

Aus dem Institut für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Remineralisation künstlicher Schmelzkaries durch
Calcium-Coacervat-Emulsionen

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sophie-Elisabeth Prause

aus Berlin

Datum der Promotion: 13.12.2019

Inhaltsverzeichnis

1.	Abbildungsverzeichnis	4
2.	Tabellenverzeichnis	5
3.	Abstrakt	6
4.	Einleitung	9
5.	Literaturübersicht	10
5.1.	Zahnschmelz	10
5.1.1.	Zusammensetzung.....	10
5.1.2.	Histologie	10
5.2.	Karies	12
5.2.1.	Allgemeines	12
5.2.2.	Histologie der Schmelzkaries.....	15
5.3.	Therapie von Karies	16
5.4.	Remineralisation von Zahnhartsubstanzen	19
5.5.	Coacervate.....	20
6.	Fragestellung	23
7.	Material und Methoden	24
7.1.	Teilprojekt 1	24
7.1.1.	Herstellung von Schmelzproben	24
7.1.2.	Demineralisation	25
7.1.3.	Behandlung der Schmelzproben.....	26
7.1.4.	Herstellung der Calcium-Coacervat-Emulsionslösungen.....	27
7.1.5.	Herstellung von Dünnschliffen	30
7.1.6.	Mikroradiografische Auswertung.....	31
7.2.	Röntgendiffraktion	33
8.	Ergebnisse	37

8.1. Teilprojekt 1	37
8.2. Röntgendiffraktion	40
9. Diskussion	45
9.1. Diskussion von Material und Methode	45
9.1.1. Boviner Schmelz.....	45
9.1.2. Erzeugung von künstlich kariösen Läsionen	46
9.1.3. Behandlung der demineralisierten Läsionen	46
9.1.4. Calcium-Coacervat-Emulsionen als Präkursor zur Remineralisation	47
9.2. Diskussion der Ergebnisse.....	49
9.2.1. Mikroradiografische Analyse	50
9.2.2. Mischungsverhältnisse	52
9.2.3. Röntgendiffraktion	53
10. Schlussfolgerungen	54
11. Literaturverzeichnis	55
12. Anhang.....	62
12.1. Eidesstattliche Versicherung.....	62
12.2. Curriculum vitae.....	63
12.3. Danksagung.....	64

1. Abbildungsverzeichnis

1. Abbildung: Schematischer Aufbau des Zahnschmelzes	11
2. Abbildung: Ökologische Plaquehypothese	13
3. Abbildung: Stephan-Kurve	14
4. Abbildung: Mikroradiografische Aufnahme einer künstlichen Schmelzkaries	16
5. Abbildung: Schematische Darstellung einer Schmelzprobe	25
6. Abbildung: Schematische Darstellung einer infiltrierten Schmelzprobe	28
7. Abbildung: Bild einer Schmelzprobe	31
8. Abbildung: Entstehung des Diffraktionsmusters.....	33
9. Abbildung: Erläuterungen zum Diffraktionsmuster	34
10. Abbildung: 2D-Transmissionsbild einer infiltrierten Schmelzprobe.....	36
11. Abbildung: Ausschnitt eines Diffraktionsmusters.....	36
12. Abbildung: Exemplarische Mikroradiogramme	39
13. Abbildung: Graphische Darstellung des Mineralverlaufs	40
14. Abbildung: Diffraktionsmuster Kontrollfläche	41
15. Abbildung: Diffraktionsmuster Effektfläche 1	41
16. Abbildung: Diffraktionsmuster Effektfläche 2	42
17. Abbildung: Graphische Darstellung der Diffraktionsmuster	43
18. Abbildung: Graph eines abweichenden Diffraktionsmusters	44

2. Tabellenverzeichnis

1. Tabelle: Demineralisationslösung nach Buskes	26
2. Tabelle: Übersicht Teilprojekt 1	29
3. Tabelle: Ergebnisse der mikroradiografischen Untersuchung	38
4. Tabelle: Darstellung der relativen Veränderungen des Mineralverlustes	39

3. Abstrakt

Der in den letzten Jahren beobachtete Kariesrückgang bei Kindern und Jugendlichen, stellt Therapiekonzepte in den Vordergrund, die auf eine Manipulation der kariösen Zahnhartsubstanz verzichten und stattdessen auf eine Remineralisation von initialen kariösen Läsionen abzielen. In der vorliegenden Studie wird erstmals in der Zahnmedizin eine Calcium-Coacervat-Emulsion als Präkursor zur Remineralisation von künstlich kariösen Läsionen im Zahnschmelz getestet. Das Prinzip der Coacervation wird bereits in anderen Bereichen, wie beispielsweise in der Kosmetik, erfolgreich angewendet. Auch bei der Herstellung von Gelatine in der Nahrungsmittelindustrie wird die Coacervation genutzt. Das Ziel dieser Studie war, eine Remineralisation von künstlich kariösen Läsionen im Zahnschmelz durch eine zuvor bestimmte optimale Konzentration der Calcium-Coacervat-Emulsion zu erzielen.

Die Calcium-Coacervat-Emulsionen wurden mittels Infiltration in die künstlich kariösen Läsionen eingebracht. Das Prinzip ist vergleichbar mit der Kariesinfiltration, bei der ein niedrig-viskoser Kunststoff als Infiltrationsmedium, nach entsprechender Vorbehandlung der kariösen Läsionen, verwendet wird. Kapillarkräfte ermöglichen ein schnelles Eindringen des niedrig-viskosen Kunststoffes in die kariöse Läsion. Der Begriff „Infiltration“ wurde in der vorliegenden Studie bewusst gewählt, da es sich um eine Weiterentwicklung der Kariesinfiltration handelt. Calcium-Coacervat-Emulsionen wurden ebenfalls mit Hilfe von Kapillarkräften in die künstlich kariösen Läsionen infiltriert.

In einem ersten Versuch wurden künstlich kariöse Läsionen in kariesfreien bovinen Schmelzproben erzeugt. Diese wurden anschließend mit 37 % Phosphorsäuregel für 5 Sekunden geätzt. Nach Reinigung und Trocknung wurden die Schmelzproben mit gesättigter Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung (1 M) infiltriert.

Anschließend wurde das optimale Verhältnis von Calciumchlorid-Dihydrat und Polyacrylsäure-Natriumsalz ermittelt. Dabei sollte eine opake, calciumreiche, niedrig-viskose Calcium-Coacervat-Emulsionslösung entstehen, die keinen Niederschlag ausbildete und sofort in die künstlich kariösen Läsionen infiltriert werden konnte, um diese zu remineralisieren. Mit Hilfe der Transversalen Mikroradiografie (TMR) wurden alle Schmelzproben in Bezug auf ihren Mineralverlust untersucht. Nur in Gruppe 8 (vgl.

Tab. 3 und 4; Seite 38-39) konnte eine signifikante Reduktion des Mineralverlustes im Sinne einer Remineralisation nachgewiesen werden.

In einem weiteren Versuch sollte nachgewiesen werden, welches Mineral sich in den künstlich kariösen Läsionen nach der Infiltration der Calcium-Coacervat-Emulsion bildete. Bei zwei infiltrierten Schmelzproben wurde die Zusammensetzung der Kristallstruktur mittels Röntgendiffraktion analysiert. Diese Proben wurden zuvor mit einer Calcium-Coacervat-Emulsion infiltriert, die in der TMR eine signifikante Reduktion des Mineralverlustes gezeigt hatte. Die Analyse der Röntgendiffraktion zeigte eine homogene Zusammensetzung des Zahnschmelzes mit Hydroxylapatit. In einer infiltrierten künstlich kariösen Läsion wurden Anteile von Oktacalciumphosphat nachgewiesen.

Die vorliegende Studie belegt die Remineralisation des Zahnschmelzes durch Calcium-Coacervat-Emulsionen und das Vorhandensein von Apatitverbindungen nach Infiltration in die Effektflächen.

The decline of caries in young individuals observed in recent years emphasizes therapeutic concepts that do not require manipulation of tooth structure and instead aim at a remineralization of initial carious lesions. In the present study, a calcium coacervate emulsion was tested for the first time in dentistry as a precursor for remineralization of artificial carious lesions in enamel. Coacervation has already been used in other areas such as the food industry or cosmetics. The aim of this study was to prove that a calcium coacervate emulsion formed calcium phosphate nanocrystals via various intermediate steps, which cause remineralization of the enamel.

Calcium coacervate emulsions were infiltrated into the artificial carious lesions. The principle is similar to the resin infiltration technique, in which a low-viscous resin is used as an infiltration medium, after appropriate pretreatment of the carious lesions. Capillary forces allow the resin to penetrate rapidly into the carious lesion. The term "infiltration" was chosen deliberately in the present study to underline the further development of caries infiltration. Calcium coacervate emulsions were also infiltrated into the artificial carious lesions by capillary forces.

Firstly, artificial carious lesions were generated in caries free bovine enamel specimens. These were then etched (37 % phosphoric acid gel, 5 seconds), cleaned, dried and stored in a saturated dipotassium hydrogen phosphate solution (1 M, 60 minutes). The optimum ratio of calcium chloride dihydrate and poly(acrylic acid) sodium salt was investigated. An opaque, calcium-rich, low-viscous calcium coacervate emulsion was developed. The infiltration emulsion was applied straight after mixing to the artificial carious lesions excessively. Transverse Microradiography (TMR) was used to examine the degree of mineral loss. Only in group 8 (Tab. 3 and 4, pp. 38-39) a significant reduction of mineral loss could be shown.

Another attempt was to demonstrate what kind of mineral was created in the artificial carious lesions after infiltration of the calcium coacervate emulsion. In order to perform an accurate crystal structure analysis of the lesions, two specimens, that had shown a significant decline in mineral loss in the TMR after infiltration of a calcium coacervate emulsion (group 8) before, were examined by X-ray diffraction analysis.

X-ray diffraction showed a homogeneous composition of the enamel with hydroxyapatite. Shares of octacalcium phosphate could be detected in one effect segment.

The present study demonstrates the remineralization of enamel by calcium coacervate emulsions and the presence of apatite compounds after infiltration into the artificial carious lesions.

4. Einleitung

Karies beschreibt einen pathologischen Vorgang, bei dem es zu einem Mineralverlust der Zahnhartgewebe kommt. Durch eine hohe Verfügbarkeit von Zuckern verändert sich die Zusammensetzung der oralen Mikroflora zugunsten von säurebildenden und säureresistenten Bakterien, wodurch kariesfördernde Bedingungen geschaffen werden. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Demineralisation der Zahnhartsubstanz, die zu einem Verlust der Zahnhartsubstanz führt, sofern die Vorgänge, die einen Mineralverlust initiieren nicht unterbrochen werden. Karies ist ein dynamischer Prozess, so dass demineralisierte kariöse Läsionen durch Einlagerung von Mineralien wieder remineralisiert und arretiert werden können.

In den letzten Jahren wurde ein Rückgang der Karies bei Kindern und Jugendlichen beobachtet. Nicht-operative Therapieverfahren treten zunehmend in den Vordergrund, um Karies frühzeitig und substanzschonend behandeln zu können. Sowohl dem Patienten als auch dem behandelnden Zahnarzt stehen heute Alternativen zur klassischen Füllungstherapie zur Verfügung, die eine Heilung von Karies, im Sinne einer Remineralisation, erzielen. Hierzu zählen die lokale Fluoridierung der Zähne, beispielsweise durch Zahnpasten, Mundspülungen oder Lacke. Die Kariesinfiltration beschreibt ein Behandlungsverfahren, bei dem ein fließfähiger lichthärtender Kunststoff in eine kariöse Läsion eindringt und somit die Diffusionswege für bakterielle Säureangriffe verschlossen werden. Eine Progression der Karies wird verhindert. Auf dem Prinzip der Kariesinfiltration, welche Kapillarkräfte ausnutzt, damit der Infiltrant in die Porositäten kariöser Läsionen eindringen kann, beruht der hier beschriebene Versuchsansatz. Eine Calcium-Coacervat-Emulsion wurde als Präkursor zur Remineralisation von künstlich kariösen Läsionen im Zahnschmelz als Infiltrant verwendet. Coacervate sind das Ergebnis einer flüssig-flüssig Phasenseparation, welche in einer polymerreichen Phase, den Coacervaten, und einer polymerarmen Mutterphase resultiert.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Eignung von Calcium-Coacervat-Emulsionslösungen zur Remineralisation künstlich hergestellter kariöser Schmelzläsionen zu überprüfen.

5. Literaturübersicht

5.1. Zahnschmelz

5.1.1. Zusammensetzung

Zahnschmelz ist die härteste Substanz des menschlichen Körpers. Zu 95-96 Gewichtsprozent besteht Zahnschmelz aus anorganischer Substanz. Des Weiteren beinhaltet Zahnschmelz 4 % Wasser und 1 % organische Matrix (Schroeder 1992; Gwinnett 1992). Der anorganische Anteil besteht aus Kristallen, welche aus Kalziumphosphatverbindungen, überwiegend Hydroxylapatit, bestehen. Verschiedene Variationen des Hydroxylapatits, welche beispielsweise durch Substitution mit Fluorid (Fluorhydroxylapatit), Magnesium (Magnesiumhydroxylapatit) oder Karbonat (Karbonhydroxylapatit) zustande kommen, sind nachweisbar (Young 1974; Wang et al. 2008; Ten Cate et al. 2003).

Die Apatitkristalle werden von einer Hydratationsschale umgeben, die den größten Anteil des im Schmelz befindlichen Wassers (75 %) ausmacht. Die übrigen 25 % sind an die organische Matrix gebunden und somit frei verfügbar (Gwinnett 1992; Hellwig et al. 2013; Ten Cate et al. 2003). Die organische Matrix besteht vor allem aus Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden, Zitrat und Laktat (Schroeder 1992; Hellwig et al. 2013).

5.1.2. Histologie

Charakteristisch für das histologische Erscheinungsbild des Zahnschmelzes sind Stäbchen (Schmelzprismen) mit einem Durchmesser von 4 bis 5 μm (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012). Sie entstehen durch die Anordnung von Hydroxylapatit-Kristallen, die den anorganischen Anteil des Zahnschmelzes ausmachen. Die Schmelzprismen verlaufen kontinuierlich von der Schmelz-Dentin-Grenze bis zur Zahnoberfläche (Wakita et al. 1983). Zahnschmelz wird von spezifischen Zellen, den Ameloblasten, während der Reifungsphase (Amelogenese) gebildet und anschließend mineralisiert (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012). Im Inneren der Schmelzprismen

sind die Hydroxylapatitkristalle parallel zur Prismenlängsachse angeordnet. Eine Ausnahme stellt die Peripherie der Prismen dar, in der die Kristalle hierzu quer verlaufen. Der Bereich, in dem die Prismen abrupt ihre Ausrichtung ändern, wird als Prismenscheide bezeichnet (Pearce und Nelson 1989). Ein interkristalliner Raum, welcher mit Wasser, Proteinen und Luft gefüllt ist, entsteht. Für eine mögliche Kariesentstehung ist dieser Bereich von Bedeutung, da das vergrößerte Porenvolumen eine mögliche Eintrittspforte für Säuren darstellt (Abb. 1).

Die homogene Struktur des gesunden Zahnschmelzes führt dazu, dass Licht relativ ungehindert durchscheinen kann und erst im Dentin reflektiert, gestreut und absorbiert wird. Daher erhalten Zähne ihre gelblich-weißliche Farbe primär durch das durchscheinende Dentin (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012).

Die Hydroxylapatitkristalle weisen eine hexagonale Form im Querschnitt auf. Der Durchschnitt beträgt ungefähr 40 nm, die Länge kann zwischen 100 bis 1000 nm variieren (Wang et al. 2008).

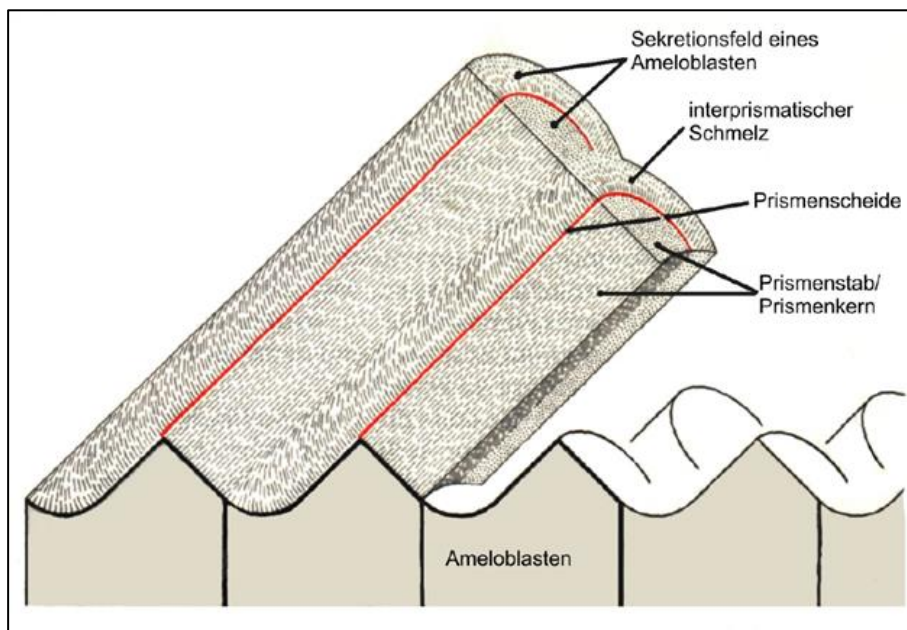


Abb. 1: Schematische Darstellung der dreidimensionalen Anordnung der Ameloblasten und der in den Stäbchen (Prismen) angeordneten Hydroxylapatit-Kristalle, welche von den Ameloblasten gebildet werden. Die sich verändernde Ausrichtung der Kristalle in der Prismenperipherie ist dargestellt. Ein vergrößerter interkristalliner Raum entsteht (Wakita und Kobayashi 1983).

5.2. Karies

5.2.1. Allgemeines

Die ökologische Plaquehypothese ist das heute am weitesten akzeptierte Paradigma zur Kariesentstehung. Dieses Modell verdeutlicht besonders die äußeren Umstände, wie Umwelteinflüsse oder Lebensgewohnheiten des Patienten, welche sich auf die Kariesätiologie auswirken. Eine Störung der Homöostase der oralen Mikroflora wird durch den häufigen Verzehr von fermentierbaren Kohlenhydraten begünstigt, wodurch das Wachstum von azidogenen (säurebildenden) und azidurischen (säuretoleranten) Bakterien, wie *Streptococcus mutans* und Laktobazillen, gefördert wird (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012). Die vermehrte Produktion von organischen Säuren durch die oben genannten Bakterien führt zu einer Demineralisation der Zahnhartsubstanzen, welche bei ausbleibenden Remineralisationsmaßnahmen zu den klinischen und röntgenologischen Anzeichen einer Karies führen (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012). Die Wirtsabwehr und die Mundhygiene wirken als protektive Faktoren von Karies. Speichel zählt durch das Lösen von Nahrungsrückständen und Bakterien sowie seinen puffernden Eigenschaften ebenfalls zu den protektiven Faktoren. Eine Remineralisation durch die im Speichel vorhandenen Fluoride und Calcium-Ionen unterstützt die protektiven Eigenschaften des Speichels. Die ökologische Plaquehypothese kann um indirekte Faktoren, wie das Alter, die Genetik, den sozioökonomischen Status und die Bildung des Patienten erweitert werden (Abb. 2) (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012). Die Entstehung von Karies ist demnach durch Zucker bedingt, wird aber multifaktoriell beeinflusst.

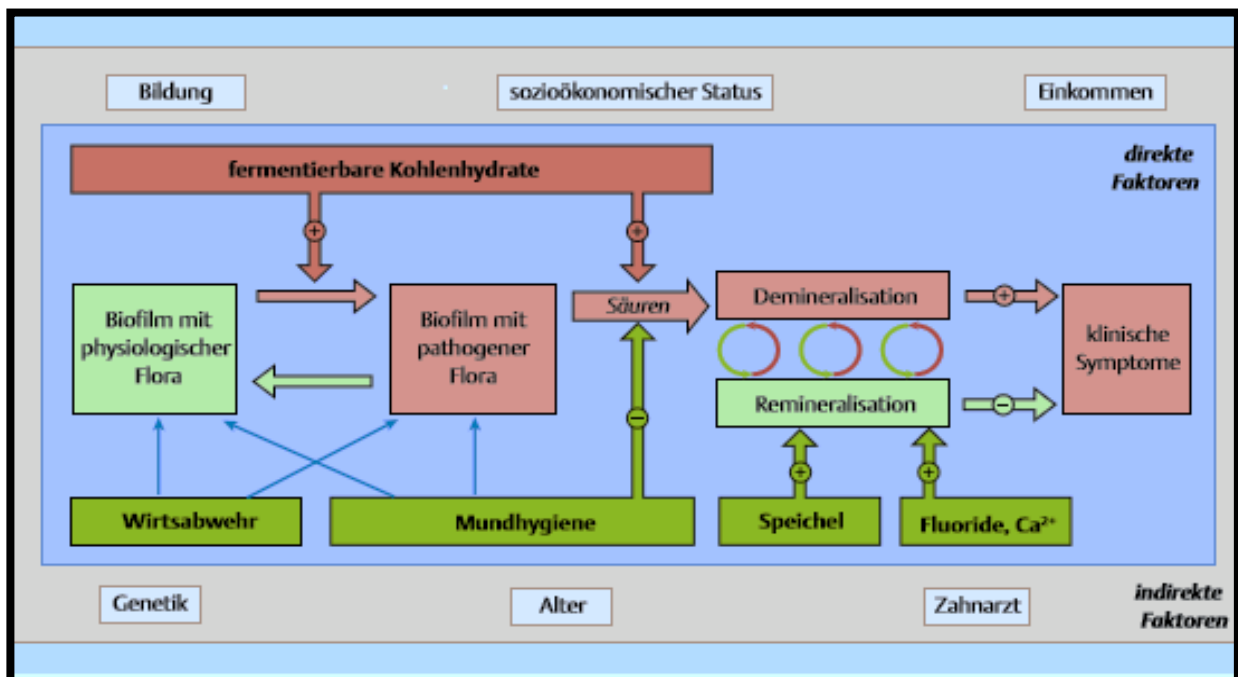


Abb.2: Schematische Darstellung eines auf der ökologischen Plaquehypothese basierenden Modells (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012): Dunkelrot dargestellt ist der ursächliche Faktor für Karies, nämlich der Konsum von fermentierbaren Kohlenhydraten (Zucker). So kommt es zu einer Verschiebung der bakteriellen Zusammensetzung des oralen Biofilms, welcher eine pathogene Flora ausbildet. Bakterien, die in diesem Milieu überleben und dieses fördern können, werden in ihrem Wachstum begünstigt, wodurch vermehrt Säuren gebildet werden, welche Zahnhartsubstanzen demineralisieren und zu den klinischen Symptomen einer Karies führen. Protektive Faktoren, die dem Kariesprozess entgegen wirken, sind in grün dargestellt. Indirekte Faktoren beeinflussen die Kariespathogenese über Umwege.

Durch einen häufigen Konsum von zuckerreicher Nahrung mit einem hohen Anteil an fermentierbaren Kohlenhydraten, können Mikroorganismen Energie aus der Nahrung beziehen. Der pH-Wert sinkt innerhalb kürzester Zeit durch die ablaufende Glykolyse und die Entstehung von Laktat durch azidogene (säureproduzierende) Bakterien. Bei einem bestimmten pH-Wert ist die Plaqueflüssigkeit in Bezug auf das Zahnmineral nur noch gesättigt. Dieser pH-Wert liegt für den Zahnschmelz bei 5,5-5,2 und wird als kritischer pH-Wert angesehen. In diesem Bereich kommt es zu einer Demineralisation der Zahnhartsubstanzen (kariogener Säureangriff) durch eine Untersättigung der Lösung. Mineralien können sich aus der Zahnhartsubstanz lösen (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012).

Anhand der Stephan-Kurve (Abb. 3) kann das typische Änderungsmuster des pH-Wertes während eines kariogenen Säureangriffs veranschaulicht werden (Marsh et al. 1992 und 2003).

Der Vorgang wiederholt sich im Laufe des Tages mehrmals. Wird wenig Zucker konsumiert, fällt der pH-Wert nur selten in den Bereich des kritischen pH-Wertes. Eine Demineralisation wird durch die ausgeprägten Phasen der Remineralisation, bei neutralem pH-Wert und adäquater Mundhygiene, kompensiert. Die Balance zwischen Demineralisation und Remineralisation verändert sich bei häufigem Zuckerkonsum und mangelnder Mundhygiene durch die daraus folgenden längeren Zeitintervalle, in denen der pH-Wert im deutlich sauren Bereich liegt. Die Zeit, in der eine Remineralisation stattfinden kann, wird reduziert. Sofern sich die Bilanz zugunsten der Demineralisation verschiebt, können sich kariöse Läsionen vergrößern und Zahnhartsubstanz geht irreversibel verloren (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012).

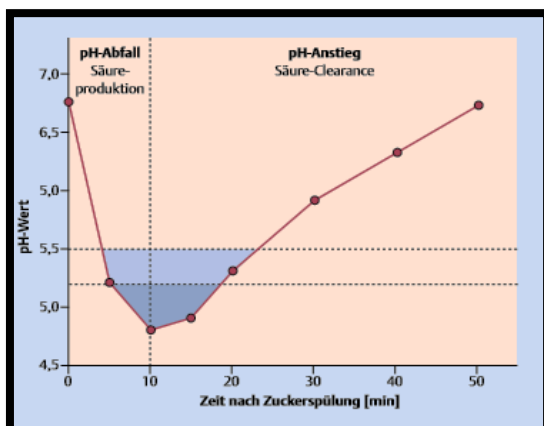


Abb. 3: Verlauf der Stephan-Kurve (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012) in zwei Phasen: Ein initial schneller Abfall des pH-Wertes in den Bereich des kritischen pH-Wertes, nach Verzehr von Süßwaren und die Metabolisierung von Zuckern (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012). Diese werden intraoral von Mikroorganismen verstoffwechselt. Hauptsächlich erfolgt der Metabolismus über die Glykolyse, wodurch Laktat produziert wird, welches zu einem Abfall des pH-Wertes in der Plaqueflüssigkeit führt (Marsh et al. 1992). Nachdem der Zucker vollständig verstoffwechselt wurde, wird die zweite Phase der Stephan-Kurve eingeleitet. Diese markiert die langsame Wiederherstellung des pH-Wertes von ungefähr 7,0 (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012). Während dieser Phase kann es zu einer Remineralisation durch Mineralablagerung in der kariösen Läsion kommen (Marsh et al. 1992). Die Dauer einer Stephan-Kurve umfasst 30 bis 60 Minuten. Der Bereich zwischen den gestrichelten Linien markiert den kritischen pH-Wert. Je dunkler die Schattierung unter einem pH-Wert von 5,2, desto stärker der Säureangriff (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012).

5.2.2. Histologie der Schmelzkaries

Karies ist durch einen Mineralverlust der Zahnhartsubstanzen gekennzeichnet. Mit Hilfe eines Polarisationsmikroskops lassen sich vier klassische Zonen der Schmelzkaries unterscheiden (Silverstone 1973): Die Oberflächenschicht (1.), welche auch als pseudointakte Oberflächenschicht bezeichnet wird. Diese weist einen geringeren Mineralverlust von 5 %, durch eine Präzipitation von bereits gelöstem Calcium und Phosphaten (Arends und Christoffersen 1986; Silverstone et al. 1988; Klimm 1997; Hellwig et al. 2003), als der darunter gelegene Läsionskörper (2.) auf (Abb. 4). Dieser beinhaltet den höchsten Mineralverlust von ungefähr 70 %, welcher auch röntgenologisch deutlich sichtbar ist (Klimm 1997). Bedingt ist die hohe Mineralisation der pseudointakten Oberflächenschicht auch durch remineralisierende Anteile, insbesondere Fluoride, die sich im Speichel befinden. Diese können sich an Kristalle der Oberflächenschicht anlagern und ein Fortschreiten der Demineralisation verhindern. Im Bereich des Läsionskörpers wird die Progression von Karies nicht aufgehalten (Meyer-Lückel et al. 2007; Schroeder 1997). Darauf folgend ist die dunkle Zone (3.), deren Mineralverlust ungefähr 6 % (Klimm 1997) beträgt und deren optisches Erscheinungsbild bisher kontrovers in der Literatur diskutiert wird. Die transluzente Zone (4.) ist der Bereich, der dem gesunden Zahnschmelz anliegt und der am weitesten innen gelegene Bereich einer Schmelzkaries. Die Kristalle sind hier kleiner als im gesunden Zahnschmelz, was auf eine beginnende Demineralisation hindeutet (Silverstone 1973; Silverstone et al. 1981).

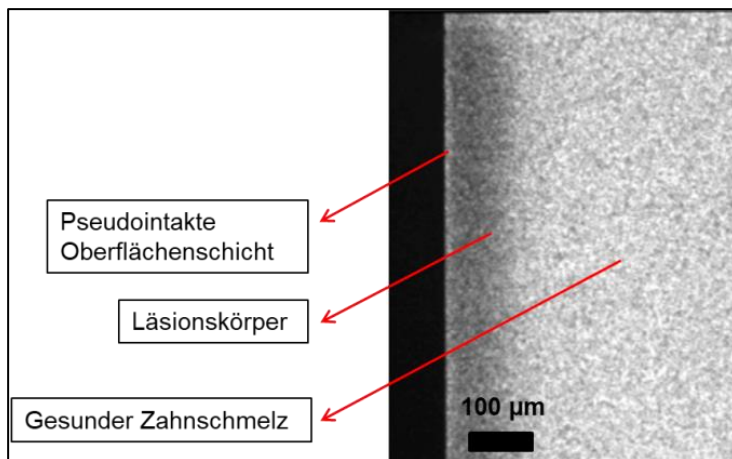


Abb. 4: Bild einer mikroradiografischen Aufnahme einer künstlich hergestellten Schmelzkaries mit einer stärker mineralisierten pseudointakten Oberflächenschicht, einem stark demineralisierten Läsionskörper und gesundem Zahnschmelz.

5.3. Therapie von Karies

Die Therapie von Karies beschreibt alle Maßnahmen zur Verhinderung, Heilung und Arretierung von Karies. Hierzu zählen ebenfalls die Linderung von Symptomen und die Wiederherstellung der Funktion der Zähne (Hoffmann-La Roche 1999; Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012). Um Karies zu therapieren, werden nicht nur deren Heilung, sondern auch präventive Maßnahmen, berücksichtigt. Grundlegend hierfür ist die Tatsache, dass kein definitiver Beginn der Erkrankung Karies festgelegt werden kann. Folglich kann nicht zwischen „gesund“ oder „krank“ beziehungsweise „Prävention“ oder „Therapie“ unterschieden werden. Außerdem führen Maßnahmen, die auf eine ursächliche Behandlung von Karies abzielen, sowohl zu einer Prävention der Erkrankung als auch zu einer Arretierung bereits vorhandener Läsionen (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012). Der Begriff „Therapie“ wird demnach in der Zahnmedizin für alle Behandlungsmaßnahmen verwendet, die Karies verhindern, heilen oder deren Symptome und Folgen reduzieren sollen (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012). Generell bieten alle ätiologischen Faktoren von Karies Therapieansätze. Besonders direkte Faktoren wie die Ernährungsumstellung oder die Beeinflussung des Biofilms können den Kariesprozess modifizieren. Je nach Ausmaß der kariösen Läsionen

werden zwischen non-invasiven, mikro-invasiven und (minimal-)invasiven Therapieformen unterschieden (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012).

(Minimal-)invasive Maßnahmen

Zu den (minimal-)invasiven Therapieformen gehören restaurative Maßnahmen, die ein Vorschreiten der Karies verhindern sollen und auf die Entfernung der kariös veränderten Zahnhartsubstanz abzielen (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012). Die klassische Füllungstherapie zählt zu dieser Therapieform. Mit Hilfe von Präparationsinstrumenten wird die Karies exkaviert. Der entstandene Defekt wird mit einem Füllungsmaterial restauriert. Das Ziel ist, eine Progression der Karies zu verhindern. Allerdings gehen restaurative Maßnahmen immer mit einem irreversiblen Verlust von gesunder Zahnhartsubstanz einher. Verschiedene Materialien, wie beispielsweise Komposite, Amalgame oder Zemente, stehen als Füllungsmaterial zur Verfügung. Der Begriff „minimal“ unterstreicht, dass heute, im Unterschied zu den früher durchgeführten Präparationsmaßnahmen („extension for prevention“ nach G. V. Black.) eine defektorientierte Restauration des kariösen Defekts möglich ist. Besonders durch die Etablierung der Adhäsivtechnik, die einen Verbund zwischen speziellen zahnfarbenen Füllungsmaterialien auf Harzbasis (Komposite) und der Zahnhartsubstanz mit Hilfe einer Vorbehandlung durch verschiedene chemikalische Lösungen sicherstellt (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012), wird ein maximaler Erhalt von gesunder Zahnhartsubstanz ermöglicht. Neben der Intention eine Kariesprogression durch das Legen einer Füllung zu vermeiden, tragen Füllungen auch zur Wiederherstellung der Ästhetik, Phonetik und Kaufunktion bei.

Um zahnhartsubstanzschonend zu arbeiten, können bereits bestehende Füllungen repariert werden, in dem sie nicht komplett entfernt werden. Von Vorteil ist diese Therapie bei großen Füllungen, da gesunde Zahnhartsubstanz geschont wird. Bei Patienten, die lange Behandlungszeiten nicht tolerieren können, ist eine Füllungsreparatur sinnvoll, um unter anderem Füllungsränänder zu optimieren. Handelt es sich um ausgedehnte kariöse Defekte, bei denen ein plastisches Füllungsmaterial keine ausreichende Lösung darstellt, sind laborgefertigte Restaurationen, wie Teilkronen oder Inlays indiziert (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012).

Non-invasive Maßnahmen

Zu den non-invasiven Maßnahmen zählen alle Therapieformen, die zu keinem Verlust von Zahnhartsubstanz führen, sondern an ätiologischen Faktoren der Karies ansetzen. Hierzu zählen besonders direkte Faktoren, wie beispielsweise eine Ernährungsumstellung, eine Modifikation des Biofilms oder der Mineralisation (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012). Um wirksam zu sein, sind non-invasive Maßnahmen oftmals über einen langen Zeitraum anzuwenden, da sie stark von der Compliance des Patienten und dessen Verständnis gegenüber der Therapie abhängig sind (Zero 2004; Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012). Dementsprechend häufig kommt es vor, dass die Karies durch mangelnde Mundhygiene oder häufigen Zuckerkonsum des Patienten voranschreitet und letztendlich eine Füllungstherapie eingeleitet werden muss (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012). Besonders erfolgreich ist die Anwendung von non-invasiven Maßnahmen bei einer beginnenden Karies, da diese arretiert und die Zahnhartsubstanz remineralisiert werden kann. Die Beeinflussung des Biofilms durch Mundhygieneinstruktionen und mineralisierende Maßnahmen, wie beispielsweise die Anwendung von Fluoriden (Ten Cate et al. 1999) fördert die Remineralisation der Zahnhartsubstanz. Die Arretierung von kariösen Läsionen im Schmelz und im Dentin ist prinzipiell möglich. Allerdings nimmt die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Arretierung der Karies bei einem bereits vorhandenen Einbruch (Kavitation) der Zahnhartsubstanz, der für Mikroorganismen günstige Nischen aufweist, ab (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012).

Mikro-invasive Maßnahmen

Bei den mikro-invasiven Maßnahmen wird ein Material auf, beziehungsweise in den Zahn eingebracht, um eine Diffusionsbarriere zu schaffen. Auf eine Präparation wird verzichtet, so dass es zu keinem Verlust von Zahnhartsubstanz kommt. Die Zahnhartsubstanz wird durch spezielle Säuren angeraut, um einen besseren Haftverbund zwischen Zahn und appliziertem Material zu schaffen.

Zu den mikro-invasiven Maßnahmen zählt die Fissurenversiegelung, die vor allem bei Kindern ab 6 Jahren angewendet wird, um die Kauflächen der gerade durchgebrochenen Molaren zu schützen. Das Ziel ist die Unterbrechung der Diffusionswege einer beginnenden aktiven Karies auf den Kauflächen durch die

Applikation eines lichthärtenden Versieglerkunststoffes (Martignon et al. 2006; Splieth et al. 2010), da gerade Fissuren schwer zu reinigen sind. Fissurenversiegelungen werden heute nicht nur zur Prävention von kariösen Läsionen (präventive Versiegelung) angewendet, sondern auch zur Versiegelung von Karies in den Fissuren auf den Kauflächen der Zähne (therapeutische Versiegelung) (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012). Hierbei kann es zu einem kurzen Einsatz von Präparationsinstrumenten kommen, da die Fissuren erweitert werden müssen und der Kunststoff optimal in die Tiefe der Fissur eindringen kann.

Des Weiteren können mit Hilfe der Kariesinfiltration nicht kavitierte kariöse Läsionen arretiert werden (Meyer-Lückel et al. 2009; Paris et al. 2010). Hierfür wird der Zahn mit Salzsäure angeraut. Anschließend wird ein niedrig-viskoser, lichthärtender Kunststoff in den Zahn infiltriert. Aufgrund von Kapillarkräften, die eine Infiltration des Kunststoffes ermöglichen, werden in kürzester Zeit Diffusionswege unterbrochen und eine Arretierung der Karies erreicht.

5.4. Remineralisation von Zahnhartsubstanzen

Der Prozess der Remineralisation beschreibt das Intervall zwischen den Säureangriffen, in denen der pH-Wert der Plaque zu einem annähernd neutralen Wert von 7 zurückkehrt. Während dieser Zeit ist es möglich, dass bestimmte Ionen in der Plaque dazu beitragen, dass sich Mineralien wieder in die Zahnhartsubstanz einlagern können. Fluorid hat einen großen Effekt auf die Remineralisation und die Löslichkeit von Zahnhartsubstanzen. Bereits geringe Konzentrationen von Fluorid in der Umgebung des Zahnes hemmen eine Demineralisation und fördern eine Remineralisation der Zahnhartsubstanz. Fluorid-Ionen ersetzen die OH⁻-Gruppen des Hydroxylapatits. Werden alle OH⁻-Gruppen durch Fluorid-Ionen ersetzt, entsteht Fluorapatit. Dieses zeichnet sich durch eine dichte und stabile Kristallstruktur aus, da sich Fluorid-Ionen besser zwischen die dreieckig angeordneten Ca²⁺-Ionen der Hydroxylapatitkristalle anordnen können als die etwas größeren OH⁻-Ionen (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012). In Bereichen, in denen die OH⁻-Gruppen durch Fluorid-Ionen ersetzt wurden, konnte eine verringerte Löslichkeit der Zahnhartsubstanz nachgewiesen werden (Christoffersen et al. 1984; Arends et al. 1990; Brown et al. 1977). Klinisch ist

Fluorhydroxylapatit, bei dem nicht alle OH-Gruppen durch Fluorid-Ionen ersetzt werden, häufiger nachzuweisen. Das Vorhandensein von Fluorid begünstigt auch das Kristallwachstum. Dieses wird zum einen beschleunigt, zum anderen entsteht durch die Bildung von Fluorapatit oder Fluorhydroxylapatit ein weniger lösliches Produkt als das zuvor herausgelöste Hydroxylapatit (Ten Cate et al. 1991). Außerdem kann sich ein Fluoridreservoir in Form von CaF_2 auf der Zahnoberfläche bilden, welches eine hohe Konzentration von Calcium- und Fluorid-Ionen aufweist und diese bei Bedarf an die Zahnhartsubstanz abgeben kann.

Bisher zeigten lediglich sehr flache Läsionen, die auf den Schmelz beschränkt sind, eine vollständige Remineralisation. Die pseudointakte Oberflächenschicht als äußerste Schicht einer Schmelzkaries enthält einen höheren Mineralgehalt als der Läsionskörper, jedoch weniger Mineral als gesunder Schmelz. Eine Aufnahme von Mineralien im Sinne einer Remineralisation findet statt, so dass die Schicht an Dicke zunimmt und annähernd so viel Mineral beinhalten kann wie gesunder Schmelz. Der Läsionskörper kann ebenfalls Mineralien aufnehmen, verbleibt in Bezug auf den Mineralgehalt aber immer unter dem des gesunden Schmelzes (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012). Eine Remineralisation findet im Läsionskörper nur im geringen Maße statt.

5.5. Coacervate

Um eine vollständige Remineralisation von kariösen Läsionen zu erreichen und eine oberflächliche Remineralisation des Zahnschmelzes, welche durch die Ausfällung von Ionen limitiert ist, zu vermeiden, wird im Folgenden das Prinzip der Coacervation dargestellt. Die Coacervation, 1929 erstmals beschrieben (Kruyt, Bungenberg de Jong 1929), beschreibt die flüssig-flüssig Phasenseparation von löslichen Kolloiden in zwei voneinander getrennte Phasen. Unterschieden wird zwischen einfacher und komplexer Coacervation (Huang et al. 2007):

Bei der einfachen Coacervation beruht das Prinzip auf teilweiser Dehydration von Makromolekülen oder auch einem Verhindern von Lösungsvorgängen einzelner Substanzen in Lösungsmitteln, der sogenannten Desolvation (Lauth et al. 2014).

Die komplexe Coacervation, auf der die im Folgenden durchgeführten Versuche beruhen, zeichnet die elektrostatische Anziehung von gegensätzlich geladenen Kolloiden oder Polyelektrolyten mit Ionen beziehungsweise mit anderen Kolloiden, respektive Polyelektrolyten, aus. Dies führt zu einer flüssig-flüssig Phasenseparation. Eine calciumreiche, hoch konzentrierte Phase und eine verarmte, wässrige Phase entstehen. Die Coacervate bilden sich in Form von polymerreichen Tropfen (Kaempfe et al. 2013; Lauth et al. 2014; Huang et al. 2007). Dabei ist die Tropfenbildung stark abhängig von den Eigenschaften der jeweiligen Lösung (pH-Wert, Ionenbindungsstärke, Konzentration), die beim Mischen von zwei gegensätzlich geladenen Lösungen auftreten (Perry et al. 2014). Neben den elektrostatischen Kräften, spielt auch die Entropie eine Rolle bei der Coacervation. Durch die Anlagerung von Calcium-Ionen an Polyacrylat kommt es durch das Freiwerden von Hydratwasser zu einer gesteigerten Entropie (Sinn et al. 2004). Coacervat-Tropfen sind zunächst nicht stabil. Durch Ostwald-Reifung, Aggregation und Koagulation der Tröpfchen entsteht eine polymerreiche makroskopische Phase (Kaempfe et al. 2013).

Vor allem die komplexe Coacervation wird bereits zahlreich in der Nahrungsmittelindustrie, z.B. bei der Herstellung von Gelatine (Kruif et al. 2004; Kaempfe et al. 2013) oder in der Kosmetik, um antioxidantische Öle zu isolieren, eingesetzt (Martins et al. 2009; Lauth et al. 2014). Seit einigen Jahren wird die komplexe Coacervation in Hinsicht auf die Abschottung und Freisetzung von Proteinen und Wachstumsfaktoren untersucht (Lauth et al. 2014).

Das Prinzip der komplexen Coacervation wurde bereits beim Zusammenspiel einer wässrigen Lösung aus polyanionischen Polymeren, wie das hier verwendete Polyacrylsäure-Natriumsalz (PAA-Na), mit Calcium-Ionen (Ca^{2+}) beschrieben (Kaempfe et al. 2013). Hierbei kommt es zur Entstehung von PAA- Ca^{2+} -Komplexen in Form von Tropfen durch eine entropisch getriebene Reaktion zwischen den Calcium-Ionen und PAA-Na (Sinn et al. 2004; Kruif et al. 2004; Lauth et al. 2014). Die Komplexbildung wird außerdem durch eine starke Anziehung zwischen den deprotonierten Carbonsäure-Gruppen der Polyacrylsäure und den Calcium-Ionen gefördert (Huang et al. 2007; Lauth et al. 2014). Im nächsten Schritt reagieren PAA- Ca^{2+} -Komplexe mit Phosphat-Ionen (PO_4^{3-}). So entstehen Calcium-Phosphat-Nanopartikel in einer stabilisierenden PAA-Matrix (Wang et al. 2009). Dieser Ansatz ist die Grundlage für den folgenden In-vitro-

Versuch, bei dem eine Remineralisation durch Infiltration von Calcium-Coacervat-Emulsionen und letztendlich eine Calciumphosphat-Kristallisation erreicht werden soll.

6. Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluation von Calcium-Coacervat-Emulsionen als Präkursor zur Remineralisation durch Infiltration von Karies am Modell künstlicher kariöser Schmelzläsionen.

Im Gegensatz zum bisher angewandten Infiltranten, bestehend aus einem niedrigviskosen Kunststoff, soll hier die Infiltration der porösen Zahnhartsubstanz mit einer Coacervat-Emulsion beschrieben werden, welche als Präkursor zur Mineralisation von Calciumphosphat/Hydroxylapatit verwendet werden kann. Durch die Verwendung der Coacervat-vermittelten Mineralisation, kann eine Remineralisation innerhalb der Zahnschmelzläsion erreicht werden.

Der Term „Infiltration“ beruht auf einer Weiterentwicklung der Kariesinfiltration. Die Calcium-Coacervat-Emulsionen wurden ebenfalls mit Hilfe von Kapillarkräften, welche auch bei der Kariesinfiltration wirken, in die künstlich kariösen Läsionen infiltriert.

Das Ziel in einem ersten Teilprojekt war die Evaluation der optimalen Mischungsverhältnisse von Calciumchlorid-Dihydrat und Polyacrylsäure-Natriumsalz, so dass empirisch das optimale Mischungsverhältnis der Komponenten der Coacervat-Emulsion bestimmt werden konnte. Diverse Einflussfaktoren, wie der pH-Wert, die Viskosität der Lösung, die Umgebungstemperatur oder die Partikelgröße der Coacervat-Tropfen beeinflussen die Infiltration. In der vorliegenden explorativen Studie geht es insbesondere darum, Einflussfaktoren zu optimieren, die am wahrscheinlichsten eine Remineralisation der künstlich kariösen Läsionen durch die Calcium-Coacervat-Emulsionslösung beeinflussen.

Die Röntgendiffraktion wurde als abschließende Analyse durchgeführt, mit dem Ziel, die kristalline Phase in den künstlich kariösen Läsionen, nach der Infiltration mit den Calcium-Coacervat-Emulsionen, zu untersuchen. Angestrebt wird ein Diffraktionsmuster, welches auf das Vorhandensein von Hydroxylapatit, nach Infiltration der Calcium-Coacervat-Emulsion, hindeutet.

7. Material und Methoden

7.1. Teilprojekt 1

7.1.1. Herstellung von Schmelzproben

Für die vorliegende Studie wurden Schmelzproben aus permanenten bovinen, kariesfreien Schneidezähnen verwendet. Die bovinen Schneidezähne befanden sich in präparierten Oberkiefern, die in 0,5 % Chloramin-T-Lösung bei Raumtemperatur gelagert wurden. Zunächst wurden die Oberkiefer mit Leitungswasser grob gereinigt und die Weichgewebe mit einem Skalpell (Surgical Disposable Scalpel, BRAUN, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) entfernt. Für die Herstellung der Schmelzproben wurden die Zahnkronen der bovinen Schneidezähne mit Hilfe einer Bandsäge der Dicke 0,2 mm (EXAKT Trennschleifsystem 300cl; Fa. EXAKT Vertriebs GmbH, Norderstedt, Deutschland) unter ständiger Wasserkühlung von der Zahnwurzel getrennt.

Bis zur fertigen Herstellung der Schmelzproben wurden die bovinen Zahnkronen in Aqua dest. (Ampuwa® Spüllösung, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) bei 4°C gelagert.

Die Schmelzproben wurden anschließend mit einer Bandsäge der Dicke 0,2 mm (EXAKT 300cl) aus den Labialflächen, unter ständiger Wasserkühlung, herauspräpariert. Je nach Größe der Zahnkronen konnten zwei bis vier Proben (7×4×3 mm³) aus einem bovinen Schneidezahn gewonnen werden. Die Probenoberflächen wurden mit einem Schleifgerät (Labo Pol 25; Struers GmbH, Ballerup, Dänemark/Willich, Deutschland) und Schleifpapier (CarbiMet™ SiC Abrasive Paper, Körnung 1000; Buehler GmbH, Illinois, USA) geglättet.

Jeweils fünf Schmelzproben wurden in einer Silikonform mit Kunstharz (Technovit 4071; Fa. Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) eingebettet. Um glatte Probenoberflächen zu erhalten, wurden die ausgehärteten Kunstharzblöcke mit den darin enthaltenen Schmelzproben mit einem Schleifgerät (Labo Pol 25) und Schleifpapier (Körnung 320, 1200, 2500 und 4000) von Kunststoffrückständen befreit und poliert. Die fertigen Schmelzproben wurden mit Nagellack (Maybelline Jade, Express Finish Nagellack; L'ORÉAL Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland) gekennzeichnet (Abb. 5).

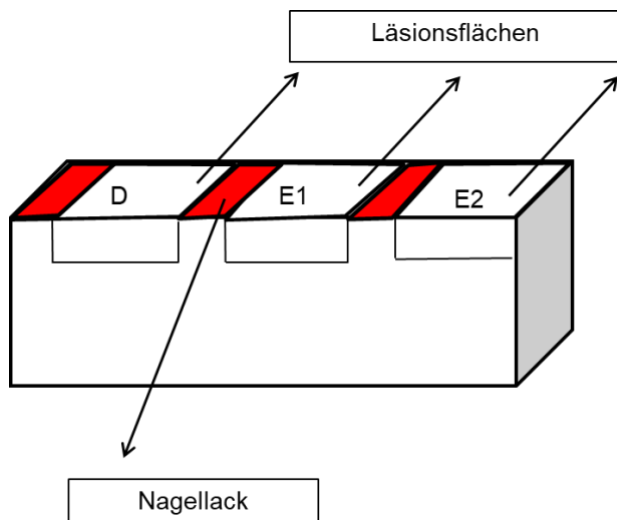


Abb. 5: Schematische Darstellung einer Schmelzprobe: Jede Probe wurde in drei freiliegende, demineralisierte Schmelzflächen, mit Hilfe von Nagellack, unterteilt (D=Kontrollfläche; E1= Effektfläche 1; E2= Effektfläche 2). Außerdem wurde ein zusätzlicher Streifen am oberen Rand der Schmelzprobe gezogen, damit eine Orientierung der einzelnen Effektflächen im weiteren Verlauf vereinfacht wurde.

7.1.2. Demineralisation

Um künstliche kariöse Läsionen zu erzeugen, wurden die Schmelzproben im nächsten Schritt für 24 Tage einer Demineralisationslösung (Buskes et al. 1985) ausgesetzt (Tab. 1). Der pH-Wert betrug 4,95 und wurde täglich mit einem pH-Meter überprüft (pH-/mV-/Temperatur-Messgerät GMH 3530; pH-Elektrode GE 100 BNC, Standard-pH-Elektrode, Fa. Greisinger, Regenstauf, Deutschland). Für das Korrigieren des pH-Wertes über 5,0 wurde Salzsäure 10 %, für einen pH-Wert unter 5,0 wurde Kalilauge 10 M, verwendet. Die Schmelzproben wurden in der Demineralisationslösung bei 37°C in einem Wärmeschrank (Venticell 404; MMM Medcenter GmbH, Planegg, Deutschland) gelagert.

Stoff	Konzentration in mmol/l	Molare Masse in g/mol	Menge in g für 5 l
CaCl₂·2H₂O	3,0	147,02	2,205 g
KH₂PO₄	3,0	136,09	2,041 g
MHDP	0,006	176	10 ml
CH₃COOH	50,0	60,05	15,012 g
KOH 10 M	-	56,11	ad pH 5,0
Aqua dest.	55,6	18	ad 5 l

Tab.1: Demineralisationslösung nach Buskes et al. 1985; Ansatz für 5 Liter

Die in jeder Probe durch die Demineralisation entstandenen drei künstlichen kariösen Läsionsflächen, wurden von den mit Nagellack abgedeckten, nicht demineralisierten Schmelzbereichen abgegrenzt. Eine dieser demineralisierten Flächen wurde bei allen Proben direkt nach der Demineralisation mit Nagellack abgedeckt, um eine Kontrollfläche bezüglich des Mineralverlustes zur Bestimmung des Ausgangs-Mineralverlustes zu erhalten. Die verbleibenden zwei Effektflächen wurden für die Infiltration genutzt (Abb. 6). Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung in einer 100 % Feuchtkammer mit befeuchtetem Aqua dest. (Ampuwa® Spüllösung) Zellstoff (TORK® Advanced, Green Singlefold Hand Towel, Fa. SCA, Göteborg, Schweden) bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

7.1.3. Behandlung der Schmelzproben

Zur Vorbereitung auf die Infiltration wurden die eingebetteten Schmelzproben aus dem Kühlschrank entnommen und mit Aqua dest. (Ampuwa® Spüllösung) vorsichtig abgespült. Nach der Reinigung sollten die Proben eine leicht feuchte Oberfläche aufweisen. Anschließend wurden die Effektflächen der Schmelzproben für 5 Sekunden

mit Phosphorsäuregel (Phosphorsäure-Ätzel 37%, ORBIS, Handelsgesellschaft mbH, Münster, Deutschland) geätzt. Mit Hilfe eines Luft-Wasser-Sprays wurden danach für 30 Sekunden alle Säurerückstände entfernt. Im nächsten Schritt wurden die getrockneten Proben für 60 Minuten in eine gesättigte Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung (1 M) eingelegt, um Phosphat-Ionen als erstes in die kariöse Läsion zu infiltrieren. Der Hintergrund einer ersten separaten Infiltration der Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung war, dass eine frühzeitige Ausfällung von Calcium- und Phosphat-Ionen verhindert wurde. Dies geschieht natürlicherweise, wenn beide Lösungen zusammen gegeben werden. Eine vollständige Remineralisation des Läsionskörpers ist allerdings nur möglich, wenn Calcium- und Phosphat-Ionen in der Läsion miteinander reagierten und Calcium-Phosphat-Nanopartikel bildeten. Daher wurde die Infiltration der Lösungen separat durchgeführt.

7.1.4. Herstellung der Calcium-Coacervat-Emulsionslösungen

Die Calcium-Coacervat-Emulsionen wurden unter ständigem Rühren (Magnetrührer IKA-Kombimag RCT; Jahnke & Kunkel GmbH, Staufen i. Breisgau, Deutschland) angesetzt. Dafür wurden Eppendorf-Gefäße mit 500 µl Polyacrylsäure-Natriumsalz (PAA-Na, Mw= 15000, pH=9; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) der entsprechenden Konzentration (Tab. 2) mit einer Eppendorf-Pipette (Eppendorf Research, 1000 µl, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) abgemessen und in das Eppendorf-Gefäß gegeben. Anschließend wurde ein definiertes Volumen (Tab. 2) Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 mM, pH=6; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) langsam dazugegeben. Mit Hilfe eines Magnetrührers wurden die Lösungen gemischt. Die Lösung sollte je nach Menge $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ mehr oder weniger opak werden. Ein gelförmiger Niederschlag durfte nicht entstehen.

Drei verschiedene PAA-Na-Konzentrationen wurden ausgewählt (2,5; 5 und 10 mg/ml). In Vorversuchen bestätigte sich eine erfolgreiche Infiltration bei diesen Konzentrationen. Allerdings erfolgte eine deutliche Remineralisation nur bei der höchsten PAA-Na-Konzentration von 10 mg/ml.

Die Schmelzproben wurden mit einem Luftpüster und mit Zellstoff (TORK® Advanced) getrocknet. Nach dem Ansetzen der Calcium-Coacervat-Emulsionen wurden diese sofort im Überschuss auf die Effektflächen 1 und 2 aufgetragen und infiltriert. Der Überstand der Emulsion wurde auf den Läsionsflächen belassen und nicht abgewischt (Abb. 6).

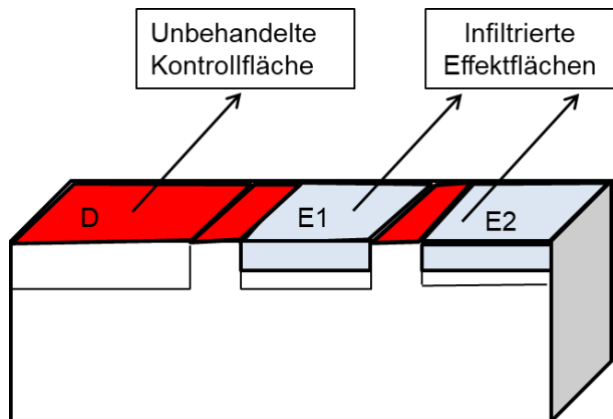


Abb. 6: Schematische Darstellung einer mit der Calcium-Coacervat-Emulsion infiltrierten Schmelzprobe. Die unbehandelte Kontrollfläche wurde im Voraus vollständig mit Nagellack abgedeckt.

Die Proben wurden randomisiert in neun Gruppen eingeteilt. Die spätere Anzahl der einzelnen Proben in den Gruppen variierte, da sich bei der Analyse der Transversalen Mikroradiografie (TMR) rausstellte, dass einige Probenoberflächen zerklüftet und somit nicht auswertbar waren (Tab.2).

Gruppe	PAA-Na-Konz. (500 µl)	CaCl ₂ ·2H ₂ O (50 mM) Volumen in µl	Anzahl der Proben
1	2,5 mg/ml	100	10
2		170	9
3		240	9
4	5 mg/ml	200	9
5		250	9
6		300	10
7	10 mg/ml	400	8
8		450	9
9		500	8

Tab.2: Verwendete Mischungsverhältnisse von PAA-Na und CaCl₂·2H₂O, sowie Anzahl der Proben in den einzelnen Gruppen

Die Proben wurden über Nacht in einer 100 % Feuchtkammer bei Raumtemperatur (23°C) gelagert, um einer möglichen Kristallisation Zeit zu geben. Ein Austrocknen der im Überschuss aufgetragenen Emulsion sollte verhindert werden. Am nächsten Tag wurde die zweite Effektfläche von Rückständen der Emulsion mit einem Aqua dest. (Ampuwa® Spüllösung) befeuchteten Wattepellet (Cotton Pellets, Size 0, Henry Schein, Melville, USA) grob gereinigt. Um zu verhindern, dass bei erneuter Infiltration der äußeren Effektfläche die Emulsion sich auch auf die mittig liegende Effektfläche ausbreitete, wurde Komposit (Tetric EvoFlow, Farbe A2+ B3, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein) als Barriere zwischen die beiden Effektflächen aufgetragen und für zehn Sekunden lichtgehärtet (Bluephase® Style, Ivoclar Vivadent). Das Komposit wurde direkt auf dem Nagellackstrich platziert, so dass kein Komposit die Schmelzoberfläche berührte. Die äußere Effektfläche wurde mit einem Wattepellet (Cotton Pellets, Size 0) getrocknet und ein zweites Mal, mit neu angesetzter Calcium-Coacervat-Emulsion, infiltriert. Diese wirkte 5 Minuten ein, bis mit der Herstellung der Dünnschliffe begonnen wurde.

7.1.5. Herstellung von Dünnschliffen

Zur Vorbereitung auf die mikroradiografische Analyse wurden 100 µm dicke transversale Dünnschliffe der Schmelzproben hergestellt. Dafür wurde jede Probe längs aus dem Kunstharz-Riegel herausgesägt (Bandsäge EXAKT 0,1 mm 300cl). Die Querschnittsflächen der Proben wurden danach mit einem Schleifgerät (Labo Pol 25) und Schleifpapier der Körnung 1200 und 4000 geglättet und poliert.

Anschließend wurden jeweils vier Schmelzproben auf einen Objektträger (Plexiglas-Objektträger 25x75x2 mm; Fa. dia-plus, Oststeinbek, Deutschland) nebeneinander mit Sekundenkleber (UHU dent; UHU GmbH, Bühl/Baden, Deutschland) aufgeklebt.

Die Proben wurden zur genauen Identifikation auf dem Objektträger nummeriert und markiert. Die Objektträger wurden nacheinander mit Hilfe einer Vakuumpumpe in eine Bandsäge (Exakt 300cl) der Dicke 0,1 mm eingespannt und auf eine Dicke von 500 µm gekürzt.

Danach wurden die Objektträger in ein Schleifgerät für Dünnschliffe (EXAKT Mikroschleifsystem 400 CS; Fa. EXAKT Vertriebs GmbH) mit einem Schleifpapier (WS flex 18 C; SiC, Körnung 1200, Waterproof, Hermes Schleifwerkzeuge GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland) eingebracht. Die Proben wurden auf eine Dicke zwischen 100 ± 10 µm reduziert.

Die fertigen Dünnschliffe wurden mit einem Skalpell (Surgical Disposable Scalpel, BRAUN) vorsichtig vom Objektträger gelöst und mit einem dünnen Streifen Klebeband (Leukofix®; BSN medical GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland) auf einem TMR-Probenhalter (Charité Facility Management GmbH, Mechanischen Werkstätten, Campus Benjamin Franklin, Berlin, Deutschland) fixiert (Abb. 7). Die Markierung der einzelnen Schmelzproben wurde auf das Klebeband übernommen und die Proben wurden in Aqua dest. (Ampuwa® Spüllösung) bis zur TMR gelagert.

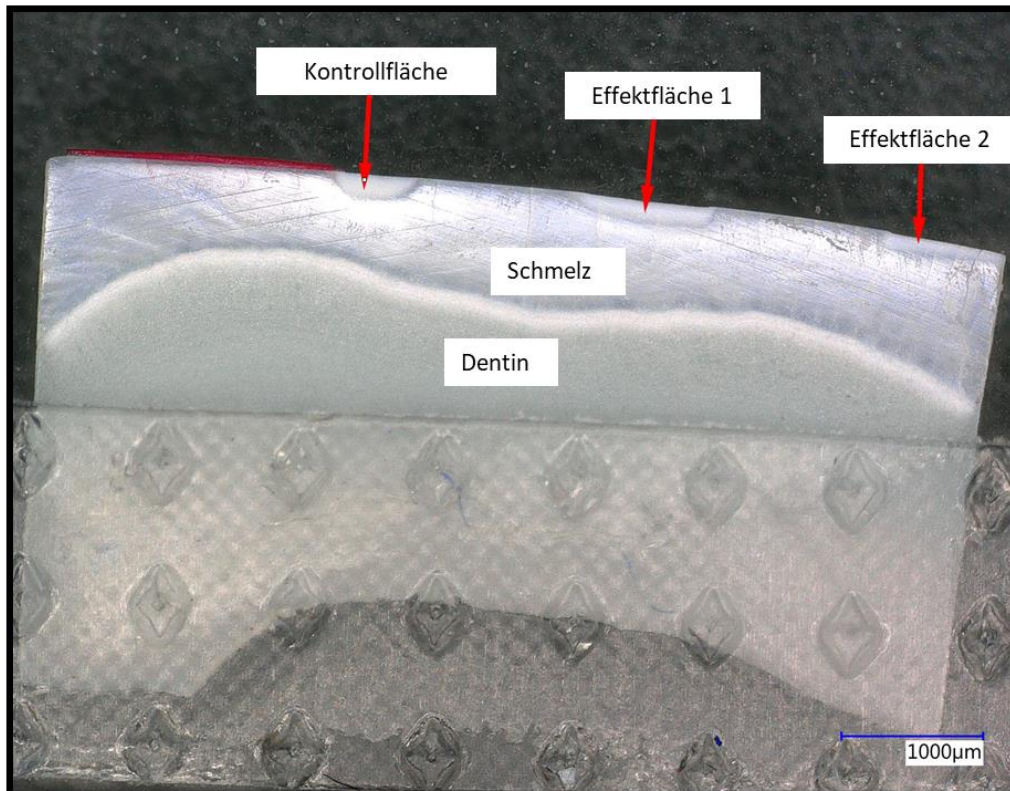


Abb. 7: Bild einer Schmelzprobe vor der TMR

7.1.6. Mikroradiografische Auswertung

Nach dem Vorwärmen der Röntgenröhre (Feinstruktur-Feinfokus-Röntgenröhre FF, Type: PW 2213/20; Fa. Panalytical, Kassel, Deutschland / Röntgenstrahlengenerator PW 1730/10, Philips, Eindhoven, Niederlande) wurden die vorbereiteten Dünnschliffe mit Zellstoff (TORK® Advanced) getrocknet und sofort nacheinander in die TMR-Kamera (modifiziertes Leitz-Gehäuse, Inspektor Research, Amsterdam, Niederlande) eingebracht. Zuvor wurde ein Fuji-Film (Motion Picture safety film Fuji fine grain positive film 71337; FUJIFILM Corporation, Tokyo, Japan) in einem lichtundurchlässigen Filmgehäuse in die TMR-Kamera eingespult. Die Proben wurden mit einer Spannung von 20 kV und einer Stromstärke von 20 mA für 10 Sekunden bestrahlt.

Die Filmentwicklung erfolgte in einer Dunkelkammer direkt im Anschluss an die TMR. Als Entwickler wurde Kodak Professional D-19 (Eastman Kodak Company, Rochester, USA) und als Fixierer Tetenal Superfix Plus (TETENAL AG & CO. KG, Norderstedt, Deutschland) verwendet. Zur Reinigung des Filmes wurde dieser danach für 7 Minuten

in Spiritus (AHK Spiritus, Walter Schmidt Chemie GmbH, Berlin, Deutschland) eingelegt. Um den Film für die anschließende mikroradiografische Analyse zu reinigen, wurde der Film für 2 Minuten in Agfa Agepon (Agfaphoto Holding GmbH, Leverkusen, Deutschland) gereinigt.

Um den Film zu trocknen, wurde dieser mit einer Gummilippenzange abgestreift und für 2 Minuten in einem Trockenschrank (Filmtrockenschrank 4302; Fa. Kindermann GmbH, Eibelstadt, Deutschland) mit einer Klammer und entsprechendem Gewicht aufgehängt.

Die mikroradiografische Analyse erfolgte mit Hilfe eines Mikroskops (Durchlichtmikroskop „Axioskop 2“; Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) in Verbindung mit einer angeschlossenen Kamera (CCD-Videokamera Modul XC 77 CE; Sony, Tokyo, Japan). Die TMR gibt Aussagen über den Mineralgehalt in einer Läsion und deren Tiefe. Die Läsionstiefe ist definiert als der Abstand zwischen der Probenoberfläche und dem Punkt in der Demineralisation in welcher der mikroradiografisch bestimmte Mineralgehalt 95 % des gesunden Schmelzes aufweist. Vor der Auswertung jedes TMR-Bildes wurden die verschiedenen Graustufen mit einer Aluminiumtreppe (step wedge) geeicht. Die Aluminiumtreppe wies den gleichen Strahlenabschwächungskoeffizienten auf wie Hydroxylapatit, so dass jeder Graustufe ein Mineralgehalt zugeordnet werden konnte.

Der integrierte Mineralverlust (ΔZ) wurde in den einzelnen Effektflächen mit Hilfe einer TMR-Software (Transversal Microradiography; TMR for Windows, Version 2.0.27.2, Inspektor Research, Amsterdam, Niederlande) bestimmt. Hierbei wurde die Läsionstiefe als der Abstand der Probenoberfläche bis zu dem Punkt, an dem der Mineralgehalt des Zahnschmelzes 95 % des gesunden Schmelzes betrug, festgelegt. Nachdem jede Effektfläche mikroradiografisch analysiert wurde, konnte aus den Werten des Mineralverlustes der einzelnen Effektflächen (D, E1, E2) ein Mittelwert gebildet werden. Dieser Wert wurde mit dem Mineralverlust der demineralisierten Kontrollfläche verglichen, um eine signifikante Reduktion des Mineralverlustes nachzuweisen. Das Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$ (Wilcoxon). Der Median der Differenzen zwischen ΔZ unbehandelt, ΔZ 1x infiltriert und ΔZ 2x infiltriert wurde ermittelt und hinsichtlich des Signifikanzniveaus überprüft. Ebenfalls ermittelt wurde der relative Mineralgewinn in Prozent.

7.2. Röntgendiffraktion

Um eine genaue Kristallstrukturanalyse der mit der Calcium-Coacervat-Emulsion infiltrierten Läsionen durchführen zu können, wurden zwei Proben mittels Röntgendiffraktion analysiert. Das grundlegende Prinzip der Röntgendiffraktion beruht auf der Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen. Diese sind definiert als Festkörper, deren Atome, Moleküle oder Ionen sich in einem wiederholenden dreidimensionalen Muster regelmäßig anordnen (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012). Trifft ein Röntgenstrahl auf einen Kristall mit homogen angeordneten Atomen, wird dieser von Elektronen, die die einzelnen Atome umgeben, gestreut. Die gebeugten Röntgenstrahlen werden auf einem nachgeschalteten Detektor aufgefangen. Sichtbar wird jeder Röntgenstrahl als einzelner Punkt. Viele Punkte zusammen ergeben ein typisches Diffraktionsmuster für jede Kristallart (Abb. 8). Aufgrund dieses spezifischen Musters können Rückschlüsse auf die Art der Kristalle, die Veränderungen des Kristallgehalts und deren Ausrichtung im Zahnschmelz gezogen werden (Abb. 9).

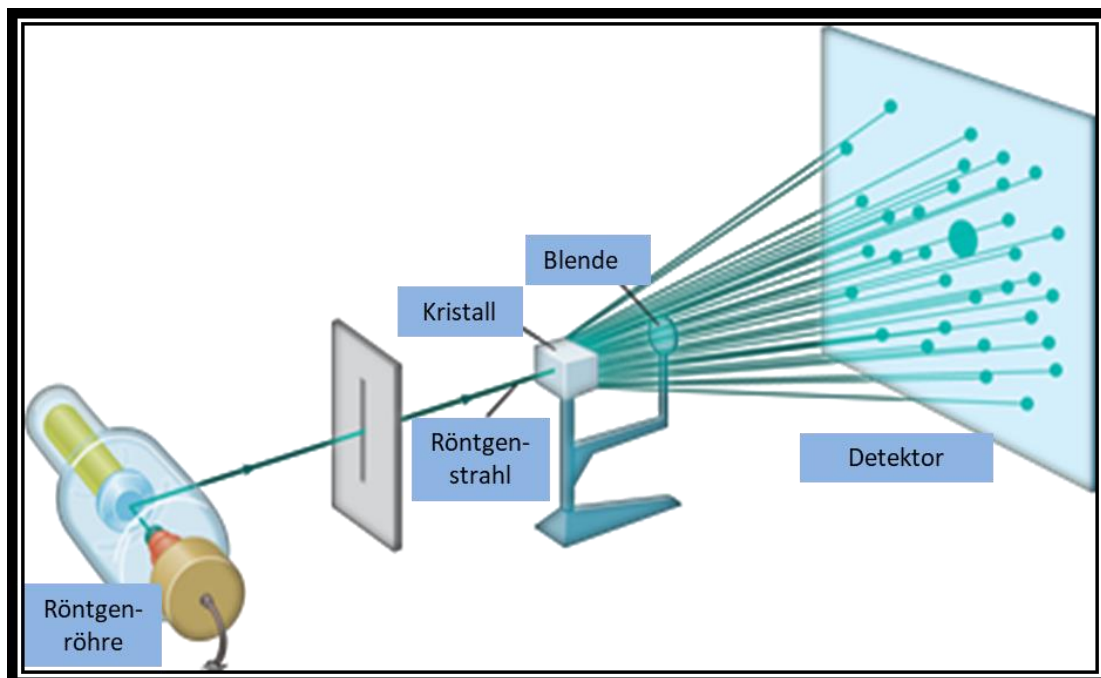


Abb. 8: Schematische Darstellung der Entstehung des Diffraktionsmusters

(http://textflow.mheducation.com/figures/0077386620/cha02680_1123.png, letzter Zugriff: 10.03.2019, 14:35 Uhr)

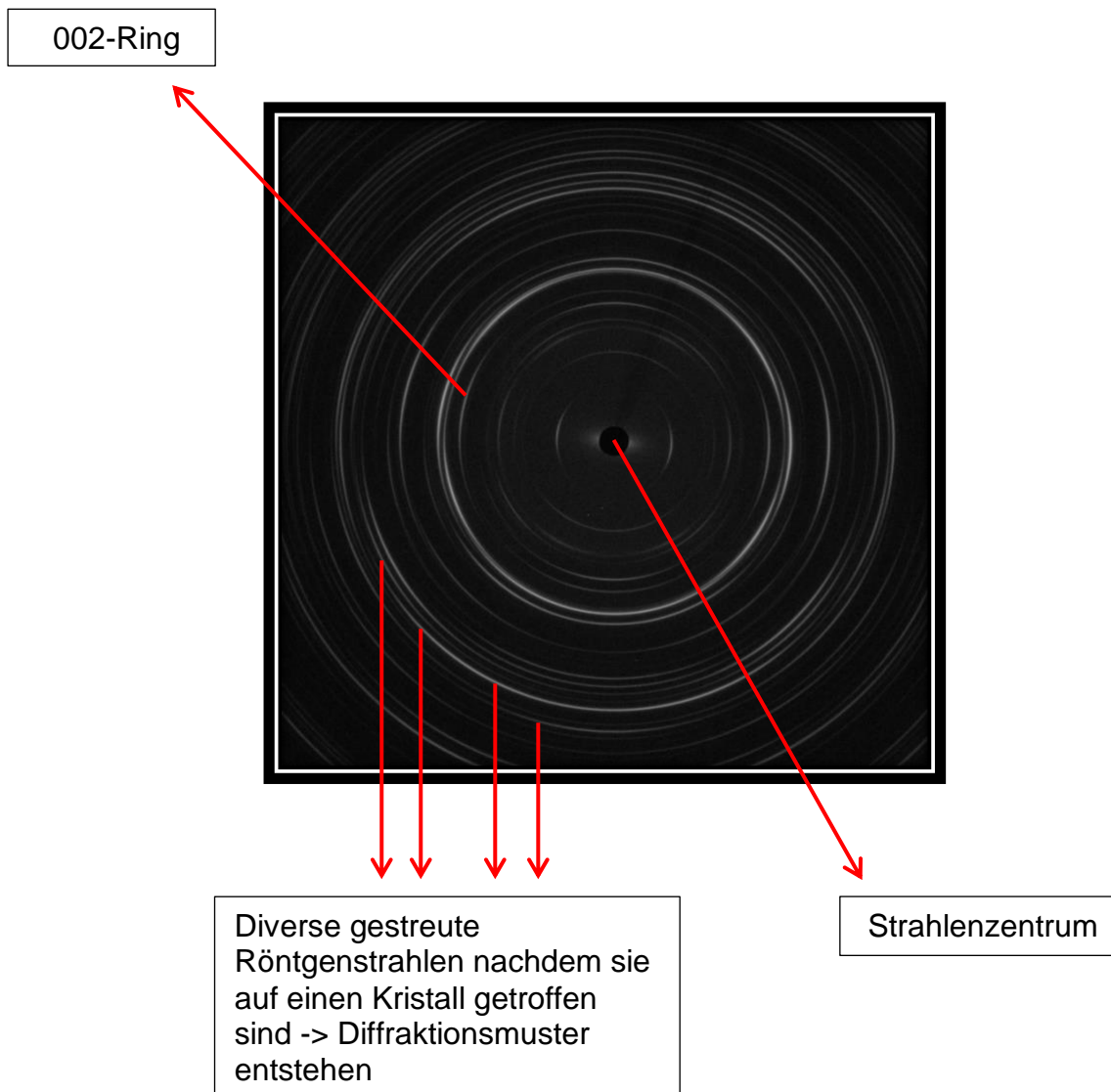


Abb. 9: Darstellung eines typischen Diffraktionsmusters: In der Mitte befindet sich das Strahlzentrum. Um dieses Zentrum sind die gestreuten Röntgenstrahlen zu erkennen. Sie erscheinen in ihrer Gesamtheit nicht mehr als einzelne Punkte, sondern als Kreise und bilden somit das für den jeweiligen Kristall typische Diffraktionsmuster. Der 002-Ring dient in jedem Kristall als Marker zur Identifizierung der Kristallverbindung.

Zwei Schmelzproben, die zuvor mit der optimalen Calcium-Coacervat-Emulsion (Gruppe 8; vgl. 8.1.) infiltriert worden waren, wurden im Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie GmbH (Bessy) mittels Röntgendiffraktionsanalyse untersucht. Hierzu wurden die Proben mit einem Röntgenstrahl ($\sim 30 \mu\text{m}$) mit einer Energie von 18 keV, einer Wellenlänge von $0,69 \text{ \AA}$ und einem ungefähren Proben-Detektorabstand von 24,7 cm für 0,3 Sekunden bestrahlt.

Für die erste Probe wurden 2380 Bilder, für die zweite Probe 2087 Bilder erstellt. Diese Bilder wurden mit dem Programm „XRDU“ (De Nolf, Universität Antwerpen, Antwerpen, Belgien) ausgewertet. Das Ziel war, den gesamten Datensatz jeder Probe grafisch darzustellen. Für die weitere Beurteilung der Kristallverbindungen, die sich in den Läsionen nach Infiltration der Calcium-Coacervat-Emulsionen bildeten, war eine grafische Darstellung des Datensatzes notwendig. In einem zweiten Schritt wurde ein Makro für das Programm „ImageJ 1.51 w“ (Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) erstellt, um den gesamten Datensatz jeder Probe, welcher sich aus einem Transmissions- und einem Diffraktionsscan zusammensetzt, vergleichen zu können. Für die Transmissionsbilder wurden die Messpunkte in einem Abstand von $60 \mu\text{m}$ in der jeweiligen Probe gescannt.

Die Transmission ergab sich aus der Relation von transmittierten Röntgenstrahlen an jedem einzelnen Punkt, dividiert durch die Werte des Weißbilds (Flatfield) am Rand der Probe. So konnten die Bilder homogenisiert und korrigiert werden.

Durch diesen Vorgang wurde ermöglicht, dass in jedem Läsionskörper die genauen Bildnummern mit dem dazugehörigen Diffraktionsmuster für einen spezifischen Punkt in der Probe untersucht werden konnten. Die Analyse erstreckte sich von der Oberfläche der Läsionsfläche über den Läsionskörper bis zum Erreichen des gesunden Schmelzes. Jeweils drei Messbereiche mit drei Messpunkten wurden ermittelt (Abb. 10).

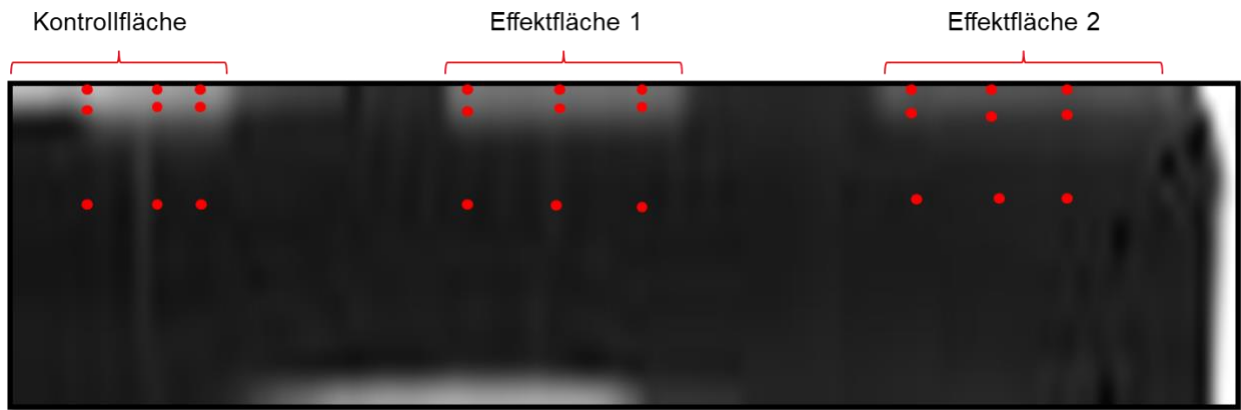


Abb. 10: 2D-Transmissionsbild einer Schmelzprobe: Probe mit drei Läsionen (Kontrollfläche, Effektfläche 1 und 2). Die roten Punkte markieren die Messbereiche am seitlichen Rand sowie in der Mitte der Läsion. Messungen wurden dort jeweils an der Oberfläche, im Läsionskörper und im Schmelz durchgeführt.

Um genauer auf die Unterschiede der einzelnen Diffraktionsbilder eingehen zu können, wurde in allen drei Diffraktionsbildern eine bestimmte Region (Abb. 11) ausgeschnitten.

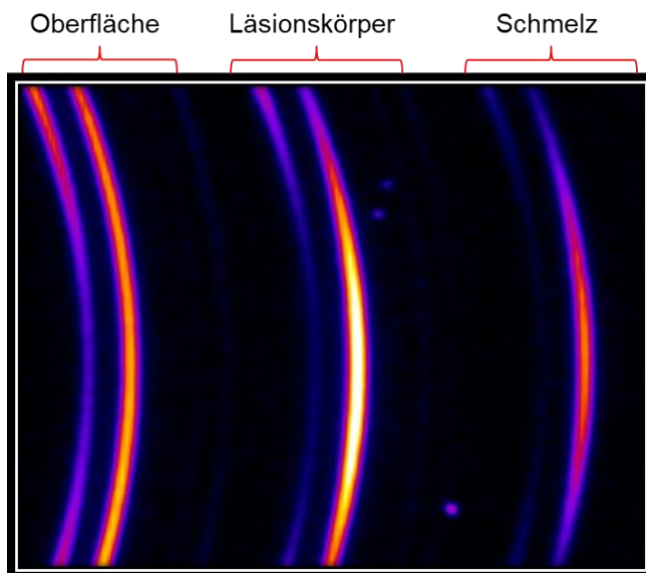


Abb. 11: Ausschnitt des Diffraktionsbildes des demineralisierten Kontrollbereichs. Die sich verändernde Intensität der Ringe, von der Oberfläche bis zum gesunden Schmelz, wird deutlich. Diese ist auf den unterschiedlich hohen Grad der Demineralisation zurückzuführen.

Anschließend wurden für die Kristallstrukturanalyse der drei Läsionsflächen Graphen erstellt, welche aus den Werten der einzelnen Diffraktionsbilder hervorgingen. Durch einen Scandurchlauf wurde aus jedem Diffraktionsbild ein Graph abgeleitet. Die Graphen wurden anschließend miteinander verglichen, um auf Veränderungen der Apatitstruktur Rückschlüsse ziehen zu können.

8. Ergebnisse

8.1. Teilprojekt 1

Bei der Mehrzahl der Gruppen wurden keine signifikanten Reduktionen des Mineralverlustes im Vergleich zu Kontrolle beobachtet ($p \leq 0,05$; Wilcoxon). Lediglich in Gruppe 8, in der ein Mischungsverhältnis von 10 mg/ml PAA-Na + 450 μ l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ infiltriert wurde, zeigte sich eine signifikante Reduktion des Mineralverlustes (Tab. 3 und 4) sowohl für den Median der Differenzen zwischen ΔZ unbehandelt und ΔZ 1x infiltriert ($p=0,038$) als auch für ΔZ 2x infiltriert ($p=0,028$). Die Darstellung von mikroradiografischen Bildern aus Gruppe 8 zeigten stärker mineralisierte Effektflächen im Vergleich zur demineralisierten Kontrollfläche (Abb. 12). Auch die grafische Darstellung machte deutlich, dass der Mineralgewinn in Gruppe 8 in beiden infiltrierten Effektflächen im gesamten Läsionskörper, im Vergleich zur demineralisierten Kontrollfläche, zugenommen hatte (Abb. 13).

Tab. 3: Ergebnisse der mikroradiografischen Untersuchung: Mineralverlust ΔZ und $\Delta\Delta Z$ nach ein- und zweimaliger Behandlung in Bezug auf die unbehandelte Kontrollfläche in Vol%. μm

Gruppe	ΔZ unbehandelt Median (Q25/Q75)	ΔZ 1x infiltriert Median (Q25/Q75)	ΔZ 2x infiltriert Median (Q25/Q75)	$\Delta\Delta Z$ 1x infiltriert Median (Q25/Q75)	$\Delta\Delta Z$ 2x infiltriert Median (Q25/Q75)
1	3927 (2837/4443)	3949 (3370/4897)	3833 (2051/4442)	-217 (-773/259)	-48 (-318/769)
2	4345 (3411/4816)	4231 (3821/4730)	3591 (3484/3711)	208 (-385/740)	316 (-300/923)
3	2997 (2656/4544)	3499 (2635/4406)	3120 (2834/3731)	-67 (-781/639)	159 (-218/883)
4	4381 (4154/5163)	4709 (4249/5293)	3514 (2993/4303)	245 (-868/399)	682 (314/933)
5	2623 (2221/4555)	3439 (2442/3786)	2693 (2493/3530)	132 (-315/227)	608 (-285/919)
6	4530 (3368/5043)	4094 (3287/4571)	3602 (3141/4494)	365 (-118/1087)	35 (-457/1615)
7	4434 (3464/5136)	4355 (3747/5393)	4188 (3184/4923)	-195 (-1204/869)	53 (-1510/1420)
8	3548 (3099/4828)	3079 (2342/3953)	2360 (2008/2983)	498 (415/1152)	1091 (585/1499)
9	3918 (3030/5798)	3725 (3255/5552)	3869 (3095/4274)	108 (-461/722)	847 (-444/1505)

Tab. 4: Relative Veränderung des Mineralverlustes zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta\Delta Z\%$) in Prozent

Gruppe	$\Delta\Delta Z\%$ 1x infiltriert Median (Q25/Q75)	$\Delta\Delta Z\%$ 2x Infiltriert Median (Q25/Q75)
1	-5 (-22/7)	-2 (-9/28)
2	7 (-9/15)	8 (-9/21)
3	-4 (-22/26)	6 (-5/18)
4	5 (-23/9)	15 (10/21)
5	5 (-9/7)	18 (-13/26)
6	8 (-2/19)	1 (-14/32)
7	-6 (-29/16)	2 (-37/27)
8	18 (14/22)	33 (28/36)
9	-1 (-15/16)	17 (-13/29)

Die Gruppe mit dem stärksten und statistisch signifikanten Mineralgewinn ist farblich gekennzeichnet.

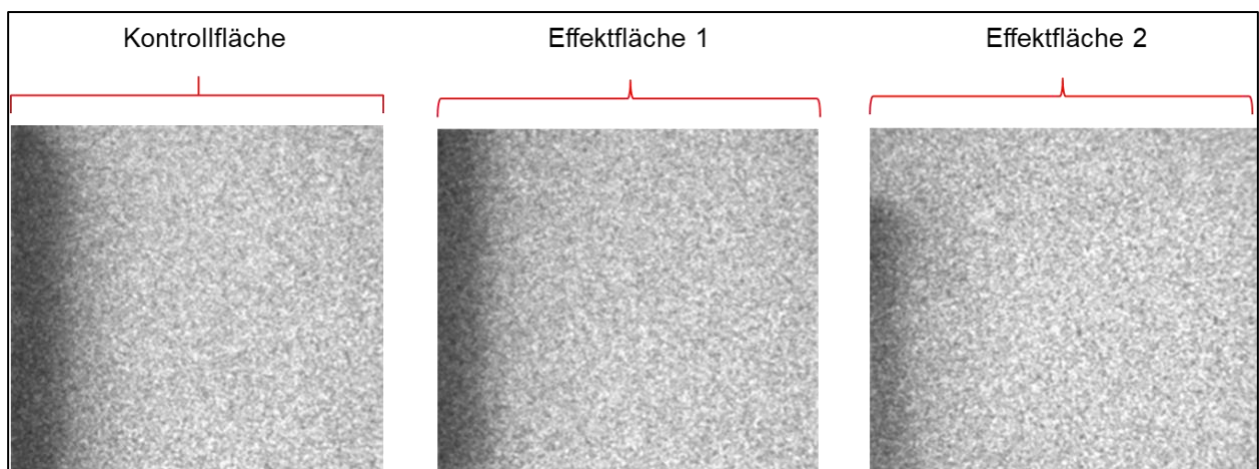


Abb. 12: Exemplarische Mikroradiogramme einer Probe aus Gruppe 8, in der eine signifikante Reduktion des Mineralverlustes nachgewiesen wurde.

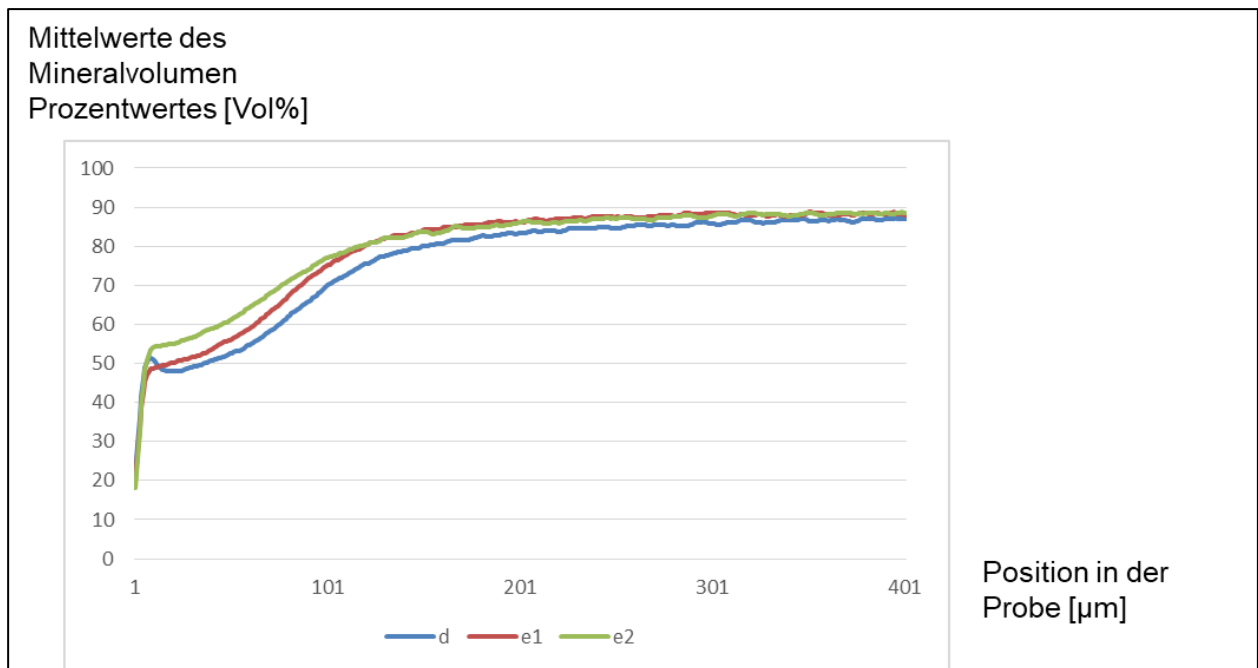


Abb. 13: Durchschnittlicher Mineralverlauf in Gruppe 8: Gegenüber der demineralisierten Kontrollfläche (d) hat der Mineralgehalt in den infiltrierten Effektflächen 1 (e1) und 2 (e2) im gesamten Läsionskörper zugenommen.

8.2. Röntgendiffraktion

Die Analyse der Röntgendiffraktionsbilder ergab, dass sich die Diffraktionsmuster in den infiltrierten Effektflächen, sowie in der demineralisierten Kontrollfläche, sehr ähnelten. Als Beispiel ist jeweils der mittig gelegene Messbereich in jeder Effektbeziehungsweise Kontrollfläche dargestellt (Abb. 14, 15 und 16). Deutlich wird, dass sich keine grundlegenden Unterschiede der Diffraktionsmuster in den verschiedenen Regionen der Probe zeigten, was auf eine homogene Zusammensetzung des Schmelzes hinwies.

Oberfläche

Läsionskörper

Schmelz

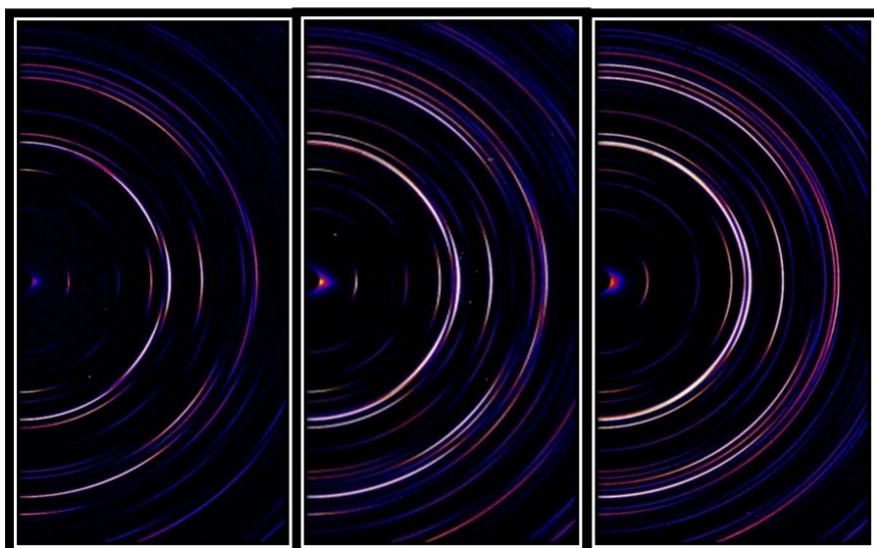


Abb. 14: Diffraktionsmuster der Kontrollfläche

Oberfläche

Läsionskörper

Schmelz

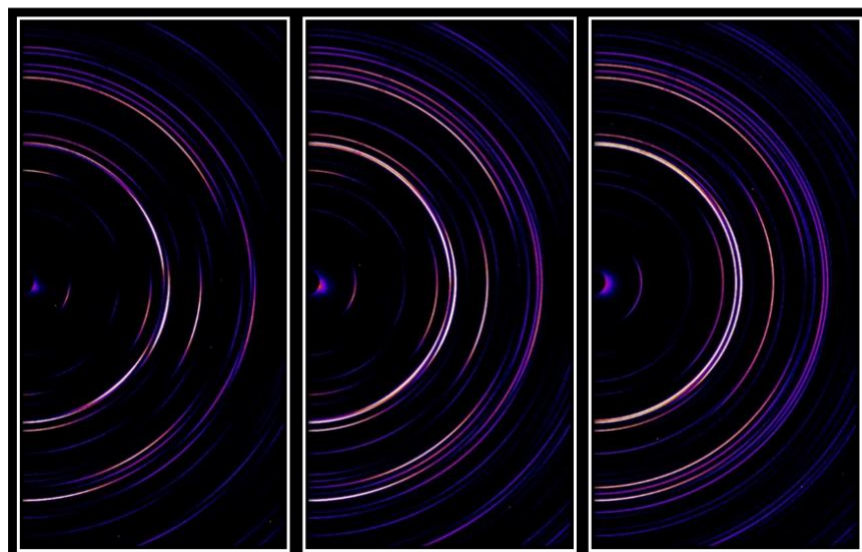


Abb. 15: Diffraktionsmuster von Effektfläche 1

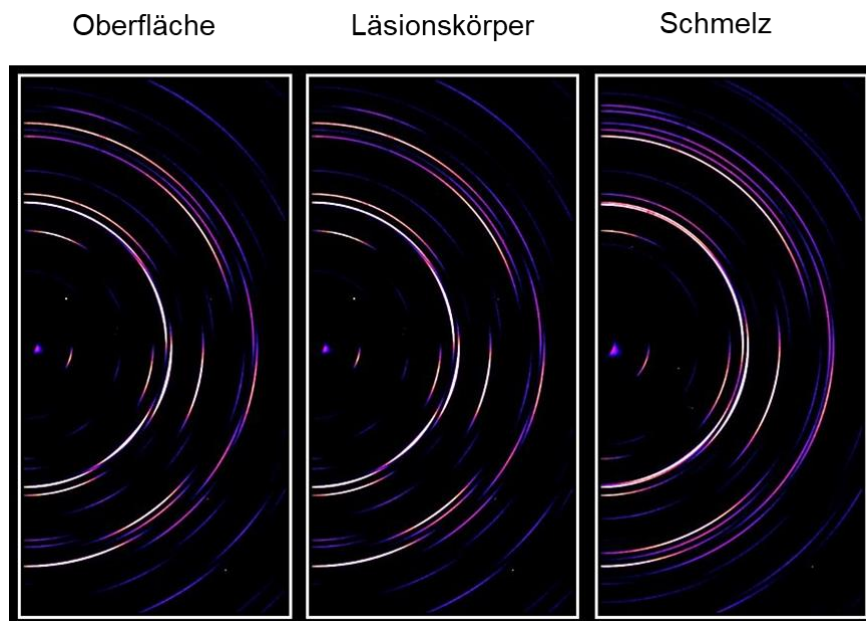


Abb. 16: Diffraktionsmuster von Effektfläche 2

Die oben dargestellten Diffraktionsbilder wurden für die nachfolgend dargestellten Graphen verwendet. Die erste Probe zeigte gleichmäßige Graphen in allen drei Läsionsflächen, die auf das Vorhandensein von Hydroxylapatit hinwiesen (Abb. 17). 2-Theta, welcher auch als Bragg-Winkel bezeichnet wird und den Winkel zwischen Röntgenstrahl und Gitterebene eines Kristalls markiert, weicht auf der X-Achse von den Werten der in diesem Versuch verwendeten Werte für 2-Theta ab, da bei dem vorliegenden Versuch eine Energie von 18 keV verwendet wurde. Dies gilt auch für die zweite Probe. Bei der Hydroxylapatit-Referenz wurde hingegen eine Energie von 15 keV verwendet (Li et al. 2009).

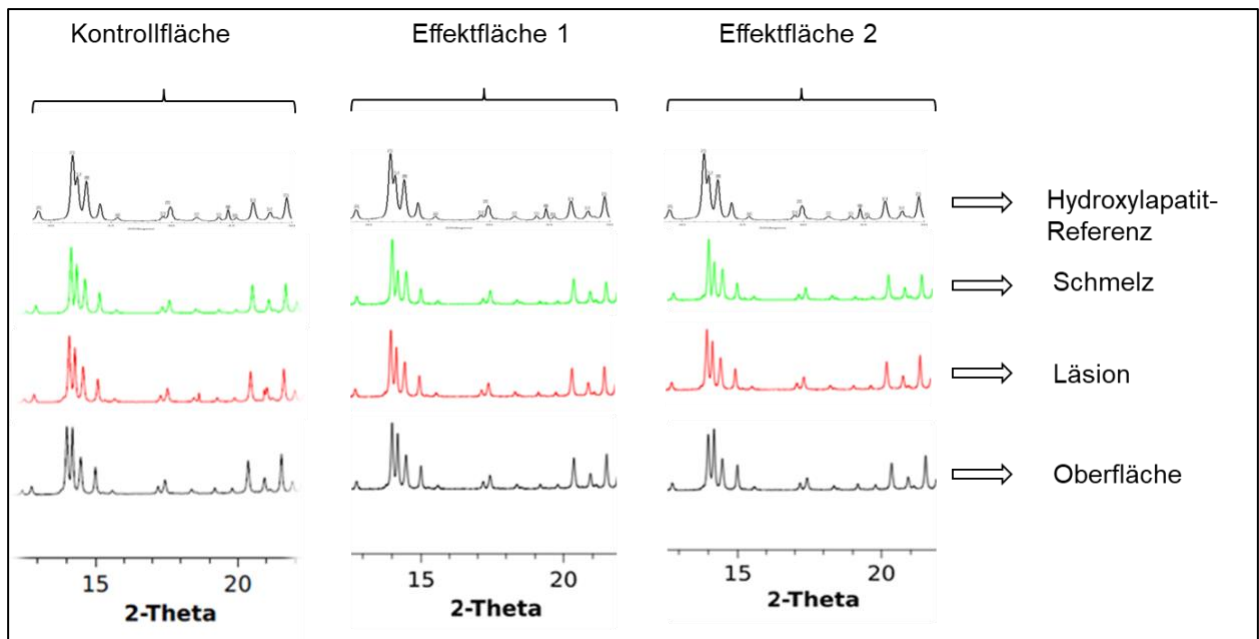


Abb. 17: Graphische Darstellung der Diffraktionsmuster aus allen drei Messpunkten (Oberfläche, Läsion, Schmelz). Diese zeigten alle ein für Hydroxylapatit (Li et al. 2009) typisches Muster. Zum Vergleich wird ein typischer Verlauf eines Graphen von Hydroxylapatit als Referenz gezeigt (Li et al. 2009).

Die zweite Probe zeigte in der ersten Effektfläche einen abweichenden Graphen im Bereich der Oberfläche der Probe (Abb. 18). Die Graphen der demineralisierten Kontrollfläche und der außen gelegenen infiltrierten Effektfläche zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die oben dargestellten Graphen, welche auf das Vorhandensein von Hydroxylapatit hindeuteten (Abb. 17). Aus diesem Grund werden nachfolgend nur die Graphen der ersten Effektfläche mit dem abweichenden Verlauf dargestellt.

Probe 2 (Effektfläche 1)

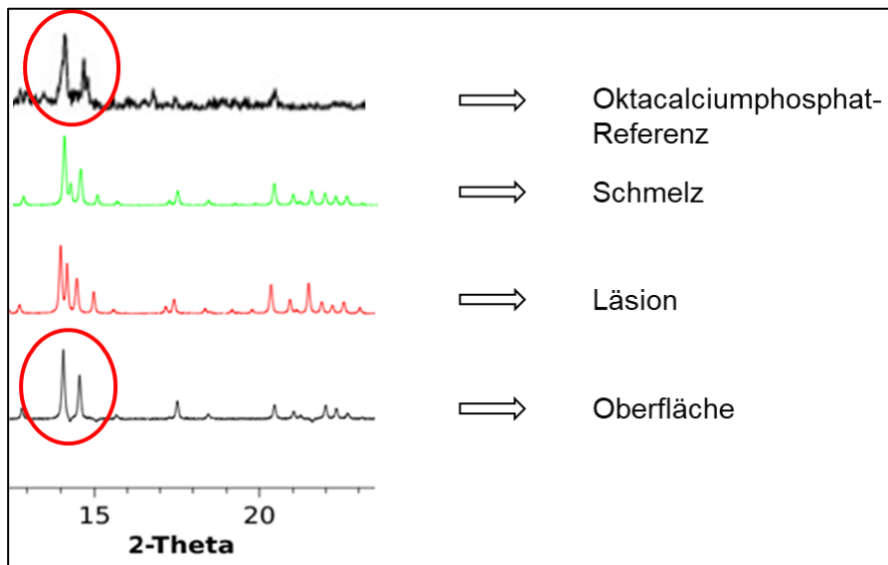


Abb. 18: Graphische Darstellung des Diffraktionsmusters der ersten Effektfläche der zweiten Probe: Der Graph im Bereich der Oberfläche zeigte zusätzliche Peaks, die für Oktacalciumphosphat (Li et al. 2014) typisch sind.

Allgemein wurden keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Kristallverbindungen zwischen der demineralisierten Kontrollfläche und den mit der Calcium-Coacervat-Emulsion infiltrierten Effektflächen nachgewiesen.

9. Diskussion

9.1. Diskussion von Material und Methode

9.1.1. Boviner Schmelz

In der vorliegenden Studie wurden Schmelzproben aus bovinen Frontzähnen hergestellt. Diese sind im Gegensatz zu humanen Zähnen relativ schnell in großen Mengen verfügbar. Außerdem haben sie den Vorteil, dass sie relativ große, gerade und kariesfreie Oberflächen aufweisen, die sich für die Probenherstellung besonders gut eignen (Mellberg 1992). Des Weiteren reagieren sie gleichmäßiger auf eine Säureexposition, da es aufgrund der uniformen Ernährungsweise der Rinder keine Unterschiede in der Fluoridzufuhr gibt. Die chemische Zusammensetzung von bovinem Schmelz ist ähnlich mit der von humanem Schmelz (Esser et al. 1998), so dass die Ergebnisse der Röntgendiffraktion in Bezug auf die Kristallisation nach Infiltration mit einer Calcium-Coacervat-Emulsion auf die Wirkung an humanem Schmelz teilweise übertragen werden kann. Hinsichtlich der Fluoridkonzentration ist anzumerken, dass boviner Schmelz mit ungefähr 200 ppm eine deutlich geringere Fluoridkonzentration als humaner Schmelz, mit ungefähr 1300 ppm, aufweist (Mellberg und Lertscher 1974). Boviner Schmelz ist weicher (Arends und Jongebloed 1979) und poröser als humaner Schmelz, so dass es zu einer schnelleren Entstehung von kariösen Läsionen kommt (Featherstone und Mellberg 1981; Edmunds et al. 1988). Im Vergleich zu humanem Schmelz schreiten kariöse Läsionen im bovinen Schmelz doppelt so schnell voran (Amaechi et al. 1999). Bei der Herstellung der Schmelzproben wird durch das Schleifen und Polieren die Oberflächenschicht mit einem hohen Fluoridgehalt entfernt, so dass ein gleichmäßiger Mineralgehalt und eine plane Oberfläche sichergestellt werden (Arends et al. 1983). In der mikroradiographischen Analyse wurde deutlich, dass sich die kariösen Läsionen nicht gleichmäßig tief ausgebildet hatten und somit eine homogene Reaktion der bovinen Schmelzproben auf eine Säureexposition, wie sie während der Lagerung in einer Demineralisationslösung stattfand, nicht bestätigt werden konnte.

9.1.2. Erzeugung von künstlich kariösen Läsionen

Die Erzeugung von künstlich kariösen Läsionen erfolgte durch ein standardisiertes Verfahren mit Hilfe einer Demineralisationslösung (Buskes et al. 1985), die aus früheren Publikationen übernommen wurde. Das Ziel war die Erzeugung von gleichmäßig tiefen kariösen Läsionen mit einer intakten Oberflächenschicht. Die mikroradiografische Analyse bestätigte den typischen Aufbau einer initialen Schmelzläsion, bestehend aus pseudointakter Oberflächenschicht und einem darunterliegenden Läsionskörper (Scott et al. 1974; Shellis und Hallsworth 1987). Auffällig war, dass die zweite, außen gelegene Effektfläche nicht so tief ausgeprägt war, wie die erste, mittig gelegene Effektfläche und die Kontrollfläche. Als mögliche Ursache ist der Zahnschmelz als organisches Material zu nennen, welcher nicht uniform auf Umwelteinflüsse reagiert. Eine verbesserte und schnellere Wirkung der Demineralisationslösung wäre durch die Lagerung auf einem Rüttler denkbar, welcher die Demineralisationslösung kontinuierlich in Bewegung hält und so deren Wirkung auf die Schmelzproben verbessern könnte. Allerdings zeigte sich in Vorversuchen, dass bei ständigem Durchmischen der Demineralisationslösung, die Wirkung auf die Schmelzproben zu aggressiv war. Die Schmelzoberflächen waren zerklüftet, die Oberflächenschicht war zerstört, so dass diese Proben für die mikroradiographische Auswertung nicht geeignet waren. Aus diesem Grund wurde die Demineralisationslösung nicht in ständiger Bewegung gehalten. Das Beschleifen und Polieren der obersten Schmelzschicht hat keinen Einfluss auf die spätere Läsionstiefe im Vergleich zu nicht polierten Schmelzoberflächen (Featherstone und Mellberg 1981).

9.1.3. Behandlung der demineralisierten Läsionen

Die entstandenen künstlich kariösen Läsionen wurden für 5 Sekunden mit 37 % Phosphorsäuregel geätzt. Ein längerer Ätzvorgang führte in Vorversuchen zu einer Zerstörung der Oberflächenschicht. Dieser nachteilige Effekt wurde auch in anderen Publikationen dargestellt (Gray und Shellis 2002). Das verwendete Ätzgel konnte aufgrund seiner hohen Viskosität genau auf den Läsionen appliziert werden und eine

gute Kontrolle des Ätzzvorgangs wurde gewährleistet. Außerdem war es nicht möglich, dass die Phosphorsäure durch Kapillarkräfte in den Läsionskörper eindringen und diesen nachhaltig demineralisieren und schwächen konnte, wodurch ein Zerstörung der Schmelzstruktur vergleichbar mit dem Kollabieren der Schmelzstruktur an der Oberfläche bei einem zu langem Ätzzvorgang verhindert wurde. Das Ziel der Ätzzung war die Entfernung der pseudointakten Oberflächenschicht mit den darin enthaltenen Mineralien, da eine mineralisierte Oberflächenschicht eine Infiltration von Ionen in den Läsionskörper verhindert (Siddiqui et al. 2014; Deyhle et al. 2014).

9.1.4. Calcium-Coacervat-Emulsionen als Präkursor zur Remineralisation

Die Anwendung einer Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung in Verbindung mit Calcium-Coacervat-Emulsionen zur Remineralisation von künstlich kariösen Läsionen wurde bisher noch nie in der Zahnmedizin getestet. Eine vorzeitige Ausfällung von Calciumphosphat sollte durch zwei separate Infiltrationen der einzelnen Lösungen verhindert werden. Das Ziel war eine vollständige Remineralisation des Läsionskörpers. Bei gleichzeitiger Infiltration beider Lösungen kommt es an der Oberfläche der kariösen Läsion zu einer sofortigen Mineralisation von Calciumphosphat bedingt durch eine hohe Übersättigung (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012). Folglich nehmen die Calcium- und Phosphatkonzentrationen kontinuierlich von der Oberfläche bis in die Tiefe des Läsionskörpers ab, so dass an tieferen Punkten im Läsionskörper nur eine geringe Remineralisation stattfinden kann. Dieser Vorgang findet natürlicherweise intraoral statt, wodurch bei kariösen Läsionen eine stärker mineralisierte pseudointakte Oberflächenschicht und ein darunter liegender, demineralisierter Läsionskörper beobachtet werden kann (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012; Hellwig et al. 2013). Eine Anlagerung von neuen Kristallen und ein Kristallwachstum im Sinne einer Remineralisation erfolgen bevorzugt an der Zahnoberfläche (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012).

Um eine vollständige Remineralisation des Läsionskörpers zu erreichen, wurden daher beide Lösungen separat infiltriert. Im ersten Schritt erfolgte das Einlegen der Schmelzproben in eine Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung, um zuerst Phosphat-Ionen

in die kariöse Läsion zu infiltrieren. Die Trocknung der künstlich kariösen Läsionen zwischen den beiden Infiltrationsschritten bewirkte, dass Phosphat-Ionen durch die Infiltration der Calcium-Coacervat-Emulsion wieder gelöst werden mussten. Dadurch wurde die Phosphatkonzentration in der Coacervat-Emulsion anfänglich kurzzeitig gering gehalten. Aus diesem Grund mineralisierte die Coacervat-Emulsion nicht direkt an der Läsionsoberfläche, sondern konnte die komplette Läsionstiefe infiltrieren. Der Vorteil einer separaten Infiltration der Calcium-Coacervat-Emulsion war, dass die Coacervat-Tröpfchen den gesamten Läsionskörper infiltrieren konnten und nicht direkt an der Oberfläche mit Phosphat-Ionen mineralisierten.

Der Calciumgehalt und somit die Konzentration an Coacervat-Tröpfchen sollte möglichst hoch sein, um eine vollständige Remineralisation des Läsionskörpers zu erreichen. Allerdings war die maximale Calciumkonzentration limitiert, da bei höheren Calciumkonzentrationen die Tröpfchen zu schnell koagulierten und eine makroskopische Gelphase bildeten. Die Ermittlung der Konzentration der Calcium-Coacervat-Emulsion, die zu einem Mineralgewinn in den künstlich kariösen Läsionen führte, erfolgte in verschiedenen Vorversuchsreihen. Je opaker die Emulsion wurde, desto höher war das zugegebene Volumen von Calciumchlorid-Dihydrat. Die Stärke der Trübung ging mit der Höhe der PAA-Na-Konzentration einher. Je höher die PAA-Na-Konzentration war, desto schneller entstand ein gelförmiger Niederschlag am Boden des Eppendorf-Gefäßes. Dieser zähflüssige Niederschlag ist für die Infiltration nicht geeignet, da nur niedrig-viskose Flüssigkeiten, aufgrund der bei diesem Vorgang wirkenden Kapillarkräfte, infiltrierbar sind. Normalerweise wurden die angesetzten Coacervat-Emulsionen nach dem Mischen zentrifugiert, um überschüssiges Polymer abzutrennen und die Tröpfchen zu konzentrieren. Besonders nach dem Zentrifugieren zeigte sich jedoch eine klare Lösung mit einem gelförmigen, polymerreichen Niederschlag. Daher wurde auf das Zentrifugieren bewusst verzichtet. Auch ohne Zentrifugation entstand nach einiger Zeit ein Niederschlag. Dieses Problem konnte umgangen werden, indem die Infiltration kurz nach dem Mischen der Komponenten durchgeführt wurde. Hierdurch wurde garantiert, dass die Konzentration der calciumhaltigen Coacervat-Tröpfchen nicht durch Sedimentation verringert wurde. In weiterführenden Studien sollte untersucht werden, ob durch Veränderungen des pH-Wertes des Polyacrylsäure-Natriumsalzes und der Calciumchlorid-Dihydrat-Lösung in

Kombination mit einer Anpassung des Mischungsverhältnisses von Calciumchlorid-Dihydrat und Polyacrylsäure-Natriumsalz, der Mineralgewinn noch gesteigert werden kann. Der Einfluss des pH-Wertes auf die Calcium-Coacervat-Emulsion ist aufgrund der vorliegenden Studie noch nicht vollständig geklärt. Bei hohen pH-Werten liegt die Polyacrylsäure vollständig deprotoniert vor. Dadurch können mehr Calcium-Ionen komplexieren und die Polymerketten vernetzen. Allerdings würde durch einen höheren Vernetzungsgrad vermutlich auch die Viskosität der Tröpfchen steigen. Der flüssige Charakter der Emulsion ginge verloren. Eine geringere Infiltrationsfähigkeit wäre die Folge. Andererseits ist bei niedrigeren pH-Werten eine geringere Calcium-Vernetzung zu erwarten. Die entstehenden Coacervat-Tröpfchen wären gut infiltrierbar, da eine niedrig-viskose Emulsion entstehen würde. Der Calcium-Gehalt wäre jedoch niedriger. Eine detaillierte Studie zum Einfluss des pH-Wertes auf die Calcium-Coacervat-Emulsion steht aufgrund der Komplexität noch aus. Eine Veränderung des pH-Wertes oder der Konzentrationen der einzelnen Lösungen, insbesondere des Calciumchlorid-Dihydrats, könnten sich positiv auf die Coacervation ausüben, wodurch der Mineralgehalt noch weiter gesteigert werden könnte.

Die Lagerung erfolgte in der vorliegenden Studie bei Raumtemperatur (23°C). Eine mögliche Remineralisation bei einer Lagerung in einem Wärmeschrank bei 37°C wurde noch nicht untersucht. Das Verhalten der Calcium-Coacervat-Emulsion bei Körpertemperatur stellt interessante Ansätze für folgende Studien dar, um eine mögliche klinische Bedeutung dieses neuen Präkursors zur Remineralisation von Zahnschmelz zu etablieren.

9.2. Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Studie konnte ein signifikanter Mineralgewinn nach Infiltration der Calcium-Coacervat-Emulsion in Gruppe 8 nachgewiesen werden. Der Mineralgewinn war im gesamten Läsionskörper nachweisbar und war nicht nur auf die Oberfläche der künstlich kariösen Läsion beschränkt.

9.2.1. Mikroradiografische Analyse

Die mikroradiografische Analyse bestätigte quantitativ den Mineralgewinn im gesamten Läsionskörper und somit eine Remineralisation der künstlich kariösen Läsionen nach Infiltration der Calcium-Coacervat-Emulsion. Bisher konnte eine Remineralisation von initialen kariösen Läsionen unter anderem durch den Patienten selbst erreicht werden. Eine zuckerarme Ernährung und die regelmäßige Anwendung von beispielsweise fluoridierten Zahnpasten oder Mundspülungen führen zu einer Hemmung der Demineralisation und Förderung der Remineralisation durch die enthaltenen Fluoride. Allerdings ist eine vollständige Remineralisation des Läsionskörpers mit Hilfe von Fluoriden bisher nur bei sehr flachen Läsionen möglich. Bei tieferen kariösen Läsionen weist die pseudointakte Oberflächenschicht einen höheren Mineralgehalt auf, welcher durch die ständige Aufnahme von Mineralien, insbesondere von Fluorapatit, wächst. Der Mineralgehalt des Läsionskörpers ändert sich hingegen unter dem der pseudointakten Oberflächenschicht nur wenig und der Läsionskörper bleibt porös (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012). Eine vollständige Remineralisation des Läsionskörpers tieferer Läsionen durch Fluoride ist bisher nicht möglich gewesen.

Ein Ansatz dieses Problem zu umgehen ist die Behandlung mit dem Casein Phosphopeptid- Amorphes Calciumphosphat- System (CPP-ACP). Dies ist ein Protein, welches Calciumphosphatverbindungen in hoher Konzentration stabilisiert und die Ausbildung von Nanokomplexen an der Zahnoberfläche fördert. Die Ionen können bei Bedarf entlang des Konzentrationsgefälles in die Zahnhartsubstanz diffundieren und somit eine Remineralisation durch Mineralablagerungen im Läsionskörper fördern (Reynolds 2009). Die CPP-unterstützten Calciumphosphatverbindungen sind wirksam, da sie unter Verbrauch der Säure, die während einer Demineralisation entsteht, mehr Calcium- und Phosphat-Ionen bereitstellen, die entlang des Konzentrationsgradienten in den Läsionskörper diffundieren können (Hegde et al. 2014). Besondere Bedeutung hat CPP-ACP als lokal applizierbare Paste. Die meisten Produkte weisen eine Kombination von CPP-ACP und Fluoriden auf (Reynolds et al. 2008). Hohe Konzentrationen an Calciumphosphatverbindungen in der dentalen Plaque und im Speichel nach Applikation des CPP-ACP konnten nachgewiesen werden. Mehrere In-vitro-Studien belegten eine Hemmung der Demineralisation im Schmelz und Dentin, sowie eine

Förderung der Remineralisation von initialen kariösen Läsionen im Schmelz (Reynolds et al. 2009). Die prozentuale Remineralisation der kariösen Läsion betrug bei einer Applikation von 2 % CPP-ACP + 1100 ppm Fluorid + Säureexposition $17,4 \pm 1,2$ % (Reynolds et al. 2008). Diese Studien wurden ebenfalls an bovinen Zähnen durchgeführt. Die Läsionstiefe betrug ungefähr 100 μm (Reynolds et al. 2009). Eine Remineralisation von kariösen Läsionen im Schmelz konnte ebenfalls in situ nachgewiesen werden (Reynolds et al. 2003). Allerdings konnte kein Vorteil gegenüber der alleinigen Anwendung von Fluoriden nachgewiesen werden (Azarpazhooh et al. 2008; Yengopal et al. 2009).

Der Erfolg dieser Therapiemaßnahmen ist stark abhängig von der Mitarbeit und der Compliance des Patienten. Des Weiteren ist eine mehrfache, regelmäßige Applikation durch den Patienten erforderlich, um einen Therapieerfolg sicherzustellen. Nachteilig ist außerdem, dass eine Remineralisation durch Diffusion der Fluoride und auch des CPP-ACPs sehr langsam abläuft. Initiale kariöse Läsionen können auch durch einen Zahnarzt behandelt werden. Die Kariesinfiltration als mikro-invasives Therapieverfahren verschließt Diffusionskanäle, die zu einer Progression der Karies führen. Durch Kapillarkräfte wird die Infiltration eines niedrig-viskosen Kunststoffes, nach Ätzung und Trocknung des Zahnes, möglich. Nach Lichthärtung ist die Versiegelung der kariösen Läsion abgeschlossen. Eine Progression der Karies wird verhindert (Meyer-Lückel, Paris, Ekstrand 2012). Behandlungsmaßnahmen durch den Zahnarzt führen zu einem schnelleren Therapieerfolg, sind aber nicht auf eine natürliche Remineralisation zurück zu führen.

In der vorliegenden Studie wurden die Vorteile der Behandlung durch den Zahnarzt und der bisher für den Patienten möglichen Remineralisationsmaßnahmen kombiniert. Calcium-Coacervat-Emulsionen erreichen in kurzer Zeit eine Remineralisation nach Infiltration in die kariöse Läsion (18 % Mineralgewinn bei einmaliger Applikation in Gruppe 8). Grundlegend dafür ist die Ätzung der künstlichen kariösen Läsionen, um die pseudointakte Oberflächenschicht und somit Mineralien vollständig zu entfernen, um anschließend eine ungehinderte und vollständige Remineralisation zu erreichen. Durch Kapillarkräfte wird anschließend eine schnelle Infiltration der Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung und der Calcium-Coacervat-Emulsion ermöglicht. In der vorliegenden Studie wurden die infiltrierten Proben in einer 100 % Feuchtkammer

über Nacht gelagert. In zukünftigen Studien könnte die Einwirkzeit verkürzt werden, um den Versuchsaufbau weiter an klinische Bedingungen heranzuführen. Aufgrund von Calcium-Phosphatverbindungen, welche natürlicherweise in der Zahnhartsubstanz vorkommen, wird eine natürliche Remineralisation der kariösen Läsion durch die Calcium-Coacervat-Emulsionen erreicht. Auf die regelmäßige Anwendung und die Compliance des Patienten kann verzichtet werden.

Ein zweimaliges Auftragen der Calcium-Coacervat-Emulsion zeigte in der vorliegenden Studie, dass der Mineralgewinn gesteigert werden konnte. Allerdings war dieses Ergebnis in einer bisher unveröffentlichten Studie nicht reproduzierbar.

9.2.2. Mischungsverhältnisse

Die Ergebnisse nach der Infiltration der Calcium-Coacervat-Emulsion zeigten, dass keine Dosis-Wirkungsbeziehung erkennbar war. Nur bei einer Kombination von PAA-Na und $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (vgl. Gruppe 8) zeigte sich ein signifikanter Mineralgewinn. Je höher das Mischungsverhältnis der einzelnen Komponenten beim Ansetzen der Calcium-Coacervat-Emulsionen wurde, desto opaker war die Lösung zu Beginn und desto schneller bildete sich ein calciumreicher, gelförmiger, für die Infiltration ungeeigneter Niederschlag. Vermutlich ist eine erfolgreiche Remineralisation mit dem hier angewendeten Versuchsaufbau nur eingeschränkt für hohe Mischungsverhältnisse der Calcium-Coacervat-Emulsionen nutzbar, da die calciumreiche Phase zu schnell ausfällt und nur eine überwiegend wässrige, calciumarme Lösung infiltriert werden kann. Eine Modifikation des Versuchsaufbaus, welche das manuelle Zusammenbringen der einzelnen Komponenten der Calcium-Coacervat-Emulsion erleichtert, könnte das Ansetzen von höheren Konzentrationen der Calcium-Coacervat-Emulsion zulassen, wodurch der Mineralgewinn potentiell gesteigert werden könnte.

Auffällig war, dass zwischen den einzelnen Proben eine große Standardabweichung zu beobachten war, so dass der Mineralgewinn großen Schwankungen unterworfen war und in Hinblick auf die Ergebnisse berücksichtigt werden muss.

9.2.3. Röntgendiffraktion

Bisher ist wenig über die Auswirkungen einer De- und Remineralisation auf die Kristallstruktur des Zahnschmelzes bekannt. In einer früheren Studie wurden mit Hilfe der Röntgendiffraktion die Effekte einer künstlichen De- und Remineralisation, bei bereits bestehender natürlicher Karies, auf die De- und Reformation der Kristallstruktur im Schmelz untersucht (Siddiqui et al. 2014). Die Ergebnisse zeigten, dass eine künstliche Demineralisation, wie sie auch in der vorliegenden Studie angewandt wurde, eine hohe Zerstörung der Kristallstruktur im Zahnschmelz, verbunden mit einem hohen Mineralverlust, nach sich ziehen. Eine anschließende Remineralisation ist in der Lage, die Kristallstrukturen so wiederherzustellen, dass sie mit denen von gesundem Zahnschmelz vergleichbar sind. Sowohl der Mineralgehalt als auch die Ausrichtung der Kristalle sind nach einer Remineralisation gesundem Zahnschmelz ebenbürtig (Siddiqui et al. 2014). Aussagen über die einzelnen Apatitverbindungen nach De- und Remineralisation wurden nicht getroffen.

Die Diffraktionsmuster zeigten auch in der vorliegenden Studie eine Wiederherstellung der Kristallstrukturen. Qualitative Unterschiede bezüglich der demineralisierten Kontrollfläche (D) und den infiltrierten Effektflächen (E1+E2) konnten in allen Messpunkten (s. Abb. 10) nicht nachgewiesen werden. In fast allen Messpunkten wurde ein für Hydroxylapatit typisches Diffraktionsmuster nachgewiesen. Nur ein Messpunkt zeigte ein für Oktacalciumphosphat typisches Diffraktionsmuster. Demnach ist darauf zu schließen, dass bei der Infiltration mit der Calcium-Coacervat-Emulsion Hydroxylapatit gebildet wurde. In der Kariesprävention und der Therapie von Karies wird vielfach eine Fluoridierung durchgeführt, wodurch Fluorhydroxylapatit oder Fluorapatit entsteht. Fluoridionen stabilisieren die umliegenden Calcium-Ionen (De Leeuw 2004). Außerdem beschleunigen Fluoride das Kristallwachstum. Fluorhydroxylapatit ist weniger löslich und dementsprechend säureresistenter als reines Hydroxylapatit (Christoffersen et al. 1984; Arends et al. 1990; Brown et al. 1977; Ten Cate et al. 1991). Zukünftig könnte über eine Zugabe von Fluorid zu der Calcium-Coacervat-Emulsion nachgedacht werden, da das entstandene reine Hydroxylapatit eine sehr geringe Säureresistenz aufweist.

10. Schlussfolgerungen

Die vorliegende Studie konnte erstmals nachweisen, dass eine gezielte Remineralisation von initialen kariösen Läsionen durch die Infiltration einer Calcium-Coacervat-Emulsion potentiell möglich ist. Durch das beschriebene Verfahren konnte eine Ablagerung von Hydroxylapatit im gesamten Läsionskörper und ein Mineralgewinn von bis zu 18 % (einmalige Infiltration) bzw. 33 % (zweimalige Infiltration) erreicht werden.

11. Literaturverzeichnis

1. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Factors influencing the development of dental erosion in vitro: enamel type, temperature and exposure time. *J Oral Rehabil* 1999; 26(8): 624-630
2. Arends J, Jongebloed WL. Ultrastructural studies of synthetic apatite crystals. *J Dent Res* 1979; 58: 837-843
3. Arends J, Bodde HE. The influence of a single fluoride treatment (1000 ppm) on in vitro remineralization of initial enamel lesions. *J Biol Buccale* 1983; 11: 355-362
4. Arends J, Christoffersen J. The nature of early caries lesions in enamel. *J Dent Res* 1986; 65: 2-11
5. Arends J, Christoffersen J. Nature and role of loosely bound fluoride in dental caries. *J Dent Res* 1990; 69: 601-605
6. Arshady R. Microspheres and Microcapsules, a Survey of Manufacturing Techniques Part II: Coacervation. *Polym. Eng. Sci.* 1990; 30, 905-914
7. Azarpazhooh A, Limeback H. Clinical efficacy of casein derivatives: a systematic review of the literature. *J Am Dent Assoc* 2008; 139: 915-924
8. Banerjee A, Frencken JE, Schwendicke F, Innes NPT. Contemporary operative caries management: consensus recommendations on minimally invasive caries removal. *British Dental Journal* 2017; 223: 215-222
9. Brown WE, Gregory TM, Chow LC. Effects of fluoride on enamel solubility and cariostasis. *Caries Res* 1977; 11 (Suppl. 1): 118-141
10. Bungenberg de Jong HG, Kruyt HR. Coacervation (Partial miscibility in colloid systems) (Preliminary Communication). *Proc. K. Ned. Akad. Wet.* 1929, 32: 849-856
11. Bungenberg de Jong. Crystallisation-Coacervation-Flocculation. *Colloid Sci.* 1949; 2, 232-258
12. Buskes JA, Christoffersen J, Arends J. Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions. A new technique with applications. *Caries Res* 1985; 19: 490-496
13. Christoffersen MR, Christoffersen J, Arends J. Kinetics of dissolution of calcium hydroxyapatite VII. The effect of fluoride ions. *J Cryst Growth* 1984;

67: 107-114

14. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res* 2010; 89: 1187-1197
15. Cortes DF, Ekstrand KR, Elias-Boneta AR, Ellwood RP. An in vitro comparison of the ability of fibre-optic transillumination, visual inspection and radiographs to detect occlusal caries and evaluate lesion depth. *Caries Res* 2000; 34: 443-447
16. Cortes DF, Ellwood RP, Ekstrand KR. An in vitro comparison of a combined FOTI/visual examination of occlusal caries with other caries diagnostic methods and the effect of stain on their diagnostic performance. *Caries Res* 2003; 37: 8-16
17. Deyhle H, White SN, Bunk O, Beckmann F, Muller B. Nanostructure of carious tooth enamel lesion. *Acta Biomaterialia* 2014; 10: 355–364
18. De Leeuw N. Resisting the onset of hydroxyapatite dissolution through the incorporation of fluoride. *J Phys Chem B* 2004; 108: 1809-1811
19. Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V) – Kurzfassung
Institut der Deutschen Zahnärzte im Auftrag von Bundeszahnärztekammer und Kassenzahnärztlicher Bundesvereinigung, 2016
(https://www.bzaek.de/fileadmin/PDFs/dms/Zusammenfassung_DMS_V.pdf)
20. Edmunds DH, Whittaker DK, Green RM. Suitability of human, bovine, equine and ovine tooth enamel for studies of artificial bacterial carious lesions. *Caries Res* 1988; 22: 327-336
21. Esser M. Materialkennwerte der Zahnhartsubstanz des Rindes im Vergleich zur humanen Zahnhartsubstanz. *Dtsch Zahnärztl Z* 1998; 53: 713-717
22. Featherstone JD, Mellberg JR. Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. *Caries Res* 1981; 15: 109-114
23. Friedman J, Marcus MI. Transillumination of the oral cavity with the use of fiber optics. *J Am Dent Assoc* 1970; 80: 801-809
24. Gower LB, Odom DJ. Deposition of calcium carbonate films by a polymer-induced liquid-precursor (PILP) process. *J Cryst Growth* 2000, 210; 4: 719-734
25. Gray GB, Shellis P. Infiltration of resin into white spot caries-like lesions of enamel: An in vitro study. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 2002; 10: 27-32
26. Gwinnett AJ. Structure and composition of enamel. *Oper Dent* 1992; Suppl 5: 10-17

27. Hannig M, Hannig C. Nanomaterials in preventive dentistry. *Nature Nanotechnology* 2010; 83: 1-5
28. Hegde AM, Naik N, Kumari S. Comparison of salivary calcium, phosphate and alkaline phosphatase levels in children with early childhood caries after administration of milk, cheese and GC tooth mousse: an in vivo study. *The Journal of clinical pediatric dentistry*. 2014; 38: 318-325.
29. Hellwig E, Klimek J, Attin T. Einführung in die Zahnerhaltung. Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag 2013, Kapitel 1, Seite 3-6; Kapitel 2, Seite 33-35
30. Hicks MJ, Silverstone LM. Internal morphology of surface zones from acid-etched caries-like lesions: a scanning electron microscopic study. *J Dent Res* 1985; 64: 1296-1301
31. Hintze H, Wenzel A, Danielsen B, Nyvad B. Reliability of visual examination, fibre-optic transillumination, and bite-wing radiography, and reproducibility of direct visual examination following tooth separation for the identification of cavitated carious lesions in contacting approximal surfaces. *Caries Res* 1998; 32: 204-209
32. Huang SC, Naka K, Chujo Y. A Carbonate Controlled-Addition Method for Amorphous Calcium Carbonate Spheres Stabilized by Poly(acrylic acid)s. *Langmuir* 2007, 23, 24: 12086-12095
33. Hoffmann-La Roche AG. Roche Lexikon der Medizin. München: Urban und Fischer 1999
34. Jablonski-Momeni A, Schipper HM, Rosen SM, Heinzl-Gutenbrunner M, Roggendorf MJ, Stoll R, Stachniss V, Pieper K. Performance of a fluorescence camera for detection of occlusal caries in vitro. *Odontology* 2011;99: 55-61
35. Kaempfe P, Lauth VR, Halfer T, Treccani L, Maas M, Rezwan K. Micromolding of Calcium Carbonate Using a Bio-Inspired, Coacervation-Mediated Process. *The American Ceramic Society* 2013; 96: 736-742
36. Kidd EAM, van Amerongen JP. The role of operative treatment in caries control. In: Fejerskov O, Kidd E, *Dental caries: The disease and its clinical management*. Blackwell Munksgaard, Oxford 2003: 245-250
37. Klimm W. Kariologie: Ein Leitfaden für Studierende und Zahnärzte. München, Wien: Carl Hanser Verlag 1997, Kapitel 4, Seite 126-131

38. Kruif CG, Weinbreck F, De Vries R. Complex Coacervation of Proteins and Anionic Polysaccharides. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2004; 9: 340-349
39. Lauth V, Maas M, Rezwan K. Coacervate-directed synthesis of CaCO₃ microcarriers for pH-responsive delivery of biomolecules. *The Royal Society of Chemistry* 2014; 2: 7725-7731
40. Li X, Koller G, Huang J, Di Silvio L, Renton T, Esat M, Bonfield W, Edirisinghe M. A novel jet-based nano-hydroxyapatite patterning technique for osteoblast guidance. *Journal of the Royal Society* 2009; DOI: 10.1098/rsif.2009.0101 (<http://rsif.royalsocietypublishing.org/content/7/42/189>)
41. Li C, Ge X, Li G, Gao Q, Ding R. A facile hydrothermal method for synthesis of submillimeter-long octacalcium phosphate and hydroxyapatite as drug carriers with sustained release behaviors. *Advanced Powder Technology* 2014; Volume 25, Issue 6, Seite 1661-1666 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921883114001587?via%3Di> hub#!)
42. Longbottom C, Huysmans MC. Electrical measurements for use in caries clinical trials. *J Dent Res* 2004; 83 Spec No C:C76-79
43. Lussi A, Firestone A, Schoenberg V, Hotz P, Stich H. In vivo diagnosis of fissure caries using a new electrical resistance monitor. *Caries Res* 1995; 29: 81-87
44. Lussi A, Imwinkelried S, Pitts N, Longbottom C, Reich E. Performance and reproducibility of a laser fluorescence system for detection of occlusal caries in vitro. *Caries Res* 1999; 33: 261-266
45. Marsh PD, Martin M. *Oral Microbiology*. 3rd ed. London: Chapman Hall 1992
46. Marsh PD, Nyvad B. The oral microflora and biofilms on teeth. In: Fejerskov O, Kidd, EAM, eds. *Dental Caries. The Disease and its Clinical Management*. Oxford: Blackwell Munksgaard 2003: 29-48
47. Martignon S, Ekstrand KR, Ellwood R. Efficacy of sealing proximal early active lesions: An 18-month clinical study evaluated by conventional and subtraction radiography. *Caries Res* 2006; 40: 382-388
48. Matos R, Novaes TF, Braga MM, Siqueira WL, Duarte DA, Mendes FM. Clinical performance of two fluorescence-based methods in detecting occlusal caries lesions in primary teeth. *Caries Res* 2011; 45: 294-302

49. Mellberg JR, Loertscher KL. Comparison of in vitro fluoride uptake by human and bovine enamel from acidulated phosphate-fluoride solutions. *J Dent Res* 1974; 53(1):64-7
50. Mellberg JR. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. *J Dent Res* 1992; 71 Spec No: 913-919
51. Meyer-Lückel H, Paris S, Kielbassa A. Surface layer erosion of natural caries lesions with phosphoric and hydrochloric acid gels in preparation for resin infiltration. *Caries Res* 2007; 41: 223-230
52. Meyer-Lückel H, Fejerskov O, Paris S. [Novel treatment options for proximal caries]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2009; 119: 454-461
53. Meyer-Lückel H, Paris S, Ekstrand K: Karies. Wissenschaft und Klinische Praxis. Stuttgart: Thieme (ZMK Praxis) 2012, Kapitel 1, Seite 8-9, 12-17; Kapitel 2, Seite 23-37; Kapitel 4, Seite 72-74; Kapitel 5, Seite 77-79; Kapitel 6, Seite 96-109, Kapitel 9, Seite 152-159; Kapitel 12, Seite 210; Kapitel 14, Seite 232-233; Kapitel 15, Seite 256-258; Kapitel 17, Seite 271 und Kapitel 20, Seite 324-325
54. Paris S, Hopfenmueller W, Meyer-Lückel H. Resin infiltration of caries lesions: an efficacy randomized trial. *J Dent Res* 2010; 89: 823-826
55. Pearce EI, Nelson DG. Microstructural features of carious human enamel imaged with back-scattered electrons. *J Dent Res* 1989; 68: 113-118
56. Peers A, Hill FJ, Mitropoulos CM, Holloway PJ. Validity and reproducibility of clinical examination, fibre-optic transillumination, and bite-wing radiology for the diagnosis of small approximal carious lesions: an in vitro study. *Caries Res* 1993; 27: 307-311
57. Perry S, Li Y, Priftis D, Leon L, Tirrell M. The Effect of Salt on the Complex Coacervation of Vinyl Polyelectrolytes. *Polymers* 2014; 6(6): 1756-1772
58. Pitts NB, Rimmer PA. An in vivo comparison of radiographic and directly assessed clinical caries status of posterior approximal surfaces in primary and permanent teeth. *Caries Res* 1992; 26: 146-152
59. Poorterman JH, Aartman IH, Kieft JA. Radiographic prevalence of approximal enamel lesions and relationship with dentine lesions and restorations in Dutch adolescents. *Int Dent J* 2002; 52: 15-19

60. Reynolds EC, Cai F, Shen P, Walker GD. Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. *J Dent Res* 2003; 82: 206-211
61. Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ, Shen P, Walker GD, Morgan MV, Reynolds C. Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Dent Res* 2008; 87: 344-348
62. Reynolds EC. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: the scientific evidence. *Adv Dent Res* 2009; 21: 25-29
63. Ricketts DN, Kidd EA, Liepins PJ, Wilson RF. Histological validation of electrical resistance measurements in the diagnosis of occlusal caries. *Caries Res* 1996; 30: 148-155
64. Ricketts D. The eyes have it. How good is DIAGNOdent at detecting caries? *Evid Based Dent* 2005; 6: 64-65
65. Schroeder H: *Orale Strukturbiologie*, Stuttgart: Thieme 1992, Kapitel 1, Seite 37-38 und 73-75
66. Schroeder HE. Karies und Erosion. *Pathobio Oral Struktur* 1997; 3: 95
67. Scott DB, Simmelink JW, Nygaard V. Structural aspects of dental caries. *J Dent Res* 1974; 53: 165-178
68. Shellis RP, Hallsworth AS. The use of scanning electron microscopy in studying enamel caries. *Scanning Microsc* 1987; 1: 1109-1123
69. Siddiqui S, Anderson P, Al-Jawad M. Recovery of Crystallographic Texture in Remineralized Dental Enamel. *PLoS ONE* 2014, 9(10): e108879. doi:10.1371/journal.pone.0108879
70. Silverstone LM. Structure of carious enamel, including the early lesion. *Oral Sci Rev* 1973; 3: 100-160
71. Silverstone LM, Johnson NW, Hardie JM, Williams RAD. Enamel Caries. In: Silverstone LM, Johnson NW, Hardie JM, Williams RAD, ed. *Dental Caries: Aetiology, Pathology and Prevention*. London: Macmillan 1981: 133-161
72. Silverstone LM. Relationship of the macroscopic, histological, and radiographic appearance of interproximal lesions in human teeth: in vitro study using artificial caries technique. *Pediatr Dent* 1982; 3: 414-422

73. Silverstone LM, Hicks MJ, Featherstone MJ. Dynamic factors affecting lesion initiation and progression in human dental enamel. Part I. The dynamic nature of enamel caries. *Quintessence Int* 1988; 19: 683-711
74. Simmons LM, Al-Jawad M, Kilcoyne SH, Wood DJ. Distribution of enamel crystallite orientation through an entire tooth crown studied using synchrotron X-ray diffraction. *Eur J Oral Sci* 2011; 119: 19–24
75. Sinn CG, Dimova R, Antonietti M. Isothermal Titration Calorimetry of the Polyelectrolyte/Water Interaction and Binding of Ca²⁺: Effects Determining the Quality of Polymeric Scale Inhibitors. *Macromolecules* 2004; 37: 3444-3450
76. Splieth CH, Ekstrand KR, Alkilzy M, Clarkson J, Meyer-Lückel H, Martignon S, Paris S, Pitts NB, Ricketts DN, van Loveren C. Sealants in dentistry: outcomes of the ORCA Saturday Afternoon Symposium 2007. *Caries Res* 2010; 44: 3-13
77. Ten Cate JM, Featherstone JD. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991; 2: 283-296
78. Ten Cate JM, Larsen MJ, Pearce EIF, Fejerskov O. Chemical interactions between the tooth and oral fluids. *Dental Caries. : The Disease and its Clinical Management*, Oxford, Blackwell Publishing Ltd. 2003: 49-69
79. Wakita M, Kobayashi S. The three-dimensional structure of Thomas' processes and the development of the microstructural organisation of tooth enamel. *Mechanisms of tooth and enamel formation*. Quintessence, Tokyo, 1983
80. Wang L, Guan X, Yin H, Moradian-Oldak J, Nancollas GH. Mimicking the self-organized microstructure of tooth enamel. *J Phys Chem* 2009; 112: 5892-5899
81. Yengopal V, Mickenautsch S. Caries preventive effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP): a meta-analysis. *Acta Odontol Scand* 2009; 67: 321-332
82. Young RA. Implications of atomic substitutions and other structural details in apatites. *J Dent Res* 1974; 53: 193-203
83. Zero DT. Sugars- the arch criminal? *Caries Res* 2004; 38: 277-285

12. Anhang

12.1. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sophie-Elisabeth Prause, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Remineralisation künstlicher Schmelzkaries durch Calcium-Coacervat-Emulsionen‘ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

12.2. Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12.3. Danksagung

Bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Sebastian Paris, möchte ich mich für die Überlassung dieses interessanten Themas bedanken. Vielmehr allerdings für das Vertrauen in meine Person und die kontinuierliche Unterstützung seit dem ersten Tag. Besonders danke ich für den Idealismus, die Neugier und die Begeisterung, die er für dieses Thema aufgebracht hat und alles, woran ich teilhaben durfte. Ich denke, dass ich in den vergangenen Jahren nicht mehr Glück hätte haben können.

Der AG Cölfen der Universität Konstanz gilt besonderer Dank für die Idee, Calcium-Coacervat-Emulsionen als Präkursor zur Remineralisation zu verwenden. Herrn Professor Dr. Helmut Cölfen und Herrn Dominik Gruber danke ich besonders für die interessanten Anregungen und die beständige Hilfe vom ersten bis zum letzten Tag.

Herrn Dr. Paul Zaslansky danke ich für alles, was in Zusammenhang mit der Diffraktionsanalyse steht. Ohne seine Anleitungen wäre dieser Teil der Promotionsarbeit unmöglich gewesen.

Frau Carola Schweynoch, Frau Dr. Petra Ganas und Herrn Rainer Toll danke ich für alles, was sie mir im Labor beigebracht haben. Das erste Teilprojekt wäre ohne sie für mich nicht umsetzbar gewesen und sie waren mir stets eine unglaubliche Unterstützung.

Bei Frau Daniela Heim möchte ich mich bedanken, da sie es mir immer möglich gemacht hat, bei Fragen oder Problemen zeitnah meinen Doktorvater treffen zu können und sich stets für mich eingesetzt hat.

Besonders danke ich meiner Mutter, Frau Dr. Gisela Prause, und meinen Großeltern, Frau Frieda Prause und Herrn Alfred Prause, für ihre bedingungslose Liebe vom ersten Moment an. Vor allem für ihre Unterstützung bei allem in meinem Leben, auch in schweren Zeiten.

Bei Frau Sigrid Hein bedanke ich mich für ihre Begeisterung für diese Promotionsarbeit.

Ich möchte mich außerdem bei meinen Freundinnen, Frau Chelsea Pawson, Frau Daniela Halft und Frau Dr. Sonia Mansour, für die gemeinsame Zeit und ihren Beistand bedanken. Es bedeutet mir viel, dass wir uns begegnet sind.