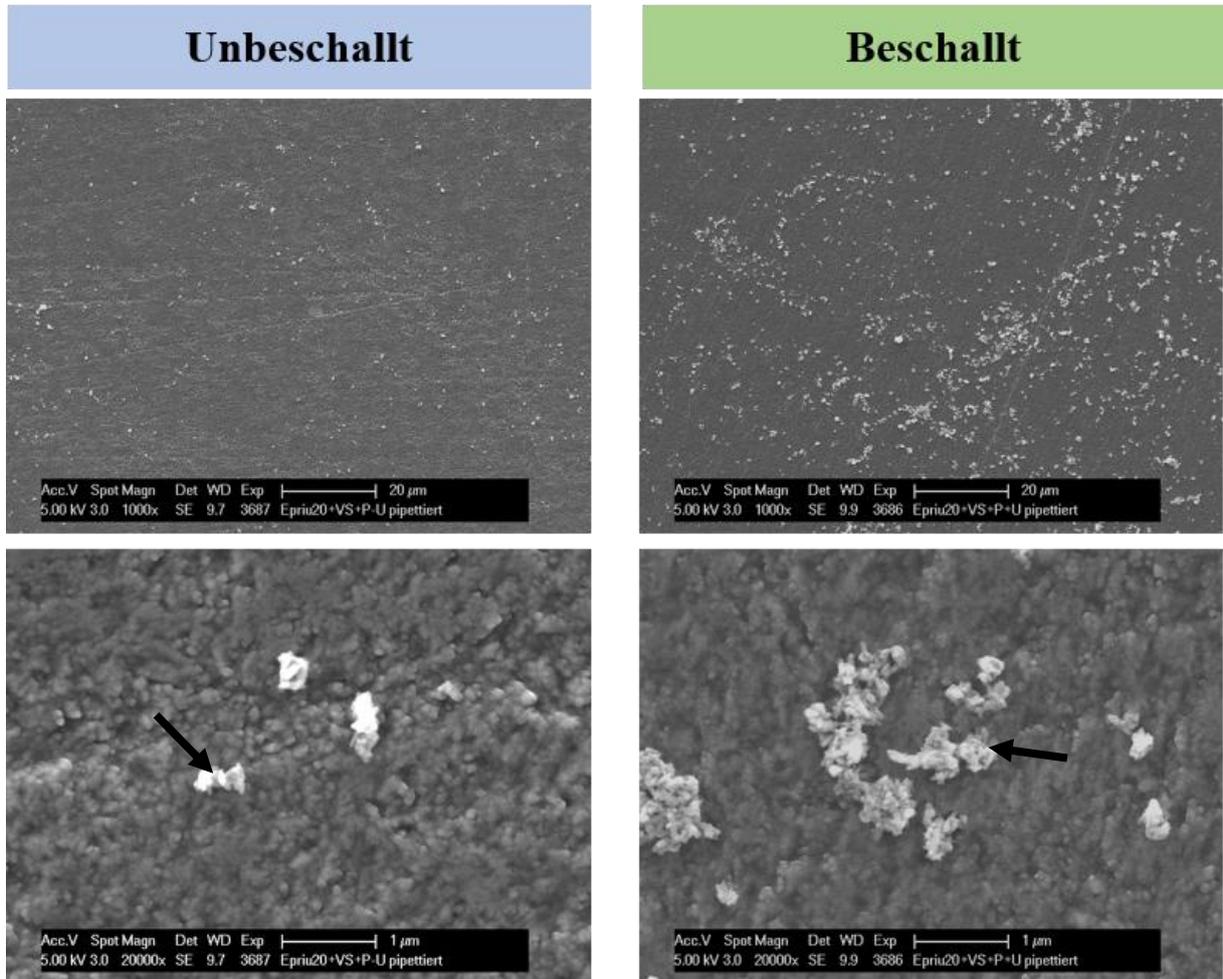
In der nächsten Versuchsreihe wurde getestet, welchen Einfluss eine 3 min Pellikel auf die Adaption der HAP-Partikel aus der Spüllösung hat. Hier zeigte sich wie in Abbildung 21 zu sehen, dass wesentlich mehr HAP-Partikel auf der Prüfkörperoberfläche anhafteten, ein deutlicher Unterschied zu den Proben ohne Pellikel. Eine 3 min Pellikel verbessert somit die Interpretation der Ergebnisse einer Ultraschallbehandlung der Suspensionen.



*Abbildung 21:* Die Abbildung zeigt einen Schmelzprüfkörper mit einer 3 min Pellikel, welcher in Eprui 20 (10%) in H<sub>2</sub>O 3 min inkubiert wurde. Darauf ist eine durch Agglomerate dominierte große Ansammlung von HAP-Partikeln zu sehen. Links (a) in 1000-facher und rechts (b) in 20.000-facher Vergrößerung.

In die weiteren Versuche wurde der Speichel als unabdingbare intraorale Komponente integriert. Somit wurden bei den Versuchen sowohl eine 3 min Pellikel, als auch die Mischung der Spüllösungen mit Vollspeichel weiterverwendet. Auf den zahlreichen Ergebnisbildern konnten leider kaum Unterschiede zu den Bildern ohne Pellikel festgestellt werden (Abb. 22). Es fand sich nur sehr wenig HAP-Material auf der Prüfkörperoberfläche, was den Nachweis eines Effektes der Ultraschallbehandlung erschwerte. Dies lässt sich also auf die Mischung der Spüllösung mit Vollspeichel zurückführen.

## Eprui 20 in H<sub>2</sub>O und Vollspeichel (1:1) auf Schmelz mit 3 min Pellikel

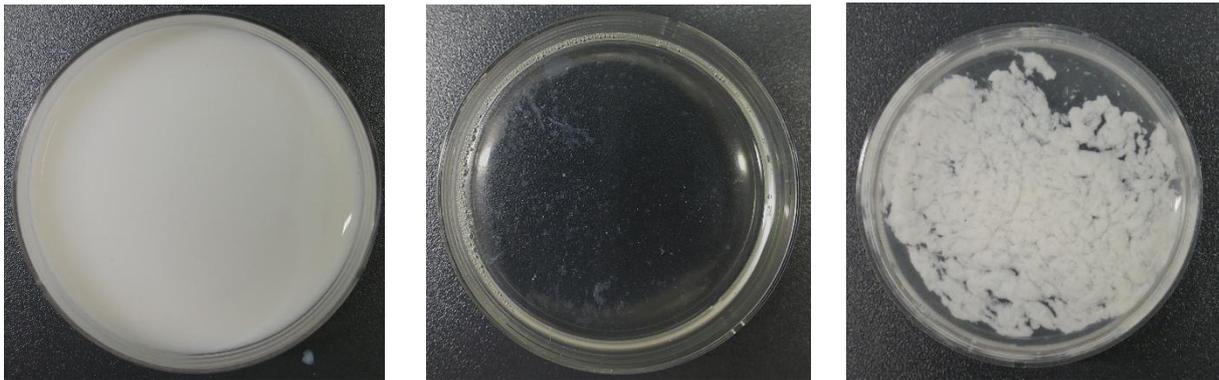


*Abbildung 22:* Alle Bilder zeigen Schmelzprüfkörper mit einer 3 min Pellikel und mit Eprui 20 (10%) in H<sub>2</sub>O und Vollspeichel (1:1) 3 min inkubiert. Rechts ist die Suspension mit Ultraschall behandelt, links nicht. Auf beiden Prüfkörpern ist wenig HAP-Material vorhanden (Pfeile).

Die mit Vollspeichel versetzten Lösungen zeigten zusammenfassend in der Auswertung sehr wenig HAP-Partikel auf den Schmelzprüfkörpern.

### Makroskopische Beobachtungen

Betrachtet man makroskopisch das Verhalten einer Mischung aus Vollspeichel und einer Spüllösung, sei es beschallt oder unbeschallt, erkennt man, dass sich die einzelnen Komponenten nur schwer miteinander mischen (Abb. 23). Es bilden sich weiße flockige Agglomerate und dazwischen verbleibt durchsichtiger Speichel. Zudem entsteht eine gelartige Konsistenz. Alleine diese Beobachtung zeigt den gravierenden Einfluss von Speichel auf die Homogenität einer Spüllösung.



a)

b)

c)

*Abbildung 23:* Verschiedene Komponenten in Petrischalen auf schwarzem Untergrund

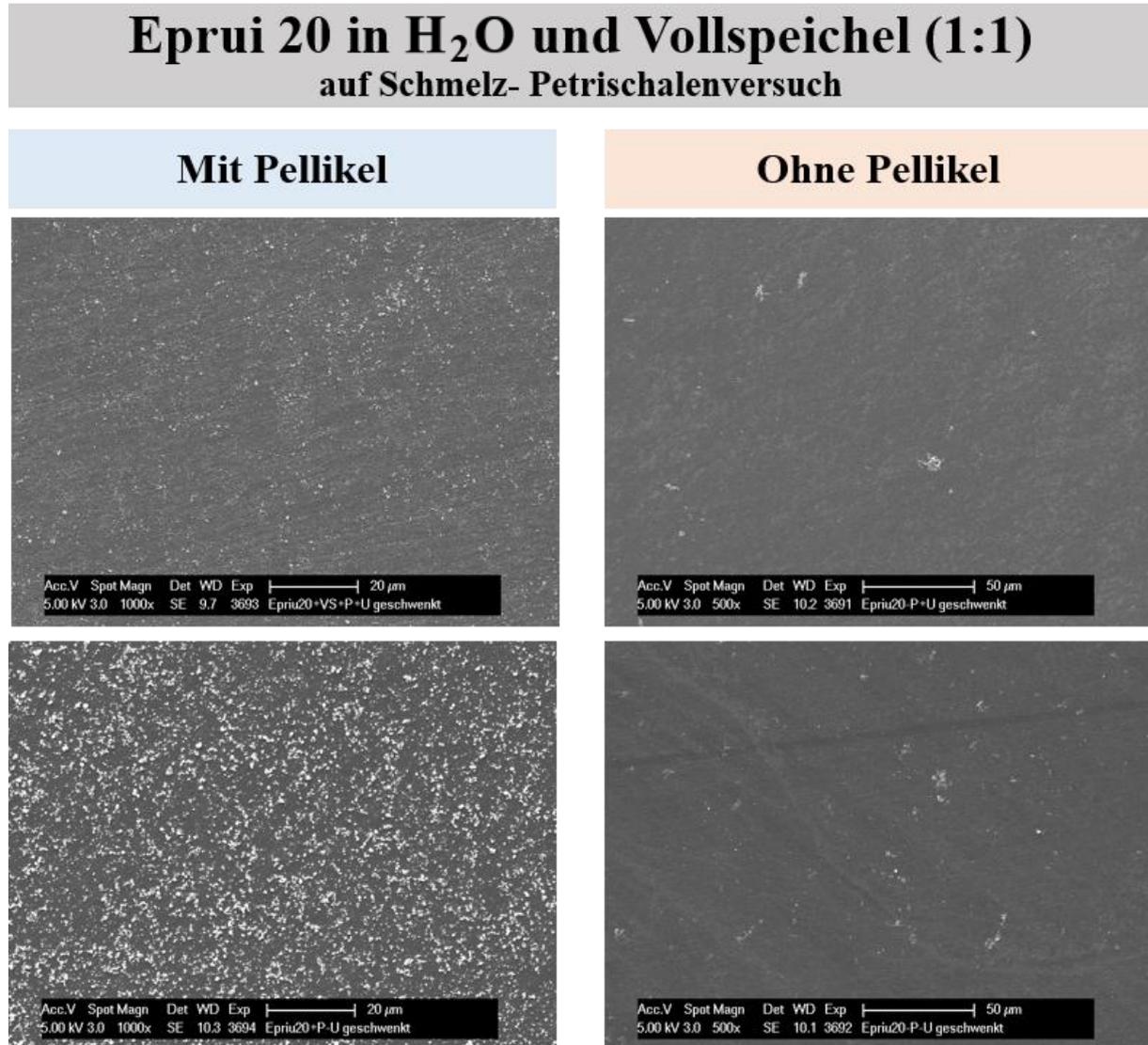
- a) Epriu 20 (10%) in H<sub>2</sub>O
- b) Vollspeichel
- c) Epriu 20 (10%) in H<sub>2</sub>O + Vollspeichel (1:1)

Beim Aufpipettieren der Suspensionen ist dieser Effekt auch deutlich sichtbar gewesen. Da die HAP-Partikel flockenartig ausfallen, war es schon makroskopisch zu sehen, dass wenig HAP-Produkt auf den Schmelzprüfkörpern verbleiben würde.

### Ergebnisse Petrischalenversuch

Daher wurde eine neue Variante der extraoralen Testung entwickelt, damit der Schmelzprüfkörper mit mehr HAP in Kontakt kommen konnte. Dabei wurden die Spüllösung und der Vollspeichel in einer Petrischale gemischt und kurz per Hand in Bewegung gebracht. Dann wurde der Prüfkörper mit der Schmelzseite nach oben hinzugelegt. Die Petrischale wurde dann eine Minute weiter per Hand bewegt. Dann wurde der Prüfkörper entnommen und 5 s gewässert. Das weitere Verfahren entsprach dem bisherigen.

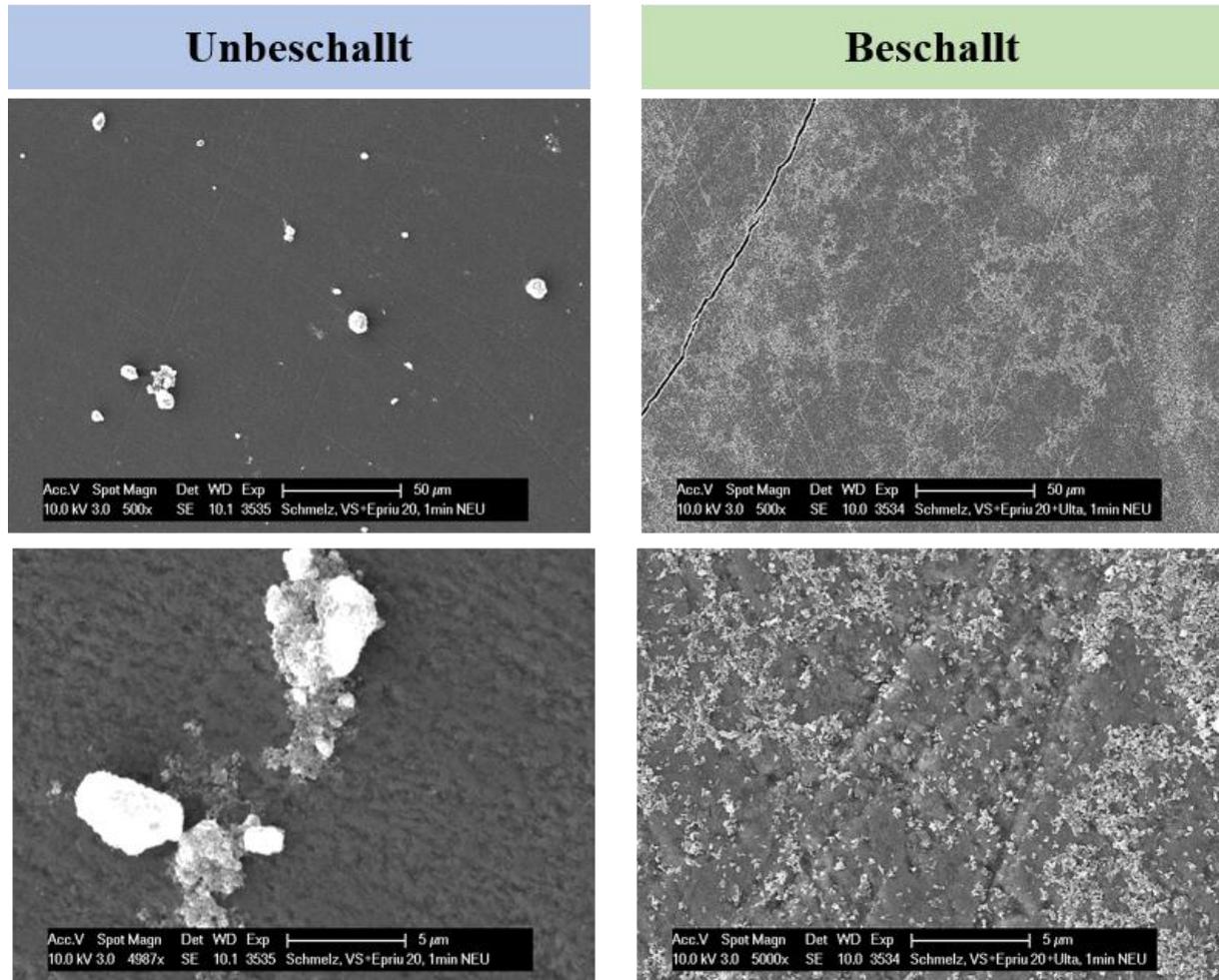
Die Ergebnisse zeigen im Vergleich zu der Aufpipettierten Variante deutliche Unterschiede. Die Pellikel behafteten Prüfkörper zeigen deutlich mehr Material als die Prüfkörper ohne Pellikel (Abb. 24). Eine Beschallung zeigt weniger große Agglomerate.



*Abbildung 24:* Schmelzprüfkörper mit und ohne 3 min Pellikel in Eprui 20 (10%) in H<sub>2</sub>O und Vollspeichel (1:1) geschwenkt in einer Petrischale (3 min Inkubation). Links in 1.000-facher und rechts in 500-facher Vergrößerung.

Auch ein reiner Vergleich ohne den Einfluss einer Pellikel nur zwischen der beschallten und unbeschallten Spüllösung in dem „Schwenkversuch“ zeigt einen deutlichen Einfluss der Ultraschallbehandlung (Abb. 25).

## Eprui 20 in H<sub>2</sub>O und Vollspeichel (1:1) ohne Pellikel



*Abbildung 25:* Vergleich der beschallten mit der unbeschallten Spüllösung von Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O und Vollspeichel (1:1) auf Schmelz. Oben in 500-facher und unten in 5.000-facher Vergrößerung.

Allerdings zeigen diese Bilder auch wiederum keinen so deutlichen Effekt wie die Bilder von den REM-Tellern. Nur mittels der „Schwenk-Methode“ zeigen sich mehr HAP-Partikel auf der Oberfläche.

### Fazit aus der Vorversuchsreihe

Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O zeigte die besten Ergebnisse auf den Haftfolien der REM-Teller. Es waren keine Unterschiede zwischen den Lösungsmitteln zu erkennen, weshalb weiter mit H<sub>2</sub>O gearbeitet wurde. Bereits zwei Intervalle der Beschallung reichten aus. Die Zugabe von Vollspeichel führt bereits makroskopisch sichtbar zu einer Agglomeratbildung. Es verbleiben weniger HAP-Partikel auf den Prüfkörpern. Eine Pellikel führt zu einer Haftsicht und bindet mehr Partikel auf den Prüfkörpern.

## 4.2 Hauptversuchsreihe- Intraorale Versuchsreihe

In der Hauptversuchsreihe ging es im Wesentlichen um die **intraorale** Testung der Spüllösungen. Es sollte vor allem gezeigt werden, dass auch hier eine Ultraschallbehandlung einen Effekt auf die Homogenität der Hydroxylapatitpartikel in den Suspensionen hat. Dieser Effekt sollte wie in den Vorversuchen auf Schmelzprüfkörpern im Rasterelektronenmikroskop dargestellt werden. Die intraoralen Tests brachten einige neue zu berücksichtigende Faktoren mit sich.

Da bei jedem Spülprotokoll mehrere Prüfkörper verwendet wurden, wurden diese Bilder zunächst untereinander verglichen um eine Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Letztendlich kann man festhalten, dass sich die Proben der gleichen Versuchsprotokolle mikroskopisch gleichen.

### 4.2.1 Einfluss der Pellikel

Zuerst wurde grundlegend der Frage nachgegangen, ob die Proben mit einer 3 min Pellikel einen wesentlichen Unterschied im Vergleich zu Proben ohne Pellikel aufweisen. Damit eine Ultraschallbehandlung den Effekt einer Pellikel nicht verfälscht, wurden anfangs nur die unbeschallten Kontrollgruppen betrachtet. Vergleicht man die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen einer reinen 3 min Pellikel mit einem völlig unbehandelten Schmelzprüfkörper, so ist kein Unterschied zu erkennen (Abb. 26). Die Pellikel lässt sich im REM nicht darstellen. Somit unterscheiden sich die Prüfkörper lediglich in ihrer individuellen Oberflächenmorphologie.

Sobald eine Spüllösung verwendet wurde, ist ein deutlicher Effekt einer Pellikel sichtbar.

Dabei ist vor allem ein inhomogenes Bild vorherrschend (Abb. 27,28). Allerdings deutlich erkennbar ist der hohe Anteil der HAP-Nanopartikel auf den pellikelbehafteten Prüfkörpern. Es finden sich auf allen Prüfkörpern Bereiche, die mehr Material aufweisen und Bereiche mit weniger. Jedoch heben sich die Pellikel behafteten Prüfkörper mit ihrem sehr viel höheren HAP-Nanopartikel Anteil deutlich ab. Man erkennt kaum noch reine Prüfkörper Oberfläche. Diese ist bei den pellikelbehafteten Prüfkörpern vollständig bedeckt mit Nanopartikeln. Es sind überall kleine stäbchenförmige HAP-Partikel zu erkennen. Bei den Prüfkörpern ohne Pellikel zeigt sich zwar auch eine geringfügige Partikelauflagerung, allerdings ist die Prüfkörperoberfläche größtenteils sichtbar. Nur vereinzelt sind kleinere Agglomerate von Nanopartikeln sichtbar. Da die untersuchten Prüfkörper innerhalb eines Versuchsablaufs

verwendet wurden, kann ein anderer Einfluss außer dem der 3 min Pellikel ausgeschlossen werden.

Das Ergebnis zeigt somit, dass eine 3 min Pellikel für deutlich aussagekräftigere Ergebnisse sorgt und zu einer deutlich besseren Anhaftung der Partikel führt.

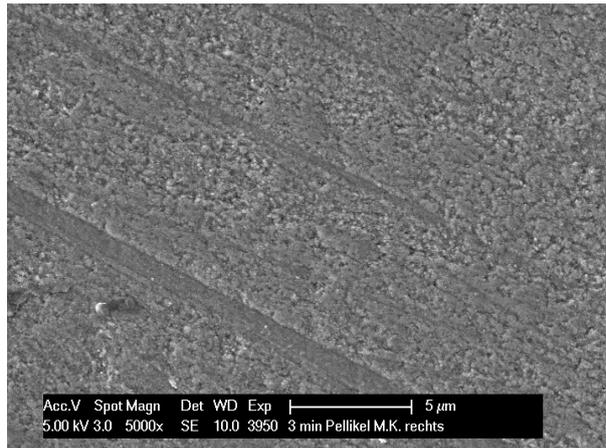
Da für die anschauliche Darstellung und Testung einer Ultraschallbehandlung genug aufgelagertes HAP-Material von Vorteil ist, wurde für alle weiteren Wiederholungen der Versuche eine 3 min Pellikel vorausgesetzt.

Die längere Inkubationszeit von 1 min zeigt im Vergleich zu den 30 s keinen Effekt. Eine Aussage über die Schichtdicke des aufgelagerten HAP kann nicht getroffen werden.

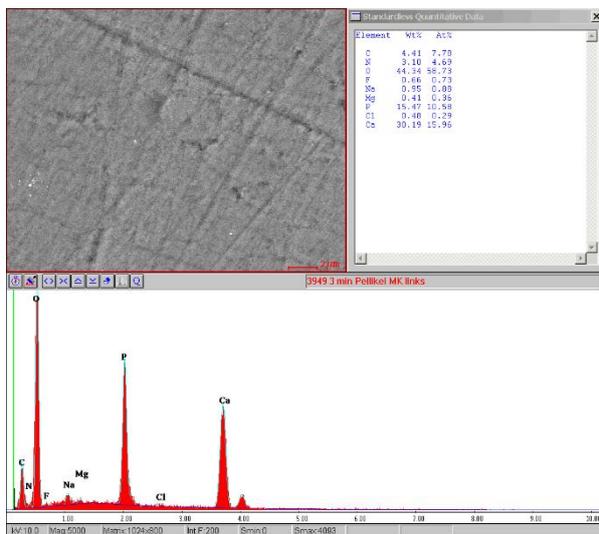
a)



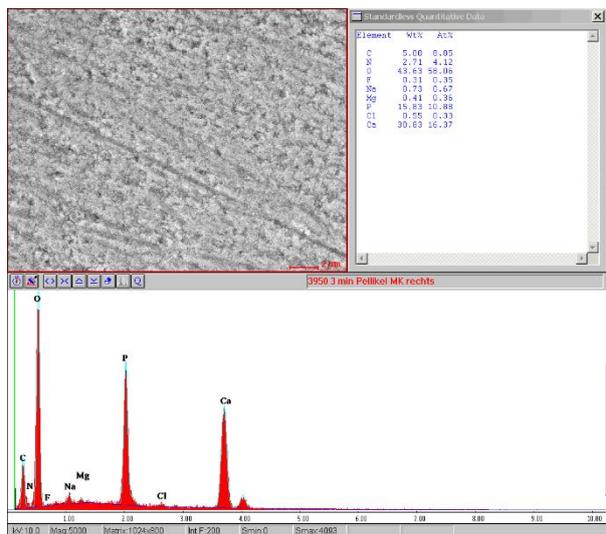
b)



c)



d)



Element	Wt%	At%
C	4.41	7.78
N	3.10	4.69
O	44.34	58.73
F	0.66	0.73
Na	0.95	0.88
Mg	0.41	0.36
P	15.47	10.58
Cl	0.48	0.29
Ca	30.19	15.96

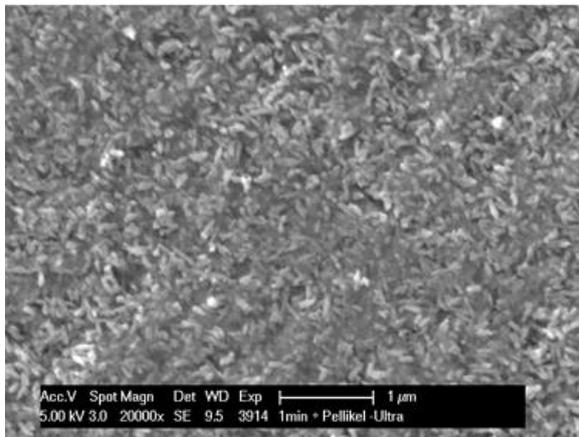
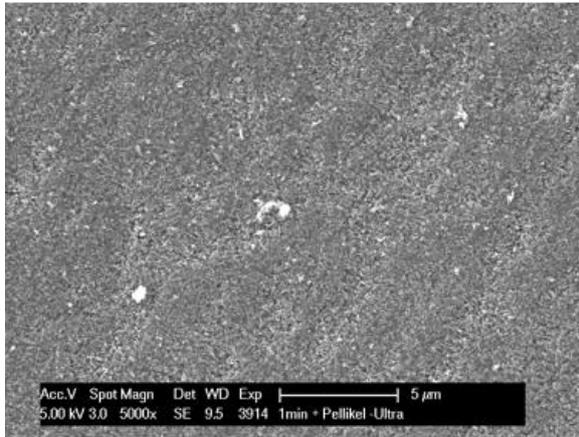
Element	Wt%	At%
C	5.00	8.85
N	2.71	4.12
O	43.63	58.06
F	0.31	0.35
Na	0.73	0.67
Mg	0.41	0.36
P	15.83	10.88
Cl	0.55	0.33
Ca	30.83	16.37

Abbildung 26: Zwei Prüfkörper mit reiner 3 min Pellikel.

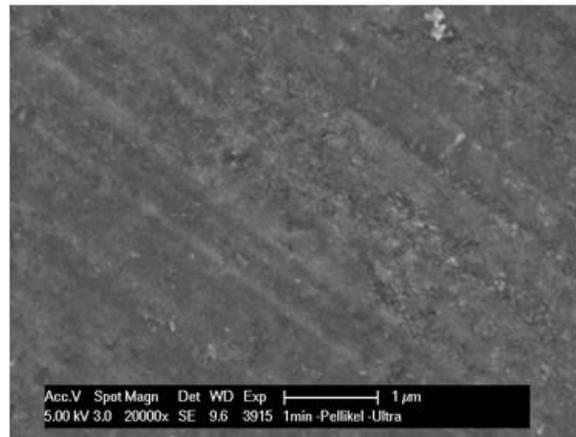
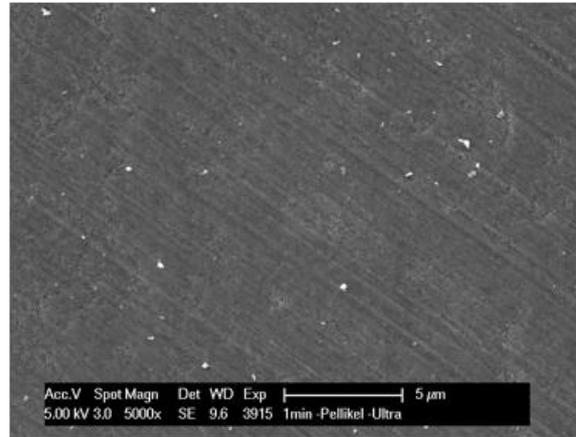
- a) Prüfkörper A, Vergrößerung 5.000-facher
- b) Prüfkörper B, Vergrößerung 5.000-facher
- c) EDX Analyse Prüfkörper A
- d) EDX Analyse Prüfkörper B

## Eprui 20 (5 %) in H<sub>2</sub>O auf Schmelz intraoral (1 min)

### Mit Pellikel



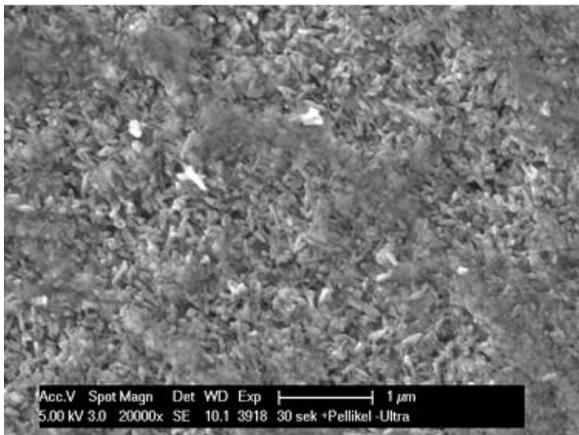
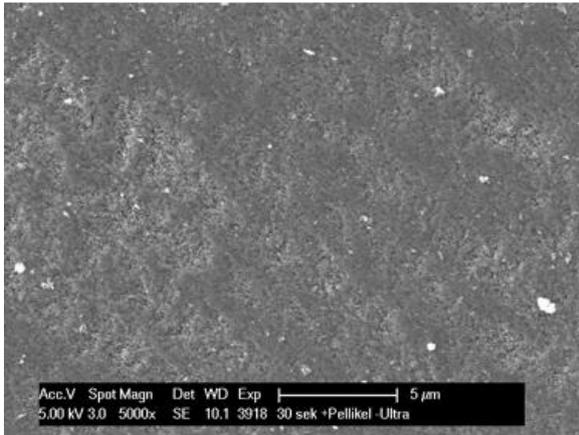
### Ohne Pellikel



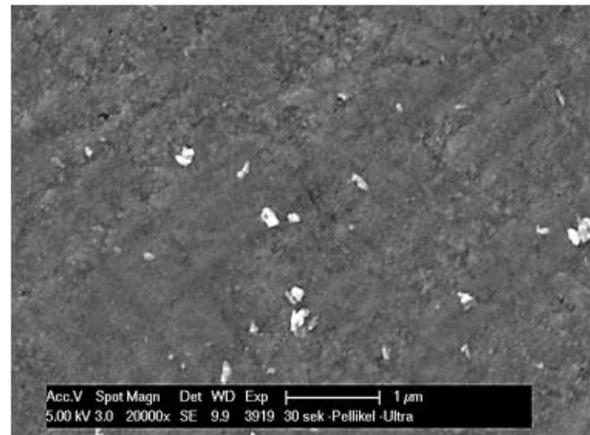
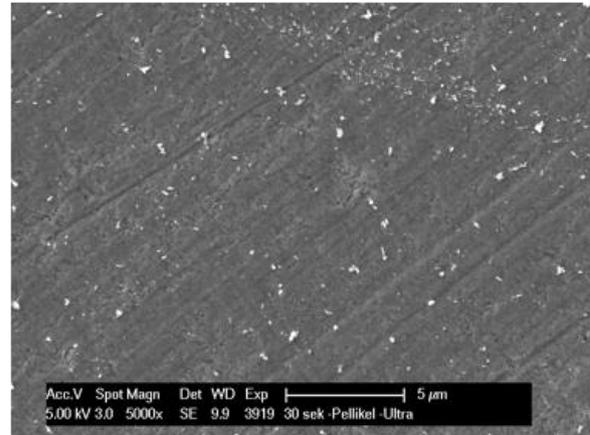
*Abbildung 27:* Vergleich von intraoral getragenen Schmelzprüfkörpern mit und ohne 3 min Pellikel und 1 min Spülvorgang mit Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O. Die Pellikelbehafteten Prüfkörper links zeigen deutlich mehr aufgelagerte HAP-Nanopartikel. Die Prüfkörper ohne 3 min Pellikel rechts zeigen kaum angehaftete HAP-Partikel. Die oberen Bilder zeigen die Prüfkörper in 5.000-facher und die unteren in 20.000-facher Vergrößerung.

## Eprui 20 (5 %) in H<sub>2</sub>O auf Schmelz intraoral ( 30 s )

### Mit Pellikel



### Ohne Pellikel



*Abbildung 28:* Vergleich von intraoral getragenen Schmelzprüfkörpern mit und ohne 3 min Pellikel und 30 s Spüldauer mit Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O. Die pellikelbehafteten Prüfkörper links zeigen deutlich mehr aufgelagerte HAP-Nanopartikel, vor allem in der starken Vergrößerung. Die Prüfkörper ohne Pellikel zeigen zum größten Teil den reinen Schmelzprüfkörper ohne aufgelagertes Material. Die oberen Bilder zeigen die Prüfkörper in 5.000-facher und die unteren in 20.000-facher Vergrößerung.

#### 4.2.2 Einfluss einer Ultraschallbehandlung

Der Übersicht wegen wurde hier aus den oben genannten Gründen auf einen zusätzlichen Vergleich der Proben ohne Pellicel verzichtet.

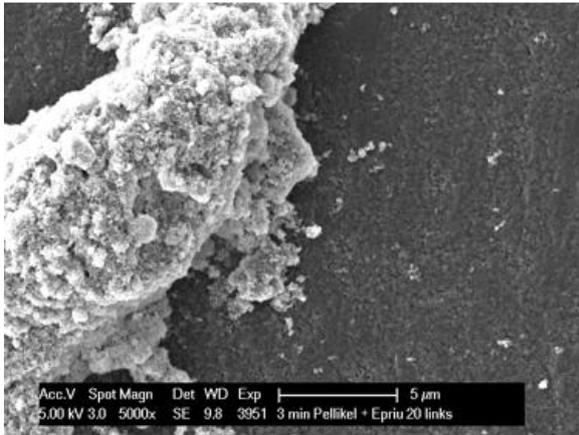
Sowohl bei einer Inkubationszeit von 30 s als auch bei 1 min heben sich die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der beschallten Spüllösungen auf den Schmelzprüfkörpern deutlich von denen der unbehandelten ab (Abb. 29,30). Die nicht beschallten Spüllösungen zeigen wieder große Agglomerate und eine große Diversität in der Verteilung der HAP-Partikel. Es fallen vor allem bei voreingestelltem Kontrast die extrem großen Agglomerate (sehr hell) auf. Betrachtet man nun die beschallten Spüllösungen auf den Schmelzprüfkörpern, so sind nur sehr vereinzelt kleinere Agglomerate erkennbar. Es überwiegt ein sehr homogenes Bild mit nur wenig kontrastreichen Stellen. Die Ergebnisse der Vorversuchsreihen zeigen sich somit auch hier in der intraoralen Testung. Die Bilder zeigen sehr eindrucksvoll den Effekt.

Vergleicht man die Inkubationszeiten von 1 min und 30 s findet sich hier auch kein Unterschied (Abb. 31). Bereits 30 s reichen bei einer beschallten Spüllösung aus, um einen homogenen Effekt auf der Schmelzoberfläche zu erzielen. Allerdings ist hier anzumerken, dass es sich bei den verglichenen Bildern immer um Aufnahmen der Schmelzoberflächen handelt und nicht um einen Querschliff oder ein Bruchpräparat. Somit ist eine Interpretation der Schichtdicke der aufgelagerten Partikel nicht möglich war. Bei Querschliffen kann eine Messung der Schichtdicke erfolgen.

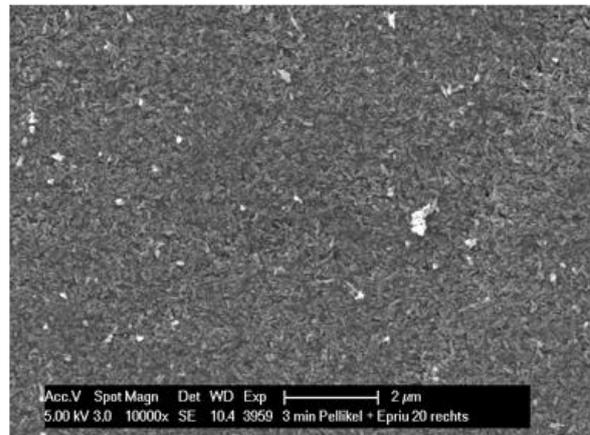
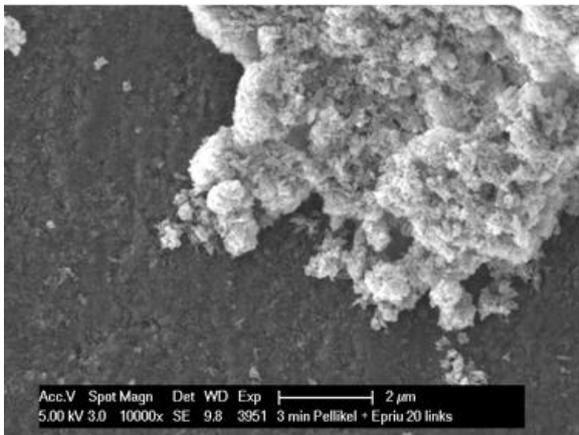
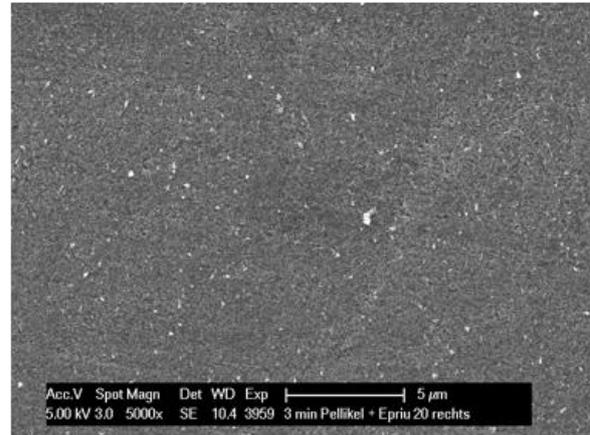
Sprich oberflächlich gleichen sich die Bilder, allerdings kann keine Aussage über die Dicke der aufgelagerten HAP-Schicht getroffen werden. Darin können sich 30 s und 1 min eventuell unterscheiden.

## Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O mit Pellikel auf Schmelz intraoral (1 min)

### Unbeschallt



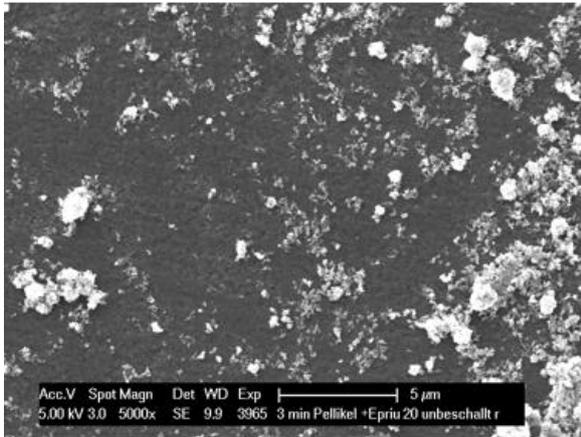
### Beschallt



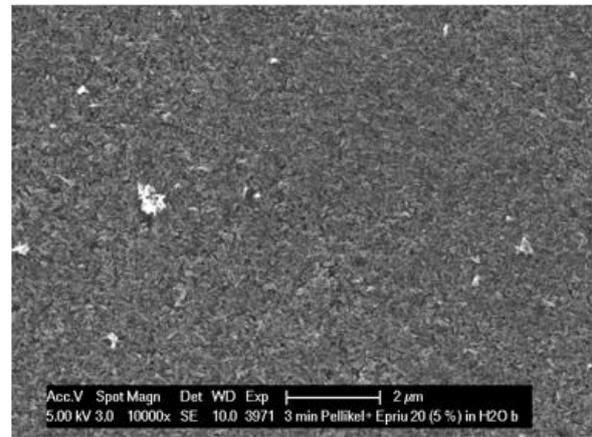
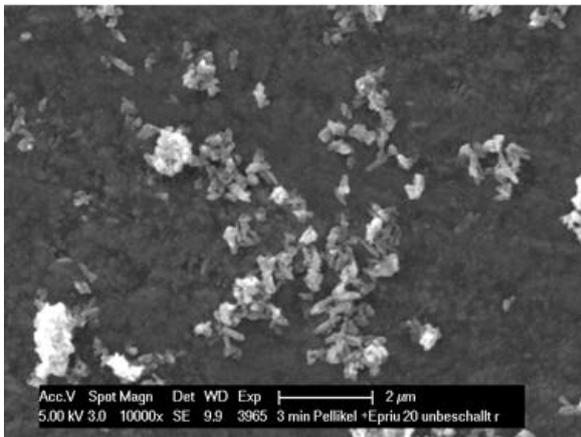
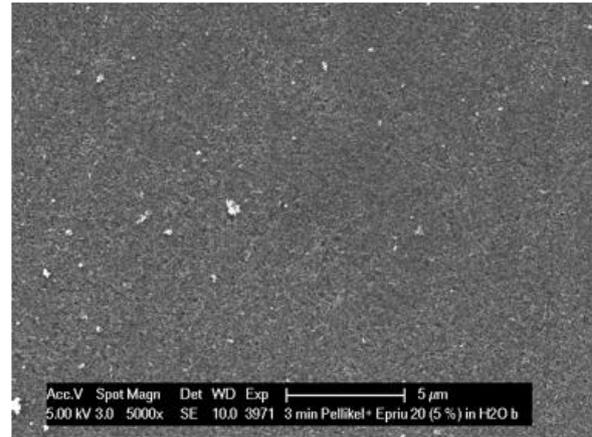
*Abbildung 29:* Vergleich der Schmelzoberfläche mit einer 3 min Pellikel und einer Spüldauer von 1 min mit beschallter und unbeschallter Suspension aus Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O. Es ist ein deutlicher Effekt einer Ultraschallbehandlung sichtbar. Es zeigen sich große Agglomerate auf den Oberflächen mit unbeschallter Spüllösung. Die beschallte Spüllösung zeigt die homogene Verteilung der Nanopartikel auf der Oberfläche ohne größere Agglomerate. Die Darstellung zeigt die Oberflächen oben in 5.000-facher und unten in 10.000-facher Vergrößerung.

## Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O mit Pellikel auf Schmelz intraoral (30 s)

### Unbeschallt



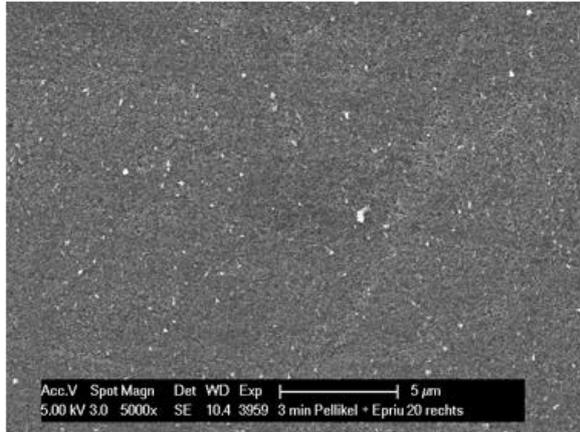
### Beschallt



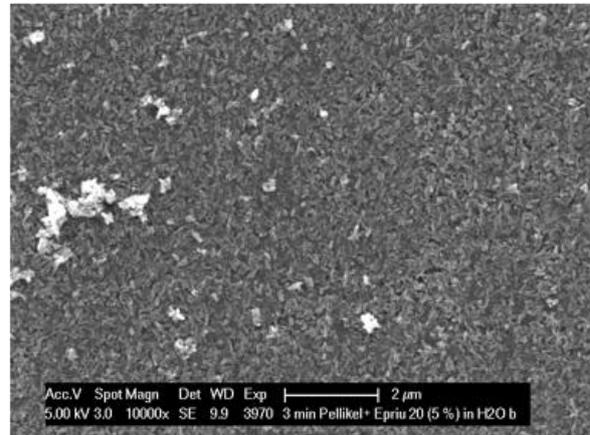
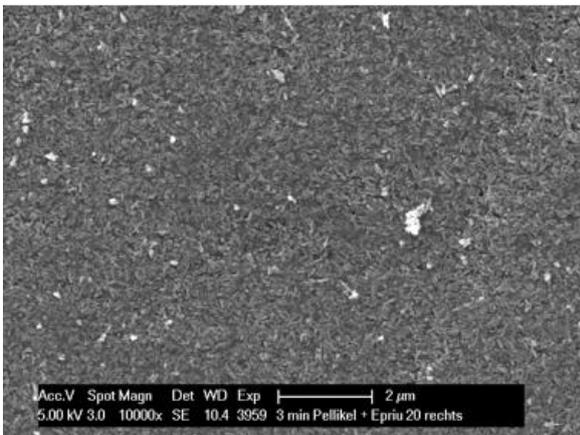
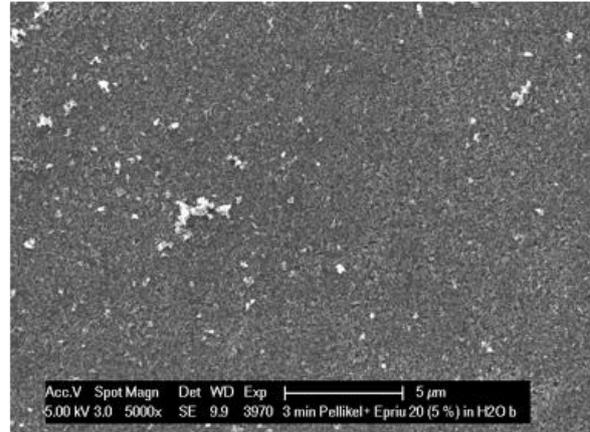
*Abbildung 30:* Vergleich der Schmelzoberfläche mit einer 3 min Pellikel und einer Spüldauer von 30 s mit beschallter und unbeschallter Suspension aus Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O. Es ist ein deutlicher Effekt einer Ultraschallbehandlung sichtbar. Es zeigen sich große Agglomerate auf den Oberflächen mit unbeschallter Spüllösung. Die beschallte Spüllösung zeigt die homogene Verteilung der Nanopartikel auf der Oberfläche ohne größere Agglomerate. Die Darstellung zeigt die Oberflächen oben in 5.000-facher und unten in 10.000-facher Vergrößerung.

## Eprui 20 (5 %) in H<sub>2</sub>O beschallt auf Schmelz intraoral

### 1 min Inkubation



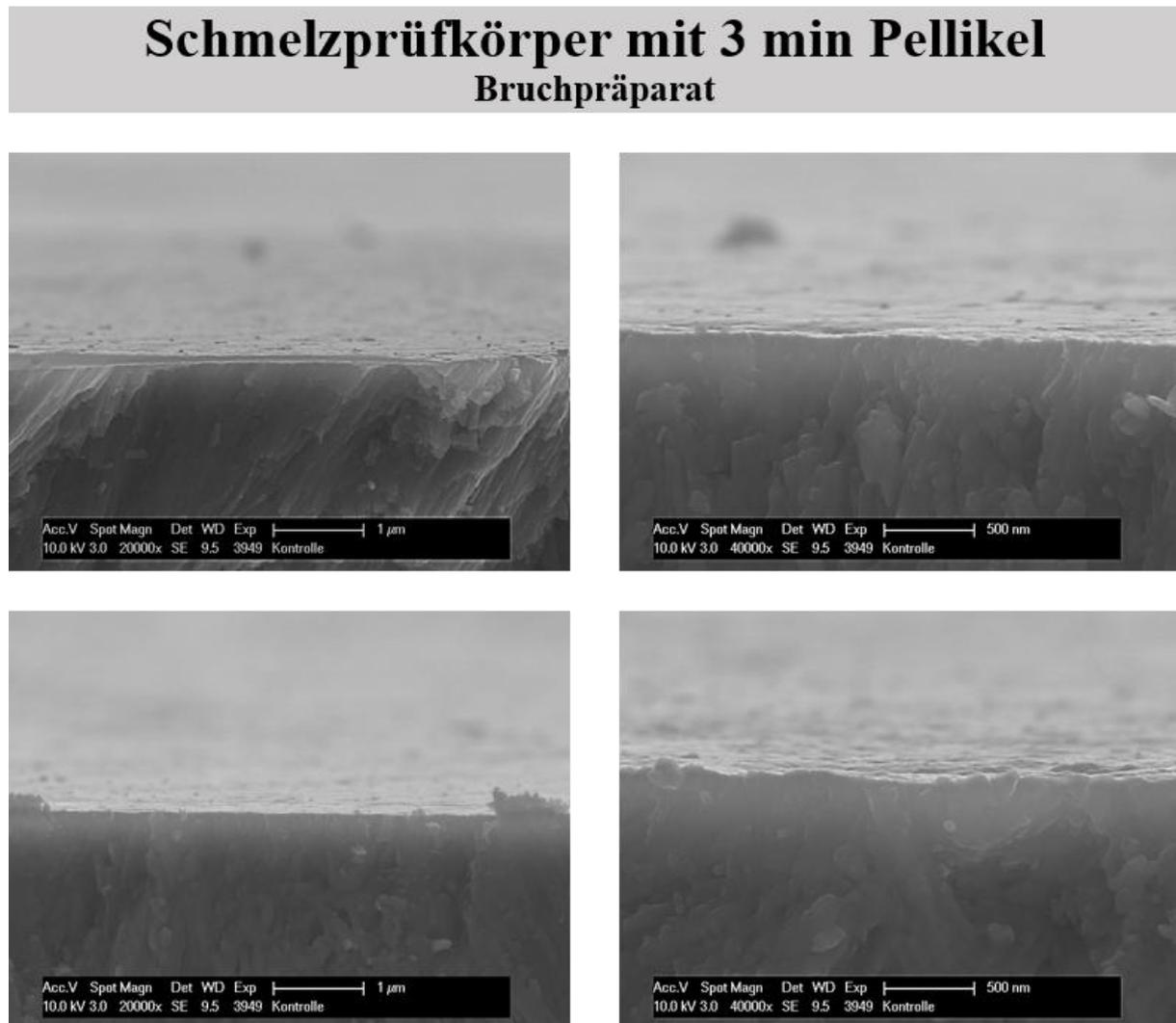
### 30 s Inkubation



*Abbildung 31:* Vergleich der Inkubationszeiten 30 s und 1 min (in vivo) bei beschallter Suspension von Eprui 20 (5 %) in H<sub>2</sub>O. Es ist kein Effekt einer verlängerten Spüldauer auf die Homogenität der aufgelagerten Partikel feststellbar. Die Darstellung zeigt die Oberflächen oben in 5.000-facher und unten in 10.000-facher Vergrößerung.

### 4.3. Bruchpräparate

Von einzelnen Schmelzprüfkörpern wurden Bruchpräparate hergestellt. Dabei wurde die Bruchkante mittels REM mikroskopiert. Zunächst wurde ein Prüfkörper lediglich mit einer 3 min Pellikel versehen und mikroskopiert um ein Vergleichsbild zu haben (Abb. 32).



*Abbildung 32:* Boviner Schmelzprüfkörper mit 3 min Pellikel. Links 20.000-fach vergrößert. Rechts 40.000-fach vergrößert.

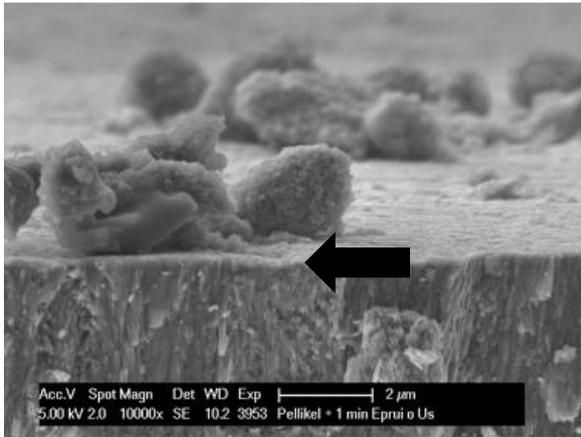
Es wurden daraufhin Bruchpräparate der bovinen Schmelzprüfkörper, welche ein intraorales Spülprotokoll durchlaufen haben, hergestellt und mikroskopiert.

Generell ist eine deutliche Auflagerung auf der Oberfläche der Schmelzprüfkörper sichtbar. Teilweise lassen sich einzelne HAP-Nanopartikel erkennen. Der Vergleich von der unbeschallten mit der beschallten Suspension bestätigt die Erkenntnisse aus der Hauptversuchsreihe. Auf den unbeschallten Proben sind große Agglomerate auf der Oberfläche

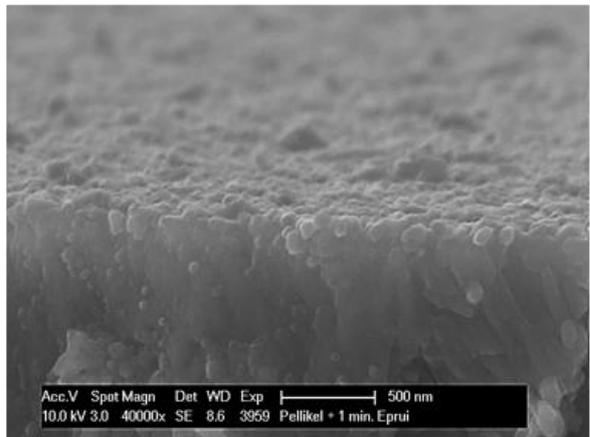
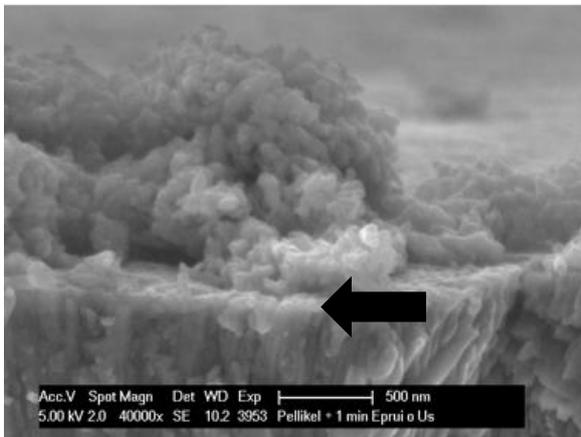
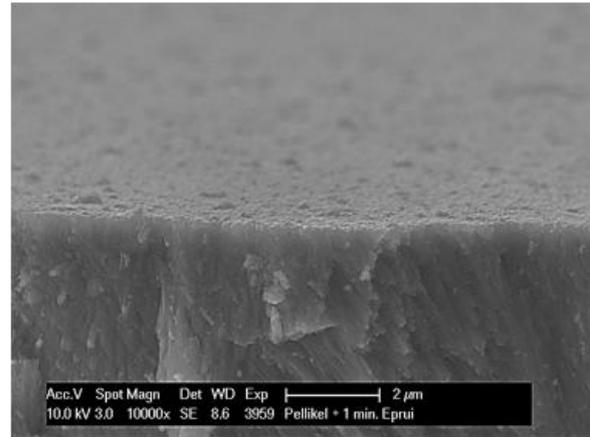
erkennbar (Abb. 33). Es lässt sich relativ genau die Schmelzoberfläche von den aufgelagerten Partikeln abgrenzen (Pfeil Abb. 33). Bei den beschallten Proben ist eine homogene Verteilung der Partikel erkennbar. Hier lässt sich allerdings nicht genau eine Grenze zwischen Prüfkörper und aufgelagerten HAP-Partikeln ausmachen. Diese Bilder zeigen nochmals eindrucksvoll die Effektivität einer Ultraschallbehandlung von Suspensionen. Ein Unterschied zwischen den Inkubationszeiten von 1 min und 30 s lässt sich nicht ausmachen (Vergl. Abb. 33 mit Abb. 34). Die Abbildung 35 zeigt nochmals zusammenfassend das Bruchpräparat und die Aufsicht des gleichen Spülprotokolls. Auch hier sieht man nochmals, dass die Homogenisierung mittels Ultraschall zu eindrucksvollen Ergebnissen führt.

## Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O auf Schmelz intraoral 1 min - Bruchpräparate

### Unbeschallt

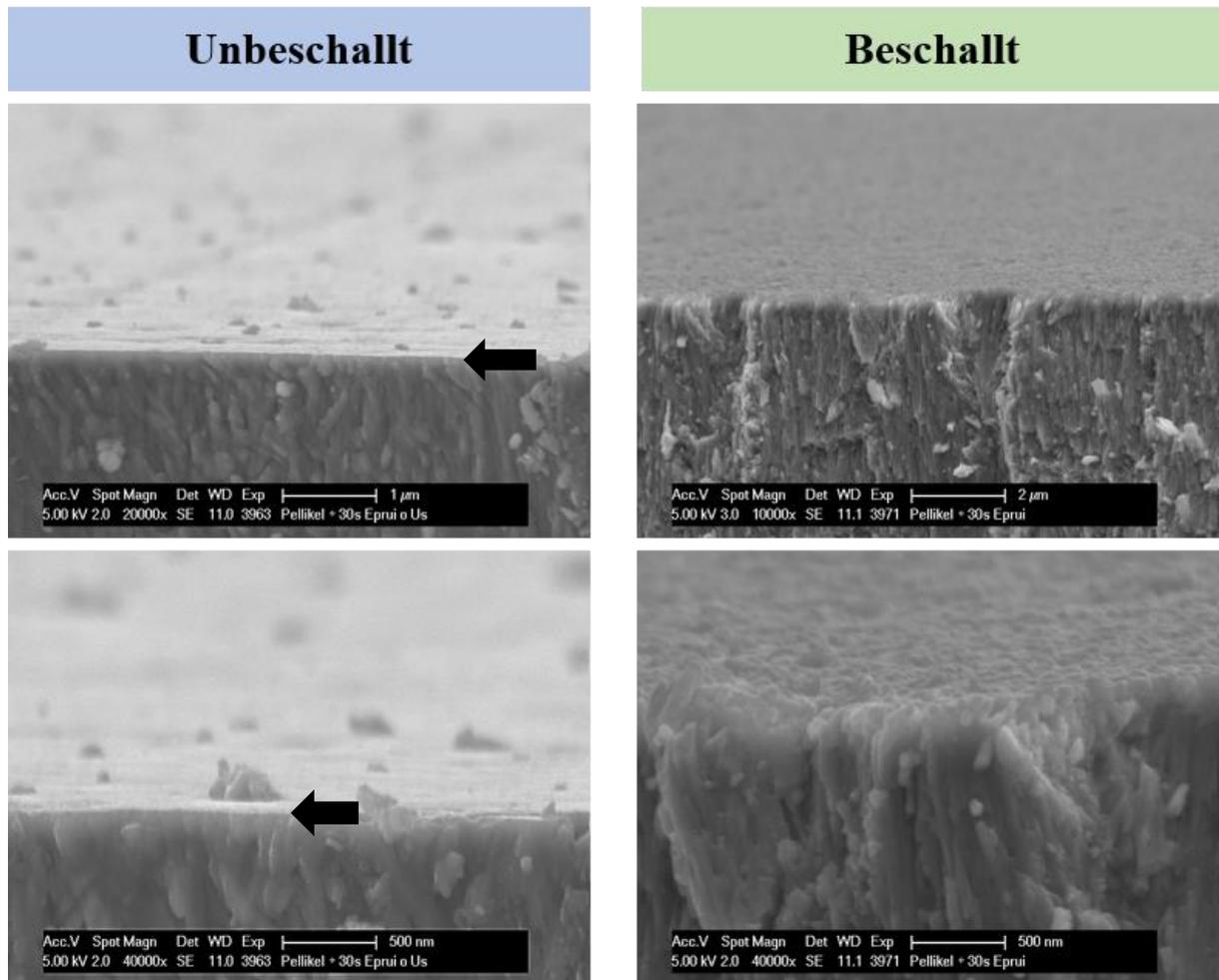


### Beschallt

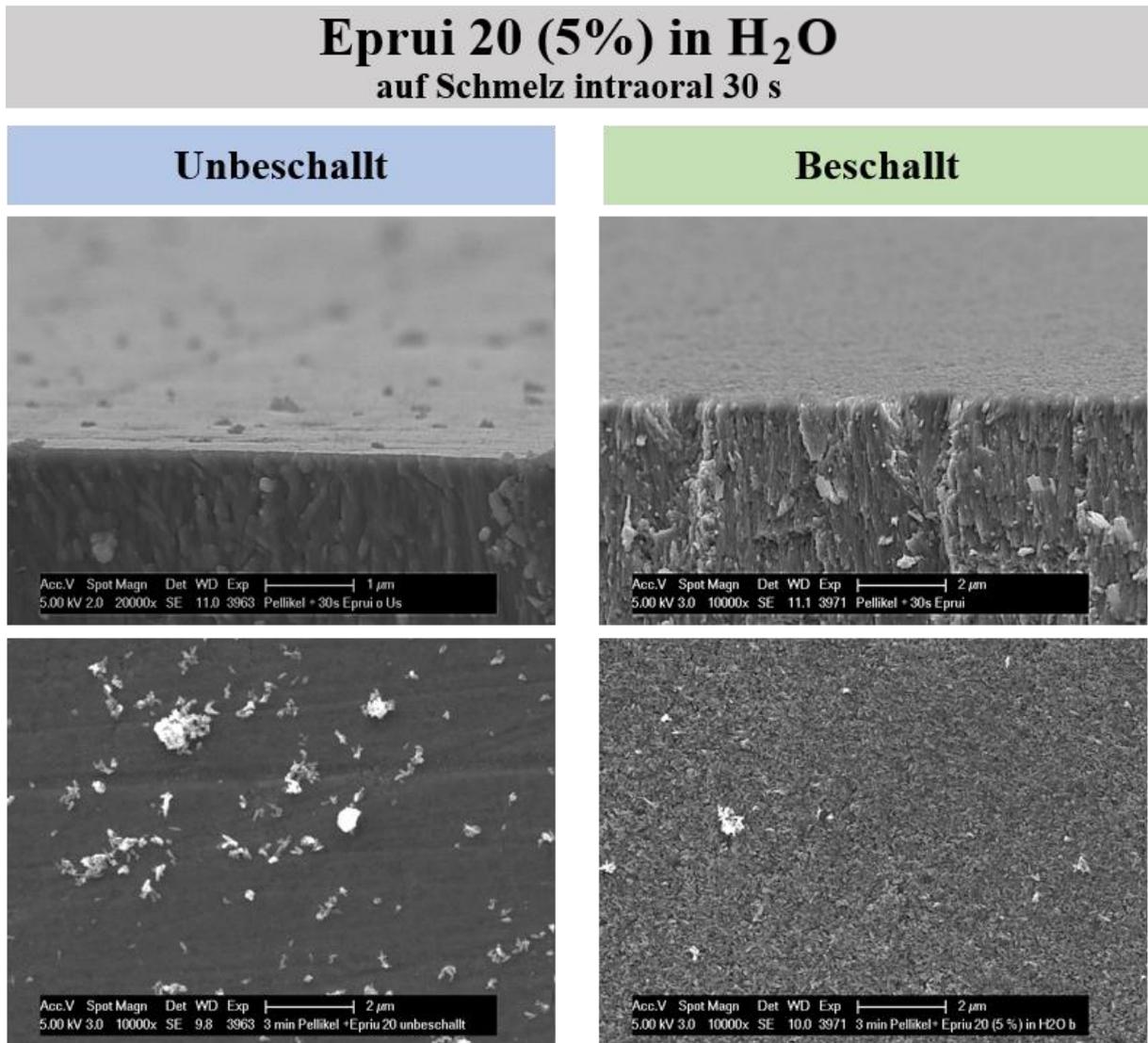


*Abbildung 33:* Bovine Schmelzprüfkörper als Bruchpräparate mit 3 min Pellikel und 1 min Spülzeit intraoral mit Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O. Links sind die Suspensionen unbeschallt und rechts beschallt (2x2 min). Es ist ein deutlicher Effekt einer Homogenisierung mittels Ultraschall zu erkennen. Links ist die Schmelzoberfläche von den aufgelagerten HAP-Partikeln abgrenzbar (Pfeile) und rechts nicht mehr eindeutig.

## Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O auf Schmelz intraoral 30 s - Bruchpräparate



*Abbildung 34:* Bovine Schmelzprüfkörper als Bruchpräparate mit 3 min Pellicel und 30 s Spülzeit intraoral mit Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O. Links sind die Suspensionen unbeschallt und rechts beschallt (2x2 min). Im oberen Bildbereich ist die Schmelzoberfläche zu sehen. Im unteren Bildbereich die Bruchfläche. Es ist ein deutlicher Effekt einer Homogenisierung mittels Ultraschall zu erkennen. Links ist die Schmelzoberfläche von den aufgelagerten HAP-Partikeln abgrenzbar (Pfeil) und rechts nicht mehr eindeutig.



*Abbildung 35:* Bovine Schmelzprüfkörper mit 3 min Pellikel und 30 s Spülzeit intraoral mit Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O. Oben sind die Prüfkörper an der Bruchfläche mikroskopiert und unten die gleichen Präparate als Aufsicht. Links sind die Suspensionen unbeschallt und rechts beschallt (2x2min). Im oberen Bildbereich ist die Schmelzoberfläche zu sehen, im unteren Bildbereich die Bruchfläche. Es ist ein deutlicher Effekt einer Homogenisierung mittels Ultraschalls zu erkennen. Links ist die Schmelzoberfläche von den aufgelagerten HAP-Partikeln abgrenzbar (Pfeil) und rechts nicht mehr eindeutig.

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion von Material und Methode

#### 5.1.1 Bovine Prüfkörper und Lagerung

Bovine Prüfkörper werden schon lange für experimentelle Versuchsreihen in der Zahnmedizin verwendet. Die Frontzähne der Rinder bieten sich dafür bestens an. Die einfache Extraktion, meist kariesfreier Zahnschmelz, und die Größe der daraus herzustellenden Prüfkörper sind Vorteile im Vergleich zu den menschlichen Zähnen. Diese werden meist extrahiert, wenn sie bereits massiv zerstört sind. Zudem kann man aus ihnen keine größeren Prüfkörper herstellen, da sie meist sehr klein sind und eine gekrümmte Oberfläche besitzen. Die Prüffläche ist also viel kleiner, sofern man eine Mindestschichtstärke der Zahnhartsubstanz gewährleisten möchte. Somit sind die Verarbeitung und die Verfügbarkeit der Rinderzähne deutlich einfacher als die humaner Zähne. Die Zähne von Rindern und die von Menschen haben einen ähnlichen evolutionären Ursprung, die Unterschiede werden auf die unterschiedlichen Ernährungsanpassungen zurückgeführt [88].

2021 wurde eine Meta-Analyse bezüglich der Vergleichbarkeit von humanen und bovinen Zähnen veröffentlicht [88]. Darin wurden 1.258 Studien untersucht, wobei nur 9 für die Meta-Analyse verwendet werden konnten. Das Ergebnis zeigt, dass Rinderzähne sich ideal eignen als Versuchsobjekte. Sie weisen keine großen Unterschiede zu den humanen Zähnen auf. Strukturell lassen sich nur geringfügige Unterschiede festhalten. Die bovine Zahnhartsubstanz hat deutlich mehr Dentin Tubuli sowie größere Schmelzprismen ( $\sim 9\mu\text{m}$ ). Im Vergleich dazu liegt die Größe bei humanen Schmelzprismen bei  $\sim 6\mu\text{m}$  [8]. In der Nanohärte macht dies allerdings keinen Unterschied aus ( $p > 0,05$ ) [89]. Die bovine Zahnschmelz hat allerdings eine 40% höhere Bruchzähigkeit als die humane Zahnschmelz [8].

Die chemische Zusammensetzung gleicht sich generell ( $p > 0,05$ ) [8]. Auch Untersuchungen der Matrix-Proteine zeigen eine Ähnlichkeit, da sich die Aminosäuren sehr gleichen [31]. Allerdings finden sich auch Unterschiede im Elektrophorese-Muster [71]. Diese Unterschiede lassen sich aber bei allen Säugetierzähnen darstellen. Der Fluoridgehalt der humanen Zähne zeigt zudem einen höheren Anteil als der der bovinen Zähne. Grund hierfür ist möglicherweise die moderne Mundhygiene und die teilweise vorhandene Fluoridierung des Trinkwassers. Dies wiederum ist für die unabhängige Testung fluoridhaltiger Produkte relevant. Da in den Studien, in denen HAP-Produkte mit Fluoridprodukten verglichen werden, meist bovine Prüfkörper

verwendet wurden, lässt sich ein Einfluss des prüfkörpereigenen Fluorides annähernd vollständig ausschließen [52].

Da bovine Prüfkörper vor allem verwendet werden, um zahnmedizinische Produkte zu testen und Modelle der Kariesentstehung nachzuvollziehen, wurde auch die Reaktion auf pH-Wert Schwankungen und Säureeinwirkungen getestet. Dabei zeigte sich, dass sich das Ca/P-Verhältnis bei Mineralverlust während einer Demineralisation, als auch das Remineralisations- Verhalten bei beiden Zahntypen gleichen [28]. Dies lässt darauf schließen, dass auch in diesem Modell die Wirkungen von HAP auf eventuelle Remineralisationsprozesse auf die Prüfkörper vergleichbar sind. Allerdings zeigen pH-Wert Messungen nach der Anwendung von verschiedenen Calciumhydroxidpasten mit unterschiedlichen Pastenträgern eine deutlich höhere Calciumionenfreisetzung während der anschließenden Lagerung in Flüssigkeit bei den Rinderzähnen [16]. Eventuell lässt sich damit ein Langzeiteffekt nicht vergleichen.

Die Lagermedien der Rinderzähne sind ebenfalls von Relevanz. Da bei *in vivo* Versuchsreihen die Zahnschubstanz permanent mit Speichel in Kontakt kommt, wäre eine Lagerung der Rinderzähne in Speichel realitätsnaher. Da allerdings aus hygienischen und anti-infektiösen Gründen die Prüfkörper ein Reinigungsprotokoll durchlaufen bevor, sie zur Testung *in vivo* verwendet werden dürfen, ist ein Einfluss auf die Zahnschubstanz nicht ausgeschlossen. 2013 wurde eine Arbeit veröffentlicht, bei der ein Einfluss von einer 0,1% Thymol-Lösung auf humane Zahnschubstanz herausgearbeitet wurde [36]. Dabei sank der E-Modul innerhalb von 50 Tagen um 41% und die Schmelzhärte um 54%. Da die bovinen Prüfkörper nach der Extraktion in 0,1% Thymollösung gelagert werden, kann eine Veränderung der mechanischen Eigenschaften nicht ausgeschlossen werden. Allerdings bezieht sich die Studie nur auf humane Zähne. Ein potentieller Einfluss des Thymols kann allerdings auch bei Rinderzähnen nicht ausgeschlossen werden. Da in der hier vorliegenden experimentellen Arbeit die Schmelzoberfläche der bovinen Zähne lediglich als "Objektträger" und Testoberfläche verwendet wurde, ist die Beeinflussung des Thymols auf die mechanischen Eigenschaften irrelevant. Ob es sonstige Einflüsse gibt, wurde bisher nicht geklärt.

Da in dieser Arbeit der Biofilm auf der Zahnoberfläche sowie die Pellikel eine wichtige Rolle spielen, wurde auch nach Studien recherchiert, welche dies untersucht haben. 2020 wurde eine Studie veröffentlicht, in der bovine und humane Prüfkörper in einem Kariesmodell während der Biofilmmreifung verglichen wurden [9]. Es wurde unter anderem der Einfluss von Natrium-Fluorid, Humanem Speichel und pH-Schwankungen untersucht. Dabei kamen die Autoren zu

dem Fazit, dass kein signifikanter Unterschied der Prüfkörper festzustellen war. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass alle Effekte etwas deutlicher bei den bovinen Prüfkörpern zu sehen waren. Sprich bei der Testung dieser Einflüsse muss bedacht werden, dass ein ausgeprägter Effekt auf den bovinen Prüfkörpern eventuell weniger ausgeprägt auf humanen Prüfkörpern ausfallen kann.

Zusammenfassend eignen sich Rinderzähne in dieser Arbeit ideal als *in vitro* Versuchsmaterial, da es lediglich um die Auflagerung von HAP-Partikeln geht und ein Vergleich untereinander betrachtet wurde. Da sich morphologisch und chemisch Unterschiede ausmachen lassen, ist eine Übertragbarkeit wahrscheinlich möglich, aber nicht umfassend geklärt. Dafür fehlen die Versuche an menschlichen Prüfkörpern. Allerdings lässt sich die Effektivität der Homogenisierung mittels Ultraschalles auch auf den Haftfolien der REM-Teller bestätigen, wodurch ein ähnlicher Effekt bei Aufbringung auf humane Prüfkörper naheliegend ist. Ein Effekt auf die Mundgesundheit konnte beim Menschen nur durch die in der Einleitung aufgelisteten Studien nachgewiesen werden.

### 5.1.2 Prüfkörper, Probanden

In den Versuchen wurden Leit Taps (Plano) als Kohlestoffklebepads verwendet. Diese wurden auf die Probeteller für das Rasterelektronenmikroskop geklebt. Diese Pads kleben beidseitig. In den Vorversuchen wurde lediglich diese Oberfläche als Objektträger verwendet. Es wurde also die Suspension auf die klebende Oberfläche aufgebracht. Die Firma Plano weist dabei extra darauf hin, dass die Klebepads nicht lösungsmittelbeständig sind [69]. Das wohl bekannteste Lösungsmittel ist Wasser. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich der Kleber durch das H<sub>2</sub>O oder PBS löst und eventuell Einfluss auf das Ergebnis nimmt. Allerdings wurden sowohl die Kontrollbilder der Suspensionen ohne Ultraschallbehandlung als auch die beschallten Suspensionen untersucht. Da es dabei nur um den direkten Vergleich ging und die Aufgabe darin bestand, einen Effekt aufzuzeigen, kann hier ein potentieller Einfluss vernachlässigt werden.

In den Vorversuchen ging es lediglich darum zu klären, ob die Ultraschallbehandlung einen Effekt hat. Dies konnte eindrucksvoll gezeigt werden. Hier gilt es zu klären, ob die Proben mit besagter kristalliner Struktur sich anders auf den Schmelzprüfkörpern verhalten. Falls die angelöste Kleboberfläche der Auslöser für dieses Phänomen ist, sollte es ebenfalls vernachlässigt werden bzw. eine Alternative gefunden werden.

Vergleicht man nun die Ergebnisse der REM-Teller mit denen der Schmelzprüfkörper, so stellte man schnell fest, dass auf den Schmelzprüfkörpern bei gleicher Vorgehensweise, kaum HAP-Produkt zu sehen ist. Hier wurde vermutet, dass die Klebeschicht die HAP-Partikel besser fixiert hat als die gereinigten und „Biofilmfreien“ Schmelzprüfkörper. Insofern hat die Klebeschicht einen Einfluss genommen. Daraufhin wurde eine 3 min Pellikel als Adhäsionsoberfläche für die HAP-Partikel eingeführt, welche wiederum vergleichbare Bilder lieferte. Schon 2018 wurde von Fabritius-Vilpoux et al. festgehalten, dass beim Aufbringen einer wässrigen Suspension auf einen „gereinigten“ Schmelzprüfkörper kaum HAP Material auf der Oberfläche beim anschließenden Wässern verbleibt [26]. Es sollte in dieser Studie geklärt werden, ob es chemische Wechselwirkungen bzw. Bindungsmechanismen zwischen aufgelagertem HAP und der bovinen Schmelzoberfläche gibt. Lediglich Partikelgrößen von 1-3  $\mu\text{m}$  hafteten nach dem Spülen auf der Oberfläche. Ob somit eine konkrete Wechselwirkung zwischen der Schmelzoberfläche und HAP-Partikeln ohne organische Substanzen als Haftvermittler nachzuweisen ist, ist fraglich. Die Partikelgröße scheint von Relevanz zu sein. Auch in dieser Doktorarbeit stellte sich heraus, dass die kleinste Partikelgröße zu den eindrucksvollsten Ergebnissen führt. Es wurden auch weitere Partikelgrößen und Formen getestet, allerdings zeigen diese keine so effektiven Ergebnisse. Dies sollte weiter untersucht werden. In der Studie von Fabritius-Vilpoux et al. konnte unter anderem gezeigt werden, dass bei steigender Hydroxylapatitkonzentration von 1-10 % sich auch der verbleibende Partikelanteil erhöhte. Eventuell wäre eine Testung einer 10 % Suspension aus HAP und Wasser besser in die Literatur einzuordnen gewesen. Auch in der Arbeit von Weidan Luo et al. von 2020 wurde eine 10 % HAP-Lösung verwendet.

Ebenfalls anzumerken ist, dass die aufpipettierte Suspensionsmenge auf den REM-Tellern genau den 50  $\mu\text{l}$  entspricht. Da die Schmelzprüfkörper deutlich kleiner sind und keine einheitliche Größe haben, musste hier eine reduzierte Menge aufpipettiert werden. Somit könnte vermutet werden, dass sich die Materialmenge, sprich die HAP Partikel Menge, die auf den jeweiligen Objektträger inkubiert wurde, unterscheidet und damit die Vergleichbarkeit lückenhaft ist.

Weiterführend ist zu erwähnen, dass alle Tests mit Pellikel und Speichel eines einzigen Spenders durchgeführt wurden. Dies bietet sich an, da der Testaufbau sehr einfach und unkompliziert ist. In der Forschung wird häufig ein so genannter „Universalspeichel“ produziert, welcher aus Spenden zahlreicher Testpersonen besteht. Dadurch versucht man alle Diversitäten einzuschließen. Es werden teilweise groß angelegte DNA- und RNA- Analysen

angefertigt, um alle Spezies mit einzubeziehen und einen reproduzierbaren Biofilm *in vitro* zu produzieren [73]. Dieser Prozess kam aufgrund seiner Komplexität und Infektiosität bei dieser Arbeit nicht in Frage. Da es um die aktive Bildung einer Pellicel geht und ein entsprechendes intraorales Spülprotokoll durchgeführt wurde, konnte schlichtweg auch kein universeller Biofilm intraoral verwendet werden. Damit die intraoralen und extraoralen Versuche miteinander vergleichbar blieben, wurde auch extraoral kein Universalspeichel verwendet.

### 5.1.3 Unterschiede in Form und Größe von Hydroxylapatit-Partikeln und deren Bedeutung für die Biokompatibilität

Hydroxylapatit (HA) ist ein biomimetisches Material, das aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeit mit Knochenmineralen sowie seiner ausgezeichneten Biokompatibilität breit in der Medizin Anwendung findet. Variationen in der Form und Größe der HA-Partikel können jedoch erhebliche Auswirkungen auf ihre biologische Integration und Funktionalität haben.

In dieser Arbeit wurden vier verschiedene Hydroxylapatite untersucht: Eprui 20, Eprui 40, Kalident und ein Hydroxylapatit von Sigma-Aldrich. Diese Produkte unterscheiden sich insbesondere durch ihre Partikelgröße und -form. Es hat sich gezeigt, dass das stäbchenförmige und gleichzeitig kleinste HAP-Produkt die besten Ergebnisse bzgl. der Homogenisierung hat. Vergleiche der HAP-Partikel Formen findet man vor allem in der Forschung zur Knochengewebsregeneration.

Eine Studie aus dem Jahr 2020 mit dem Titel „Biomimetic and Mesoporous Nano-Hydroxyapatite for Bone Tissue Application: A Short Review“ hebt hervor, dass die Partikelform von Hydroxylapatit (HA) eine entscheidende Rolle bei der Knochengeweberegeneration spielt [60]. Plattenförmige und stabförmige HA-Partikel, wie sie in Eprui 20 und Eprui 40 vorkommen, zeigen herausragende Eigenschaften, die ihre Anwendung in der Knochengeweberegeneration unterstützen.

Plattenförmige HA-Partikel imitieren die natürliche Morphologie der anorganischen Phase des Knochens, was zu einer besseren Integration und mechanischen Anpassung an die Knochenmatrix führt. Ihre größere spezifische Oberfläche fördert die Zelladhäsion und -proliferation, was die Bioaktivität und die Einbindung in das umgebende Gewebe verbessert [30].

Stäbchenförmige HA-Partikel bieten durch ihre längliche Form eine präzisere Kontrolle der Partikelgröße und -morphologie. Diese Form ist besonders vorteilhaft für die Osseointegration,

da sie die Ausrichtung und Differenzierung von Knochenzellen unterstützt. Zudem erleichtert die verbesserte biologische Reaktion dieser Partikel die Bildung neuer Knochensubstanz [60].

Runde HA-Partikel hingegen, wie sie in dem Hydroxylapatit von Sigma-Aldrich vorkommen, weisen einige Nachteile auf. Ihre geringere spezifische Oberfläche bietet weniger Platz für die Zelladhäsion und -proliferation, was die Bioaktivität und die Integration in das Knochengewebe einschränken kann. Darüber hinaus unterstützen sie aufgrund ihrer Form die Zellinteraktion und Differenzierung weniger effektiv, was zu einer weniger effizienten Knochenbildung führt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass plattenförmige und stäbchenförmige HA-Partikel aufgrund ihrer hohen Bioaktivität, mechanischen Stabilität und biologischen Interaktion ideal für die Knochengeweberegeneration sind. Runde Partikel hingegen bieten aufgrund ihrer geringeren Oberflächeneigenschaften und mechanischen Einschränkungen weniger Vorteile. Diese Erkenntnisse unterstreichen die Bedeutung der Partikelform bei der Entwicklung effektiver Materialien für die regenerative Medizin und ist in der zahnmedizinischen Anwendung von Bedeutung.

### 5.1.4 Einsatz von Ultraschall-Homogenisatoren und Alternativen in der Probenvorbereitung

Die Verwendung von Ultraschall-Homogenisatoren hat sich in der Laboranalytik zunehmend etabliert, insbesondere in Bereichen wie der Umweltforschung, der Medizin, der Qualitätskontrolle und der Sonochemie [70]. Diese Geräte sind bekannt für ihre Benutzerfreundlichkeit und die Fähigkeit, konsistente und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, was sie zu einem wesentlichen Bestandteil der modernen Laborpraxis macht.

Ultraschall-Homogenisatoren arbeiten durch die Anwendung hochfrequenter Schallwellen, typischerweise bei etwa 20 kHz. Diese Schallwellen erzeugen Kavitation in Flüssigkeiten, bei der mikroskopisch kleine Blasen entstehen und anschließend kollabieren. Dieser Prozess setzt erhebliche Energiemengen frei, die die Partikel aufbrechen und eine gleichmäßige Verteilung in der Flüssigkeit sicherstellen.

Ein Hauptvorteil dieser Technik ist ihre hohe Effizienz, die es ermöglicht, auch komplexe Proben schnell und gleichmäßig zu homogenisieren. Darüber hinaus bieten diese Geräte eine präzise Steuerung der Betriebsparameter, wie etwa der Schallamplitude, was besonders bei der Bearbeitung empfindlicher Proben von Vorteil ist.

Es gibt jedoch auch einige Herausforderungen, die bei der Verwendung von Ultraschall-Homogenisatoren berücksichtigt werden müssen. Ein bedeutender Teil der eingeleiteten Energie wird in Wärme umgewandelt, was thermisch empfindliche Proben beeinträchtigen kann. Daher kann es notwendig sein, zusätzliche Kühlmaßnahmen zu ergreifen oder den Prozess intermittierend durchzuführen, um eine Überhitzung zu vermeiden. Dieser Einfluss wurde bei den Versuchsreihen mit den HAP-Suspensionen erkannt. Die Wärmeentwicklung wurde durch eine Eiswasser- Kühlung der Proben reduziert und die Dauer der Beschallung wurde auf 2 min Intervalle reduziert. Weitere zu berücksichtigende Faktoren dieser Methode sind sowohl die Anschaffung als auch der Betrieb dieser Geräte. Im Vergleich zu einfacheren mechanischen Homogenisierungsmethoden können diese mit höheren Kosten verbunden sein.

Neben der Ultraschalltechnologie gibt es andere Methoden zur Homogenisierung, die je nach Anwendungsfall in Betracht gezogen werden sollten. Kugelmøhlen sind beispielsweise gut geeignet für die Verarbeitung hochviskoser Proben und ermöglichen die Erzeugung sehr feiner Partikel, obwohl der Prozess zeitaufwendig ist und das Risiko einer Kontamination durch Abrieb besteht [50]. Außerdem sollte in den hier stattgefundenen Versuchsreihen die Größe und Form der Nanopartikel nicht verändert werden, was die Verwendung von Kugelmøhlen ausschließt. Rotor-Stator-Homogenisatoren bieten eine wirksame Alternative für Proben mittlerer Viskosität, erreichen jedoch nicht die gleiche Feinheit der Partikelverteilung wie Ultraschall-Homogenisatoren [70]. Hochdruckhomogenisatoren erzeugen sehr hohe Scherkräfte, die sich besonders gut für die Verarbeitung von Nanopartikeln und großen Probenvolumina eignen, erfordern jedoch spezielle Ausrüstung und können ebenfalls zu einer Erwärmung der Probe führen.

Insgesamt bietet die Ultraschall-Homogenisierung eine äußerst wirksame Methode für die gleichmäßige Verteilung von Partikeln in Proben, insbesondere in der medizinischen und chemischen Analytik. Trotz ihrer vielen Vorteile sollten die spezifischen Anforderungen und mögliche Alternativen sorgfältig geprüft werden, um optimale Ergebnisse zu erzielen [43, 70].

### 5.1.5 REM

Da Elektronen eine sehr viel kürzere Wellenlänge (5 nm) besitzen als Licht wie bspw. in einem Lichtmikroskop (380 nm) wird, wenn es um Nanopartikel geht das Rasterelektronenmikroskop verwendet [58]. Dabei werden Oberflächenstrukturen in einer sehr hohen Vergrößerung mikroskopiert und können zusätzlich durch die Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) qualitativ beurteilt werden. Dieses Verfahren ist ein wichtiges Instrument in der Mikroanalytik. Außerdem kann beurteilt werden, wieviel Prozent eines Produktes die Oberfläche eines Objektträgers bedeckt. Diese quantitative Analyse wurde in dieser Arbeit nicht vorgenommen. Es sind lediglich qualitative Untersuchungen durchgeführt worden, um eventuelle Verschmutzungen auszuschließen. Da die Analyse einer Schmelzoberfläche, auf welcher ein Hydroxylapatit aufgelagert ist, keine Differenzierung untereinander aufgrund der annähernd identischen Zusammensetzung zulässt, wurde auf einen Vergleich der EDX-Analysen verzichtet. Lediglich zur Analyse der jeweiligen HAP-Produkte und deren Zusammensetzung auf den Haftfolien der REM-Teller wurde es verwendet. Generell galt es lediglich ein homogenes Oberflächenbild der Spüllösungen festzustellen. Da sich die Hydroxylapatit Nanopartikel von der Form und Größe gut von der Schmelzoberfläche abgrenzen ließen, war eine morphologische Betrachtung möglich. Da die Schichtdicke allerdings einen großen Einfluss haben könnte und sich die Schichtdicke des aufgelagerten HAPs eventuell unterscheiden könnte, wurden Bruchpräparate angefertigt. Diese waren allerdings bezogen auf eine Schichtdicke nicht aussagekräftig, weshalb dies weiterführend untersucht werden sollte.

Das Rasterelektronenmikroskop eignet sich sehr gut zur Untersuchung der Oberflächenstruktur und Morphologie von HAP-Produkten. Bei der Herstellung von HAP Pulver wird das REM gerne verwendet [25]. Somit ist es für diese Arbeit ein ideales Instrument zur Beurteilung der Verteilung von HAP auf Oberflächen.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Die Rolle der Pellikel und der Applikationsformen

Die Effekte von Hydroxylapatiten in Mundspüllösungen und Zahnpasten wurden schon in zahlreichen Versuchsreihen untersucht [3, 5, 6, 47, 53, 72, 76]. Dass Hydroxylapatit selbst remineralisierende Effekte hervorruft, ist nicht ausreichend geklärt und wird als sehr kritisch bewertet [19]. Allerdings könnte es einen Einfluss auf Remineralisationsprozesse durch Calcium- und Phosphat- Ionen aus dem Speichel geben. Dabei könnten die auf dem Biofilm gebundenen HAP-Partikel zu einer Übersättigung an Calcium und Phosphat- Ionen führen und dadurch als Kristallisationszentren von Speichelbestandteilen fungieren [3]. Eine Arbeit von 2015 zeigte in diesem Zusammenhang auch, dass die Calcium Konzentration nach Behandlung mit HAP in einem *S.mutans* Biofilm acht Mal so hoch war wie in der Kontrollgruppe [90]. Hier wurde betont, dass der Biofilm fundamental zur Effektivität eines HAP-Produktes beiträgt und als Ca-Speicher fungiert. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass die Anhaftung von Bakterienstämmen auf Schmelzoberflächen, welche mittels HAP Spüllösungen behandelt wurden, reduziert werden konnten [47]. Eine Bildung von Microclustern konnte im TEM beobachtet werden. In allen Versuchsreihen bestätigt sich somit, dass es sich um eine Wechselwirkung von HAP-Partikeln mit dem Biofilm handelt und nicht um eine HAP - Zahn Wechselwirkung. Diese Arbeit bestätigt den Effekt einer Pellikel und Biofilmbildung auf die Anhaftung der Nanopartikel auf der Schmelzoberfläche. Auch hier kann eine homogenere Verteilung zu einer besseren Effektivität führen. Schon früh konnte gezeigt werden, dass sich kleinere HAP-Nanopartikel besser an vorhandenes organisches Material haftet als auf reine anorganische Oberflächen [47]. Auch in der Medizin zeigte sich, dass kleine Nanopartikel bessere Effekte bei der Zellneubildung und Osteoblastenaktivität zeigen als große [80]. Auch in dieser Arbeit zeigt sich schon früh in den Vorversuchsreihen, dass das kleinste der HAP-Produkte die beste Anhaftung und Homogenität bei Beschallung aufweist.

Bei der Applikationsform *in vitro* wurde ein einfaches Aufpipettieren auf die Schmelzprüfkörper angewandt. Hier zeigte sich schnell, dass die Menge an aufgelagerten Partikeln leider keine Interpretation möglich machte. Es wurde ein Versuch gestartet, um die Situation mehr an einen intraoralen Spülvorgang anzugleichen. Es wurde Speichel als zusätzlicher Mediator ergänzt. Allerdings zeigte sich, dass eventuell die schon makroskopisch zu sehende gelartige Entmischung der Spüllösung und des Speichels Grund für eine misslungene Applikation der Suspension auf den Prüfkörpern sein könnte. Beim Pipettieren

wird lediglich die Suspension auf den Prüfkörper vorsichtig appliziert. Da beim intraoralen Spülen die Suspension von Speichel und Spüllösung durch sehr viel mehr mechanische Kräfte vermischt und in Kontakt mit den Prüfkörpern kommt, ist dieser Versuch sehr wahrscheinlich nicht damit zu vergleichen. Fragwürdig ist generell auch das Mischverhältnis 1:1 von Speichel und Lösung und ob dies einer intraoralen Situation nahe kommt.

In der Arbeit von Fabritius-Vilpoux et al. von 2018 wurde eine Methode verwendet, die diese Arbeit extraoral sehr viel näher an die intraorale Situation gebracht hätte. Dabei wurde der Prüfkörper auf einen länglichen Objektträger geklebt und dann in die, in einem Becherglas zirkulierende Suspension für die entsprechende Inkubationszeit gehängt [26]. Dieser Versuchsaufbau bietet die Möglichkeit einen intraoralen Spülvorgang mit den entsprechenden mechanischen Kräften extraoral nach zu simulieren.

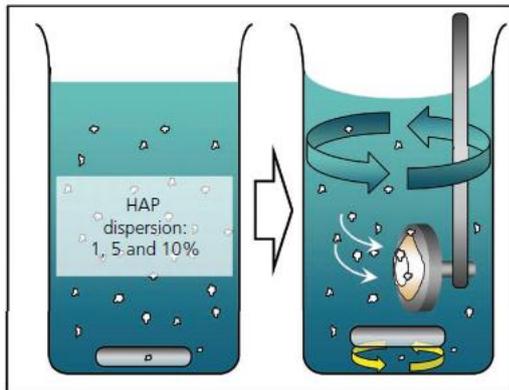


Abbildung 36: [26] Schematic depiction of the mouth rinse-inspired procedure used to apply the HAP particles to the enamel surface.

Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass es nicht nur Mundspüllösungen als Mundhygieneprodukte gibt. Zahnpasten gehören zur täglichen Mundhygiene noch viel mehr dazu als Mundspüllösungen. Auch in vielen bereits in der Einleitung erwähnten Studien werden Zahnpasten verwendet. Da allerdings bereits gezeigt wurde, dass HAP vor allem mit dem Biofilm interagiert und beim Zähneputzen mechanisch ein Biofilm reduziert bzw. entfernt wird, kann das HAP als Ionenspeicher nicht unmittelbar fungieren. Eventuell könnte der nach dem Zähneputzen verbleibende Anteil im Speichel als Puffer fungieren. Eine Vergleichsstudie zwischen HAP versetzten Zahnpasten und Mundspüllösungen, konnte nicht gefunden werden. Da allerdings in den Studien eine Effektivität bestätigt werden konnte, wäre zu klären inwiefern die Wechselwirkung Biofilm-HAP da hineinpasst. Außerdem ist zu diskutieren, ob eine homogene Verteilung kleinster Nanopartikel in einer Zahnpasta von Relevanz ist, da durch die mechanische Bearbeitung eine erneute Verklumpung nicht ausgeschlossen werden kann.

---

### 5.3 Schlussfolgerung

1. Diese Arbeit zeigt, dass eine Ultraschallbehandlung von Nanohydroxylapatit-Suspensionen deutlich zu einer homogenen Verteilung der Partikel auf Testoberflächen beiträgt. Es konnte in den *in vitro* Versuchen kein Unterschied zwischen den Lösungsmitteln (H<sub>2</sub>O und PBS) ausgemacht werden. Das Produkt mit den kleinsten stäbchenförmigen HAP-Partikeln (~20 nm) überzeugte mit den besten Effekten.

2. Generell reicht eine Beschallung von zwei Intervallen (2 x 2 min) mit einer Amplitude von 20 % ohne Pulsation aus. Mehr Beschallungsintervalle zeigten keinen Vorteil.

3. Bei Eprui 20 (5 %) in H<sub>2</sub>O konnte nach 24 h und erneutem Aufschütteln der Probe eine bestehende Homogenität festgestellt werden. Alle anderen Produkte reagglomerierten und bildeten teilweise kristalline Strukturen aus.

4. Eine Pellikel ist für die *in vivo* Testung unabdingbar, da es sich bei der Anhaftung von den HAP-Partikeln um eine Wechselwirkung zwischen HAP und Pellikel handelt. Die Prüfkörper ohne Pellikel zeigten kaum aufgelagertes Material, was sich durch die Literaturrecherche bestätigen lässt.

## 6 Literaturverzeichnis

### Literaturverzeichnis

1. Albee FH (1920) Studies in bone growth: Triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. *Ann. Surg.* 71(1):32–39. doi:10.1097/00000658-192001000-00006
2. Al-Sanabani JS, Madfa AA, Al-Sanabani FA (2013) Application of calcium phosphate materials in dentistry. *Int. J. Biomater.* 2013:876132. doi:10.1155/2013/876132
3. Amaechi BT, van Loveren C (2013) Fluorides and non-fluoride remineralization systems. *Monogr. Oral Sci.* 23:15–26. doi:10.1159/000350458
4. Amerongen AVN, Veerman ECI (2002) Saliva-the defender of the oral cavity. *Oral Dis.* 8(1):12–22. doi:10.1034/j.1601-0825.2002.1o816.x
5. Anil A, Ibraheem WI, Meshni AA, Preethanath RS, Anil S (2022) Nano-Hydroxyapatite (nHAp) in the Remineralization of Early Dental Caries: A Scoping Review. *Int. J. Envir. Res. Publ. Health* 19(9):5629. doi:10.3390/ijerph19095629
6. Antonio Nanci (2018) *Ten Cate's Oral Histology*, 9. Aufl, 165-204. Elsevier
7. Anwar H, Strap JL, Costerton JW Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 36:1347-1351
8. Arango-Santander S, Montoya C, Pelaez-Vargas A, Ossa EA (2020) Chemical, structural and mechanical characterization of bovine enamel. *Arch. Oral Biol.* 109:104573. doi:10.1016/j.archoralbio.2019.104573
9. Ayoub HM, Gregory RL, Tang Q, Lippert F (2020) Comparison of human and bovine enamel in a microbial caries model at different biofilm maturations. *J. Dent.* 96:103328. doi:10.1016/j.jdent.2020.103328
10. Badiie M, Jafari N, Fatemi S, Ameli N, Kasraei S, Ebadifar A (2020) Comparison of the effects of toothpastes containing nanohydroxyapatite and fluoride on white spot lesions in orthodontic patients: A randomized clinical trial. *Dent. Res. J.* 17(5):354–359
11. Bardow A, Moe D, Nyvad B, Nauntofte B (2000) The buffer capacity and buffer systems of human whole saliva measured without loss of CO<sub>2</sub>. *Arch. Oral Biol.* 45(1):1–12. doi:10.1016/s0003-9969(99)00119-3
12. Borutta A, Reuscher G, Hufnagl S, Möbius S (2006) Caries prevention with fluoride varnishes among preschool children. *Gesundheitswesen* 68(11):731–734. doi:10.1055/s-2006-927247
13. Bossù M, Saccucci M, Salucci A, Di Giorgio G, Bruni E, Uccelletti D, Sarto MS, Familiari G, Relucenti M, Polimeni A (2019) Enamel remineralization and repair results of

- Biomimetic Hydroxyapatite toothpaste on deciduous teeth: an effective option to fluoride toothpaste. *J. Nanobiotechnol.* 17(1):17. doi:10.1186/s12951-019-0454-6
14. Buzalaf MAR, Pessan JP, Honório HM, Cate JM ten (2011) Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr. Oral Sci.* 22:97–114. doi:10.1159/000325151
  15. C. Hannig, S. Basche, T. Burghardt, A. Al-Ahmad, M.Hannig (2013) Influence of a mouthwash containing hydroxyapatite microclusters on bacterial adherence in situ. *Clin. Oral Inv.* (17):805–814
  16. Camargo CHR, Bernardineli N, Valera MC, de Carvalho, Cláudio Antônio Talge, Oliveira LD de, Menezes MM, Afonso SE, Mancini MNG (2006) Vehicle influence on calcium hydroxide pastes diffusion in human and bovine teeth. *Dent. Traumatol.* 22(6):302–306. doi:10.1111/j.1600-9657.2005.00326.x
  17. Chaffee BW, Feldens CA, Rodrigues PH, Vítolo MR (2015) Feeding practices in infancy associated with caries incidence in early childhood. *Comm. Dent. Oral Epidemiol.* 43(4):338–348. doi:10.1111/cdoe.12158
  18. Choi AL, Sun G, Zhang Y, Grandjean P (2012) Developmental fluoride neurotoxicity: a systematic review and meta-analysis. *Environ. Health Persp.* 120(10):1362–1368. doi:10.1289/ehp.1104912
  19. Dabanoglu A, Wood C, García-Godoy F, Kunzelmann K-H (2009) Whitening effect and morphological evaluation of hydroxyapatite materials. *American J. Dent.* 22(1):23–29
  20. Dawes C (1983) A mathematical model of salivary clearance of sugar from the oral cavity. *Caries Res.* 17(4):321–334. doi:10.1159/000260684
  21. Deimling D, Hannig C, Hoth-Hannig W, Schmitz P, Schulte-Mönting J, Hannig M (2007) Non-destructive visualisation of protective proteins in the in situ pellicle. *Clin. Oral Inv.* 11(3):211–216. doi:10.1007/s00784-007-0112-5
  22. Dorozhkin SV, Epple M (2002) Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten. *Angew. Chem.* 114(17):3260–3277. doi:10.1002/1521-3757(20020902)114:17<3260::AID-ANGE3260>3.0.CO;2-S
  23. Dowd FJ (1999) Saliva and dental caries. *Dent. Clin. North America* 43(4):579–597
  24. E.Hellwig/ J.Klimek- Deutscher Zahnärzterverlag (Hrsg) Einführung in die Zahnerhaltung, 6. Aufl. Deutscher Zahnärzterverlag
  25. Ebrahimi S, Stephen Sipaut Mohd Nasri C, Bin Arshad SE (2021) Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite powders using Response Surface Methodology (RSM). *PloS one* 16(5):e0251009. doi:10.1371/journal.pone.0251009

26. Fabritius-Vilpoux K, Enax J, Herbig M, Raabe D, Fabritius H-O (2019) Quantitative affinity parameters of synthetic hydroxyapatite and enamel surfaces in vitro. *Bioinsp. Biomim. Nanobiomat.* 8(2):141–153. doi:10.1680/jbibn.18.00035
27. Farmus L, Till C, Green R, Hornung R, Martinez Mier EA, Ayotte P, Muckle G, Lanphear BP, Flora DB (2021) Critical windows of fluoride neurotoxicity in Canadian children. *Envir. Res.* 200:111315. doi:10.1016/j.envres.2021.111315
28. Feagin F, Koulourides T, Pigman W (1969) The characterization of enamel surface demineralization, remineralization, and associated hardness changes in human and bovine material. *Arch. Oral Biol.* 14(12):1407–1417. doi:10.1016/0003-9969(69)90258-1
29. Feldens CA, Rodrigues PH, Anastácio G de, Vítolo MR, Chaffee BW (2018) Feeding frequency in infancy and dental caries in childhood: a prospective cohort study. *Int. Dent. J.* 68(2):113–121. doi:10.1111/idj.12333
30. Feng P, Zhao R, Yang L, Chen S, Wang D, Pan H, Shuai C (2022) Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanorods and their use in PCL bone scaffold. *Ceram. Int.* 48(22):33682–33692. doi:10.1016/j.ceramint.2022.07.314
31. Fincham AG (1980) Changing amino acid profiles of developing dental enamel in individual human teeth and the comparison of the protein matrix of developing human and bovine enamel. *Arch. Oral Biol.* 25(10):669–674. doi:10.1016/0003-9969(80)90099-0
32. Flemming HC, Wingender J (2001) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci. Tech.* 43(6):1–8
33. Garcia GL, Tolles WE (1977) Ultrasonic disaggregation of cell clusters. *J. Histochem. Cytochem.* 25(7):508–512. doi:10.1177/25.7.894000
34. Gerrit Josef Lefering (2018) In-situ-Untersuchung zu den tubulusokkludierenden Eigenschaften verschiedener Präparate zur Behandlung von Dentinhypersensibilitäten. Dissertation, Universität des Saarlandes
35. Grocholewicz K, Matkowska-Cichońska G, Makowiecki P, Drożdżik A, Ey-Chmielewska H, Dziwulska A, Tomasiak M, Trybek G, Janiszewska-Olszowska J (2020) Effect of nano-hydroxyapatite and ozone on approximal initial caries: a randomized clinical trial. *Sci. Rep.* 10(1):11192. doi:10.1038/s41598-020-67885-8
36. Grünberg C (2013) Einfluss der Lagermedien auf die mechanischen Eigenschaften von dentalen Hartgeweben - eine Nanoindenter-Studie. Universitäts- und Landesbibliothek Sachsen-Anhalt

37. Guth S, Hüser S, Roth A et al (2020) Toxicity of fluoride: critical evaluation of evidence for human developmental neurotoxicity in epidemiological studies, animal experiments and in vitro analyses. *Arch. Toxi.* 94(5):1375–1415. doi:10.1007/s00204-020-02725-2
38. Hannig C, Hannig M Natural enamel wear- A physiological source of hydroxylapatite nanoparticles for biofilm management and tooth repair. Elsevier Ltd. *Medical Hypotheses* 2009(74):670–672
39. Hannig M, Joiner A (2006) The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr. Oral Sci.* 19:29–64. doi:10.1159/000090585
40. Hannig M, Hannig C (2014) The pellicle and erosion. *Monogr. Oral Sci.* 25:206–214. doi:10.1159/000360376
41. Hench LL (1991) Bioceramics: From Concept to Clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* 74(7):1487–1510. doi:10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x
42. Hench LL, Wilson J (1999) An introduction to bioceramics, 2. Aufl. Advanced series in ceramics, Bd 1. World Scientific, Singapore
43. Hielscher Ultrasonics (2022) Homogenizers – Working Principle, Use and Scale-Up. Hielscher Ultrasound Technology
44. Joachim Enax, Matthias Epple (2018) Synthetic Hydroxyapatite as a biomimetic oral care agent. *Oral Health Prev. Dent.* (16):7–19
45. Juntavee A, Juntavee N, Sinagpulo AN (2021) Nano-Hydroxyapatite Gel and Its Effects on Remineralization of Artificial Carious Lesions. *Int. J. Dent.* 2021:7256056. doi:10.1155/2021/7256056
46. KANI T, KANI M, ISOZAKI A, SHINTANI H, OHASHI T, TOKUMOTO T (1989) Effect to apatite-containing dentifrices on dental caries in school children. *J. Dent. Health* 39(1):104–109. doi:10.5834/jdh.39.104
47. Kensche A, Holder C, Basche S, Tahan N, Hannig C, Hannig M (2017) Efficacy of a mouthrinse based on hydroxyapatite to reduce initial bacterial colonisation in situ. *Arch. Oral Biol.* 80:18–26. doi:10.1016/j.archoralbio.2017.03.013
48. Kensche A, Holder C, Basche S, Tahan N, Hannig C, Hannig M (2017) Efficacy of a mouthrinse based on hydroxyapatite to reduce initial bacterial colonisation in situ. *Arch. Oral Biol.* 80:18–26. doi:10.1016/j.archoralbio.2017.03.013
49. Kerebel B, Daculsi M, Kerebel K Ultrastructural studies of enamel crystallites. *J. Dent. Res.* 1979(58):844–851
50. Kintek Solution (2024) Die Vor- und Nachteile von Kugelmöhlen in Labor- und Industrieanwendungen verstehen. Kintek Solution

51. Lancet (2018) Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 392(10159):1789–1858. doi:10.1016/S0140-6736(18)32279-7
52. Laurance-Young P, Bozec L, Gracia L, Rees G, Lippert F, Lynch RJM, Knowles JC (2011) A review of the structure of human and bovine dental hard tissues and their physicochemical behaviour in relation to erosive challenge and remineralisation. *J. Dent.* 39(4):266–272. doi:10.1016/j.jdent.2011.01.008
53. Limeback H, Enax J, Meyer F (2021) Biomimetic hydroxyapatite and caries prevention: a systematic review and meta-analysis. *CJDH* 55(3):148–159
54. Losee F, Cutress T, Brown R Natural Elements of the Periodic Table in Human Dental Enamel. *Caries Res.* 1974(8):123–134
55. Luo W, Huang Y, Zhou X, Han Q, Peng X, Ren B, Li J, Li M, Cheng L (2020) The effect of disaggregated nano-hydroxyapatite on oral biofilm in vitro. *Dent. Mat. : Pub. of Acad. Dent. Mat.* 36(7):e207-e216. doi:10.1016/j.dental.2020.04.005
56. Lussi A, Hellwig E, Klimek J Fluorides – Mode of Action and Recommendations for Use. *Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin* 2012(122):1030–1036
57. Lynch RJM (2013) The primary and mixed dentition, post-eruptive enamel maturation and dental caries: a review. *Int. Dent. J.* 63 Suppl 2:3–13. doi:10.1111/idj.12076
58. Manfred Ruppel (2024) Rasterelektronenmikroskopie- Einführung (pdf), Frankfurt am Main, Goethe- Universität, <https://www.bio.uni-frankfurt.de/43229358/einfuehrung.pdf>
59. Matthias Hannig, Christian Hannig (2010) Nanomaterials in preventive dentistry. *Nature Nanotech.* (5):565–569
60. Molino G, Palmieri MC, Montalbano G, Fiorilli S, Vitale-Brovarone C (2020) Biomimetic and mesoporous nano-hydroxyapatite for bone tissue application: a short review. *Biomed. Mat.* 15(2):22001. doi:10.1088/1748-605X/ab5f1a
61. Monroe EA, Votava W, Bass DB, McMullen J (1971) New calcium phosphate ceramic material for bone and tooth implants. *J. Dent. Res.* 50(4):860–861. doi:10.1177/00220345710500041201
62. Muñoz-González C, Feron G, Canon F (2018) Main effects of human saliva on flavour perception and the potential contribution to food consumption. *Proc. Nutr. Society* 77(4):423–431. doi:10.1017/S0029665118000113

63. Murphy J, Beighton D, Clark D, Bartlett D (2007) The potential for sodium hexametaphosphate (SHMP) found in common children drinks to limit acid production in the oral biofilm. *J. Dent.* 35(3):214–217. doi:10.1016/j.jdent.2006.08.003
64. Nguyen NK, Leoni M, Maniglio D, Migliaresi C (2013) Hydroxyapatite nanorods: soft-template synthesis, characterization and preliminary in vitro tests. *J. Biom. Appli.* 28(1):49–61. doi:10.1177/0885328212437065
65. Nobre CMG, Pütz N, Hannig M (2020) Adhesion of Hydroxyapatite Nanoparticles to Dental Materials under Oral Conditions. *Scanning* 2020:6065739. doi:10.1155/2020/6065739
66. Paszynska E, Pawinska M, Gawriolek M, Kaminska I, Otulakowska-Skrzynska J, Marczuk-Kolada G, Rzatowski S, Sokolowska K, Olszewska A, Schlagenhaut U, May TW, Amaechi BT, Luczaj-Cepowicz E (2021) Impact of a toothpaste with microcrystalline hydroxyapatite on the occurrence of early childhood caries: a 1-year randomized clinical trial. *Sci. Rep.* 11(1):2650. doi:10.1038/s41598-021-81112-y
67. Pendrys DG, Stamm JW (1990) Relationship of total fluoride intake to beneficial effects and enamel fluorosis. *J. Dent. Res.* 69 Spec No:529-38; discussion 556-7. doi:10.1177/00220345900690S107
68. Peres RCR, Camargo G, Mofatto LS, Cortellazzi KL, Santos MCLG, Nobre-dos-Santos M, Bergamaschi CC, Line SRP (2010) Association of polymorphisms in the carbonic anhydrase 6 gene with salivary buffer capacity, dental plaque pH, and caries index in children aged 7-9 years. *Pharmac. J.* 10(2):114–119. doi:10.1038/tpj.2009.37
69. Plano (2022) Leit Tabs - leitfähige Kohlenstoffklebepads. Zugegriffen: 22. Juli 2022, [www.plano-em.de](http://www.plano-em.de)
70. Platthaus M (2005) Leichte Homogenisierung mit Ultraschall. *LABORPRAXIS*, <https://www.laborpraxis.vogel.de/leichte-homogenisierung-mit-ultraschall-a-106233/>
71. Robinson C, Lowe NR, Weatherell JA (1975) Amino acid composition, distribution and origin of "tuft" protein in human and bovine dental enamel. *Arch. Oral Biol.* 20(1):29–42. doi:10.1016/0003-9969(75)90149-1
72. Rodemer T, Pütz N, Hannig M (2022) Influence of hydroxyapatite nanoparticles on the formation of calcium fluoride surface layer on enamel and dentine in vitro. *Sci. Rep.* 12(1):17612. doi:10.1038/s41598-022-21545-1
73. Rudney JD, Chen R, Lenton P, Li J, Li Y, Jones RS, Reilly C, Fok AS, Aparicio C (2012) A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. *J. Appl. Microb.* 113(6):1540–1553. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05439.x

74. Sanderink R WC (2004) Plaque und Zahnstein. In: Sanderink RBA, Bernhardt H, Knoke M, Meyer J, Weber C, Weiger R (Hrsg.). *Orale Mikrobiologie und Immunologie.*, 1. Aufl. Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin
75. Sangi Europe GmbH (2022) MEILENSTEINE. [https://www.sangi-eu.com/ueberuns/meilensteine/?utm\\_referrer=https%3A%2F%2Fwww.sangi-eu.com%2F](https://www.sangi-eu.com/ueberuns/meilensteine/?utm_referrer=https%3A%2F%2Fwww.sangi-eu.com%2F). Zugegriffen: 08. Januar 2022
76. Schestakow A, Pütz N, Guth MS, Eisenmenger TA, Dudek J, Hannig M (2022) Influence of a hydroxyapatite suspension on 48-h dental biofilm formation in-situ. *Arch. Oral Biol.* 136:105388. doi:10.1016/j.archoralbio.2022.105388
77. Schlagenhauf U, Kunzelmann K-H, Hannig C, May TW, Hösl H, Gratza M, Viergutz G, Nazet M, Schamberger S, Proff P (2019) Impact of a non-fluoridated microcrystalline hydroxyapatite dentifrice on enamel caries progression in highly caries-susceptible orthodontic patients: A randomized, controlled 6-month trial. *J. Inv. Clin. Dent.* 10(2):e12399. doi:10.1111/jicd.12399
78. Seppä L (1991) Studies of fluoride varnishes in Finland. *Proc. Fin. Dent. Society. Suomen Hammaslaakariseuran toimituksia* 87(4):541–547
79. Shahmoradi M, Rohanzadeh R, Sonvico F, Ghadiri M, Swain M (2018) Synthesis of stabilized hydroxyapatite nanosuspensions for enamel caries remineralization. *Australian Dent. J.* doi:10.1111/adj.12624
80. Shi Z, Huang X, Cai Y, Tang R, Yang D (2009) Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells. *Acta Biomat.* 5(1):338–345. doi:10.1016/j.actbio.2008.07.023
81. Sköld U Approximal caries increment in relation to baseline approximal caries prevalence among adolescents in Sweden with and without a school-based fluoride varnish programme. *Comm. Dent. Health* 2016(33):281–285
82. Sköld UM (2005) On caries prevalence and school-based fluoride programmes in Swedish adolescents. *Swedish Dent. J.* (178):11–75
83. T. Thamaraiselvi, S. Rajeswari (2004) Biological Evaluation of Bioceramic Materials - A Review. *BMSM* (8 (1))
84. Thornton-Evans G, Junger ML, Lin M, Wei L, Espinoza L, Beltran-Aguilar E (2019) Use of Toothpaste and Toothbrushing Patterns Among Children and Adolescents - United States, 2013-2016. *MMWR.* 68(4):87–90. doi:10.15585/mmwr.mm6804a3
85. Tinanoff N, Baez RJ, Diaz Guillory C, Donly KJ, Feldens CA, McGrath C, Phantumvanit P, Pitts NB, Seow WK, Sharkov N, Songpaisan Y, Twetman S (2019) Early childhood

- caries epidemiology, aetiology, risk assessment, societal burden, management, education, and policy: Global perspective. *Int. J. Paediatric Dent.* 29(3):238–248. doi:10.1111/ipd.12484
86. van Thompson P (2020) The tooth: An analogue for biomimetic materials design and processing. *Dent. Mat. : Pub. of Acad. Dent. Mat.* 36(1):25–42. doi:10.1016/j.dental.2019.08.106
87. W. Buchalla Multitalent Speichel: Bekanntes und Neues zu Zusammensetzung und Funktion. Deutscher Ärzte-Verlag | DZZ | Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift | 2012(67):438–446
88. Wang C, Fang Y, Zhang L, Su Z, Xu J, Fu B (2021) Enamel microstructural features of bovine and human incisors: A comparative study. *Ann. Anat.* 235:151700. doi:10.1016/j.aanat.2021.151700
89. White AJ, Yorath C, Hengel V ten, Leary SD, Huysmans, Marie-Charlotte D N J M, Barbour ME (2010) Human and bovine enamel erosion under 'single-drink' conditions. *Europ. J. Oral Sci.* 118(6):604–609. doi:10.1111/j.1600-0722.2010.00779.x
90. Zhang M, He LB, Exterkate RAM, Cheng L, Li JY, Cate JM ten, Crielaard W, Deng DM (2015) Biofilm layers affect the treatment outcomes of NaF and Nano-hydroxyapatite. *J. Dent. Res.* 94(4):602–607. doi:10.1177/0022034514565644

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Form und Größe der getesteten HAP-Partikel im Vergleich zu Hydroxylapatitkristall aus menschlichem Zahnschmelz.....	- 14 -
Abbildung 2: Sägeschema für die bovinen Unterkieferfrontzähne in der Prüfkörperherstellung. .....	- 22 -
Abbildung 3: Veranschaulichung der Definition von Intervallen bei der Beschallung von Suspensionen.....	- 26 -
Abbildung 4: Versuchsaufbau Extraorale Vorversuchsreihe .....	- 28 -
Abbildung 5 : Ablauf des Petrischalenversuches .....	- 29 -
Abbildung 6 : Übersicht des extraoralen und intraoralen Versuchsaufbaus .....	- 31 -
Abbildung 7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der unbeschallten und beschallten (5 Intervalle) Spüllösung von Eprui 20 (5%) in H <sub>2</sub> O auf den Haftfolien der REM-Teller. Oben in 1.000-facher und unten in 5.000-facher Vergrößerung.....	- 34 -
Abbildung 8: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der unbeschallten und beschallten (5 Intervalle) Spüllösung von Eprui 40 (5%) in H <sub>2</sub> O auf den Haftfolien der REM-Teller. .....	- 35 -
Abbildung 9: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der unbeschallten und beschallten (5 Intervalle) Spüllösung von dem HAP Sigma (5%) in H <sub>2</sub> O auf den Haftfolien der REM-Teller. Oben in 1.000-facher und unten in 5.000-facher Vergrößerung.....	- 36 -
Abbildung 10: EDX-Analyse einer Suspension von dem HAP Sigma (5%) in H <sub>2</sub> O nach 4 Intervallen Ultraschallbehandlung. ....	- 37 -
Abbildung 11: EDX-Analyse einer Suspension von dem HAP Sigma (5%) in H <sub>2</sub> O nach 4 Intervallen Ultraschallbehandlung.. ....	- 38 -
Abbildung 12: Vergleich der unbeschallten und beschallten (5 Intervalle) Spüllösung von Kalident (5%) in H <sub>2</sub> O auf den Haftfolien der REM-Teller.....	- 39 -
Abbildung 13: Vergleich der Beschallungsintervalle von Eprui 20 (5%) in H <sub>2</sub> O auf den Haftfolien der REM-Teller.....	- 40 -
Abbildung 14: Vergleich der unmittelbar nach Beschallung pipettierten Spüllösung Eprui 20 (5%) in H <sub>2</sub> O mit der manuell aufgeschüttelten Spüllösung nach 24 h auf den Haftfolien der REM-Teller (5 Intervalle der Beschallung).....	- 41 -

Abbildung 15: Vergleich der unmittelbar nach Beschallung pipettierten Spüllösung Eprui 40 (5%) in H<sub>2</sub>O mit der manuell aufgeschüttelten Spüllösung nach 24 h auf den Haftfolien der REM-Teller (5 Intervalle der Beschallung)..... - 42 -

Abbildung 16: Vergleich der unmittelbar nach Beschallung pipettierten Spüllösung Kalident (5%) in PBS mit der manuell aufgeschüttelten Spüllösung nach 24 h auf den Haftfolien der REM-Teller (5 Intervalle der Beschallung)..... - 43 -

Abbildung 17: Vergleich der unmittelbar nach Beschallung pipettierten Spüllösung vom HAP Sigma (5%) in H<sub>2</sub>O mit der manuell aufgeschüttelten Spüllösung nach 24 h auf den Haftfolien der REM-Teller (5 Intervalle der Beschallung). ..... - 44 -

Abbildung 18: Reine Schmelzprüfkörper ohne Spülprotokoll..... - 46 -

Abbildung 19: Schmelzprüfkörper mit Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O 1 min inkubiert..... - 47 -

Abbildung 20: Die Abbildungen zeigen Schmelzprüfkörper inkubiert in HAP und Vollspeichel mit einem Mischungsverhältnis von 1:1.. ..... - 48 -

Abbildung 21: Die Abbildung zeigt einen Schmelzprüfkörper mit einer 3 min Pellikel, welcher in Eprui 20 (10%) in H<sub>2</sub>O 3 min inkubiert wurde. .... - 49 -

Abbildung 22: Alle Bilder zeigen Schmelzprüfkörper mit einer 3 min Pellikel und mit Eprui 20 (10%) in H<sub>2</sub>O und Vollspeichel (1:1) 3 min inkubiert.. ..... - 50 -

Abbildung 23: Verschiedene Komponenten in Petrischalen auf schwarzem Untergrund ... - 51 -

Abbildung 24: Schmelzprüfkörper mit und ohne 3 min Pellikel in Eprui 20 (10%) in H<sub>2</sub>O und Vollspeichel (1:1) geschwenkt in einer Petrischale ( 3 min Inkubation). ..... - 52 -

Abbildung 25: Vergleich der beschallten mit der unbeschallten Spüllösung von Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O und Vollspeichel (1:1) auf Schmelz..... - 53 -

Abbildung 26: Zwei Prüfkörper mit reiner 3 min Pellikel. .... - 57 -

Abbildung 27: Vergleich von intraoral getragenen Schmelzprüfkörpern mit und ohne 3 min Pellikel und 1 min Spülvorgang mit Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O..... - 58 -

Abbildung 28: Vergleich von intraoral getragenen Schmelzprüfkörpern mit und ohne 3 min Pellikel und 30 s Spüldauer mit Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O..... - 59 -

Abbildung 29: Vergleich der Schmelzoberfläche mit einer 3 min Pellikel und einer Spüldauer von 1 min mit beschallter und unbeschallter Suspension aus Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O. .... - 61 -

Abbildung 30: Vergleich der Schmelzoberfläche mit einer 3 min Pellikel und einer Spüldauer von 30 s mit beschallter und unbeschallter Suspension aus Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O..... - 62 -

Abbildung 31: Vergleich der Inkubationszeiten 30 s und 1 min (in vivo) bei beschallter Suspension von Eprui 20 (5 %) in H<sub>2</sub>O..... - 63 -

Abbildung 32: Boviner Schmelzprüfkörper mit 3 min Pellikel. Links 20.000-fach vergrößert. Rechts 40.000-fach vergrößert. .... - 64 -

Abbildung 33: Bovine Schmelzprüfkörper als Bruchpräparate mit 3 min Pellikel und 1 min Spülzeit intraoral mit Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O..... - 66 -

Abbildung 34: Bovine Schmelzprüfkörper als Bruchpräparate mit 3 min Pellikel und 30 s Spülzeit intraoral mit Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O..... - 67 -

Abbildung 35: Bovine Schmelzprüfkörper mit 3 min Pellikel und 30 s Spülzeit intraoral mit Eprui 20 (5%) in H<sub>2</sub>O..... - 68 -

Abbildung 36: Schematic depiction of the mouth rinse-inspired procedure used to apply the HAP particles to the enamel surface. .... - 78 -

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung hydroxylapatithaltiger Hartgewebe beim Menschen [3] .....	- 12 -
Tabelle 2: Test-Suspensionen der Studie „The effect of disaggregated nano-hydroxyapatite on oral biofilm in vitro“ von Weidan Luo et al. [48] .....	- 19 -
Tabelle 3: Die Hydroxylapatitpräparate .....	- 23 -
Tabelle 4: Die Chemikalien.....	- 24 -
Tabelle 5: Geräte und zusätzliche Materialien .....	- 24 -
Tabelle 6: Die Spüllösungen .....	- 26 -
Tabelle 7: Auswertung der Vorversuche.....	- 45 -

## 8 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Matthias Hannig für die Überlassung des Themas und für die regelmäßigen Besprechungen und Anregungen hinsichtlich der Versuchsabläufe. Da ich durch die gewonnenen Erkenntnisse ständig die Versuchsprotokolle ändern und neue Ideen umsetzen musste, gilt mein besonderer Dank meiner besonders guten Betreuung durch PD Dr. Johanna Dudek, welche mir regelmäßig mit Rat und Tat zur Seite stand. Darüber hinaus möchte ich mich auch bei der ganzen Forschungsgruppe der Konservierenden Zahnerhaltung für die sehr herzliche Aufnahme und den regen Austausch bedanken. Zusätzlich bedanken möchte ich mich bei Norbert Pütz für die vielen Stunden am Rasterelektronenmikroskop und die Ideen zur Umsetzung neuer Versuchsprotokolle.

Selbstverständlich gilt mein Dank auch meiner Familie und meinen Freundinnen und Freunden. Vor allem bei meinem Lebensgefährten bedanke ich mich für das mühevollen Korrekturlesen und für die große Unterstützung.

## 9 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.