

M. Hannig¹, C. Hannig²

Möglichkeiten und Grenzen der Schmelzregeneration – eine aktuelle Übersicht

Possibilities and limitations of enamel regeneration – an up-to-date overview



M. Hannig



C. Hannig

Einführung: In diesem Übersichtsbeitrag wird das Potenzial azellulärer Verfahren zur biomimetischen Synthese von schmelzartigen Strukturen einer aktuellen Bestandsaufnahme und kritischen Wertung unterzogen.

Ergebnisse: In den letzten Jahren sind verschiedene biomimetische Strategien zur Kristallisation und Aggregation von Apatiten beschrieben worden mit der Zielsetzung, die nano- und mikro-skalierte, hierarchisch organisierte Topographie des natürlichen Schmelzes nachzubilden. Neben der dreidimensional orientierten Selbstaggregation von Apatitkristalliten wird vor allem die Strukturbildung von Apatitnanopartikeln über präformierte oder selbst organisierte organische Gerüste (Scaffolds, Templates) angestrebt. Besondere Relevanz haben biomimetische Strategien, mit denen sich unter physiologischen Bedingungen aus Mineralisationslösungen unter Zusatz des Schmelzmatrixproteins Amelogenin oder unter Verwendung alternativer Additive (Dendrimere, synthetische Peptide, Gelatine, EDTA) geordnete Apatitschichten auf der geätzten Schmelzoberfläche generieren lassen. Daneben besitzen Pasten aus präformierten Apatitnanopartikeln und Phosphorsäure ein vielversprechendes Potenzial zur azellulären Schmelzregeneration. Mit den meisten dieser Syntheseverfahren können innerhalb von mehreren Tagen Apatitschichten gebildet werden, deren Dicke mehrere Mikrometer beträgt und die im Hinblick auf ihr ultrastrukturelles Erscheinungsbild (d.h. das Kristallitgefüge) sowie ihre chemische Zusammensetzung dem natürlichen Zahnschmelz durchaus ähneln. Die reproduzierbare Nachbildung der Schmelzarchitektur auf der mikrostrukturellen Ebene (d.h. die dreidimensional organisierte Konfiguration der Kristallite in Form von Prismenstäben) stellt allerdings nach wie vor eine nur ansatzweise beherrschte Herausforderung im Rahmen der bioinspirierten Synthese schmelzartiger Strukturen dar. Das Gros der biomimetischen Strategien zur azellulären Synthese schmelz-

Introduction: The present review paper aims to analyze and to discuss critically the suitability of acellular methods for biomimetic synthesis of enamel like structures.

Results: In the last years, different biomimetic strategies for crystallization and aggregation of apatites have been described aiming to resemble the nano- and microscaled hierarchically organized structure of dental enamel. Besides the oriented three-dimensional self-aggregation of apatite crystallites, main focus of research is laid on structured organization of apatite nanoparticles based on self-assembled or preformed templates and scaffolds. On the one hand, hierarchically structured apatite layers can be generated on the etched enamel surface under ambient conditions, using mineralizing solutions in combination with the enamel matrix protein amelogenin or other additives, like dendrimers, synthetic peptides, gelatin or EDTA. On the other hand, pastes containing preformed apatite nanoparticles and phosphoric acid reveal a promising approach for acellular enamel regeneration. With most of these approaches, apatite layers are formed within several days; the coating thickness amounts to several μm , the ultrastructure and the chemical composition are quite similar to dental enamel. However, mimicking the three-dimensional enamel microstructure by crystallites arranged in prism-like configuration is still a nearly unmanageable challenge regarding bioinspired synthesis of enamel. Until now, most biomimetic strategies for acellular synthesis of enamel-like structures have only been tested in vitro, potential clinical application has to be validated in situ or in vivo.

Conclusion: All in all based on the current knowledge it can be stated that there is no acellular nanotechnological method available, yet, for biomimetic regeneration of clinically visible enamel defects.

Keywords: enamel; acellular; apatite; regeneration; nanotechnology; biomimetic synthesis; amelogenin

¹ Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes, Geb. 73, 66421 Homburg/Saar

² Poliklinik für Zahnerhaltung mit Bereich Kinderzahnheilkunde, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Fetscherstraße 74, 01307 Dresden

Peer-reviewed article: eingereicht: 19.01.2014, Fassung akzeptiert: 23.01.2014

DOI 10.3238/dzz.2014.0131-0142

artiger Strukturen wurde bis dato lediglich in vitro erprobt und muss daher im Hinblick auf die Anwendbarkeit unter Mundhöhlenbedingungen erst noch durch In-situ- und In-vivo-Studien validiert werden.

Schlussfolgerung: Insgesamt betrachtet lässt sich basierend auf dem aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstand feststellen, dass derzeit noch kein azelluläres, nanotechnologisches Verfahren zur Verfügung steht, mit dem sich eine biomimetische Schmelzregeneration in klinisch-makroskopisch sichtbaren Schmelzdefekten realisieren ließe. (Dtsch Zahnärztl Z 2014; 69: 131–142)

Schlüsselwörter: Schmelz; azellulär; Apatit; Regeneration; Nanotechnologie; biomimetische Synthese; Amelogenin

Einleitung

Die moderne Zahnerhaltung hat zum Ziel, zum einen durch präventive Strategien, zum anderen durch minimalinvasive Füllungstechniken die Zähne ein Leben lang zu erhalten. Bei der Behandlung von Läsionen ohne Kavitation finden Fluoridpräparate ebenso wie Nanomaterialien Anwendung [24–26, 34]. Bei der Versorgung von Läsionen mit Kavitation sind jedoch nach wie vor alloplastische, artifizielle Materialien üblich, mit denen die Defekte verfüllt werden. Verfahren zur Regeneration der Zahnhartsubstanzen sind zum jetzigen Zeitpunkt in der klinischen zahnärztlichen Praxis noch nicht verfügbar. Dies betrifft kleinere kariöse Läsionen ebenso wie Abfrakturen, Abrasionen, Erosionen, aber auch Resorptionen. Wünschenswert wäre die Versorgung von makroskopisch sichtbaren Kavitäten im Zahnschmelz mit einem schmelzähnlichen Material. Dies betrifft sowohl die potenzielle Versorgung kleinerer Kavitäten mit plastischen Materialien als auch das Einlegieren von Inlays oder Teilkronen in die defekte Zahnkrone mithilfe von speziellen regenerativen Mineralisationssystemen.

Regenerative Strategien haben in der Medizin erheblich an Bedeutung gewonnen. Hierbei ist als Grundsatz definiert, dass in der regenerativen Therapie mit Zellen „geheilt“ wird. Übertragen auf den Zahn bedeutet dies, dass bei einer potenziellen Regeneration der Zahnhartsubstanzen der Ersatz verlorenen Schmelzes durch Ameloblasten erfolgt. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass der Zahnschmelz aufgrund des apopto-

tischen Verlustes der Ameloblasten nach Abschluss der Schmelzbildung kein Potenzial zur zellulären Regeneration aufweist.

Derzeitige Strategien zur Schmelzregeneration basieren auf azellulären biomimetischen und bioinspirierten Verfahren [22, 24]. Ausgehend von neuen Erkenntnissen zu den generellen Gesetzmäßigkeiten von Biomineralisationsprozessen wird versucht, innovative Verfahren für die Bildung schmelzartiger Strukturen auf Zahnschmelz oder anderen Oberflächen zu erarbeiten [36, 37, 41, 45, 46]. Zum Verständnis dieser Ansätze in der Schmelzregeneration ist es erforderlich, die Mikro- und die Nanostruktur des Zahnschmelzes näher zu betrachten. Der Zahnschmelz ist eine hierarchisch aufgebaute Biokeramik mit einer komplexen Nano- und Mikrostruktur. Grundsubstanz des Zahnschmelzes ist Hydroxylapatit. Im Zahnschmelz liegt der Hydroxylapatit in Form von hexagonalen Kristalliten vor, deren Durchmesser 40–60 nm und deren Länge 100–1000 nm beträgt [24, 45, 52]. Diese Kristallite lagern sich zusammen, um die Schmelzprismen zu bilden, die auf mikrostruktureller Ebene die Histologie des Zahnschmelzes prägen. Die Schmelzprismen sind eng miteinander verwoben und bilden eine durchgängige, dreidimensional organisierte Struktur von der Schmelz-Dentin-Grenze bis zur Zahnoberfläche. Diese verleiht dem Zahnschmelz seine sehr hohe Festigkeit und Widerstandsfähigkeit. Neben den dominierenden anorganischen Bestandteilen (ca. 97 %) finden sich im Zahnschmelz auch Schmelz-Matrix-Proteine. Sie machen 20–30 Gewichts-%

der Schmelz-Matrix während der Phase der Schmelzbildung aus, nach Abschluss der Schmelzbildung verbleiben jedoch nur noch weniger als 1 Gewichts-% Proteine im Schmelz. Das dominierende Protein (mit über 90 %) ist hierbei das Amelogenin (20–25 kDa), ein primär hydrophobes Protein (25 % Prolin, 14 % Glutamin, 9 % Leucin, 7 % Histidin). Neben Amelogenin finden sich auch Enamelysin (MMP-20), Kallikrein (KLK-4), weitere Proteasen, Enamelin und Ameloblastin [20, 35].

Besondere funktionelle Bedeutung hat das Amelogenin (Abb. 1) [4, 20, 35, 50, 59]. Amelogenin ist bei niedrigem pH-Wert löslich und hat bei physiologischem pH-Wert die Fähigkeit zur Selbstorganisation [4, 20, 59]. Es bildet supra-molekulare Aggregate, sog. Nanosphären, die sich zu Ketten formieren (Abb. 1) [20, 59]. Dieses dreidimensionale Netzwerk ist von essenzieller Bedeutung für den physiologischen Prozess der Schmelzbildung, denn es reguliert die Calciumphosphatmineralisation und stabilisiert amorphes Calciumphosphat während der Schmelzformation [20, 59]. Mit zunehmender Mineralisation der Schmelzmatrix wird das Amelogenin-Netzwerk durch die Enzyme MMP-20 und KLK-4 kontinuierlich proteolytisch abgebaut.

Will man den Zahnschmelz auf azellulärem Weg regenerieren, so ist es neben der Synthese von nano-skaliertem Apatit erforderlich, eine organisierte Anordnung bei der Kristallitbildung zu gewährleisten [21, 36, 37]. Die Zielsetzung der biomimetischen Schmelzregeneration besteht somit idealerweise darin, die Bildung des nano- und mikro-skalierten,

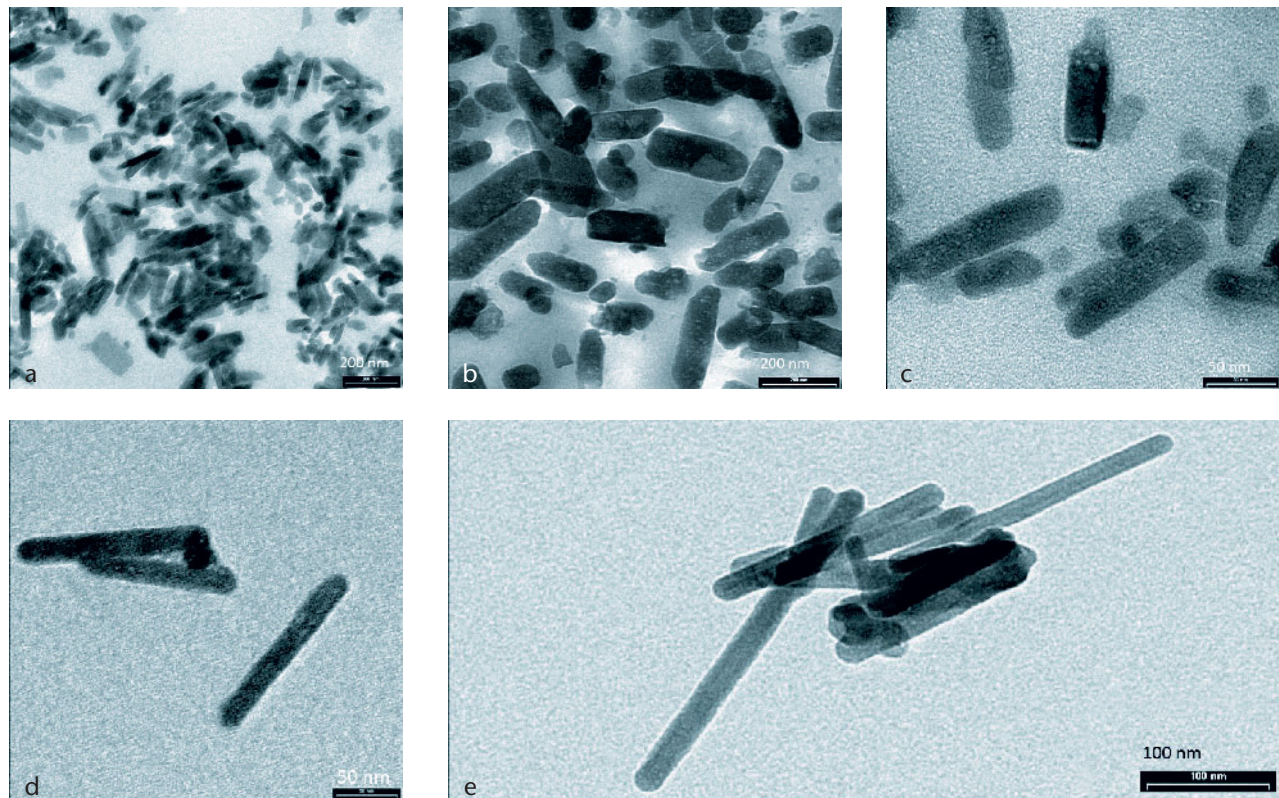


Abbildung 2 Biomimetisch synthetisierte Fluorapatit-Kristallite [56, 64], deren Dimensionierung den natürlichen Hydroxylapatitkristalliten im Schmelz ähnelt.

Figure 2 Biomimetically synthesized fluor-apatite-crystallites with dimensions similar to the natural hydroxy-apatite crystallites in enamel.

(Abb. 2: W. Hoth-Hannig, M. Hannig Universität des Saarlandes, Homburg/Saar)

toren [32] argumentieren, dass die 20 nm messenden Nanopartikel den „building blocks“ (kleinsten Unterbaueinheiten) der natürlichen Schmelzkristallite entsprechen und daher besonders effektiv an der geätzten Schmelzoberfläche adsorbiert werden. Bemerkenswerterweise resultiert aus der Einlagerung der 20 nm messenden Hydroxylapatitpartikel in das Ätzrelief der Schmelzoberfläche außerdem auch eine massive Reduktion der Säurelöslichkeit des Schmelzes verglichen mit der natürlichen Zahnschmelzoberfläche [32]. In weiterführenden Experimenten konnten Li et al. [33] aufzeigen, dass an der Schmelzoberfläche präadsorbierte Hydroxylapatit-Nanopartikel (20 nm Durchmesser) unter dem Einfluss von Glutaminsäure der Selbstorganisation unterliegen und innerhalb von 72 h eine dichte Schicht aus schmelzähnlichen Hydroxylapatitkristalliten (300–500 nm lang, 40–50 nm Durchmesser) ausbilden können [33]. Die Untersuchungen von Li et al. [32] machen insgesamt deutlich, dass Größeneffekte

von essenzieller Bedeutung sind im Hinblick auf den Versuch der partiellen Schmelzregeneration mit biomimetischen Apatit-Nanopartikeln. Gerade in diesem Bereich besteht allerdings noch erheblicher Forschungsbedarf [24–26, 36, 37].

Die eigentliche Herausforderung im Hinblick auf die azelluläre biomimetische Schmelzregeneration stellt jedoch nicht die Synthese von einzelnen oder aggregierten Schmelzkristallit-Analoga dar, sondern – neben den effektiven Interaktionen mit der Zahnoberfläche – deren hierarchische Organisation und Ausrichtung entsprechend dem Vorbild des natürlichen Schmelzes.

Selbstorganisation von Nanopartikeln

Prinzipiell kann die Formation hierarchisch orientierter biomineralisierter Strukturen über das gerichtete Kristallwachstum mithilfe entsprechender Templates (Schablonen), über die dreidi-

mensional organisierte Aggregation von z.T. präformierten Nanokristalliten oder auch über die Aggregation von anorganischen Nanopartikeln mithilfe organischer Scaffolds (Gerüste, Netzwerke) erfolgen [36, 37, 41, 46].

Verschiedene Additive sind denkbar, um die Kristallit-Selbstorganisation zu ermöglichen (Abb. 4). Eine häufig angewandte Methode zur Ausrichtung und Orientierung von Nanopartikeln besteht in der Selbstorganisation unter der Einwirkung von oberflächenaktiven Substanzen (Surfactants) [36, 37]. Im Rahmen der nanotechnologischen Synthese und Selbstorganisation nano-skalierter Strukturen werden oberflächenaktive Substanzen üblicherweise als sog. inverse Mizellen (hydrophobe Peripherie, hydrophiles Zentrum der Mizelle) oder in Form von Mikroemulsionen eingesetzt [9, 63]. Dadurch versucht man, die natürliche Biomineralisation nachzuempfinden und aus nanopartikulären Apatitkristallen über den Prozess der Selbstorganisation prismenartige Strukturen zu erzeugen.

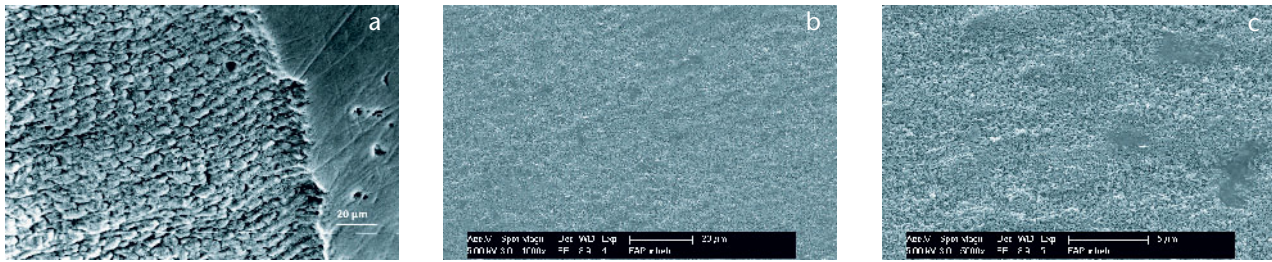


Abbildung 3 a Schmelzoberfläche nach Ätzung mit 35 %iger Phosphorsäure für 60 sec; b, c geätzter Schmelz nach Applikation einer Suspension aus 10 % Fluorapatit-Nanokristalliten (vergl. Abb. 2) in Wasser. Die Suspension wurde 2x täglich für jeweils 30 sec über einen Zeitraum von 4 Wochen in vitro auf den geätzten Schmelz aufgetragen. Das Schmelzätzmuster ist durch die randomisierte Adsorption der Fluorapatit-Nanokristallite nahezu vollständig maskiert.

Figure 3 a Enamel surface after treatment with 35 % phosphoric acid over 60 sec; b, c etched enamel after treatment with a suspension of 10 % fluor-apatite nanocrystallites (see Fig. 2) in water. The suspension was applied in vitro two times daily for 30 sec each over a period of 4 weeks. The surface etching pattern has been masked by randomly adsorbed fluor-apatite nanoparticles.

(Abb. 3: K. Dönges, M. Hannig, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar)

Ein Ansatz ist die Anwendung des Tensids Diethylhexylsulfosuccinat [9]. Hydroxylapatit-Nanokristallite unterliegen nach Vorbehandlung mit Bis-(2-ethylhexyl)-sulfosuccinat der Selbstorganisation und nehmen orientiert an der C-Achse der Kristallite an der Wasser-Luft-Grenzfläche eine gerichtete Anordnung ein [9]. Diese Ausrichtung entspricht unter morphologischen Aspekten der Anordnung der Kristallite im natürlichen Zahnschmelz [9]. Die fragliche Biokompatibilität nicht biologischer Tenside bzw. oberflächenaktiver Substanzen limitiert allerdings deren klinische Anwendbarkeit ganz erheblich.

Ein anderes Verfahren zur Bildung von Apatitschichten mit dreidimensional orientierten Kristallitstrukturen besteht in der hydrothermalen Selbstorganisation von Nanokristalliten. So lassen sich z.B. durch 10-stündiges Autoklavieren (bei 121 °C und einem Druck von 2 atm) aus Fluorapatitkristalliten auf geeigneten Substratoberflächen (beispielsweise Eisen) dicht gepackte Bündel schmelzprismenartiger Mikrostrukturen erzeugen [11]. Trotz der unphysiologischen Bedingungen können nur sehr dünne Schmelzschichten erzielt werden. Von Zhang et al. konnte gezeigt werden, dass sich aus Calciumhydrogenphosphat (CaHPO_4) unter hydrothermalen Synthesebedingungen sowie Zusatz des Tensids Dodecylphosphat und Gelatine bei Temperaturen zwischen 80–120 °C und Einwirkzeiten von 18 h bis zu 4 Tagen ca. 10 µm große Nanokristallitaggregate erzeugen lassen [63]. Die einzelnen Nanokristallite sind dabei dicht gepackt und parallel zur

C-Achse ausgerichtet, was der Nanoarchitektur des natürlichen Schmelzes sehr nahe kommt [63].

Trotz ihrer faszinierenden Möglichkeiten im Hinblick auf das Erzeugen biomimetischer Schmelzstrukturen ist die Translation von nanotechnologischen Verfahren, die auf unphysiologischen Temperaturen und hohen Drucken basieren, in die klinische Anwendung nicht möglich. Daher wurde in den letzten Jahren nach weitergehenden Strategien gesucht, um eine biomimetische Schmelzsynthese unter ambienten Bedingungen zu realisieren.

Nanopapatit-haltige Pasten – eine Möglichkeit der Applikation

Orientiert an den biologischen Prozessen, die zur natürlichen Schmelzbildung führen, wäre zu postulieren, dass auch für die biomimetische Zahnschmelzsynthese neben den anorganischen, mineralischen Komponenten die Einbeziehung organischer Additive als Scaffold oder Template eine *conditio sine qua non* ist. Allerdings sind in den letzten 10 Jahren verschiedene rein anorganische, nanotechnologische Methoden zur gerichteten Apatitkristallisation unter Verzicht auf organische Additiva oder Scaffolds beschrieben worden [40, 51, 53, 57].

Von Yamagishi et al. wurde bereits 2005 in der renommierten naturwissenschaftlichen Zeitschrift „Nature“ ein Verfahren zur Schmelzsynthese für die „rasche“ Zahnreparatur vorgestellt, das auf

einer Paste aus rein anorganischen Komponenten basiert [57]. Die Herstellung der Reparaturpaste erfolgt durch Lösen eines Pulvers aus Fluorid-substituiertem Hydroxylapatit in 85 %iger Phosphorsäure und 35 %igem H_2O_2 . Es resultiert eine stark saure Paste (pH < 2), die direkt auf die defekte Zahnschmelzoberfläche appliziert wird. Innerhalb von nur 15 min entsteht eine 20–30 µm dicke, sehr homogene und kompakte Schicht aus Fluorhydroxyapatit, die dem natürlichen Zahnschmelz nahtlos und spaltfrei anliegt [40, 57]. Die „regenerierte“ Schicht enthält Fluorapatitkristallite, die mehr oder weniger regulär zur natürlichen Schmelzoberfläche orientiert sind und deren Dimensionierung mit einer Länge von 100–400 nm und einem Durchmesser von 20–80 nm den natürlichen Schmelzkristalliten sehr ähnlich ist. Transmissionselektronenmikroskopisch scheinen die neu gebildeten Fluorapatitkristallite mit dem Zahnschmelz fusioniert zu sein. Weiterhin imponieren sowohl eine nahezu identische Ultrastruktur als auch dreidimensionale Orientierung der synthetisierten Nanokristallite beim Vergleich mit den natürlichen Schmelzkristalliten [40, 57].

Einige Jahre später konnten Wang et al. [53] zeigen, dass sich auch unter Verzicht auf H_2O_2 mit einer Paste, die nur Fluorapatit-Nanopartikel und 17 %ige Phosphorsäure enthält, innerhalb von 15 min auf dem geätzten Zahnschmelz eine ca. 30 µm dicke Apatitschicht erzeugen lässt, die sich ebenfalls durch eine sehr dichte und kompakte schmelzähnliche Mikrostruktur auszeichnet [53]. Die neu gebildeten, prismenartigen Mikro-

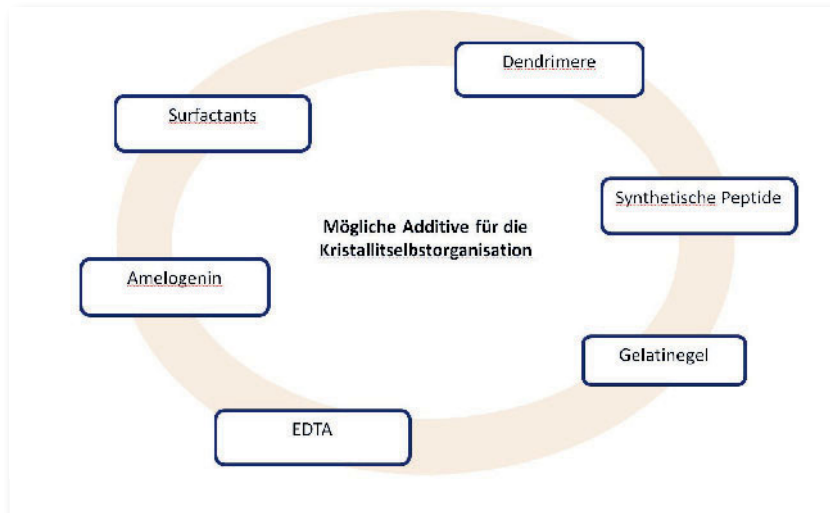


Abbildung 4 Mögliche Additive zur Kristallit-Selbstorganisation bei der biomimetischen Bildung schmelzartiger Strukturen.

Figure 4 Possible additives for self-organization of crystallites in biomimetic formation of enamel like structures.

strukturen bestehen aus Bündeln nanoskalierter stäbchen- sowie plättchenförmiger Kristallite und sind parallel zueinander und senkrecht zur Schmelzoberfläche angeordnet [53]. In weiterführenden Experimenten [51] wurde der Einfluss des pH-Wertes der Nanoapatit-Phosphorsäurepaste auf die Bildung selbstorganisierter Schichten an der geätzten Schmelzoberfläche untersucht mit der Zielsetzung, den pH-Wert der Paste möglichst neutral oder allenfalls leicht sauer einstellen zu können. Zur Anwendung kam eine Paste aus Nano fluorapatit-Partikeln (40 nm lang, Durchmesser 10 nm) in Kombination mit 17 %iger Phosphorsäure, wobei der pH-Wert der Paste auf 1,0 bzw. durch Zusatz von NaOH auf 4,5 oder 7,5 adjustiert wurde. Mit allen 3 Pasten konnten auf erodiertem Schmelz innerhalb von 15 min etwa 30 µm dicke Schichten aus parallel zueinander orientierten schmelzprismenartigen Mikrostrukturen gebildet werden, die wiederum aus Bündeln nadelartiger, schmelzähnlicher Nano fluorapatitkristallite bestehen [51]. Die generierten Schichten weisen einen spaltfreien, kontinuierlichen Verbund zur geätzten Schmelzoberfläche auf und sind vom natürlichen Zahnschmelz im Hinblick auf die Mikromorphologie rasterelektronenmikroskopisch nahezu nicht mehr zu unterscheiden. Es zeigte sich weiterhin, dass bei Anwendung der neutralen Paste (pH 7,5) bessere mechanische Eigenschaften der neu gebildeten schmelzartigen

Schicht auf dem erodierten Zahnschmelz erzielt werden können als bei Applikation der sauren Paste (pH 1,0). Nach Anwendung der neutralen Paste beträgt die Vickershärte der neu gebildeten Schicht 304,9 HV und entspricht damit fast der Vickershärte der natürlichen Schmelzoberfläche (ca. 350 HV), während unter Verwendung der sauren Paste nur eine Vickershärte von 125,9 HV an der Oberfläche der Schichtbildung erreicht wird [51]. Die Erklärungsansätze der Autoren [51] für die beobachteten Phänomene sind allerdings sehr spekulativ, sodass eine weiterführende wissenschaftliche Validierung erforderlich ist, um die Abscheidung von selbstorganisierten Fluorapatitschichten aus Nanoapatit-Phosphorsäurepasten im Detail zu verstehen und klinisch nutzen zu können. Insgesamt betrachtet scheinen Nano fluorapatit-Phosphorsäurepasten – insbesondere mit neutralem pH-Wert – eine interessante Möglichkeit zur azellulären Schmelzregeneration unter physiologischen Bedingungen und innerhalb klinisch relevanter Zeiten darzustellen.

Ein physiologischer Ansatz – Schmelzregeneration mit Amelogenin

Aufgrund seiner Bedeutung bei der physiologischen Formation des Zahnschmelzes (Abb. 1) findet Amelogenin zuneh-

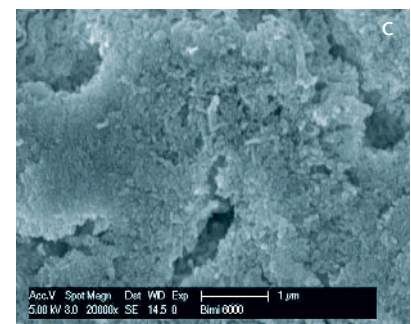
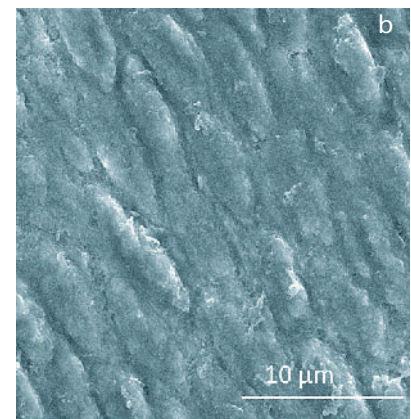
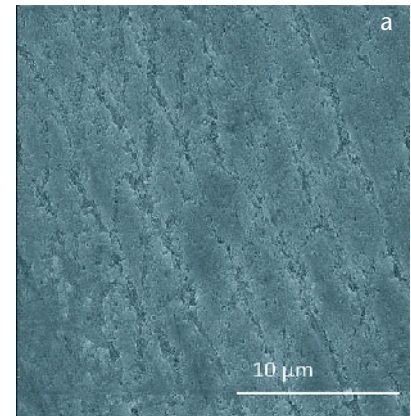


Abbildung 5 Bildung von Fluorapatit auf geätztem Zahnschmelz nach zweimaliger Applikation (über jeweils 8 h) eines Gelatine-Gelstreifen-Prototypen (BiMin-System = Fluorapatitformation in Gelatine, Heraeus-Kulzer).

Figure 5 Formation of fluorapatite on etched enamel after twofold application (over 8 h each) of a gelatin-gelstrip prototype (BiMin system = fluor-apatite formation in gelatin, Heraeus-Kulzer).

(Abb. 5: N. Idlibi, M. Hannig, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar)

mend Beachtung bei der Entwicklung von Strategien zur biomimetischen Schmelzsynthese. Ein sehr vielversprechender Ansatz zur hierarchischen Orientierung und Ausrichtung von Hydroxyl-

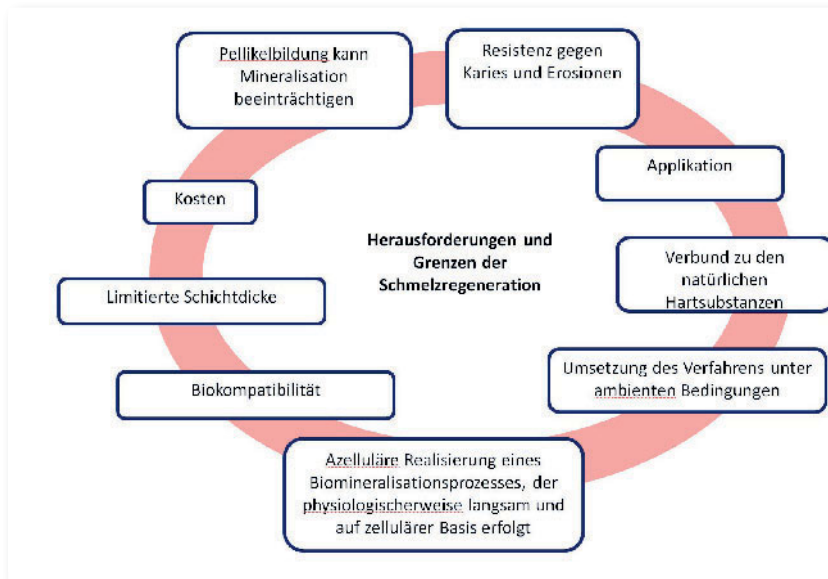


Abbildung 6 Herausforderungen und Grenzen der Schmelzregeneration.

Figure 6 Challenges and limits of enamel regeneration.

(Abb. 1, 4, 6: C. Hannig)

apatit-Nanopartikeln im Rahmen der azellulären Schmelzregeneration besteht in der biomimetischen Selbstorganisation mittels rekombinanten Amelogenin [17, 18, 31, 50]. Amelogenin induziert die Mineralisation und gerichtete Apatitkristallisation [52, 59]. Wird eine geätzte Zahnschmelzoberfläche in einer Calcium- und Phosphatlösung, die darüber hinaus Fluorid und rekombinantes Amelogenin (rP 172; 33 µg/ml) enthält, über Zeiträume von 6–30 h bei 37 °C und physiologischem pH-Wert inkubiert, so resultiert die Ausbildung einer schmelzartigen Nanokompositschicht aus Amelogenin und Fluorhydroxyapatit [18]. Der Zusatz von Amelogenin bewirkt auf dem angeätzten Schmelz die gerichtete, senkrecht zur Oberfläche orientierte Abscheidung von nadelartigen Nanokristalliten (35 nm Durchmesser) aus fluoridiertem Hydroxylapatit [18]. Dadurch wird das mikroretentive Oberflächenrelief des geätzten Schmelzes innerhalb von 6–8 h nahezu vollständig maskiert [18].

Durch die Fluoridkonzentration und den Grad der Übersättigung von Calcium und Phosphat in der Mineralisationslösung kann im Rahmen der biomimetischen Schmelzregeneration mit rekombinanten Amelogenin die Morphologie und Organisation der erzeugten Kristallite so gesteuert werden, dass eine relativ dicht gepackte Schicht aus

parallel zueinander angeordneten Fluorapatitkristallen entsteht [17]. Die optimale Amelogeninkonzentration liegt bei 40 ± 10 µg/ml [17]. Größtenteils parallel zur Längsachse angeordnete Calciumphosphatkristallite lassen sich auch synthetisieren, wenn auf der Schmelzoberfläche primär ein prä-adsorbiertes Netzwerk aus rekombinanten Amelogenin etabliert und anschließend eine übersättigte Calciumphosphatlösung appliziert wird [50].

Allerdings wird mit allen bis dato beschriebenen Verfahren zur biomimetischen Schmelzregeneration unter Zusatz von Amelogenin die extrem hohe Packungsdichte der Kristallite im natürlichen Schmelz nicht erreicht [18, 50]. Erklären lässt sich dieses Ergebnis dadurch, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen das Amelogenin-Netzwerk nach Abschluss der Mineralisation und Kristallitbildung im Gegensatz zur natürlichen Zahnschmelzbildung zwischen den Kristalliten persistiert. Während des Prozesses der biologischen Schmelzbildung wird dieses Amelogenin-Netzwerk durch Proteasen (MMP-20, KLK4) abgebaut, sodass die bekannte hohe Kristallitdichte des Zahnschmelzes bei der Eruption der Zähne in die Mundhöhle resultiert. Setzt man bei Schmelzsynthesen unter Laborbedingungen ebenfalls proteolytische

Enzyme ein, wie z.B. MMP-20, so wird überschüssiges Amelogenin enzymatisch abgebaut und die Dichte des Kristallgefüges deutlich erhöht [49]. Mit steigendem Apatitanteil verringert sich dabei die proteolytische Aktivität des MMP-20 [47].

Im Hinblick auf die potenzielle Applikation von Amelogenin zur azellulären Schmelzregeneration unter klinischen Bedingungen wurde ein Amelogenin freisetzendes Hydrogel entwickelt [19]. Das Hydrogel enthält in seiner polymeren Matrix die zur Mineralisation erforderlichen Calcium-, Phosphat- sowie Fluoridionen und gestattet die kontinuierliche Freisetzung von Amelogenin (rP 172). Bei Applikation dieses Amelogenin freisetzenden Hydrogels auf die demineralisierte Zahnschmelzoberfläche erfolgt unter In-vitro-Bedingungen innerhalb von 5 Tagen die partielle Remineralisation des Schmelzes durch die Ausbildung von schmelzähnlichen Kristalliten. Gleichzeitig ist eine signifikante Steigerung der Oberflächenhärte des angeätzten Zahnschmelzes zu verzeichnen (von 34 KHN auf 172 KHN), wobei allerdings die Mikrohärtigkeit der natürlichen Schmelzoberfläche (315–365 KHN) nicht erreicht wird [19].

Als Fazit aus den bislang durchgeführten Untersuchungen zur azellulären Schmelzregeneration mithilfe von (rekombinanten) Amelogenin lässt sich zusammenfassen, dass es sich hierbei zweifelsohne um einen aus Sicht der Grundlagenforschung hochrelevanten Ansatz zur biomimetischen Synthese schmelzartiger Biomaterialien unter physiologischen Bedingungen handelt, der bislang jedoch noch keine klinische Relevanz besitzt.

Alternativen zu Amelogenin – biomimetische Schmelzsynthese unter Zusatz von Dendrimeren oder Peptiden

In den zitierten Studien zur biomimetischen Schmelzregeneration unter Anwendung von Mineralisationslösungen in Kombination mit Amelogenin wurde rekombinantes Amelogenin eingesetzt. Die Gewinnung von rekombinanten Amelogenin ist vergleichsweise aufwendig und erfordert die Expression von Amelogenin in Bakterien (*E. coli*), die Isolierung aus den Bakterien und die an-

schließende Aufreinigung [5]. Daher wird seit Jahren nach Möglichkeiten gesucht, anstelle des Amelogenins synthetische Peptide und Proteine einzusetzen, die amelogeninartige Eigenschaften aufweisen und die Fähigkeit zur selbstorganisierten Ausbildung supramolekularer Nanostrukturen (Nanonetzwerke, Nanoaggregate) besitzen.

Poly-(Amin/Amid)-Dendrimere (PAMAM-Dendrimere) sind proteinähnliche, biomimetische Makromoleküle, die auch als organische Matrix für Mineralisationsprozesse eingesetzt werden können [46, 48, 55]. Dendrimere weisen eine ähnliche dreidimensionale Konformation wie natürliche biologische Makromoleküle auf und werden daher auch als artifizielle bzw. synthetische Proteine bezeichnet [46]. Amphiphile dendritische Moleküle, wie das PAMAM, haben die Fähigkeit zur Selbstorganisation und Ausbildung supramolekularer Nanosphären und makromolekularer Netzwerke, die ähnlich wie Nanosphären aus Amelogenin ein gerichtetes Wachstum von Hydroxylapatitkristallen initiieren können [46, 48, 60].

Wu et al. [55] konnten zeigen, dass Dendrimere an der Zahnschmelzoberfläche adsorbiert werden und nach der Inkubation im Speichel die Bildung von Hydroxylapatitkristalliten an der Schmelzoberfläche induzieren. Um die Adsorption von Dendrimern an der Schmelzoberfläche zu optimieren, wurden von Wu et al. [55] PAMAM-Dendrimere mit Alendronat (ALN) konjugiert, da Alendronate ein hohes Adsorptionsvermögen an Hydroxylapatit besitzen. Die resultierenden ALN-PAMAM-Dendrimere zeichnen sich nicht nur durch eine verbesserte Haftung an der Schmelzoberfläche, sondern auch durch geringe Toxizität aus. ALN-PAMAM-Dendrimere induzieren nach der Adsorption an der geätzten Schmelzoberfläche die Bildung von Hydroxylapatitkristallen in Kontakt mit künstlichem Speichel. Innerhalb von mehreren Wochen wird eine mehr als 10 µm dicke Apatitschicht generiert. Die neu gebildete Schicht besteht aus Bündeln von schmelzartigen Nanokristallitstäbchen, die überwiegend senkrecht zur Schmelzoberfläche angeordnet sind und eine hohe Packungsdichte aufweisen [55].

Auch carboxylierte PAMAM-Dendrimere (PAMAM-COOH Dendrimere) haben ein gutes Bindungsvermögen an

Hydroxylapatit und können nach Applikation auf die geätzte Schmelzoberfläche über den Prozess der Selbstorganisation innerhalb von 30 min ein Template für die gerichtete Mineralisation ausbilden [12]. Wird der derart vorbehandelte Schmelz für 20 h bei 37 °C und pH 7,0 in einer fluoridhaltigen Mineralisationslösung inkubiert, kommt es zur Auffüllung des Ätzmusters durch stäbchenförmige Fluorhydroxyapatit-Nanokristallite, die parallel zur Längsachse der natürlichen Schmelzkristallite angeordnet sind [12].

Des Weiteren sind auch kleinere biomimetische Moleküle, z.B. das Peptid-Oligomer 8 DSS, als geeignete Additive im Rahmen der azellulären Schmelzregeneration bzw. als Additive zur Remineralisation geätzter Schmelzoberflächen beschrieben worden [28]. Bei dem synthetischen Peptid 8 DSS handelt es sich um das Achtfach-Oligomer eines Tripeptids aus Aspartat-Serin-Serin. Die Applikation von 8 DSS unterstützt die gleichmäßige Ablagerung von nanokristallinem Calciumphosphat aus einer Mineralisationslösung auf demineralisierten Schmelzoberflächen und führt zu einer signifikanten Verbesserung der mechanischen Eigenschaften des geätzten Schmelzes *in vitro* [28].

Aber auch Triplets des Peptids DDS oder des Peptids NSS (Asparagin-Serin-Serin) sind in der Lage, die Präzipitation von Calciumphosphat aus einer Mineralisationslösung an der geätzten Schmelzoberfläche positiv zu beeinflussen [13–16]. Es resultiert innerhalb von 14 Tagen unter *In-vitro*-Bedingungen die gleichmäßige Deposition von Apatit-Nanopartikeln verbunden mit einer signifikanten Verbesserung der Nano Härte der geätzten Schmelzoberfläche, wobei jedoch lediglich ein Drittel der Härte des nicht erodierten natürlichen Schmelzes erreicht wird [13–16]. Erosive Schmelzdefekte können unter diesen Versuchsbedingungen somit nur partiell repariert werden.

Schmelzregeneration mit einfachen Additiven

Von Yin et al. (2009) [61] wurde erstmals ein Verfahren zur azellulären, chemischen Schmelzregeneration *in vitro* unter quasi physiologischen Bedingungen (pH 6,0, 37 °C, 1 atm) ohne die Ver-

wendung präformierter Apatit-Nanokristallite beschrieben [61]. Die geätzte Schmelzoberfläche wird für 3 min in eine Calciumphosphatlösung unter Zusatz von Hydroxyethyl-EDTA (= HEDTA) eingetaucht, anschließend wird eine KF-Lösung zugegeben. In der resultierenden Suspension aus HEDTA-Ca, KH₂PO₄ und KF wird der Zahnschmelz bei 37 °C, 1 atm und pH 6,0 über 8 Tage inkubiert. Dadurch lässt sich auf der Schmelzoberfläche eine etwa 5 µm dicke Fluorapatitschicht erzeugen, die eine schmelzähnliche Mikroarchitektur aufweist. Rasterelektronenmikroskopisch lassen sich dicht gepackte prismenartige Strukturen mit einem Durchmesser von 2–4 µm detektieren, die wiederum aus homogenen Bündeln hexagonaler Kristallite bestehen. Die synthetischen Kristallite sind entlang ihrer C-Achse fehlerstellenfrei parallel zueinander angeordnet und haben einen Durchmesser von 300–400 nm [61]. Die synthetische Apatitschicht zeichnet sich im Hinblick auf Nanohärte und E-Modul durch ähnliche mechanische Eigenschaften wie der natürliche Zahnschmelz aus. Anzumerken bleibt allerdings, dass die Anwendung von HEDTA in der Mundhöhle als bedenklich einzustufen ist. Im Hinblick auf die klinische Applikation ist die Inkubationsdauer von mehr als einer Woche als kritisch zu bewerten. Nichtsdestotrotz steht mit dieser Methode ein simples Verfahren zur Verfügung, mit dem sich geordnete, dreidimensional organisierte schmelzartige Strukturen auf rein chemische Weise, d.h. ohne Zellen, ohne Zusatz präformierter Schmelzkristallite, ohne organisches Scaffold und ohne Zusatz von Proteinen oder synthetischen Peptiden generieren lassen. Folglich fehlt allerdings dieser mikrostrukturierten, schmelzähnlichen Fluorapatitschicht die interkristalline organische Substanz.

Von Xie et al. (2011) wurde eine ähnliche Mineralisationslösung bestehend aus EDTA, Dicalciumphosphat-Anhydrit und NaF eingesetzt, um auf der geätzten Schmelzoberfläche unter quasi physiologischen Bedingungen innerhalb von 3–8 Tagen schmelzartige Schichtbildungen aus Fluorid-substituierten Hydroxylapatit-Mikrokristallen (Durchmesser 1–2 µm) aufwachsen zu lassen [56]. Bei der Ausbildung der mehrere Mikrometer starken Schichten aus Fluorhydroxyapatit-Mikrokristal-

len durch meso-skalierte Selbstorganisation bei pH 6,0, 37 °C und 1 atm ist EDTA im Sinne eines „chemischen Mediators“ von entscheidender Bedeutung [56]. EDTA induziert die Bildung sowie die weitgehend parallele Orientierung und Ausrichtung der hexagonalen FHAp-Mikrokristalle entlang ihrer C-Achse und senkrecht zur Schmelzoberfläche. Mit zunehmender Reaktionszeit fusionieren die individuellen Mikrokristalle zu einer kompakten Schicht [56]. Nach einer Reaktionszeit von 5 Tagen entspricht die Vickershärte der neu generierten schmelzartigen Schicht mit 347–370 HV der Oberflächen-Mikrohärte des natürlichen Zahnschmelzes [56]. Zu diesen vielversprechenden Ansätzen auf der Basis von EDTA fehlen allerdings noch weiterführende Untersuchungen und klinische Daten.

Eine andere Methode, bei der als Scaffold zur gerichteten Apatitkristallisation eine Gelatinematrix eingesetzt wird [6, 7], wurde hingegen bereits in vivo getestet [23]. Das Verfahren basiert auf der Diffusion von Calciumionen in ein Glycerin-Gelatine-Gel, das Phosphat- und Fluoridionen enthält [6, 7]. Der Zahnschmelz wird mit einer Calcium-haltigen Lösung vorbehandelt und mit einem Phosphat- und Fluorid-haltigen Gelatinegel sowie einem zweiten Gelatinegel, das Calcium enthält, überschichtet. Anschließend wirken die Präparate geschützt durch eine Schiene über 8 h ein. Innerhalb von einem Applikationszyklus resultiert die Ausbildung einer ca. 500 nm starken Schicht aus Fluorapatitkristalliten. Die neu gebildeten Fluorapatitkristalle sind größtenteils senkrecht zur Zahnschmelzoberfläche angeordnet [6, 7]. Die synthetisierte Schicht weist eine ähnliche Mikrohärte auf wie der natürliche Zahnschmelz (400 KHN). Erste In-vivo-Experimente zeigen, dass unter Mundhöhlenbedingungen die Abscheidung von schmelzartigen Strukturen mithilfe dieses Verfahrens prinzipiell möglich erscheint [23]. Ein Prototyp eines Produktes wurde auf Basis dieser Strategie entwickelt (Heraeus Kulzer) (Abb. 5). Angesichts des Aufwands und der in vitro erzielten Schichtdicke von ca. 0,5 µm im Rahmen eines achtstündigen Applikationszyklus muss bei dieser Vorgehensweise die klinische Relevanz hinterfragt werden.

Alternative Applikationsverfahren für Apatit an der Zahnoberfläche

Schmelzregeneration mit HAp-Folie

Es wird von verschiedenen Arbeitsgruppen nach innovativen Trägersystemen und Applikationsformen von Hydroxylapatit für die azelluläre Schmelzregeneration gesucht. Von Nishikawa et al. (2008) [39] wurde die Herstellung von Hydroxylapatitfolien (Schichtstärke < 10 µm) durch Deposition mithilfe eines gepulsten ArF-Excimer-Lasers beschrieben. Die flexiblen Hydroxylapatitfolien haben ein breites Anwendungsspektrum in der regenerativen Medizin und können auch zur azellulären Schmelzregeneration eingesetzt werden. Nach Vorbehandlung der Schmelzoberfläche mit einer Calciumphosphatlösung (pH 5,5) wird die kristallisierte Hydroxylapatitfolie appliziert und unter In-vitro-Bedingungen mit künstlichem Speichel besprüht [27, 58]. Innerhalb von einer Woche resultiert die feste Verbindung und partielle „Verschmelzung“ der Folie mit dem Zahnschmelz; gleichzeitig kommt es zu einer Zunahme der Kristallinität in der Folie [27, 58]. Damit steht ein einfaches Verfahren zur biomimetischen Schmelzoberflächenrestauration und Konservierung zur Verfügung, dessen klinische Anwendbarkeit und Eignung allerdings noch im Rahmen von In-vivo-Studien überprüft und validiert werden müssen. Auch bei diesem Ansatz ist die Applikationsdauer kritisch zu berücksichtigen.

Einsatz von Pulverstrahlgeräten

Im Rahmen der vorliegenden Übersichtsdarstellung und kritischen Wertung biomimetischer nanotechnologischer Verfahren zur azellulären Schmelzregeneration darf nicht unerwähnt bleiben, dass auch vergleichsweise einfache physikalische Methoden zur Erzeugung schmelzähnlicher Schichten aus Hydroxylapatit-Mikropartikeln entwickelt und beschrieben worden sind [1–3]. Hierzu zählt beispielsweise die „Pulverstrahl-Deposition“ von Hydroxylapatitpartikeln auf der Schmelzoberfläche [1–3]. Die Partikel mit Durchmesser von 3,18 µm oder 4,7 µm werden mit Stickstoff oder Luft als Trägergas zu einem Aerosol kombiniert und bei ei-

nem Druck von 0,5 MPa auf die Schmelzoberflächen gestrahlt [1–3]. Es entsteht innerhalb von 30 sec eine 30–50 µm dicke Hydroxylapatitschicht [1–3], die sich hinsichtlich der Mikrohärte nicht signifikant vom natürlichen Zahnschmelz unterscheidet und deren Haftung an der Schmelzoberfläche der Komposit-Schmelzhaftung nach Anwendung der Schmelzätztechnik entspricht [1, 2]. Die aufgestrahlte Apatitschicht weist auch nach thermischer Wechselbelastung eine schmelzähnliche Oberflächenhärte und Mikrostruktur sowie einen festen Verbund mit dem Schmelz auf [1, 2].

Diskussion

Der azelluläre Zahnschmelz besitzt kein regeneratives Potenzial und kann folglich demineralisationsbedingte Oberflächendefekte nicht selbst heilen und reparieren, d.h. einmal verloren gegangener Zahnschmelz kann nicht regeneriert werden.

In den letzten Jahren sind daher zahlreiche In-vitro-Untersuchungen zur Apatitkristallisation und nachfolgenden dreidimensionalen Ausrichtung der synthetisierten Strukturen initiiert worden, um die Bildung hierarchisch organisierter schmelzähnlicher Nano- und Mikrostrukturen unter Nutzung azellulärer nanotechnologischer Methoden zu realisieren [24, 25]. Biomimetische Strategien zur künstlichen Schmelzbildung weisen prinzipiell das Potenzial auf, eine „azelluläre“ Reparatur von Schmelzoberflächendefekten auf mikroskopischem Niveau – zumindest unter In-vitro-Bedingungen – durch die Abscheidung von Apatitschichten mit schmelzähnlicher Nano- und Mikroarchitektur zu realisieren. Besonders herauszustellen ist hierbei, dass mittlerweile Verfahren der biomimetischen Schmelzsynthese beschrieben worden sind, mit denen unter quasi-physiologischen, ambienten Bedingungen die biomimetische Generierung von organisierten Nanoapatit-basierten Schichten möglich ist, deren hierarchische Architektur auf der Nano- und Mikroskala dem natürlichen Zahnschmelz nachempfunden ist [51, 56, 61].

Trotz dieser sehr vielversprechenden In-vitro-Experimente und Resultate ist derzeit eine klinische Nutzung der dar-

gestellten nanotechnologischen Verfahren zur Schmelzmikroreparatur oder in der restaurativen Kariestherapie noch nicht möglich. Für eine effektive Schmelzregeneration in der klinischen Anwendung ist es erforderlich, Kristallisationsprozesse in sehr kurzer Zeit zu realisieren, die physiologisch präeruptiv über viele Monate andauern und auch noch nach dem Durchbruch der Zähne in die Mundhöhle einer jahrelangen posteruptiven Reifung unterliegen. Neben ungeklärten Fragen zu Applikationsmodus und Zeitdauer biomimetischer Verfahren zur azellulären Schmelzregeneration (Abb. 6) stellt insbesondere die reproduzierbare Organisation und Aggregation von nano-skalierten Apatitkristalliten zu prismenartigen Mikrostrukturen eine noch nicht verlässlich beherrschte Herausforderung dar. Weiterhin offene Fragen betreffen die mechanische Eigenschaften und auch die chemische Stabilität der biomimetisch generierten schmelzanalogen Strukturen unter klinischen Bedingungen [24–26], da bis dato keine In-situ-Untersuchungen oder gar klinische Studien zu dieser Thematik verfügbar sind (Abb. 6).

Auch die Interaktion mit den natürlichen Schmelzstrukturen in der Mundhöhle muss als besondere Herausforderung angesehen werden. Dies betrifft nicht nur den Verbund zum ggf. kariös oder erosiv alterierten Schmelz, sondern auch die Beeinträchtigung der Biomineralisationsprozesse durch eingelagerte Proteine in initialen Kariesläsionen (white spots). Weiterhin können Speichel und Pellikel die intentionelle Biomineralisation an der Zahnschmelzoberfläche unter Mundhöhlenbedingungen beeinträchtigen.

Als Vorteil biomimetischer Verfahren zur azellulären Schmelzregeneration kann die zu erwartende Biokompatibilität des synthetischen Biomaterials aus

Apatitpartikeln herausgestellt werden. Allerdings muss auch die Biokompatibilität der Scaffolds und Trägersysteme gewährleistet sein. Zudem darf in diesem Zusammenhang nicht außer Acht gelassen werden, dass auch Zahnoberflächen, die mit Nanoapatit und schmelzähnlichen Materialien restauriert worden sind, kariöser Destruktion und erosiven Demineralisationsprozessen ausgesetzt sind. Auch ist für eine breite klinische Anwendung die Wirtschaftlichkeit der Technologie zu berücksichtigen (Abb. 6).

Zur Regeneration der Zahnhartsubstanzen auf biomimetisch azellulärem Weg ist noch sehr viel Forschungsarbeit erforderlich. Es gilt somit weiterhin die Einschätzung von *Mitsiadis* und *Papage-rakis* (2011): „Regeneration of human enamel is a very difficult – almost impossible – task at present“ [38]. Eine übergeordnete regenerative Strategie muss in diesem Kontext ebenfalls diskutiert werden, d.h. die zelluläre Regeneration ganzer Zähne bzw. pulpalen Gewebe als Basis auch zur erneuten Etablierung von Zahnhartsubstanzen [8, 29]. An dieser Stelle sei auf die anderen Beiträge in diesem Heft zu regenerativen Strategien in der Endodontie hingewiesen.

Schlussfolgerung

Mit biomimetischen Syntheseverfahren können innerhalb von mehreren Tagen Apatitschichtbildungen generiert werden, deren Schichtstärke mehrere Mikrometer beträgt und die im Hinblick auf ihr ultrastrukturelles Erscheinungsbild sowie ihre chemische Zusammensetzung dem natürlichen Zahnschmelz durchaus ähnlich sind.

Die reproduzierbare Nachbildung der Schmelzarchitektur auf der mikrostrukturellen Ebene (d.h. die dreidimensionale organisierte Konfiguration der

Kristallite in Form von Prismenstäben) stellt allerdings nach wie vor eine nur ansatzweise beherrschte Herausforderung im Rahmen der bioinspirierten Synthese schmelzartiger Strukturen dar.

Das Gros der biomimetischen Strategien zur azellulären Synthese schmelzartiger Strukturen wurde bis dato nur in vitro erprobt. Derzeit steht kein azelluläres nanotechnologisches Verfahren zur Verfügung, mit dem sich eine biomimetische Schmelzregeneration in makroskopisch sichtbaren Schmelzdefekten klinisch realisieren ließe.

Danksagung

Die Anfertigung der vorliegenden Übersichtsarbeit erfolgte mit Unterstützung durch die DFG (SFB 1027). Für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Abbildungen danken die Autoren Frau W. Hoth-Hannig (Abb. 2), Frau ZÄ K. Dönges (Abb. 3) und Herrn Dr. N. Idlibi (Abb. 5).

Interessenskonflikt: Die Autoren, Prof. Dr. Matthias Hannig und Prof. Dr. Christian Hannig, kooperieren mit der Heraeus Kulzer GmbH.

Korrespondenzadressen

Prof. Dr. Matthias Hannig
Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie
und Präventive Zahnheilkunde
Universitätsklinikum des Saarlandes,
Geb. 73
66421 Homburg/Saar
matthias.hannig@uks.eu

Prof. Dr. Christian Hannig
Poliklinik für Zahnerhaltung mit Bereich
Kinderzahnheilkunde
Universitätsklinikum Carl Gustav Carus,
Technische Universität Dresden,
Fetscherstraße 74, 01307 Dresden
Christian.Hannig@uniklinikum-dresden.de

Literatur

- Akatsuka R, Matsumura K, Noji M et al.: Evaluation of hydroxyapatite film by powder jet deposition after artificial aging. *Key Eng Mater* 2013;529–530: 229–232
- Akatsuka R, Matsumura K, Noji M, Tsunemoto K, Sasaki K: Evaluation of thermal stress in hydroxyapatite film fabricated by powder jet deposition. *Eur J Oral Sci* 2013;121:504–507
- Akatsuka R, Sasaki K, Zahmaty MSS et al.: Characteristics of hydroxyapatite film formed on human enamel with the powder jet deposition technique. *J Biomed Mater Res B* 2011;98B: 210–216
- Beniash E, Simmer JP, Margolis HC: Structural changes in amelogenin upon self-assembly and mineral interactions. *J Dent Res* 2012;91:967–972
- Bonde JS, Bulow L: One-step purification of recombinant human amelogenin and use of amelogenin as a fusion partner. *Plos One* 2012;7:e33269

6. Busch S: Regeneration of human tooth enamel. *Angw Chem Int Ed* 2004;43: 1428–1431
7. Busch S, Schwarz U, Kniep R: Chemical and structural investigations of biomimetically grown fluorapatite-gelatin composite aggregates. *Adv Funct Mater* 2003;13:189–198
8. Cai J, Zhang Y, Liu P et al.: Generation of tooth-like structures from integration-free human urine induced pluripotent stem cells. *Cell Regeneration* 2013;2:6 (doi:10.1186/2045–9769–2–6)
9. Chen H, Clarkson BH, Sun K, Mansfield JF: Self-assembly of synthetic hydroxyapatite nanorods into an enamel prism-like structure. *J Colloid Interface Sci* 2005;288:97–103
10. Chen H, Sun K, Tang Z, Law RV, Mansfield JF, Clarkson BH: Synthesis of fluorapatite nanorods and nanowires by direct precipitation from solution. *Crystal Growth Design* 2006;6:1504–1508
11. Chen H, Tang Z, Liu J et al.: Acellular synthesis of a human enamel-like microstructure. *Adv Mater* 2006;18: 1846–1851
12. Chen L, Liang K, Li J, Wu D, Zhou X, Li J: Regeneration of biomimetic hydroxyapatite on etched human enamel by anionic PAMAM template in vitro. *Arch Oral Biol* 2013;58:975–980
13. Chung HY, Cheng CL: Microstructure and nanomechanical properties of enamel remineralized with asparagine-serine-serine peptide. *Mater Sci Eng* 2013;C33:969–973
14. Chung HY, Huang KC: Effects of peptide concentration on remineralisation of eroded enamel. *J Mechan Behav Biomed Mater* 2013;28:213–221
15. Chung HY, Li CC: Asparagine-serine-serine peptide regulates enamel remineralisation in vitro. *J Mater Res* 2013; 28:2890–2896
16. Chung HY, Li CC, Hsu CC: Characterization of the effects of 3DSS peptide on remineralized enamel in artificial saliva. *J Mechan Behav Biomed Mater* 2012;6: 74–79
17. Fan Y, Nelson JR, Alvarez JR, Hagan J, Berrier A, Xu X: Amelogenin-assisted ex vivo remineralisation of human enamel: effects of supersaturation degree and fluoride concentration. *Acta Biomater* 2011;7:2293–2302
18. Fan Y, Sun Z, Moradian-Oldak J: Controlled remineralisation of enamel in the presence of amelogenin and fluoride. *Biomaterials* 2009;30:478–483
19. Fan Y, Wen ZT, Liao S et al.: Novel amelogenin-releasing hydrogel for remineralisation of enamel artificial caries. *J Bioactive Compatible Polym* 2012;27: 585–603
20. Fang PA, Conway JF, Margolis HC, Simmer JP, Beniash E: Hierarchical self-assembly of amelogenin and the regulation of biomineralization at the nanoscale. *PNAS* 2011;108:14097–14102
21. Galler KM, D'Souza R: Tissue engineering approaches for regenerative dentistry. *Regen Med* 2011;6:111–124
22. Gómez-Morales J, Iafisco M, Delgado-López JM, Sarda S, Drouet C: Progress on the preparation of nanocrystalline apatites and surface characterization: Overview of fundamental and applied aspects. *Progress Crystal Growth Characterization Mater* 2013;59:1–46
23. Guentsch A, Busch S, Seidler K et al.: Biomimetic mineralization: Effects of human enamel in vivo. *Adv Engin Mater* 2010;12:B571–B576
24. Hannig M, Hannig C: Nanomaterials in preventive dentistry. *Nature Nanotech* 2010;5:565–569
25. Hannig M, Hannig C: Nanotechnology and its role in caries therapy. *Adv Dent Res* 2012;24:53–57
26. Hannig M, Hannig C: Nanobiomaterials in preventive dentistry. In: Ahmed W, Subramani K, Hartsfield JK: *Nanobiomaterials in clinical dentistry*. Elsevier Inc. pp 167–186
27. Hontsu S, Kato N, Yamamoto E et al.: Regeneration of tooth enamel by flexible hydroxyapatite sheet. *Key Engineering Mat* 2012;493–494:615–619
28. Hsu, CC, Chung HY, Yang JM, Shi W, Wu B: Influence of 8DSS peptide on nano-mechanical behaviour of human enamel. *J Dent Res* 2011;90:88–92
29. Huang Z, Newcomb CJ, Bringas P, Stupp SI, Snead ML: Biological synthesis of tooth enamel instructed by artificial matrix. *Biomaterials* 2010;31: 9202–9211
30. Iafisco M, Delgado-Lopez JM, Gomez-Morales J, Hernandez-Hernandez MA, Rodriguez-Ruiz I, Roveri N: Formation of calcium phosphates by vapour diffusion in highly concentrated ionic microdroplets. *Cryst Res Technol* 2011; 46:841–846
31. Iijima M, Moradian-Oldak J: Control of apatite crystal growth in a fluoride containing amelogenin-rich matrix. *Biomaterials* 2005;26:1595–1603
32. Li L, Pan H, Tao J et al.: Repair of enamel by using hydroxyapatite nanoparticles as the building blocks. *J Mater Chem* 2008;18:4079–4084
33. Li L, Mao C, Wang J et al.: Bio-inspired enamel repair via glu-directed assembly of apatite nanoparticles: an approach to biomaterials with optimal characteristics. *Adv Mater* 2011;23: 4695–4701
34. Lussi A, Hellwig E, Klimek J: Fluorides – mode of action and recommendations for use. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2012;122:1030–1042
35. Margolis HC, Beniash E, Fowler CE: Role of macromolecular assembly of enamel matrix proteins in enamel formation. *J Dent Res* 2006;85:775–793
36. Meldrum FC, Cölfen H: Crystallization and formation mechanisms of nanostructures. *Nanoscale* 2010;2:2326–2327
37. Meldrum FC, Cölfen H: Controlling mineral morphologies and structures in biological and synthetic systems. *Chem Rev* 2008;108:4332–4432
38. Mitsiadis TA, Papagerakis P: Regenerated teeth: the future of tooth replacement? *Regen Med* 2011;6:135–139
39. Nishikawa H, Hatanaka R, Kusunoki M, Hayami T, Hontsu S: Preparation of free-standing hydroxyapatite membranes with excellent biocompatibility and flexibility. *Applied Physics Express* 2008;1:088001
40. Onuma K, Yamagishi K, Oyane A: Nucleation and growth of hydroxyapatite nanocrystals for non destructive repair of early caries lesions. *J Cryst Growth* 2005;282:199–207
41. Palmer LC, Newcomb, CJ, Kaltz SR, Spoerke ED, Stupp SI: Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. *Chem Rev* 2008;108:4754–4783
42. Roveri N, Battistella E, Foltran I et al.: Synthetic biomimetic carbonate-hydroxyapatite nanocrystals for enamel remineralisation. *Adv Mater Res* 2008; 47–50:821–824
43. Ryu SC, Lim BK, Sun F, Koh K, Han DW, Lee J: Regeneration of a micro-scratched tooth enamel layer by nanoscale hydroxyapatite solution. *Bull Korean Chem Soc* 2009;30:887–890
44. Sanosh KP, Chu MC, Balakrishnan A, Lee YC, Kim TN, Cho SJ: Synthesis of nano hydroxyapatite powder that simulate teeth particle morphology and composition. *Current Applied Phys* 2009;9:1459–1462
45. Sarikaya M, Tamerler C, Jen AK, Schulten K, Baneyx F: Molecular biomimetics: Nanotechnology through biology. *Nat Mater* 2003;3:577–585
46. Sowmya S, Bumgardener JD, Chennazhi KP, Nair SV, Jayakumar R: Role of nanostructured biopolymers and bioceramics in enamel, dentin and periodontal tissue regeneration. *Polymer Sci* 2013;38:1748–1772
47. Sun Z, Carpioux W, Fan D, Fan Y, Lakshminarayanan R, Moradian-Oldak J: Apatite reduces amelogenin proteolysis by MMP-20 and KLK4 in vitro. *J Dent Res* 2010;89:344–348
48. Tsiourvas D, Tsetsekou A, Kammenou MI, Boukos N: Controlling the formation of hydroxyapatite nanorods with dendrimers. *J Am Ceram Soc* 2011;94: 2023–2029
49. Uskokovic V, Khan F, Liu H et al.: Hydrolysis of amelogenin by matrix metalloprotease-20 accelerates mineralization in vitro. *Arch Oral Biol* 2011;56: 1548–1559
50. Uskokovic V, Li W, Habelitz S: Biomimetic precipitation of uniaxially grown calcium phosphate crystals from full-length human amelogenin sols. *J Bion Engineering* 2011;8: 114–121

51. Wang C, Zhang Y, Wei J, Wei S: Effects of different pH conditions on enamel erosion repair by nano fluorapatite pastes. *J Nanosci Nanotechnol* 2012;12: 7346–7353
52. Wang L, Guan X, Yin H, Moradian-Oldak J, Nancollas GH: Mimicking the self-organized microstructure of tooth enamel. *J Phys Chem C: Nanomater Interfaces* 2008;112:5892–5899
53. Wang X, Xia C, Zhang Z et al.: Direct growth of human enamel-like calcium phosphate microstructures on human tooth. *J Nanosci Nanotechnol* 2009;9: 1361–1364
54. Willigeroth SF, Beneke K, Hannig M, Zimehl R: Preparation strategies for phosphate-based mineral biomaterials. *Progr Colloid Polym Sci* 2002;121: 1–6
55. Wu D, Yang J, Li J et al.: Hydroxyapatite-anchored dendrimer for in situ remineralization of human tooth enamel. *Biomaterials* 2013;34:5036–5047
56. Xie R, Feng Z, Li S, Xu B: EDTA-assisted self-assembly of fluoride-substituted hydroxyapatite coating on enamel substrate. *Cryst Growth Design* 2011;11: 5206–5214
57. Yamagishi K, Onuma K, Suzuki T et al.: Synthetic enamel for rapid tooth repair. *Nature* 2005;433:819
58. Yamamoto E, Kato N, Nishikawa H et al.: Adhesive strength between flexible hydroxyapatite sheet and tooth enamel. *Key Eng Mater* 2013;529–530:522–525
59. Yang X, Wang L, Qin Y et al.: How amelogenin orchestrates the organization of hierarchical elongated microstructures of apatite. *J Phys Chem B* 2010;114: 2293–2300
60. Yang S, He H, Wang L, Jia X, Feng H: Oriented crystallization of hydroxyapatite by the biomimetic amelogenin nanospheres from self-assemblies of amphiphilic dendrons. *Chem Commun* 2011;47:10100–10102
61. Yin Y, Yun S, Fang J, Chen H: Chemical regeneration of human tooth enamel under near-physiological conditions. *Chem Commun* 2009;21:5892–5894
62. Zhan J, Tseng YH, Chan JCC, Mou CY: Biomimetic formation of hydroxyapatite nanorods by a single-crystal-to-single-crystal transformation. *Adv Funct Mater* 2005;15:2005–2010
63. Zhang J, Jiang D, Zhang J, Lian Q, Huang Z: Synthesis of dental enamel-like hydroxyapatite through solution mediated solide-state conversion. *Langmuir* 2010;26:2989–2884
64. Zimehl R, Willigeroth SF, Hannig M, Frahm H: Nano-sized fluorapatite particles by controlled precipitation from heterogeneous systems. *Progr Colloid Polym Sci* 2004;129:110–118