

Regeneration von humanem Zahnschmelz**

Susanne Busch*

Zahnschmelz, die äußere Schutzschicht der Wirbeltierzähne, hat beachtliche Härte und Resistenz gegen physikalische und chemische Angriffe. Die besonderen Eigenschaften des Zahnschmelzes sind die Folge seiner Kompositstruktur:^[1] Schmelz besteht aus nadeligen Kristalliten, die sich in parallel angeordneten Schmelzprismen bündeln und aus substituiertem Hydroxylapatit^[2] und organischen Makromolekülen^[3] aufgebaut sind. Die mikrokristalline Anordnung variiert von Individuum zu Individuum.^[4] Da ausgereifter Schmelz kein lebendiges Gewebe ist, wird er nach Mineralverlusten, etwa durch Karies, nur geringfügig remineralisiert. Defekte im Schmelz und dem darunter liegenden Dentin werden gewöhnlich mit unstrukturierten Materialien wie Amalgam, Keramik oder Polymer-Kompositen gefüllt, um ein Absterben des Zahns zu verhindern.

Es wurde versucht, die Schmelzoberfläche zu härten^[5] oder durch Behandlung mit Fluorid,^[6] metastabilen Calciumphosphat-Lösungen oder Apatitpartikeln zu remineralisieren.^[7–11] Die Behandlung mit Nanopartikeln, die aus Apatit und Gelatine zusammengesetzt sind, führt tatsächlich zu mineralischen Abscheidungen auf der Dentinoberfläche,^[12] doch ist es bis heute nicht gelungen, die komplexe Struktur natürlichen Schmelzes nachzubilden. Hier wird eine In-vitro-Technik vorgestellt, die eine lokale Bildung von geordnetem, schmelzähnlichem Mineral auf der Oberfläche induziert, das eng mit dem Substrat verknüpft ist. Schichten aus parallel angeordneten Fluorapatit-Protein-Kompositen bilden sich bis in den makroskopischen Bereich. Die vorgestellten Resultate eröffnen neue Möglichkeiten im Bezug auf die Remodellierung komplexer biologischer Minerale in vitro sowie die Remineralisation oberflächlicher Schmelzdefekte in vivo. Vorteilhaft ist auch die geringere Säurelöslichkeit von Fluorapatit im Vergleich zu Zahnschmelz.

Grundlegende Untersuchungen zur Mineralisation von Fluorapatit in Gelatine-Gelen führten zu sphärischen Kompositaggregaten, die Zahnschmelz chemisch und morphologisch bemerkenswert ähnlich sind.^[14–16] Die entstehenden nadeligen Kristalle haben, ähnlich dem Zahnschmelz, ein großes Länge-zu-Breite-Verhältnis und enthalten etwa zwei Gewichtsprozent eines organischen Materials (Kompositcharakter^[17]). Die Hauptunterschiede zu Schmelz liegen im Fluoridgehalt der Partikel, der Zusammensetzung der orga-

nischen Komponente und einer geringeren Länge der Kristallite.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde eine Technik entwickelt, die zur Bildung von dichten Fluorapatitschichten auf menschlichem Zahnschmelz führt. Diese Methode basiert auf der Diffusion von Calciumionen aus einer Lösung in ein Glycerin-Gelatine-Gel bei 37°C, das Phosphat- und Fluoridionen enthält und die Oberfläche des Zahns bedeckt. Dieses Gel ist mit einem weiteren phosphatfreien Gel abgedeckt. Um die Mineralisation von Fluorapatit auf der Zahnoberfläche zu induzieren, werden die entsprechend vorbereiteten Proben einer neutralen Calciumlösung ausgesetzt. Gel und Calciumlösung werden periodisch ausgetauscht (siehe Experimentelles). Bereits nach wenigen Tagen hat sich eine homogene, schmelzartige Schicht auf der Oberfläche der Zahnscheibe gebildet. Ihre Dicke ist von der Zahl der Austauschzyklen abhängig.

Abbildung 1a zeigt eine Rasterelektronenmikroskop-(REM)-Aufnahme der Seitenansicht einer Schicht nach fünf Austauschzyklen. Die Zahnscheibe wurde so geschnitten,

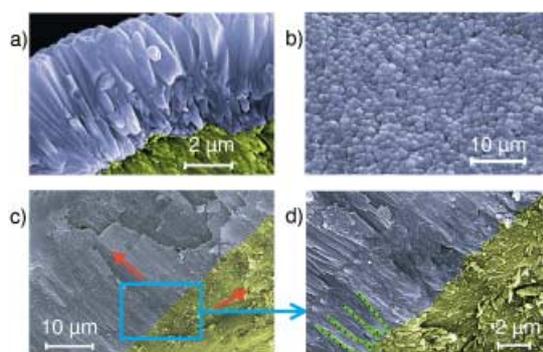


Abbildung 1. Fluorapatit-Schichten auf humanen Zahnscheiben (REM). Zur Verdeutlichung ist die Fluorapatit-Schicht blau, die Schmelz-Schicht gelb eingefärbt. a) Seitliche Ansicht von Schmelz und Fluorapatit-Schicht nach dem fünften Austauschzyklus des Gels. b) Aufsicht auf eine Schicht nach dem zehnten Austauschzyklus. Ein dichter Rasen homogener Kristalle ist zu erkennen. Da die Kristallite der Oberfläche zuletzt mineralisieren, haben sie noch nicht die Morphologie der tieferliegenden Schichten ausgebildet. c) Seitenansicht vom Schmelz und der gebildeten Fluorapatit-Schichten nach dem 36. Austauschzyklus des Gels. Die dichte, einheitliche Schicht ist etwa 35 μm dick was einer Wachstumsgeschwindigkeit von etwa 500 nm/Tag entspricht. Die Haupttrichtung der Kristallorientierung ist durch rote Pfeile angezeigt. d) Nahaufnahme der Grenzregion zwischen natürlichem Schmelz und Fluorapatit. Links unten: Schmelzprismenartige Bündel des Fluorapatits sind markiert.

das die langen Achsen der Schmelzprismen senkrecht zur Scheibenoberfläche orientiert sind. Daher sind die Schmelzkristalle in dem gezeigten Aufbruch von der Seite zu sehen. Die Orientierung von Schmelzkristallen und kristallisiertem Fluorapatit stimmt weitgehend überein. Die neue Schicht mit einer Dicke von 5 μm hat ihre endgültige Morphologie noch nicht erreicht. Die Knoop-Härte wurde zu 45 (± 30) KHN bestimmt (Dentin 50 (± 30) KHN).^[18] Nach dem zehnten Austauschzyklus (Abbildung 1b) sehen die Fluorapatit-Schichten dem Zahnschmelz bereits ähnlicher und zeigen etwa die gleiche Knoop-Härte von 400 (± 100) KHN wie

[*] Dr. S. Busch

Max-Planck-Institut für Chemische Physik fester Stoffe
Nöthnitzer Straße 40, 01187 Dresden (Deutschland)
Fax: (+49) 351-46463002
E-mail: busch@cpfs.mpg.de

[**] Mein Dank gilt Prof. Rüdiger Kniep, Dr. Oliver Hochrein, Prof. Jürg Hulliger und Jana Buder für ihre Unterstützung, sowie Dr. Jens Messerschmidt für die frischen Zahnproben und Dr. Raul Cardoso für die Durchführung der Röntgenbeugungsexperimente.

Zahnschmelz mit $400(\pm 50)$ KHN. Eine dichte Schicht von gleichartigen Kristalliten hat sich gebildet. Im Unterschied zum menschlichen Zahnschmelz erscheint die hexagonale Grundfläche der Prismen nicht gestaucht, sondern regelmäßig wie die Fluorapatitkristalle im Schmelz des Haifischzahns.^[20]

Abbildung 1c zeigt eine REM-Aufnahme einer Probe nach dem 36. Austausch, wobei die Schmelzprismen senkrecht zu den langen Achsen der Apatitnadeln orientiert sind. Diese Abbildung zeigt, dass sich die neu gebildeten Kristalle, unbeeinflusst von der Schmelzprismenorientierung, größtenteils senkrecht zur Oberfläche des Substrates anordnen. Die Wachstumsgeschwindigkeit beträgt ungefähr 500 nm/Tag. Eine Nahaufnahme der Grenzschicht Schmelz/Fluorapatit ist in Abbildung 1d zu sehen. Habitus und Durchmesser von beiden Kristalltypen sind ähnlich. Obwohl die Kristallorientierung nicht übereinstimmt, ist der Übergang zwischen Schmelz und Fluorapatit nahtlos. Wie im natürlichen Schmelz können die Fluorapatit-Kristalle innerhalb dieser Schichten teilweise gebündelt vorliegen. Die Bildung von vorwiegend parallel orientierten Fluorapatit-Kristallen wurde durch Röntgendiffraktometrie bestätigt. Wegen des hauptsächlich senkrechten Auswachsens und der bevorzugt parallelen Orientierung der Kristallite sind besonders die Reflexe mit den Indices 002, 004, 006 und 116 enorm verstärkt (Abbildung 2a). Die Verstärkung der Reflexe ist auch im Beugungsdiagramm einer Schmelzoberfläche zu sehen (Abbildung 2b) und resultiert aus der vorwiegend senkrechten Orientierung von Schmelzkristallen relativ zu der Zahnoberfläche.^[21]

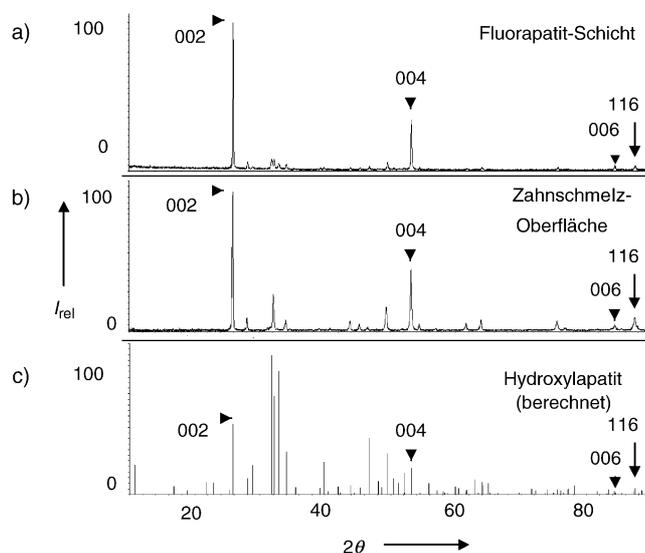


Abbildung 2. a) Röntgenpulverdiagramm einer Fluorapatit-Schicht nach dem 36. Austauschzyklus. b) Röntgenpulverdiagramm einer humanen Schneidezahnoberfläche. c) Ein berechnetes Röntgenpulverdiagramm von hexagonalem Hydroxylapatit zum Vergleich.^[29] Sowohl die Fluorapatit-Schicht als auch der Zahnschmelz zeigen infolge der ausgeprägten Parallelorientierung der Kristallite eine starke Überhöhung bestimmter Reflexintensitäten. Die Positionen in den Röntgenpulverdiagrammen von Fluorapatit und Hydroxylapatit sind im Wesentlichen identisch. Im Fall des Fluorapatits ist die Position der Reflexe, aufgrund der kleineren Gitterparameter, lediglich leicht in Richtung größerer Beugungswinkel verschoben.^[30]

Im Folgenden werden die grundlegenden Prinzipien der verwendeten Technik genauer erläutert und eine Hypothese vorgestellt, die den Mechanismus der beobachteten Mineralisation im Ansatz erklärt. Um die Reaktion bei Körpertemperatur durchführen zu können, wird die Gelatine mit Glycerin angereichert, sodass sich die Erweichungstemperatur auf 40°C erhöht.^[22] Die direkte Diffusion von Calciumionen in ein phosphathaltiges Gel würde zu ausgeprägter Präzipitation von Apatit an der Grenzfläche von Flüssigkeit und Gel führen. Daher wird eine Schutzschicht, die nicht mit Phosphat und Fluorid angereichert ist, eingeführt. Das vierschichtige System Zahn-Phosphatgel-Schutzgel-Calciumlösung wird bei 37°C aufbewahrt. Bei pH 5 ist die Mobilität der Phosphationen im Gel geringer als die der Calciumionen. Weder bei neutralen oder alkalischen pH-Werten noch bei einem Austausch von Phosphat-/Fluorid- und Calciumionen funktioniert das Prinzip der Schutzschicht. Um das beobachtete Kristallwachstum zu erklären wird folgende Hypothese vorgeschlagen: Positiv geladene Ammoniumgruppen der Gelatine gehen vermutlich salzartige Bindungen mit den Phosphatgruppen der Zahnoberfläche und mit den Hydrogenphosphationen im Gel ein. Wechselwirkungen zwischen den sauren Seitengruppen der Polypeptide und den Calciumionen spielen aufgrund des pK_s -Wertes von Gelatine (≈ 9 ^[23]) keine große Rolle. Infolgedessen ist die Diffusion der Calciumionen in Richtung der Zahnoberfläche schneller als die Bewegung der Phosphationen zur Grenzfläche Gel/Flüssigkeit. Auf höhere Beweglichkeit der Calciumionen im Gel wurde auch aus Ergebnissen von Doppeldiffusions-Experimenten geschlossen: Der größte Anteil des gebildeten Fluorapatits wurde auf der Seite des Gels gefunden, die der Phosphatlösung näher lag.^[24] Die begünstigten Mineralisationsbedingungen in der Nähe der Zahnoberfläche induzieren eine heterogene Keimbildung.

Die Untersuchung von Zahnscheiben mit unterschiedlichen Orientierungen der Schmelzprismen relativ zur Oberfläche ergeben grundsätzlich weitgehend senkrecht aufgewachsene Fluorapatitnadeln. Dies gilt auch für Schichten, die Vertiefungen in vollständigen Zähnen bedecken, nachdem diese wie die Zahnscheiben behandelt wurden (Abbildung 3). Ein Zusammenhang zwischen der Diffusionsrichtung der Calciumionen mit der Wachstumsrichtung kann ausgeschlossen werden. Bei pH 5 binden die N-terminalen Gruppen der gestreckten Polypeptide vermutlich an die Phosphatgruppen

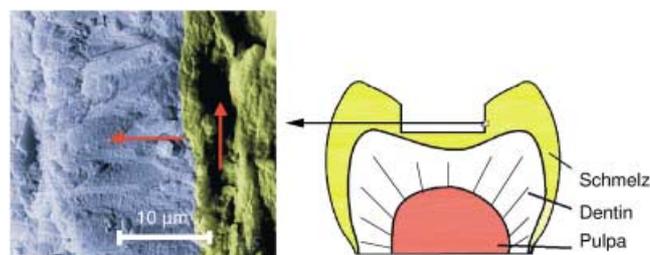


Abbildung 3. Schematische Darstellung eines Zahns (ohne Zahnwurzel) mit Vertiefung und markiertem Bereich der daneben gezeigten REM-Aufnahme einer bewachsenen Seitenwand. Zur Verdeutlichung ist die Fluorapatit-Schicht blau, die Schmelz-Schicht gelb eingefärbt. Die Hauptorientierung der Kristalle ist durch rote Pfeile angezeigt.

der Zahnoberfläche, wobei sich ihre langen Achsen annähernd senkrecht zur Oberfläche orientieren. Bei der Keimbildung von Knochenmineral in der kollagenreichen extrazellulären Matrix sind die Keimbildungszentren in Bereichen hoher Polarität am wahrscheinlichsten. Dies ist in den Lücken- und Überlappungszonen des Kollagens sowie in allen Bereichen hoher Ladungsdichte auf der Kollagenfaser der Fall.^[25] Da sich die Aminosäuresequenzen von Kollagen und Gelatine stark ähneln, sind im Fall der Gelatine die gleichen polaren Regionen als Keimbildungszentren zu erwarten. Lücken und Überlagerungsbereiche, die aus der typischen Quartärstruktur der tripelhelicalen Kollagenmoleküle resultieren, wie sie im nativen Knochenkollagen auftreten, spielen in der denaturierten Gelatine vermutlich keine bedeutende Rolle. Bei der Gelatine liegen die Keimbildungsstellen mutmaßlich an den Enden oder zwischen den parallelen Peptiden in der Nähe geladener Aminosäurereste. In diesen Bereichen wird, durch geladene N-Termini und Seitengruppen von Arg, His und Lys (0.8% der Aminosäuren in Kollagen Typ I^[26]), eine hohe Konzentration von immobilisierten Hydrogenphosphationen erwartet. Der pH-Anstieg infolge der Diffusion der neutralen CaCl₂-Lösung vermindert das Löslichkeitsprodukt von Apatit. Die Mineralisation wird ausgelöst, und die Kristallite orientieren sich parallel zu den organischen Molekülen (Abbildung 4).

Untersuchungen an Fluorapatit-Komposit-Aggregaten, die sich unter Bedingungen der Doppeldiffusion gebildet haben, lassen darauf schließen, dass sich die langen Achsen von Fluorapatit und Gelatinefasern bevorzugt parallel orientieren,^[17] wie es auch bei Apatitkristallen und Proteinen im Zahnschmelz der Fall ist.^[27] Das induzierte senkrechte Aufwachsen von Fluorapatit ist für eine zahnmedizinische Anwendung von Vorteil. Schmelzprismen sind immer so orientiert, dass ihre langen Achsen senkrecht zur Zahnoberfläche verlaufen.^[21] Somit sind die Fluorapatitkristallite in der gleichen Richtung orientiert, wenn sie auf einer natürlichen Zahnoberfläche aufwachsen.

Die Ähnlichkeit des natürlichen und des biomimetisch gewachsenen Minerals zeigt, dass der experimentelle Aufbau ein interessantes Modell nicht nur für die Mineralisation von Zahnschmelz, sondern auch für die Biomineralisation im Allgemeinen ist. Wie im lebendigen System hat sich ein Komposit mit gleichmäßiger Partikelgröße, Morphologie und Orientierung gebildet.^[28] Die verwendete Technik hat ein gewisses Potenzial für die Zahnheilkunde, da sie einen möglichen Weg eröffnet, oberflächlich demineralisierte Zähne zu remineralisieren. Darüber hinaus kann erwartet werden, dass eine stabile Schicht aus Fluorapatit auf dem Zahnschmelz einen Schutz gegen Karies bietet.

Experimentelles

Humane Backenzähne werden mit einer Diamantsäge in Scheiben (Dicke ca. 500 µm) geschnitten; dabei werden unterschiedliche Orientierungen der Schmelzprismen relativ zur Schnittfläche realisiert. Die Scheiben werden mit EtOH entfettet, mit 30 proz. (w/w) H₃PO₄ angeätzt und anschließend mit entionisiertem Wasser gewaschen. Eine Mischung aus 8.6 g Gelatine (Schweineschwarte, 300 Bloom, sauer hydrolysiert), 8.2 g 85 proz. Glycerinlösung, 7.3 g H₂O, 1.8 mL 2 M NaOH und 2.7 mL 2 M AcOH (Puffersystem), 13.8 mg

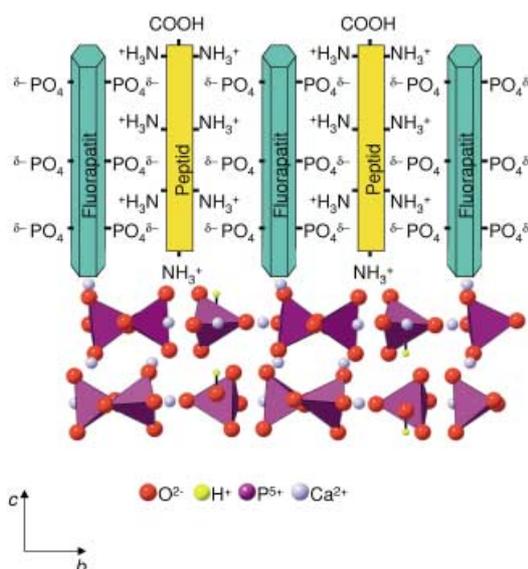


Abbildung 4. Hypothetisches Modell für die Orientierung gelatinöser Makromoleküle an einer Apatitoberfläche (Zahnschmelz) und die frühe Mineralisation von Fluorapatit. Phosphationen werden durch Tetraeder repräsentiert. Zur Vereinfachung werden alle organischen Moleküle als identisch angenommen. Die Größenverhältnisse sind fiktiv, da die exakte Ausdehnung der aktiven Moleküle und des initialen Fluorapatit-Keimes unbekannt sind. Epitaktische Zusammenhänge zwischen Apatit und Gelatine werden nicht diskutiert, da die Überstruktur des gelatinösen Teils nicht bekannt ist. Phosphationen auf der apatitischen Schmelzoberfläche erscheinen als besonders attraktiv für die positiv geladenen N-terminalen Gruppen der Peptide, die sich dann senkrecht zum Substrat und parallel zueinander anordnen können. Die polaren Bereiche des Moleküls ziehen ihrerseits Ionen an, welche zu Apatit mineralisieren. Orientiert durch die Templatwirkung der Gelatine resultiert das senkrechte Aufwachsen der Fluorapatit-Kristalle. Nur die vermutete Mineralisation zwischen den organischen Molekülen ist gezeigt. Eine Wechselwirkung der Calciumionen mit den Carboxy-Gruppen wird nicht berücksichtigt, da diese bei dem pH-Wert der Reaktion weitgehend ungeladen vorliegen.

NaF und 755.2 mg Na₂HPO₄ wird vorbereitet, sowie eine weitere Mischung aus 8.6 g Gelatine, 8.2 g 85 proz. Glycerinlösung und 11.8 g H₂O. Nach 30 min Quellen werden die Mischungen auf dem siedenden Wasserbad in homogene, dickflüssige Gele überführt. Die unterschiedlichen Zahnscheiben werden zunächst mit einer 2 mm dicken Schicht des Phosphat-Gels bedeckt und danach mit dem ionenfreien Gel überschichtet. Nach Erstarren des Gels wird das System 20–60 min mit einer neutralen 0.13 M CaCl₂-Lösung überschichtet. Diese wird im Anschluss verworfen. Die Zahnscheiben werden bei 37°C im Wasserbad aufbewahrt. Die Einwirkung der CaCl₂-Lösung wird alle 24 h wiederholt, die Gele werden alle 48 h ausgetauscht. Um das Schichtenwachstum auf vollständigen Zähnen zu untersuchen, werden Backenzähne mit einer 1.0 mm tiefen und 2.0 mm breiten Kavität ausgestattet. Die Vertiefung wird mit den Gelen gefüllt und die CaCl₂-Lösung wie oben beschrieben zugefügt. Die röntgenographische Untersuchung der Fluorapatit-Schicht erfolgt durch Pulverdiffraktometrie (STOE STADI P) in Reflexionsgeometrie (Ca_{Kα1}, Ge-Monochromator).

Eingegangen am 23. Juni 2003,
veränderte Fassung am 30. Oktober 2003 [Z52183]

Stichwörter: Bioorganische Chemie · Biomineralisation · Fluorapatit · Kompositstrukturen · Zahnschmelz

-
- [1] S. Mann, *Nature* **1988**, 332, 119–124.
- [2] E. D. Eanes, *J. Dent. Res.* **1979**, 58B, 829–836.
- [3] C. Robinson, S. J. Brookes, R. C. Shore, J. Kirkham, *Eur. J. Oral Sci.* **1998**, 106, 282–291.
- [4] G. Cevc, P. Cevc, M. Schara, U. Skaleric, *Nature* **1980**, 286, 425–426.
- [5] T. Koulourides, H. Cueto, W. Pigman, *Nature* **1961**, 189, 226–227.
- [6] T. Aoba, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **1997**, 8, 136–153.
- [7] S. R. Brailsford, B. Shah, D. Simons, S. Gilbert, D. Clark, I. Ines, S. E. Adams, C. Allison, D. Beighton, *J. Dent. Res.* **2001**, 80, 1828–1833.
- [8] E. Lynch, A. Baysan, *Caries Res.* **2001**, 35, 60–64.
- [9] G. Dolchi, International Patent 00/03747, **2000**.
- [10] K. Kropf, H. Dolhaine, M. Marcel, U. Brüninghaus, A. Weiss, U. Schrörken, L. Kintrup, A. Pastura, P. Wülknitz, R. Kniep, B. Eschen, M. Meinders, H. Laska, S. Müllner, International Patent 01/01930A2, **2001**.
- [11] W. Wiedemann, International Patent 98/10736, **1998**.
- [12] G. Schechner, **2002**, persönliche Mitteilung.
- [13] S. Busch, R. Kniep, WO 10223157.5, **2002**.
- [14] S. Busch, H. Dolhaine, A. DuChesne, S. Heinz, O. Hochrein, F. Laeri, O. Podebrad, U. Fietze, T. Weiland, R. Kniep, *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999**, 1643–1653.
- [15] S. Busch, U. Schwarz, R. Kniep, *Chem. Mater.* **2001**, 13, 3260–3271.
- [16] R. Kniep, S. Busch, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2788–2791; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2624–2626.
- [17] S. Busch, U. Schwarz, R. Kniep, *Adv. Funct. Mater.* **2003**, 13, 189–198.
- [18] Y. Hosoya, S. J. Marshall, L. G. Watanabe, G. W. Marshall, *Oper. Dent.* **2000**, 25, 81–89.
- [19] K. Collys, D. Slop, R. Cleymaet, D. Coomans, Y. Michotte, *Dent. Mater.* **1992**, 8, 332–335.
- [20] N. Kemp, J. H. Park, *Arch. Oral Biol.* **1974**, 19, 633–644.
- [21] R. J. Radlanski, W. Seidl, G. Steding, A. Jäger, *Anat. Anz.* **1998**, 168, 405–412.
- [22] T. Leopold, *Z. Körperpflegemittel-, Parfümerie-, Riechstoff- und Aerosol-Industrie* **1990**, 16, 639–645.
- [23] I. Tomka, *Chimia* **1983**, 37, 534–540.
- [24] S. Busch, Dissertation, TU Darmstadt, **1998**.
- [25] M. E. Maitland, A. L. Arsenault, *Calcif. Tissue Int.* **1991**, 48, 341–352.
- [26] P. I. Rose in *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, Wiley, London, **1987**.
- [27] *Handbook of Microscopic Anatomy: Teeth* (Hrsg.: A. Oksche, L. Vollrath), Springer, Berlin, **1989**.
- [28] A. L. Bianconi, J. Lin, A. R. Strzelecki, *Nature* **1991**, 349, 315–317.
- [29] K. Sudarsanan, R. A. Young, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1982**, 24, 1968–2038.
- [30] K. Sudarsanan, P. E. Mackie, R. A. Young, *Mater. Res. Bull.* **1971**, 7, 1331–1338.
-