

Aus der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde  
der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr.-Ing. R. Thull

**Antimikrobiell wirksame Zemente  
aus Tetracalciumphosphat und alkalidotierten Calciumphosphaten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt

von  
Oliver Knappe  
aus Westerstede

Würzburg, März 2006

**Referent:** Prof. Dr.-Ing. R. Thull

**Korreferent :** Prof. Dr. U. Schlagenhauf

**Dekan:** Prof. Dr. Georg Ertl

**Tag der mündlichen Prüfung: 13.09.2006**

**Der Promovend ist Zahnarzt.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KENNTNISSTAND</b> .....	<b>5</b>
2.1 Antiinfektiva .....	5
2.1.1 Wirkungsmechanismen und Spektren einzelner Antibiotika .....	7
2.1.2 $\beta$ -Lactamantibiotika .....	8
2.1.3 Makrolide .....	9
2.1.4 Lincosamide .....	10
2.1.5 Aminoglycoside .....	10
2.1.6 Tetracycline .....	11
2.2 Antimikrobielle Dentalzemente .....	12
2.2.1 Calciumhydroxid .....	12
2.2.2 Zinkoxidphosphatzemente .....	13
2.2.3 Carboxylatzemente .....	13
2.2.4 Glasionomerzemente (GIZ) .....	14
2.3 Calciumphosphatzemente (CPC) .....	15
2.3.1 Antimikrobielle Calciumphosphate .....	19
<b>3. MATERIAL UND METHODE</b> .....	<b>21</b>
3.1 Zemente .....	21
3.2 Abbindeigenschaften alkalischer Calciumphosphatzemente .....	22
Prüfkörperherstellung für den Agar-Diffusionstest .....	23
3.3 Bakterienkulturen .....	24
3.3.1 Nährmedienherstellung .....	27
3.3.2 Agarkulturplatten .....	28
3.4 Versuchsdurchführung .....	30
3.4.1 Bestimmung der Hemmhofgröße .....	30
3.4.2 pH-Wert-Messungen am Prüfkörper und im Agar .....	32
<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	<b>34</b>
4.1 Abbindeigenschaften alkalischer Calciumphosphate .....	34
4.2. Bestimmung der Hemmhofgrößen .....	36
4.2.1 Zusatz von gemahlenem TTCP .....	42
4.2.2 Variation der Mahldauer bei TTCP .....	45
4.3 pH-Werte der Prüfkörper und im Agar .....	47

<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>52</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>58</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>59</b>

## Abkürzungen

$\alpha$ -TCP	$\alpha$ -Tricalciumphosphat
$\beta$ -TCP	$\beta$ -Tricalciumphosphat
CaO	Calciumoxid
CaP	Calciumphosphat(e)
CDHA	calciumdefizitärer Hydroxylapatit
CPC	Calciumphosphat Zement
CPP	Calciumkaliumphosphat
CPSP	Calciumkaliumnatriumphosphat
CSD	critical size defect
CSP	Calciumnatriumphosphat
DCPA	Calciumhydrogenphosphat (Monetit)
DCPD	Calciumhydrogenphosphat Dihydrat (Bruschit)
GIZ	Glasionomerzement
HA	Hydroxylapatit
MA	mechanisch aktiviert(e)
MLS	Makrolid-, Lincosamid- und Streptogramin-Gruppe
OCP	Octacalciumphosphat
PGA	Polyglycolic acid
PLA	Polylactic acid
REM	Rasterelektronenmikroskopie
PLR	Pulver- / Flüssigkeits-Verhältnis
REM	Rasterelektronenmikroskopie
TCP	Tricalciumphosphat
TTCP	Tetracalciumphosphat
XRD	X-ray diffraction (Röntgendiffraktometrie)



## 1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Seit der Einführung von Calciumhydroxid in die Zahnheilkunde 1930 durch Hermann [1], gelten Calciumhydroxidzemente und -pasten als die am weitesten verbreiteten Therapeutika für die medikamentöse Wurzelkanaleinlage in der Endodontie [2, 3] sowie als Mittel der Wahl bei der direkten oder indirekten Überkappung der Pulpa. Außerdem findet es, vor allem im skandinavischen Raum, Verwendung bei der Vitalamputation im Milchgebiss [4, 5]. Der hohe antimikrobielle Effekt des Calciumhydroxids ist primär zurückzuführen auf den hohen pH-Wert von etwa 12,5 im Kontakt mit dem Körperelektrolyten. Ein pH-Wert  $>9,5$  in der Umgebung wird von den meisten Bakterienstämmen nicht toleriert und führt zur Schädigung der Zellmembran, zur Denaturierung von Proteinen und zum Absterben der Mikroorganismen. Zusätzlich wirken die meisten Calciumhydroxidpräparate antientzündlich, dies zeigt eine deutliche Reduzierung der periapikalen Entzündungsparameter nach Applikation von Calciumhydroxid-Werkstoffen [4]. Die Pufferkapazität gegenüber säurehaltigen Zementen, wie zum Beispiel Zinkoxidphosphatzemente, die oft zum Zementieren von Kronen- und Brückenrekonstruktionen verwendet werden, sowie die geringe thermische Leitfähigkeit, sind weitere positive Eigenschaften von Calciumhydroxid. Im Bereich der Zahnerhaltungskunde hat sich gezeigt, dass Calciumhydroxid sich nicht nachteilig auf den Polymerisationsgrad der verwendeten Komposite bzw. Kompomere ausgewirkt hat, wie dies für Zemente auf Eugenolbasis bekannt ist [6].

Calciumhydroxid zeigt nicht nur Vorteile, wenn es um die biologische Verträglichkeit geht, ein wesentlicher Nachteil ist die induzierte Pulpanekrose mit gleichzeitiger Entzündung in den ersten Tagen nach der Applikation [7], hiernach bildet sich an der betroffenen Stelle der Pulpa atubuläres Tertiärdentin. Die Bildung dieser Tertiärdentinbrücke geht einher mit einem Volumenverlust bezüglich der Pulpakammer, welcher langfristige biologische Auswirkungen auf das Pulpensystem hat [8]. Aufgrund der geringen Endhärte, der nachgewiesenen Schrumpfung während der Aushärtphase und des hohen Löslichkeitsverhaltens ist Calciumhydroxid nur als temporäre Versorgung, besonders in der Endodontie, anzusehen. Ein sicherer und dichter Verschluss des Wurzelkanalsystems, wie er in der Endodontie gefordert wird,

um eine Reinfektion des periapikalen Parodonts oder des Wurzelkanalsystems zu verhindern, kann mit Calciumhydroxid nicht gewährleistet werden.

Die geringe mechanische Stabilität und die vergleichsweise hohe Löslichkeit von Calciumhydroxid sind Ansatzpunkte für die Entwicklung alternativer Werkstoffe, beispielsweise auf Basis von Hydroxylapatit-bildenden Calciumphosphat-Zementen (CPC). Erste, abbindefähige Calciumphosphatzemente wurden in den frühen 80er Jahren durch Chow und Brown [9] und LeGeros et al. [10] beschrieben. Sie zeigten, dass die Kombination verschiedener Calciumorthophosphate nach dem Anmischen mit Wasser bzw. mit wässrigen Elektrolytlösungen zu Hydroxylapatit geringer Kristallinität führt. Eine dreidimensionale Verfilzung der Calciumorthophosphate resultiert in einer Aushärtung der Paste. Aufgrund dieser Eigenschaft wurden CPC schon früh als potentielles Knochenersatzmaterial erkannt. Im Vergleich zu anderen klinisch in Einsatz befindlichen Knochenersatzwerkstoffen, beispielsweise Polymethylmethacrylate oder autogenen sowie allogenen Transplantaten, zeigten Calciumphosphate die geringsten Nachteile bezüglich der hohen biologischen Anforderungen, die an diesen Werkstoff gestellt werden. Von besonderem Interesse sind hierbei die Korrosions- und chemische Stabilität [11] des Werkstoffes, ohne dass dieser eine lokal zelluläre Reaktion mit der Ausbildung von Gewebnekrosen [12] hervorruft bzw. eine kanzerogene Wirkung hat. Das Material sollte keine Antigenität zeigen [13] oder eine entzündliche Reaktion auslösen, und zudem über eine Bioaktivität [14] und ausreichende mechanische Stabilität in Hinblick auf das Implantationsgebiet [15] verfügen. Calciumphosphat-Zemente zeichnen sich durch hervorragende Biokompatibilität und freie Formbarkeit aus [10]. Am Implantationsort ließ sich ein Ersatz von Calciumphosphat-Zementen durch einsprossenden Knochen beobachten. Im Gegensatz zu anderen Knochenersatzmaterialien findet somit weder eine Resorption ohne Knochenersatz, noch ein Verbleib von Calciumphosphat-Zementen als langfristig inerte Implantate im Anwendungsgebiet statt [16]. Hinsichtlich der mechanischen Eigenschaften weisen die auf Calciumphosphat basierenden Knochenersatzmaterialien ein dem menschlichen Knochen vergleichbares Verhalten bezüglich ihrer Druckfestigkeit auf, sind jedoch in der Biege- und Zugfestigkeit diesem unterlegen. Der Abbinde Mechanismus von Calciumphosphatzementen folgt jeweils einem Lösungs-/Präzipitationsmechanismus vergleichbar mit auf Calciumsulfat basierenden Werkstoffen. Die Reaktivität von CaP

in Zementen ist hierbei stark abhängig von der Lösungsrate der Werkstoffe, die durch Einstellung definierter Partikelgrößen durch Mahlung beeinflusst wird. Daneben hat der Mahlvorgang Auswirkungen auf die Kristallinität der Verbindungen. Der Prozess der mechanischen Aktivierung von Calciumphosphat-Zementen durch hochenergetisches Mahlen in einer Kugelmühle zeigt, dass neben der Partikel- auch die Kristallitgröße des Werkstoffes verringert wird [17, 18] und dies in einer höheren Löslichkeit dieser partiell amorphisierten Calciumphosphate resultiert. Die Geschwindigkeit der Abbindereaktion konnte durch die mechanische Aktivierung gesteigert werden, zusätzlich wurde das Löslichkeitsverhalten der Zemente ebenfalls durch das Mahlen verbessert.

In verschiedenen Arbeiten der letzten Jahre finden sich Ansätze zur Modifikation von Calciumphosphatzementen. Zielstellungen waren etwa eine Steigerung der mechanischen Eigenschaften durch Verringerung der Porosität [19] oder Faserverstärkung [20], die Entwicklung injizierbarer Zemente [21-24] oder die Verwendung von Calciumphosphat-Zementen zur kontrollierten Freisetzung von Wirkstoffen, wie Wachstumsfaktoren [25, 26] oder Antibiotika [27-30]. Die Zugabe von Antibiotika führte zu antimikrobiell wirksamen Werkstoffen, allerdings ist dies mit der Gefahr einer Resistenzbildung bei Freisetzung zu geringer Dosen verbunden. Alternativ erfolgte die Entwicklung bakterizider CPC durch Einstellungen eines stark basischen pH-Werts der Zementpaste nach Zusatz von Calciumhydroxid zum Zementpulver [30]. Die Wirksamkeit der Modifikationen erreichte maximal die eines reinen Calciumhydroxids.

Ziel dieser Arbeit war es, antimikrobielle hochwirksame CPC durch Einsatz stark alkalischer Reaktanden darzustellen. Als Ausgangswerkstoffe dienten Tetracalciumphosphat sowie alkalidotierte CaP, wie Calciumnatriumphosphat (CSP,  $\text{CaNaPO}_4$ ), Calciumkaliumphosphat (CPP,  $\text{CaKPO}_4$ ) oder Calciumkaliumnatriumphosphat (CPSP,  $\text{Ca}_2\text{K,Na(PO}_4)_2$ ). Die Verbindungen wurden in einem ersten Schritt mechanisch durch Kugelmahlung aktiviert, um abbindefähige Einkomponenten-Zemente zu erhalten. Anschließend wurden die antimikrobiellen Eigenschaften über einen Zeitraum von zehn Tagen gegenüber drei verschiedenen Bakterienkulturen und einem Pilzstamm getestet. Hierzu wurde der antimikrobielle Effekt unter Angabe der relativen Hemmhofgröße im Agar-Diffusionstest bestimmt

---

und mit ortsabhängigen Änderungen des pH-Werts der Agarnährböden in Korrelation gebracht. Als Referenzprobe diente bei allen Versuchsdurchläufen ein handelsüblicher und im klinischen Einsatz befindlicher Calciumhydroxidzement. Als Anwendungsgebiete der neu entwickelten Werkstoffe wäre ein Einsatz in der Endodontie als medikamentöse Wurzelkanaleinlage oder bei der direkten oder indirekten Überkappung der Pulpa denkbar.

## 2. KENNTNISSTAND

### 2.1 Antiinfektiva

Die ersten in der Literatur genannten antimikrobiellen Substanzen waren die Rinde der *Chinchona* (Chinarinde, „Chinin“), die um 1600 vom Augustinermönch Antonio de la Calancha als Mittel zur Fieberbekämpfung bei Malaria [31] eingesetzt wurde, und die Wurzel des Halbstrauches *Uragoga Ipeca-duanha*, die 1698 von Christoph F. Kneussel als Therapeutikum gegen die Amöbenruhr [31] beschrieben wurde. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde von Paul Ehrlich der Begriff „Chemotherapie“ eingeführt [32], hierunter wird die selektive Abtötung von Keimen ohne Schädigung des Organismus verstanden. Der oft verwendete Terminus der Antibiotika (griechisch: anti: gegen; biotikos: zum Leben gehörig), der sich aus ihrer Entstehung in unterschiedlichen Mikroorganismen, wie Bakterien, Pilze, Flechten und Algen, ableitet, wird gegenwärtig unter dem Oberbegriff Chemotherapeutikum geführt, unter dem auch synthetische Verbindungen eingeordnet werden [33].

Von großer Bedeutung für die weitere Entwicklung der Antiinfektiva war die Entdeckung der antibakteriellen Aktivität des aus dem *Penicillium notatum* gewonnenen Naturstoffes Penicillin durch Alexander Fleming 1929 [32-34]. Von H.W. Florey und E. Chain entwickelte Methoden zur Gewinnung größerer Penicillinmengen aus den Flemingschen *Penicillium*kulturen ermöglichten ab 1940 einen breiteren Einsatz des Antibiotikums. Weitere wichtige Daten in der Entwicklung der Antiinfektiva war die Entdeckung der Sulfonamide 1935 durch Gerhard Domagk [35] und des Streptomycins, das 1944 als erstes Aminoglycosid aus den Kulturfiltraten von *Streptomyces griseus* von S.A. Waksman isoliert wurde [33]. Seit 1948 wurden, basierend auf den Forschungsarbeiten von G. Brotzu, die Cephalosporine entwickelt und ab dem Ende der 50er Jahre fanden in der Veterinärmedizin die ersten Makrolid-Antibiotika ihre Anwendung [36].

Die Entdeckung des Penicillins durch Fleming war der Beginn einer systematischen Suche nach weiteren Antibiotika, die heutzutage als weitgehend abgeschlossen gilt. Die Bestrebungen heutiger Forschungen beziehen sich auf chemische Modifikationen der natürlichen Antibiotika und deren Optimierung für therapeutische

Zwecke [35]. Eine Übersicht über die in der Medizin am häufigsten eingesetzten Antinfektiva [37] geben Tabelle 1 und 2 wieder.

**Tabelle 1:** Auflistung der wichtigsten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika

Gruppe	Untergruppe	Wichtige Verbindungen
Penicilline	Benzylpenicillin	Penicillin G
		Benzathin-Penicillin
	Phenoxymethylpenicilline	Penicillin V
	Aminopenicilline	Amoxicillin
		Ampicillin
		Azidocillin
	Penicilline und $\beta$ -Lactamase-Hemmer	Amoxicillin/Clavulansäure
		Ampicillin/Sulbactam
	Isooxazolylicilline	Dicloxacillin
		Oxacillin
Flucloxacillin		
Ureidopenicilline	Piperacillin	
	Mezlocillin	
Cephalosporine	1. Generation	Cefazolin
	2. Generation	Cefotiam
		Cefuroxim
	3. Generation	Cefmenoxim
		Cefotaxim
	4. Generation	Cefepim
		Cefpirom
	Cephamyne	Cefotetan
		Cefoxitin
	Orale Cephalosporine	Cefaclor
Cefalexin		
Cefuroxim/-axetil		
Monobactame		Aztreonam
$\beta$ -Lactamase-Hemmer		Sulbactam
Carbapeneme		Meropenem
		Ertapenem

**Tabelle 2.2:** Auflistung der wichtigsten Chemotherapeutika

Gruppe	Untergruppe	Wichtige Substanzen
MLS - Gruppe	Makrolide	Erythromycin
		Clarithromycin
		Roxithromycin
	Lincosamide	Clindamycin
	Streptogramine	Dalfopristin
Aminoglycoside	Ältere Aminoglycoside	Streptomycin
		Neomycin
	Neuere Aminoglycoside	Amikacin
		Gentamicin

Gruppe	Untergruppe	Wichtige Substanzen
		Tobramycin
Tetracyclin-Gruppe	Tetracycline, Glycylcycline	Doxycyclin
		Minocyclin
		Tetracyclin
Gyrasehemmer (Chinolone)	Gyrasehemmer Gruppe 1	Norfloxacin
		Pefloxacin
	Gyrasehemmer Gruppe 2	Ofloxacin
		Ciprofloxacin
	Gyrasehemmer Gruppe 3	Levofloxacin
	Gyrasehemmer Gruppe 4	Moxifloxacin
Chloramphenicol		Chloramphenicol
Nitroimidazole		Metronidazol
		Omidazol
Antibiotika	Polymyxine	Colistin
	Sulfonamide	Cotrimoxazol
		Sulfamethoxazol
	Epoxyd-Antibiotika	Fosmomycin
	Rifamycine	Rifampicin
Trimetoprim	Trimethoprim	
Glycopeptid-Antibiotika		Teicoplanin
		Vancomycin
Tuberkulostatika		Ethambutol
		Isoniazid
		Rifabutin

Da heutzutage viele Antibiotika bereits synthetisch oder semisynthetisch hergestellt werden können und generell keine grundlegenden Unterschiede zwischen Antibiotika und Chemotherapeutika bestehen, werden beide Begriffe synonym verwendet. Eine Abgrenzung, wie sie früher verwendet wurde, existiert heute nicht mehr.

### 2.1.1 Wirkungsmechanismen und Spektren einzelner Antibiotika

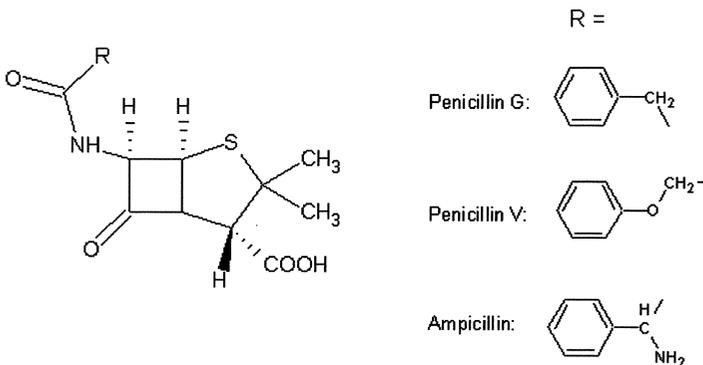
Bakterien werden gewöhnlich durch eine Farbreaktion, die Gram-Färbung, in zwei Gruppen unterteilt, die so genannten grampositiven und die gramnegativen Bakterien. Diese Reaktion beruht auf dem unterschiedlichen Aufbau der bakteriellen Zellwände. Grampositive Bakterien besitzen eine dicke Peptidoglycanschicht, die mit Hilfe der in der Gramfärbung verwendeten Farbstoffe angefärbt werden kann. Gramnegative Bakterien besitzen nur eine dünne Peptidoglycanschicht, verfügen aber zusätzlich über eine Außenmembran und sind aufgrund dieser Beschaffenheit nur gering bis nicht anfärbbar. Diese Färbereigenschaften lassen sich auch zur Einteilung der unterschiedlichen Antibiotika heranziehen, viele dieser Substanzen wirken entweder nur gegen grampositive oder gramnegative Bakterien [37].

### 2.1.2 $\beta$ -Lactamantibiotika

Die beiden wichtigen Hauptgruppen sind die Penicilline und Cephalosporine. Neuere Gruppen sind die Peneme und Monobactame, sowie die Betalactamase-Blocker [38, 39].

#### *Penicilline*

Das Grundgerüst aller Penicilline ist die 6-Aminopenicillansäure, die aus zwei kondensierten Ringsystemen, einem  $\beta$ -Lactamring und einem Thiazolidinring, besteht. Die heute gebräuchlichsten Penicilline unterscheiden sich durch eine Reihe unterschiedlicher Substituenten an der 6-Aminogruppe. Zumeist werden hier aromatische organische Säuren über eine Säureamidbindung substituiert.

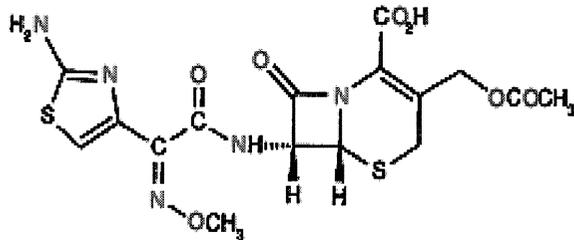


**Abb. 1:** Strukturformeln einzelner Penicilline

Die Penicilline greifen in die Zellwandsynthese der Bakterien ein. In der Zytoplasmamembran der Bakterien befinden sich unterschiedliche penicillinbindende Proteine, an die sich die einzelnen Penicilline anheften. Dieser Mechanismus führt zur Inaktivierung der Proteine und hat eine letale Schädigung der Bakterien zur Folge. Die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der einzelnen Penicilline erklären, warum sie sich in ihren antibakteriellen Eigenschaften und Wirkspektren unterscheiden. Der bakterizide Wirkmechanismus liegt jedoch allen Penicillinen zugrunde.

### Cephalosporine

Die Cephalosporine sind halbsynthetische Derivate der 7-Aminocephalosporansäure, die große strukturelle Ähnlichkeit ( $\beta$ -Lactamring mit einem sechsgliedrigen Dihydrothiazinring) mit den Penicillinen aufweist [38, 39].



**Abb. 2:** Strukturformel des Cefotaxims als Beispiel für die Cephalosporine

Der Wirkmechanismus ist mit dem der Penicilline vergleichbar. Über die Bindung an die penicillinbindenden Proteine beeinflussen die Cephalosporine Reaktionen in der Zellwandsynthese der Bakterien. Aufgrund der Hemmung der Transpeptidase, einem für den Zellwandaufbau der Bakterien essentiellen Vorgang, zeigt sich eine bakterizide Wirkung. Das Wirkspektrum umfasst gramnegative Bazillen und grampositive Kokken.

#### 2.1.3 Makrolide

Die Struktur der Makrolide zeigt einen 14-16-gliedrigen makrozyklischen Lactonring mit glykosidisch gebundenen Aminodesoxy- und neutralen Desoxyzuckern. Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist das Erythromycin [38, 39]. Makrolidantibiotika sind Hemmstoffe der Proteinbiosynthese. Über die Bindung an die große Ribosomenuntereinheit (50 S) und der damit verbundenen Hemmung der Kettenelongation (Translokation) resultiert ein bakteriostatischer Effekt. Das Wirkspektrum der Makrolide umfasst grampositive und gramnegative Kokken sowie grampositive Stäbchenbakterien.

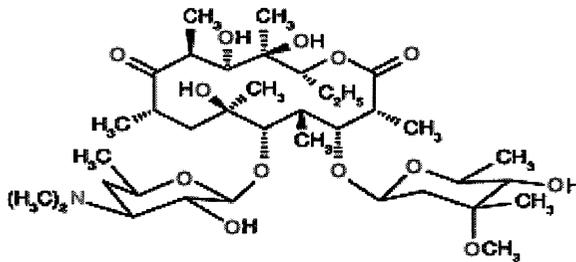


Abb. 3: Strukturformel des Erythromycins als Beispiel für die Makrolide

#### 2.1.4 Lincosamide

In dieser Gruppe werden die beiden Acylaminopyranoside Lincomycin und dessen halbsynthetisches Derivat Clindamycin zusammengefasst. Beide Substanzen hemmen die Proteinbiosynthese durch Bindung an die 50 S-Ribosomenuntereinheit. Dort beeinflussen sie die Peptidyltransferase und verhindern so das Wachstum der Peptidkette, die Kettenelongation wird auf diese Weise inhibiert [38, 39]. Daraus ergibt sich ein bakteriostatischer Wirkungstyp, mit nur in hohen Konzentrationen bei empfindlichen Bakterien bakterizider Wirkung. Das Wirkspektrum umfasst im Wesentlichen grampositive Erreger unter dem Einschluss von Anaerobiern.

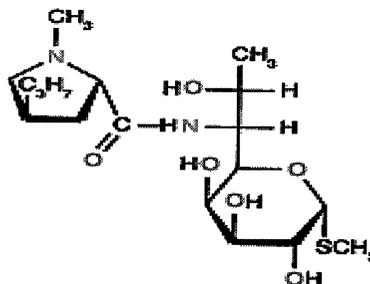
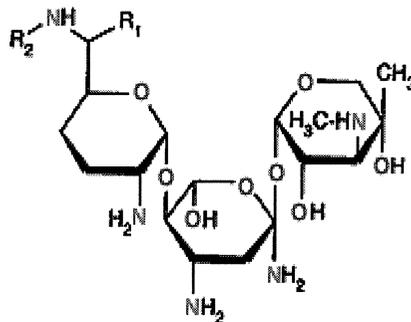


Abb. 4: Strukturformel des Lincomycins

#### 2.1.5 Aminoglycoside

Alle Aminoglycoside zeigen dieselbe chemische Struktur, es sind Aminocyclitole, die  $\alpha$ -glycosidisch mit zwei oder drei Zuckern oder Aminozuckern verknüpft sind. Die Aminoglycoside sind Hemmstoffe der Proteinbiosynthese. Über die Bindung an der

kleinen 30 S-Ribosomenuntereinheit beeinflussen sie sowohl die Initiation als auch die Kettenelongation. Zusätzlich kann es über Effekte an der Bakterienmembran zu Permeabilitätsstörungen an dieser mit dem Verlust von essentiellen Metaboliten kommen. Weiter können sie zu Fehlablesungen der mRNA führen, welche die Synthese falsch zusammengesetzter Proteine zur Folge haben. Ihnen unterliegt daher ein bakterizider Wirkungstyp, das Wirkspektrum umfasst die meisten gramnegativen Erreger [38, 39].



**Abb. 5:** Strukturformel des Gentamicins, einem Aminoglycosid der neuen Generation

### 2.1.6 Tetracycline

Das gemeinsame Grundgerüst aller Tetracycline bildet das polycyclische Naphtacen. Die Tetracycline sind Hemmstoffe der Proteinbiosynthese. Durch die Bindung an die kleine 30 S- Ribosomenuntereinheit verhindern sie, dass sich der Aminoacyl-tRNA-Komplex an die ribosomale Akzeptorstelle anlagert. Dies führt zur Hemmung der Elongation wachsender Polypeptidketten. Dieser Mechanismus unterliegt dem bakteriostatischen Wirkungstyp. Das Wirkspektrum beinhaltet zahlreiche grampositive und gramnegative Kokken sowie Mycoplasmen, Chlamydien, Treponemen und Actinomyceten [38, 39]. Eine mögliche, störende Nebenwirkung der Tetracycline aus zahnmedizinischer Sicht ist die Einlagerung in Knochen und Zähne, vor allem in der Wachstumsperiode bei Kindern und Jugendlichen, was zu bleibenden Schäden an den Zähnen wie Schmelzhyoplasie, erhöhte

Kariesanfälligkeit und einer Verfärbung der Zähne führen kann [40]. Der Grund hierfür ist die Eigenschaft der Tetracycline, mit  $\text{Ca}^{2+}$  Chelatkomplexe zu bilden.

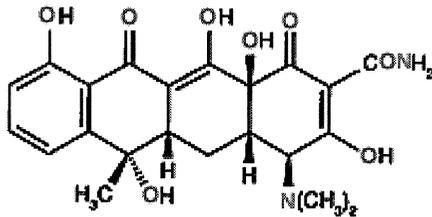


Abb. 6: Strukturformel des Tetracyclins

## 2.2 Antimikrobielle Dentalzemente

### 2.2.1 Calciumhydroxid

Calciumhydroxid findet in der Zahnheilkunde vielfach Verwendung, etwa als Einlage bei der medikamentösen Wurzelbehandlung oder bei der direkten oder indirekten Überkappung der Pulpa. Calciumhydroxid wird in unterschiedlichen Applikationsformen eingesetzt. Wässrige Lösungen (Hypocal®, Calxyl®) werden aus Calciumhydroxid-Pulver und Wasser bzw. Kochsalzlösung hergestellt. Teilweise wird das Pulver zusätzlich mit Calcium-, Kalium- oder Natriumchlorid versetzt und für eine bessere Applikation ein Verdickungsmittel beigelegt. Unter Linern (Tubulitec®) versteht man Kavitätenlacke, die mit Calciumhydroxid versetzt sind. Bei den Kitten sind ölhaltige Substanzen mit Calciumhydroxid verbunden, durch Verseifung entstehen bei der Reaktion Glycerin und schwerlösliche Calciumsalze der Fettsäuren.

Bei Zementen (Dycal®, Kerr-Life®) werden Säuren mit Calciumhydroxid vermischt. Die Produkte Dycal® und Kerr-Life® bestehen aus einem Salicylatester, welcher mit Calciumhydroxid eine Chelatbindung eingeht, das Endprodukt ist ein Calciumsalicylatzement. Den Produkten können zusätzlich plastifizierende Substanzen, Füllstoffe oder Farbpigmente beigelegt sein. Bei diesen Zementen handelt es sich meist um Paste-/Paste-Systeme, die nach dem Vermischen

aushärten. Daneben gibt es Kunststoffpräparate, denen Calciumhydroxid zugesetzt wird. Allen Präparaten gemeinsam ist ein antimikrobieller Effekt, der auf dem hohen pH-Wert beruht und die Fähigkeit Hydroxylionen abzugeben [41]. Zahlreiche Untersuchungen konnten zeigen, dass die Hydroxylionenabgabe bei den verschiedenen Präparaten unterschiedlich hoch ist [42]. Bei weich bleibenden Pasten ist sie am größten [43], bei Zementen schon deutlich geringer und bei Linern, Kittungen und Kunststoffpräparaten ist eine Hydroxylionenabgabe kaum noch feststellbar [40]. In einer Studie von Morrier et al. hat sich gezeigt, dass reines Calciumhydroxid in Kombination mit Glycerin ein wesentlich höheres antimikrobielles Potential vorweist als alle herkömmlichen Präparate [44].

### 2.2.2 Zinkoxidphosphatzemente

Zinkoxidphosphatzemente werden meist zum Zementieren von Kronen- und Brückenrestorationen verwendet. Das Pulver besteht zu 80-90 Gewichtsprozent aus Zinkoxid, durch Zusätze wie Magnesiumoxid, Siliziumoxid und Calciumfluorid werden die Festigkeit und Mundbeständigkeit des Zementes optimiert. Die Flüssigkeit ist eine wässrige Lösung von Orthophosphorsäure ( $H_3PO_4$ ) und Zusätzen von Aluminium und Zink zur Pufferung. Durch diese Zusätze wird die Reaktionsgeschwindigkeit herabgesetzt. Aufgrund des Zinkoxids ist ein geringes antimikrobielles Potential erkennbar. In einer Studie von Vokus et al. zeigte Zinkoxidphosphatzement die größte antibakterielle Wirkung verschiedener getesteter Dentalzemente in Bezug auf *Streptococcus mutans* [45]. Dieser Effekt beruht auf der bakteriostatischen Wirkung des Zinkoxids [46].

Abgewandelt von den Zinkoxidphosphatzementen sind die Zinkoxid-Eugenol-Zemente, hier ist die Säure durch die Flüssigkeit Eugenol ersetzt, die mit Zinkoxid ein Chelat bildet. Diese Verbindung besitzt einen bakteriziden Effekt, wird aber aufgrund der geringeren Druckfestigkeit gegenüber Zinkoxidphosphatzementen und einer nachgewiesenen Inhibition bei der Polymerisation von Kompositmaterialien nur noch selten angewandt.

### 2.2.3 Carboxylzemente

Der Anwendungsbereich der Carboxylzemente entspricht im Wesentlichen dem der Zinkoxidphosphatzemente, dies betrifft auch die Pulverzusammensetzung. Die

Flüssigkeit besteht zu 40-50 Gewichtsprozent aus Polyacrylsäure. Die Carboxylatzemente härten unter Kettenbildung aus, dabei entsteht ein Metallionenkomplex mit Zink. Die Polyacrylsäure kann jedoch auch an das Kalzium der Zahnhartsubstanz binden und chemisch haften. In Bezug auf Phosphatzemente sind Carboxylatzemente diesen in den mechanischen Eigenschaften unterlegen und zeichnen sich lediglich durch eine bessere Pulpenverträglichkeit aus. Antibakterielle Fähigkeiten lassen sich nur begrenzt oder gar nicht feststellen [47].

#### 2.2.4 Glasionomerzemente

Der Haupteinsatzbereich von Glasionomerzementen liegt bei Füllungen der Kavitätenklasse V, so genannte Zahnhalsfüllungen, bei nicht kaubelasteten Füllungen (z. B. Unterfüllungen) und in der Kinderzahnheilkunde als Amalgamersatz. Außerdem finden GIZ Verwendung beim Zementieren von Kronen- und Brückenrestorationen. Glasionomerzemente bestehen aus aluminiumreichem Silikatglas als Pulver und aus bis zu 50% wässrigen Lösungen von Polysäuren (Acryl-, Methacryl-, Itacon- oder Maleinsäuren) als flüssige Komponente. Die Abbindereaktion beruht auf einem Ionenaustausch der freigesetzten  $Al^{3+}$ -,  $Ca^{2+}$ - oder  $Na^{+}$ -Ionen aus den Glaspartikeln gegen  $H_3O^{+}$  aus den entsprechenden Polysäuren [48]. Diese Reaktion führt zur Bildung einer vernetzten Matrix aufgrund der mehrwertigen Metallionen. Das im Reaktionsgemisch vorhandene Wasser wird über den chemischen Prozess der Hydratation gebunden.

Durch einen Ionenaustausch mit der Zahnhartsubstanz entsteht eine chemische Verbindung mit dieser, welche eine gute Haftung des Materials mit der Zahnschicht bewirkt. Diese ist der Haftung von adhäsiven Kompositssystemen dennoch unterlegen. Studien haben gezeigt, dass der antimikrobielle Effekt von Glasionomerzementen auf der kontinuierlichen Freisetzung von Fluoridionen beruht.

Perez et al. wiesen diesen Effekt nach, indem sie herkömmliche Glasionomerzementproben auf den Bakterienstamm *Streptococcus mutans* testeten [48]. Molgatini et al. zeigten vergleichbare Ergebnisse einer antibakteriellen Wirkung an verschiedenen *Actinomyces*-Stämmen [49]. Die Abgabe der Fluoridionen konnte auch nach längeren Inkubationszeiten noch nachgewiesen werden.

Aufgrund nur schwacher mechanischer Eigenschaften und begrenzter Haltbarkeit von nur zwei bis vier Jahren ist die Verwendung von Glasionerzementen auf die oben genannten Einsatzbereiche beschränkt. Eine Weiterentwicklung der Glasionerzemente sind die metallverstärkten oder kunststoffmodifizierten GIZ, die höhere Festigkeitswerte aufweisen, jedoch weniger Fluoridionen freisetzen als die herkömmlichen GIZ.

### 2.3 Calciumphosphatzemente

Calciumphosphatzemente bestehen aus mehrkomponentigen Mischungen verschiedener Calciumorthophosphate wie Calcium-bis-dihydrogenphosphat (MCPA), Calciumhydrogenphosphat Dihydrat (DCPD, Bruschit), Calciumhydrogenphosphat (DCPA, Monetit) oder Tetracalciumphosphat (TTCP). Weitere Formulierungen auf der Basis von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tricalciumphosphat sind literaturbekannt [50]. Calciumphosphate sind chemische Verbindungen aus den Elementen Calcium, Phosphor, Sauerstoff und Wasserstoff. Es lassen sich zahlreiche chemisch verschiedene Calciumphosphate mit unterschiedlichen molaren Ca/P-Verhältnissen voneinander unterscheiden.

**Tab. 2.3:** Löslichkeitsprodukte (LP) verschiedener Calciumphosphate [Log (LP) bei 37°C]

Verbindung	Summenformel	Ca/P-Verhältnis	Löslichkeitsprodukt
Calcium-bis-dihydrogenphosphat (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.5	löslich
Calciumhydrogenphosphat Dihydrat (DCPD, Bruschit)	$\text{CaHPO}_4 + 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.0	LP : -6,63 [51]
Calciumhydrogenphosphat (DCPA, Monetit)	$\text{CaHPO}_4$	1.0	LP : -7,04 [51]
$\alpha$ -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	LP : -25,5 [52]
$\beta$ -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	LP : -29,5 [52]
Tetracalciumphosphat (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2.0	LP : -37,4 [53]
Hydroxylapatit (OHAp)	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	1.67	LP : -58,6 [54]

Die thermodynamische Löslichkeit der Verbindungen variiert in Abhängigkeit verschiedener Parameter, beispielsweise dem pH-Wert der Lösung, um mehrere Größenordnungen. Die Löslichkeit und Stabilität der Verbindungen bestimmt das

Verhalten der Verbindungen in wässrigen Elektrolyten in Bezug auf Auflösung, Präzipitation und Phasenumwandlung. Der Antrieb der Abbindereaktion von Calciumphosphat-Zementen beruht auf der unterschiedlichen Löslichkeit der Zementedukte und des Reaktionsproduktes. Nach der Zugabe der wässrigen Zementphase gehen die Edukte solange in Lösung bis der durch das Löslichkeitsprodukt beschriebene, thermodynamische Gleichgewichtszustand erreicht ist. Aufgrund der zu diesem Zeitpunkt starken Übersättigung des Reaktionsproduktes gegenüber der Reaktionsphase kommt es zur Ausfällung des Produktes, welches zur Aushärtung des Zementes führt.

Der pH-Wert der Zementpasten beeinflusst maßgeblich die Art des Reaktionsproduktes. Hydroxylapatit ist das am wenigsten lösliche Calciumphosphat bis zu einem pH-Wert von 4,2. Neutrale oder basische Zemente binden deshalb unter diesen Bedingungen zu Hydroxylapatit geringer Kristallinität ab. Unterhalb dieses Wertes stellt Calciumhydrogenphosphat (DCPA) das am geringsten lösliche Calciumphosphat dar. In sauren Zementen wird aufgrund der geringen Kristallbildungsrate des DCPA als Produkt jedoch das Dihydrat DCPD gebildet. Eine Übersicht über die verschiedenen CPC-Verbindungen findet sich in der Literatur [55-57].

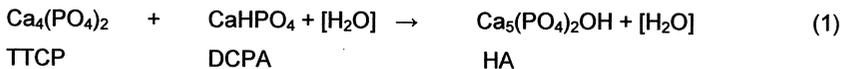
Die Reaktivität der einzelnen Calciumphosphate wird bestimmt von der thermodynamischen Löslichkeit (Löslichkeitsprodukt) der Reaktanden. Die Übersättigung der wässrigen Reaktionsphase muss ein Mehrfaches des Löslichkeitsproduktes des Reaktionsproduktes betragen. Dies erklärt das unterschiedliche Verhalten der beiden Tricalciumphosphate in wässrigen Elektrolyten. Während das  $\beta$ -TCP unreaktiv bleibt, reagiert das  $\alpha$ -TCP zum calciumarmen Hydroxylapatit.

Die Lösungsrate und Kristallwachstumsrate der Zementedukte bestimmen die Reaktionsgeschwindigkeit von Calciumphosphaten. Dabei ist die Lösungsrate abhängig von der Oberflächenstruktur der Zementpartikel, welche über die Mahlung in fester oder flüssiger Phase gezielt beeinflusst werden kann [58]. Bei mehrkomponentigen Mischungen verschiedener Calciumorthophosphate ist es notwendig, definierte Lösungsraten der Einzelkomponenten vorzugeben, um so eine

gleichartige Löslichkeit zu erreichen. Die Kristallbildungsrate der Reaktionsprodukte ist ebenfalls bestimmend für die Geschwindigkeit der Reaktion. So zeigt sich für Hydroxylapatit nur eine geringe Bildungsrate in wässrigen Lösungen ( $2.7 \times 10^{-7} \text{ mol Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH min}^{-1} \text{ m}^{-2}$  [59], welches den Einsatz von Alkaliphosphaten und Phosphorsäure als Abbindebeschleuniger impliziert, um für die Klinik akzeptable Abbindezeiten zu erhalten [60, 61].

### Zementformulierungen

Bei den Zementformulierungen lassen sich Hydroxylapatit und Brushit bildende Zementssysteme unterscheiden. Apatit wird bei pH-Werten  $> 4,2$  in den Zementpasten gebildet. Als Edukte dienen dabei vorwiegend basische Calciumphosphate wie Tetracalciumphosphat (TTCP) oder Calciumoxid in Kombination mit leicht sauren Verbindungen wie Calciumhydrogenphosphat (DCPA) oder Calciumhydrogenphosphat Dihydrat (DCPD) [62, 63]. Die Abbindereaktion erfolgt über einen Lösungs-/Präzipitationsmechanismus nach Zusatz der wässrigen Phase. In einer ein- bzw. mehrstufigen Reaktion bei Raumtemperatur kommt es dabei unter Phasenumwandlung zum Abbinden des Zementes [64]



In der Literatur finden sich diverse Studien bezüglich des Zementsystems nach Gleichung (1) und (2), und verbunden damit Ansätze zur Optimierung dieses Systems [62, 65-67]. So lassen sich abbindefähige Zemente mit den höchsten mechanischen Festigkeiten bei äquimolaren Mischungen der Edukte und einem Partikelgrößen Aspektverhältnis TTCP : DCPA von etwa 10 : 1 produzieren. Ein einkomponentiges Zementssystem zeigt die Hydrolyse von  $\alpha$ -Tricalciumphosphat ( $\alpha$ -TCP) zu einem calciumarmen Hydroxylapatit (Gleichung (3)).



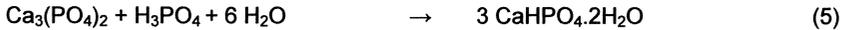
Als weiteren Abbindemechanismus lässt sich die Kristallisation amorpher Calciumphosphate anführen. Zum einen kann dies über die Ausfällung aus gesättigten Lösungen unter gleichzeitiger Zugabe von Magnesiumionen zur Stabilisierung und abschließender Gefriertrocknung erfolgen oder über den Vorgang der mechanischen Aktivierung durch hochenergetisches Mahlen, wie in dieser Arbeit unter Kapitel 3.1 beschrieben.

Zementsysteme, die zu Hydroxylapatit abbinden, sind aufgrund ihrer Apatitstruktur sehr gut kompatibel mit Hart- und Weichgeweben [68]. Diese Kombination aus Biokompatibilität und dem Abbindeverhalten ermöglicht den Einsatz in unterschiedlichen biomedizinischen Bereichen wie beispielsweise als Implantatmaterial bei parodontalen Defekten [69] oder als endodontisches Füllmaterial [70]. In der Literatur finden sich weiter Anwendungen im Bereich der Kieferchirurgie zur Deckung von zystischen Defekten nach Zystektomie [71], zur Rekonstruktion auf dem Gebiet der kraniofazialen Chirurgie [71] und zur Glättung von Konturen zwischen Knochentransplantaten [71, 72]. In der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde dienen Calciumphosphat-Zemente zur Fixation von implantierten Hörelektroden [71]. Weiter erweisen sich die Calciumphosphat-Zemente als geeignetes Trägermaterial für osteogene Proteinkomplexe, welche einen beschleunigenden Effekt auf die Knochenheilung ausüben [71].

Zum Anmischen der Zemente wird für gewöhnlich eine Natriumphosphatlösung ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) verwendet, die eine rasche Auflösung der Pulver gestattet [73], diese kam auch im Zuge dieser Arbeit zum Einsatz. Weitere wässrige Lösungen wie Wasser oder Blut (intraoperativ), zeigen ebenfalls annehmbare Ergebnisse [74]. Für Applikationen, die eine längere Verarbeitungszeit erfordern, werden Cellulosederivate oder Glycerin verwendet [74, 75].

Zur Bildung von Calciumhydrogenphosphat Dihydrat (Bruschit, DCPD) kommt es, wenn durch Zusatz saurer Calciumphosphate oder Phosphorsäure der pH-Wert der Zementpaste  $< 4.2$  eingestellt wird [76]. Die Gleichungen (4) und (5) geben die Abbindereaktion von Bruschit-Zementen wieder.





Im Gegensatz zu Zementen, die zu Hydroxylapatit abbinden, verläuft diese Reaktion wesentlich schneller ab. Bei  $\alpha$ -TCP lässt sich eine heftige Reaktion innerhalb weniger Sekunden beobachten, beim etwas unreaktiveren  $\beta$ -TCP läuft diese in einem Zeitraum von 30-60 Sekunden ab. Um klinisch akzeptable Abbindezeiten zu erzielen, können diesen Zementssystemen Abbindeverzögerer wie Pyrophosphat- oder Citrationen zugesetzt werden [77]. Bruschnit-bildende Zemente sind im Vergleich mit HA-Zementen weniger belastbar, die Druckfestigkeiten bewegen sich hier in einem Bereich von 1 bis 60 MPa. Bruschnit-Zemente sind thermodynamisch unter physiologischen Bedingungen (pH = 7,4 mit CaP-Sättigung) löslich und damit chemisch resorbierbar. Dies unterscheidet sie von Apatit-Zementen, da die Löslichkeit von Bruschnit ein Vielfaches von HA beträgt.

### 2.3.1 Antimikrobielle Calciumphosphate

Derzeitige Forschungen beschäftigen sich mit dem Versuch, die antimikrobiellen Eigenschaften der Calciumphosphatzemente zu steigern. Dies gelingt zum einen durch den Zusatz von Antibiotika zur flüssigen Phase der Zemente [78-80], oder es wird versucht, den antimikrobiellen Effekt der Zemente durch einen übermäßigen Zusatz von CaO zu steigern [81].

In einer Studie von Yoshida et al. konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -TCP in Kombination mit antibakteriellen Substanzen den gleichen Effekt bei direkter Pulpaüberkappung hatte wie das als Referenz verwendete  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Es konnten vergleichbare antientzündliche und antibakterielle Effekte wie beim  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  erzielt werden, lediglich die Bildung einer Tertiärdentinbrücke blieb aus [82]. Weitere Studien zeigten, dass von Calciumphosphaten auf der Basis von Calcium-bis-dihydrogenphosphat Monohydrat (MCPM) und Calciumoxid ebenfalls ein antimikrobieller Effekt ausgeht [81, 83]. Mittels der Agardiffusionsmethode konnte bei diesen Zementssystemen für ein Ca/P-Verhältnis  $\geq 2$  in Bezug auf die verwendeten Prüfkörper eine antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden. Diese Aussage ließ sich für alle in dieser Untersuchung getesteten Bakterien- bzw. Pilzstämmen treffen.

Ein antimikrobieller Effekt konnte auch für Zementsysteme auf der Basis von Calciumhydrogenphosphat Dihydrat (DCPD) und Calciumoxid nachgewiesen werden. Die Reaktionsprodukte dieser Reaktion waren eine Mischung aus HA und CaO, nach Zusatz von Natriumphosphat als flüssige Phase. Das Calcium-Phosphat-Verhältnis (Ca/P) der Prüfkörper wurde in einem Bereich zwischen 1.67 bis 2.75 bestimmt. Auch hier zeigten alle Prüfkörper mit einem Ca/P-Verhältnis  $> 2$  einen antibakteriellen Effekt in Bezug auf die getesteten Mikroorganismen (*L. acidophilus*, *E. faecalis*, *S. hominis*, einer Plaque-Mischflora und *C. albicans*). Die bakterizide Wirkweise wurde über die Agardiffusionsmethode bestimmt [84]. Diese Ergebnisse implizieren einen klinischen Einsatz der Calciumphosphatzemente beispielsweise in der Endodontie als Wurzelkanalfüllmaterial.

### 3. MATERIAL UND METHODE

#### 3.1 Zemente

Die Herstellung der Zemente erfolgte durch Sinterung von Pulvermischungen entsprechender Stöchiometrie mit anschließender mechanischer Aktivierung durch Kugelmahlung. Die Zusammensetzung der jeweiligen Pulvermischungen ist Tabelle 3.1 zu entnehmen. DCPA wurde von Mallinckrodt-Baker (Griesheim) bezogen, alle anderen Verbindungen von Merck (Darmstadt).

Die Pulver wurden in 300 ml Isopropanol suspendiert und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde abfiltriert und der Filterkuchen bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Sinterung erfolgte in Tiegeln aus Aluminiumoxid bei 1050°C für 24 Stunden (alkalidotierte CaP) bzw. 1500°C für 18 Stunden (Tetracalciumphosphat) mit anschließendem Abschrecken des Sinterkuchens. Nach Abkühlung wurde dieser mit Mörser und Pistill manuell zerkleinert und in einer Kaffeemühle zermahlen. Fraktionen mit einer Korngröße kleiner als 355 µm wurden durch Siebung abgetrennt. Die mechanische Aktivierung erfolgte in einer Planetenkugelmühle PM400 (Retsch, Haan) mit 500 ml Achatmahlbechern und 10 mm-Kugeln. Hierzu wurden jeweils 75 g des CaP, 125 ml Ethanol und 200 Kugeln pro Becher bei einer Geschwindigkeit von 250 U/min für bis zu 24 Stunden vermahlen. Anschließend wurde das Pulver über ein Sieb von den Kugeln abgetrennt und im Vakuum bei 60°C getrocknet [17, 18].

**Tabelle 3.1:** Zusammensetzung der Pulvermischungen zur Synthese von TTCP und alkalidotierten CaP

Verbindung	CaHPO <sub>4</sub>	CaCO <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Ca <sub>4</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> O (TTCP)	1.00 mol (136.05g)	1.00 mol (100.09g)	-	-
CaNaPO <sub>4</sub> (CSP)	2.00 mol (272.1g)	-	1.00 mol (100.09g)	-
CaKPO <sub>4</sub> (CPP)	2.00 mol (272.1g)	-	-	1.00 mol (100.09g)
Ca <sub>2</sub> KNa(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (CPSP)	2.00 mol (272.1g)	-	0.50 mol (50.45g)	0.50 mol (50.45g)

Als Referenzmaterial diente der Calciumhydroxid-/Salicylat-Zement *Kerr Life*® (Kerr, Italien), bestehend aus einer Base und einem Katalysator, die im Verhältnis von 1:1 angemischt werden.

#### Zusammensetzung

" *Kerr Life* " Base – Calciumhydroxid, Zinkoxid, Diethyl-p-toluol-sulfonamid

" *Kerr Life* " Catalyst – Methylsalicylat, Bariumsulfat, Formaldehydharz,

Titanoxid RA 2020, Aerosil R972

Der enthaltene Hauptwirkstoff Calciumhydroxid wirkt gegen ein breites Spektrum von gram-positiven Keimen bakterizid, neutralisiert Kariessäuren, regt zur Tertiärdentinbildung an und härtet bereits erweichtes Dentin. Er wirkt alkalisch und besitzt die Fähigkeit, durch die Dentinkanälchen hindurch zur Pulpa zu diffundieren. Systemische Nebenwirkungen sind nicht bekannt.

### 3.2 Abbindeigenschaften alkalischer Calciumphosphat-Zemente

Im Verlauf der Arbeit wurden die Eigenschaften der Calciumphosphate bezüglich der Abbindezeit, Druckfestigkeit und Phasenzusammensetzung überprüft. Die Pastenformung erfolgte jeweils mit einer 2.5%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  Lösung.

#### *Abbindezeit*

Die Abbindezeit eines Zementes wurde über die Penetrationsmethode nach Gilmore [85] ermittelt. Über die Penetration der Probenkörper mit zwei spezifischen Gilmorenadeln unter einer definierten Kraftereinwirkung, wird die Oberflächenfestigkeit einer härtenden Zementprobe bestimmt. Unterschieden wird die initiale Abbindezeit (G1 Nadel: Durchmesser 2,117 mm; Gewicht 113,398 g; Zeitintervall 2 Minuten), entsprechend der Verarbeitungsdauer des Zementes, und die finale Abbindezeit. Diese wurde nachfolgend durch das periodische Absinken der G2 Nadel (Durchmesser 1,106 mm; Gewicht 453,592 g; Zeitintervall 5 Minuten) gemessen.

#### *Druckfestigkeit*

Für die Versuchsreihen wurden zur Ermittlung der Druckfestigkeiten der einzelnen Calciumphosphatzemente zylindrische Probenkörper (12 mm Höhe und 6 mm Durchmesser) hergestellt. Die gemahlene Alkaliphosphate und TTCP wurden mit

2.5%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung im Pulver-Füssigkeits-Verhältnis von 2 g/ml miteinander vermischt. Folgend wurden die Zementmixturen in Edelstahlformen zuerst einem Druck von 9 MPa für 5 Sekunden und danach einem Druck von 0,7 MPa für 2 Stunden ausgesetzt. Die so erhaltenen Probenkörper wurden abschließend für 22 h in einem Wasserbad bei 37°C ausgelagert. Die Druckfestigkeit der Probenkörper wurde in einer statischen Universalprüfmaschine Zwick 1440 (Fa. Zwick, Ulm) mit einer konstanten Vortriebskraft von 1 mm/min bis zum Bruch belastet.

#### *Phasenzusammensetzung*

Die Röntgendiffraktometrie ermöglicht die Untersuchung von polykristallinen Materialien durch die Beugung von Röntgenstrahlung. Die prinzipielle Funktionsweise der Methode basiert auf der Detektion von konstruktiven Beugungsereignissen als Funktion des Einstrahlwinkels bei entsprechender Wellenlänge. Dies wird durch die Interaktion der Röntgenstrahlung mit dem atomaren Aufbau der Testsubstanz erreicht, und es ermöglicht qualitative wie auch quantitative Aussagen über deren Phasenzusammensetzung sowie deren strukturellen und mikrostrukturellen Eigenschaften. Im Zuge dieser Arbeit wurden die einzelnen Calciumphosphatverbindungen und ihre Abbindeprodukte röntgendiffraktometrisch hinsichtlich ihrer Phasenzusammensetzung charakterisiert. Die röntgendiffraktometrische Untersuchung erfolgte mit einem Diffraktometer D5005 (Fa. Siemens, Karlsruhe) bei folgenden Parametern:

- |                          |            |
|--------------------------|------------|
| - Kathodenspannung:      | 40 kV      |
| - Kathodenstrom:         | 50 mA      |
| - Winkelbereich 2 Theta: | 20 - 40°   |
| - Schrittweite:          | 0.01°      |
| - Messgeschwindigkeit:   | 0.1 sec/st |

#### Prüfkörperherstellung für den Agar-Diffusionstest

Zur Herstellung von Prüfkörpern mit 10 mm Durchmesser und 5 mm Höhe kamen folgende Materialien und Geräte zum Einsatz:

- Silikon [Duplicil SP, Fa. Espe, Deutschland]
- Pipette 1000 µl, Eppendorf, Hamburg

- digitale Waage, Ablesegenauigkeit  $f_0 : 0.01$  [Typ Sartorius 4, Fa. Bicerba, Waagen und Maschinenfabrik, Würzburg]
- Wärmebad [Fa. Hartenstein GFL, Hannover]

Um Prüfkörper von definierter und reproduzierbarer Größe zu erhalten, wurden zuerst Formen aus Silikon (Duplicil SP, Fa. Espe, Deutschland) gegossen. Zur Prüfkörperherstellung wurden die jeweiligen Calciumphosphate mit einer Natriumphosphatlösung (2.5%-ig) bei einem Pulver-Flüssigkeitsverhältnis von 2:1 angemischt. Für die 1 bzw. 4 Stunden gemahlene TTCP Zemente lag das Pulver-Flüssigkeitsverhältnis bei 3:1, auf 2 g Zement kamen hier 670  $\mu\text{l}$  Natriumphosphatlösung (2.5%-ig). Angemischt wurden die Zemente auf einer Glasplatte bei 20°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) und einer Anmischzeit von 1 Minute mit einem Spatel, hiernach wurde die pastöse Masse in die Silikonformen eingebracht. Die Probenformen der verschiedenen Calciumphosphatzemente wurden anschließend in einem Wasserbad [Fa. Hartenstein GFL, Hannover] bei 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit für eine Dauer von 2 Stunden ausgelagert. Dort härteten die Prüfkörper aus, um so eine ausreichende Festigkeit für die folgenden Experimente zu erlangen. Nach Entfernung der Prüfkörperüberstände wurden die Prüfkörper aus den Silikonformen entnommen und für festgelegte Zeitintervalle im Wasserbad gelagert. Neben den Reinzementen kamen auch Mischungen aus mechanisch aktiviertem Pulver (24h Mahldauer) mit kurzzeitig trocken gemahlendem TTCP (200 U/min, 10 min) im Verhältnis 1:1 zum Einsatz.

### 3.3 Bakterienkulturen

Für die Testreihen wurden folgende Bakterienstämme und eine Pilzart, die alle dem eigenen Labor entstammen, verwendet:

#### *Streptococcus salivarius*

Der Begriff Streptokokken kennzeichnet eine Gruppe grampositiver Bakterien, die zur Familie der Kokken gehören. Lichtmikroskopisch erscheinen die Streptokokken in etwa rund und unbekapselt. Sie sind unbeweglich und lagern sich in Kultur zu Ketten zusammen. Innerhalb der Bakterienwand weisen alle Streptokokken ein so genanntes C-Polysaccharid auf, das als Antigen erkannt werden kann und eine Klassifizierung in Subtypen ermöglicht. Über Hämolyse sind einige Streptokokken

in der Lage, Erythrozyten auf Blutagarkulturplatten zu lysieren; auch auf dieser Grundlage können sie klassifiziert werden. Auf der Fähigkeit einiger Streptokokkenstämme in Blutagar Hämolysehöfe zu bilden, beruht die einfachste Einteilung. Dabei unterscheidet man ein unterschiedliches Hämolyse-Verhalten:

- $\alpha$ -Hämolyse (Vergrünung): Auf dem Blutagar sind die Kolonien von einer grünen Zone umgeben, in der es zu einer unvollständigen Hämolyse gekommen ist. Es finden sich noch intakte Erythrozyten.
- $\beta$ -Hämolyse: Die Kolonien sind von einem großen, klaren bis gelblichen Hämolysehof umgeben. In diesem Bereich sind alle Erythrozyten vollständig hämolysiert.
- $\gamma$ -Hämolyse: Es besteht keine Hämolyse.

Das für die Testreihen verwendete Bakterium *S. salivarius* gehört zur Gruppe der oralen Streptokokken und lässt sich der  $\alpha$ - oder  $\gamma$ - Hämolyse zuordnen. [26]

#### *Staphylococcus epidermidis*

Staphylokokken gehören zur Familie der *Micrococcaceae*, die in der Gruppe der grampositiven Kokken zusammengefasst werden. Bei den Staphylokokken handelt es sich um kleine, kugelige bis ovale Zellen, die sich in Haufen bzw. Trauben anordnen. Sie sind unbeweglich und bilden Katalase. Bei den Staphylokokken unterscheidet man in koagulasepositive und koagulasenegative Stämme. Die wichtigsten beim Menschen vorkommenden Vertreter sind *S. aureus*, *S. epidermidis* und *S. saprophyticus*.

Das für die Testreihen verwendete Bakterium lässt sich den koagulasenegativen Staphylokokken (KNS) zuordnen und gehört zur Normalflora von Haut und Schleimhäuten. KNS sind klassische Opportunisten, die nur bei entsprechender Disposition Krankheiten verursachen [26].

#### *Plaque-Mundhöhlen-Mix*

Der Plaque-Mundhöhlen-Mix wurde einem Patienten aus der Poliklinik für Parodontologie der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten in Würzburg entnommen. Die klassische Plaque eines Patienten mit durchschnittlichem

Kariesrisiko und fehlender erblicher Disposition für parodontologische Erkrankungen setzt sich aus folgenden Mikroorganismen (Tabelle 3.2) zusammen.

**Tabelle 3.2:** Klassifikation der wichtigsten in der menschlichen Plaque vorkommenden Mikroorganismen [TM]

Grampositiv (+)		Gramnegativ (-)		
fakultativ anaerob	anaerob	fakultativ anaerob	anaerob	
Streptokokkus • S. mutans • S. sanguis • S. salivarius • S. milleri	Peptostreptokokkus • P. micros	Neisseria	Veillonella	Kokken
Actinomyces • A. viscosus	Actinomyces • A. israeli	Actinobacillus • A. comitans	Porphyromonas • P. gingivales	Stäbchen
Lactobacillus	Eubacterium	Haemophilus	Bacteroides • B. forsythus	
Corynebacterium		Eikenella	Prevotella • P. intermedia  Fusobacterium • F. nucleatum	

Diese genannten Bakterien bilden zusammen mit Speiseresten die Plaque, welche per Definition ein weicher, strukturierter, zäher bakterieller Zahnbelag ist, der mit dem Wasserspray nicht zu entfernen ist. Diese ist Auslöser für unterschiedliche Parodontalerkrankungen und die Zahnkaries [40].

### *Candida albicans*

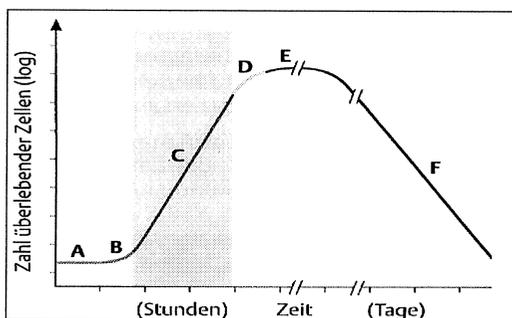
Bei *Candida albicans* handelt es sich um einen Sprosspilz der Gattung *Candida*. Mindestens 90% der humanen *Candida*-Infektionen werden durch die *C. albicans* hervorgerufen. Bei Gramfärbung erscheint *C. albicans* als grampositive, kapsellose Hefe von ovaler bis rundlicher Form mit einem Durchmesser von 5 µm. *C. albicans* ist fakultativ pathogen für den Menschen, sie kommt als Kommensale auf der Schleimhaut von Menschen vor, erst bei herabgesetzter Resistenz oder gestörter zellulärer Immunität kommt es zu Infektionen. Zur Differenzierung von anderen Hefen werden morphologische und biochemische Merkmale herangezogen.

Die wichtigsten Vertreter der Gattung der *Candida* [26]:

- *C. albicans*
- *C. parapsilosis*
- *C. tropicalis*
- *C. cruzei*

### 3.3.1 Nährmedienherstellung

Für die Versuchsreihen wurden die Bakterienkulturen jeweils 24 Stunden vor Beimpfung der Agarkulturplatten, in dem ihnen entsprechenden Nährmedium inokuliert, um so eine ausreichende Menge für die Experimente zu erhalten. Aufgrund des exponentiellen Wachstums (Abbildung 3.1) der Bakterienkulturen in der Nährlösung, wurden diese vor jeder beginnenden Testreihe neu inokuliert. Um große Schwankungen bezüglich der Konzentration an Bakterien in dem Nährmedium zu verhindern, wurde die Inokulationszeit von 24 Stunden exakt eingehalten.



**Abb. 3.1:** Normale Wachstumskurve einer Bakterienkultur; A = Lagphase, B = Beschleunigungsphase, C = exponentielle Phase, D = Verzögerungsphase, E = stationäre Phase, F = Absterbephase, [26]

Folgende Substanzen wurden für die Herstellung der einzelnen Nährmedien benutzt.

*Thioglykolat – Medium (S. salivarius)*

- Fluid Thioglycollate Medium USP/EP [Fa. Becton and Dickinson, USA]

Bei der Herstellung wurden 11,8 g der Grundsubstanz mit 400 ml destilliertem Wasser in einer Laborflasche 500 ml vermischt. Diese Mischung wurde dann für 2

Stunden auf einem Magnetrührer [Rh basic 2 IKAMAG, Fa. IKA®, Deutschland] bei 60°C weiter durchgemischt. Abschließend wurde das Thioglycolat – Medium bei 134°C autoklaviert. Gelagert wurde das Medium bei Raumtemperatur.

*LB – Medium (S. epidermidis / Plaque-Mundhöhlen-Mix)*

- Trypton/Pepton Difco™ [Fa. Necton and Dickinson, USA]
- NaCl [Fa. Merck KGaA, Darmstadt]
- Hefeextrakt [Fa. AppliChem, Darmstadt]

Für 400 ml LB – Medium wurden 2 g Hefeextrakt, 4 g Trypton/Pepton und 2 g NaCl mit 400 ml destilliertem Wasser gemischt, danach wurde das LB – Medium bei 134°C autoklaviert. Gelagert wurde das Medium im Kühlraum bei einer Temperatur von 4°C.

*YPD – Medium (C. albicans)*

- Pepton/Trypton Difco™ [Fa. Becton and Dickinson, USA]
- Hefeextrakt [Fa. AppliChem, Darmstadt]
- Glucoselösung (20%) → 20 g Glucosemonohydrat auf 100 ml destilliertes Wasser

Für die Herstellung von 1000 ml YPD - Medium wurden 20 g Pepton/Trypton, 10 g Hefeextrakt und 900 ml destilliertes Wasser in einer 1000 ml Laborflasche vermischt. Danach wurden 100 ml Glucoselösung (20%-ig) beigefügt und alles abschließend bei 134°C autoklaviert. Gelagert wurde das Medium bei 4°C im Kühlraum.

Der Vorgang des Autoklavierens wurde genutzt, um möglichst keimfreie Nährmedien zu erhalten.

### 3.3.2 Agarkulturplatten

Agar ist per Definition ein Polysaccharidkomplex, der aus Agarophyten extrahiert wird. Er besteht aus Agarose, einem Polysaccharid aus D-3,6-Anhydrogalaktose und L-Galaktose, und dem sulfatiertem Agaropektin. Agar ist durchsichtig, geruchs- und geschmacksneutral. In heißem Wasser löst sich Agar und quillt in kaltem Wasser, eine 1%-ige Lösung bildet ein steifes Gel. Für die Versuchsreihen wurden drei unterschiedliche Agarkulturplatten verwendet, da jede Bakterienkultur den für sie am besten geeigneten Nährboden zum Wachstum benötigt.

### Blutagarkulturplatten

Trypticase™ Soy Agar II with 5% Sheep Blood [Fa. Becton and Dickinson, USA] wurde verwendet für die *Streptococcus salivarius*-Kultur und den Plaque-Mundhöhlen-Mix. Bei beiden handelt es sich um hämolysefähige Kokken.

### LB – Agar / YPD – Agar

Die beiden folgenden Agarkulturplatten wurden im Labor selbsttätig gegossen. Dabei wurden zuerst die Grundsubstanzen für die beiden Agarkulturen zusammen mit der entsprechenden Menge an destilliertem Wasser vermischt.

**Tabelle 3.3:** Zusammensetzung für den LB - und YPD – Agar

	LB-Agar (400 ml)	YPD-Agar (1000 ml)
Pepton/Trypton	4 g	20 g
Hefeextrakt	2 g	10 g
Agar, granuliert	6 g	15 g
Glucoselösung (20%)	-	100 ml
NaCl	2 g	-
Destilliertes Wasser	400 ml	900 ml

Die Zusammensetzung des LB – Agars und des YPD –Agars entspricht der der gleichnamigen Medien, bis auf die Zugabe von granuliertem Agar, Produkt Difco™ Agar granulated [Fa. Becton and Dickinson, USA]. Nach Vermischen der angegebenen Bestandteile wurden beide Agarkulturlösungen im Autoklaven bei 134°C autoklaviert, um so die Keimfreiheit zu erreichen. Im Anschluss an diesen Vorgang kühlten die Agarkulturlösungen leicht aus und wurden dann unter einer sterilen Werkbank in sterile Petrischalen (100 mm im Durchmesser) umverteilt. Auf jede einzelne Schale kamen 20 ml der Agarlösungen. Danach mussten die Agarkulturplatten für 12 Stunden aushärten. Nach der Aushärtephase wurden die Agarplatten im Kühlraum bei 4°C gelagert. Die LB - Agarplatten wurden zum Wachstum für die *Staphylokokkus epidermidis*-Kultur und die YPD – Agarplatten für die *Candida albicans*-Kultur verwendet.

### 3.4 Versuchsdurchführung

#### 3.4.1 Bestimmung der Hemmhofgröße

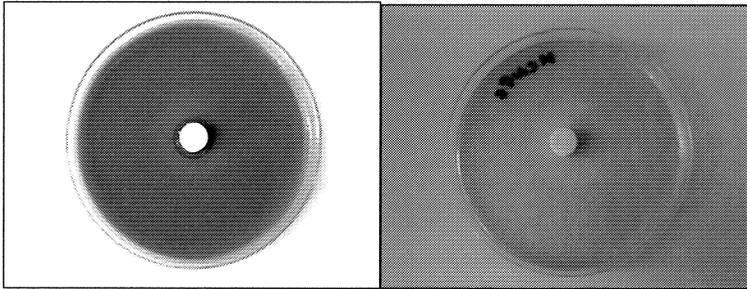
Zu Beginn jeder Versuchsreihe wurden die jeweiligen Bakterienkulturen mit ihren entsprechenden Nährmedien inokuliert. Dazu wurden jeweils 2 ml der Nährlösungen mit 10 µl der entsprechenden Bakterienkultur versetzt. Dieser Arbeitsschritt fand aufgrund der geforderten Keimfreiheit unter einer sterilen Werkbank statt. Als Hilfsmittel dienten zwei Eppendorf – Pipetten [Eppendorf, Hamburg], vier Reagenzgläser für die angesetzten Kulturen und ein Vortex – Gerät [Genie 2, Fa. Roth GmbH, Karlsruhe] zum Durchmischen der vorher pipettierten Lösungen.

**Tabelle 3.4:** Bakterienkulturen mit ihren entsprechenden Medien und Agarkulturplatten

	Medium	Agarträger
<i>S. salivarius</i>	Thioglycolate	TSB – Blutagar
<i>S. epidermidis</i>	LB	LB
<i>C. albicans</i>	YPD	YPD
Plaque - Mix	LB	TSB – Blutagar

Die Inokulationszeit für die Bakterienkulturen betrug 24 Stunden in einem Rüttler bei 37°C. Am Folgetag wurden die Agarkulturplatten mit den Bakterienkulturen beimpft, welche vorher noch in einem Verhältnis von 1:4 (*S. salivarius*, *S. epidermidis* und der Plaque-Mix) bzw. 1:8 (*C. albicans*) mit den Nährmedien verdünnt wurden, um so ein zu schnelles Wachstum auf den Agarträgern zu verhindern. Als Hilfsmittel für die Beimpfung der Agarträger dienten µl - Pipetten [Eppendorf, Hamburg], eine College-Pinzette [Fa. Kern, Würzburg] und autoklavierbare Kunststoffkügelchen, mit einem Durchmesser von 5 mm. Aus Gründen der Keimfreiheit fand dieser Arbeitsschritt unter der sterilen Werkbank statt. Es wurden 50 µl der verdünnten Bakterienkulturen in die dazugehörigen Agarträger pipettiert, und zusätzlich wurden 8-10 sterile Kunststoffkügelchen dazugegeben. Nach Verschluss der Agarschalen konnten die jeweiligen verdünnten Bakterienlösungen mit Hilfe der Kunststoffkügelchen durch vorsichtiges Schwenken der Schalen, gleichmäßig auf den Agarkulturplatten verteilt werden. Danach wurden die Kunststoffkügelchen in ein steriles Becherglas zurückgegeben. Abschließend wurden dann die einzelnen Zementproben mit einer sterilen Pinzette in die Mitte der Agarplatten gesetzt. Die beimpften Agarkulturen

wurden in einem geschlossenen Wärmeschrank bei einer Temperatur von 37°C gelagert.



**Abb. 3. 2:** Versuchsanordnung bei *S. salivarius* (links) und *S. epidermidis* (rechts) mit  $\text{CaKPO}_4$  – Zementprüfkörper einen Tag nach Beimpfung der Agarkulturplatten

Getestet wurde die Wachstumsbeeinflussung der einzelnen Calciumphosphat-Zemente auf *S. salivarius*, *S. epidermidis*, *C. albicans* (klinische Isolate) und dem polymikrobiellen Plaque-Mundhöhlen-Mix (Isolat aus der menschlichen dentalen Plaque). Die Hemmhöfe wurden nach 1, 2, 3, 6, 7 und 10 Tagen gemessen, um so mögliche Variationen der Hemmhofgröße über einen längeren Zeitraum verfolgen zu können. In jeder Versuchsreihe wurden fünf Prüfkörper der einzelnen Calciumphosphat-Zemente und des Calciumhydroxidzementes, welcher als Referenzprobe benutzt wurde, auf die vier unterschiedlichen Bakterienkulturen getestet. Aufgrund diverser Faktoren, wie der pH-Wert des Agars, das Agarvolumen in den Petrischalen, Bakterienkulturkonzentrationen, etc., welche Auswirkungen haben könnten auf das Bakterienwachstum oder auch auf den Hemmeffekt der einzelnen Zemente, wurde jede Testreihe in der gleichen Anordnung wiederholt.

Für die Bestimmung der Hemmhofgrößen wurden die folgenden Calciumphosphat-Zemente bzw. Calciumhydroxidzement getestet:

- "Kerr Life" Calciumhydroxidzement [Fa. Kerr Dentistry, USA] als Referenzzement
- TTCP,  $\text{Ca}(\text{KNaPO}_4)_2$ ,  $\text{CaKPO}_4$  und  $\text{CaNaPO}_4$  jeweils 24 Stunden in Ethanol gemahlen.

- TTCP,  $\text{Ca}(\text{KNaPO}_4)_2$ ,  $\text{CaKPO}_4$  und  $\text{CaNaPO}_4$  jeweils 24 Stunden in Ethanol gemahlen, vermischt mit TTCP 10 min trocken bei 200 U/min gemahlen. Gemischt wurde im Verhältnis 1:1 für 20 s in einer Kaffeemühle.

- TTCP, bei 250 U/min, jeweils für 1 Stunde, 4 Stunden und 24 Stunden in Ethanol nass gemahlen

#### 3.4.2 pH-Wert-Messungen am Prüfkörper und im Agar

Die pH-Wert Bestimmung der Prüfkörper erfolgte mit Hilfe einer Universal – Indikatorlösung [Fa. Merck KGaA, Darmstadt]. Diese war in zwei Ausführungen vorhanden, zum einen für den Indikationsbereich von pH 4-10 und zum anderen für den Bereich von pH 9-13. Die Versuchsanordnung ist vergleichbar mit der vorher beschriebenen Hemmhofgrößenbestimmung. Am 1, 2, 3, 6, 7 und 10 Tag, nach Beimpfen der Agarplatten wurde der pH-Wert durch Betropfen der jeweiligen Prüfkörper mit der Universal – Indikatorlösung, bestimmt. Dies erfolgte anhand der vorliegenden pH – Farbtafeln, die der Indikatorlösung beilagen. Vergleichend zu den Prüfkörpern auf den Bakterienkulturen, wurde eine Referenzprobe ohne Kulturen erstellt, um mögliche Auswirkungen der Bakterienstämme bzw. des Pilzes auf den pH-Wert der Prüfkörper zu kontrollieren.

Die Bestimmung der pH-Werte im Agar erfolgte ohne Beimpfung der Agarplatten mit Bakterien- bzw. Pilzkulturen. Die Herstellung der Agarplatten erfolgte nach der oben beschriebenen Methode. Als Hilfsmittel für die Bestimmung der pH-Werte im Agar diente eine Mini-pH-Elektrode mit einem Durchmesser an der Spitze von 660  $\mu\text{m}$ , Modell ZBE ECAL [Fa. World Precision Instruments (WPI), Berlin]. Diese wurde mit Hilfe eines Verbindungsstückes (Level Shifting Device) [Fa. World Precision Instruments (WPI), Berlin] an ein pH-Meter angeschlossen. Die Zementproben wurden vor dem Versuchsbeginn für 24 Stunden in einem Wärmebad [Fa. Hartenstein GFL, Hannover] ausgelagert. Nach Eichen der Elektrode in einer sterilen Kochsalzlösung wurde diese in definierten Abständen zum Prüfkörper in den Agar eingebracht. In Schritten von 1 mm, mit dem Prüfkörper als Ausgangspunkt, wurde der pH-Wert bestimmt. Die Werte konnten über das angeschlossene pH-Meter abgelesen werden. Gemessen wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden, an den unterschiedlichen Agarböden (Trypticase™ Soy Agar, LB – Agar, YPD-Agar). Von

den einzelnen Messwerten wurden jeweils die Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung berechnet.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Abbindeigenschaften alkalischer Calciumphosphate

#### *Abbindezeit*

Die Abbindezeiten der einzelnen Calciumphosphat-Zemente variieren im Bereich zwischen 5 bis 15 Minuten. Gründe für die differierenden Abbindezeiten sind beispielsweise unterschiedliche Pulver-/Flüssigkeitsverhältnisse, die zur Pastenformung nötig waren oder Änderungen der chemischen Zusammensetzung der Werkstoffe durch unterschiedlich lange mechanische Aktivierung. Hervorzuheben ist, dass nur bei den mechanisch aktivierten Calciumphosphaten eine Abbindereaktion stattgefunden hat, die Rohmaterialien zeigten in Verbindung mit Wasser oder  $\text{NaHPO}_4$ -Lösung nur ein geringes Abbindeverhalten und keine nennenswerte Verfestigung der Zementpaste. Durch den Zusatz verschiedener flüssiger Phasen lassen sich die Abbindezeiten beeinflussen, die  $\text{NaHPO}_4$ -Lösung zeigt klinisch akzeptable Abbindezeiten von 5-6 Minuten (Tabelle 4.1).

**Tab. 4.1:** Abbindezeiten der Calciumphosphatzemente

Calciumphosphat-Zemente	Pulver-/Flüssigkeitsverhältnis [g/ml]	Abbindezeit [min]	Partikelgröße D50 [ $\mu\text{m}$ ]
$\text{CaKPO}_4$	2.0	6	2,45
$\text{CaNaPO}_4$	2.0	5	2,72
$\text{Ca}_2(\text{K, Na})(\text{PO}_4)_2$	2.0	5	0,80

#### *Druckfestigkeit*

Die Druckfestigkeit der Zementmatrixen sind in Tabelle 4.2 wiedergegeben und bewegten sich im Bereich von ca. 5-10 MPa für die einkomponentigen Zemente. Höhere Festigkeiten bis ca. 25 MPa wurden für Mischungen aus TTCP, 10 min trocken gemahlen, und  $\text{Ca}_2\text{KNaPO}_4$ , 24 Stunden nass gemahlen, erhalten. Die Druckfestigkeiten der einkomponentigen TTCP-Zemente variiert je nach Mahldauer in einem Bereich zwischen 5.6 und 10.0 MPa [86]. Hierbei nimmt die Druckfestigkeit der Zemente mit Verlängerung der Mahldauer signifikant ( $p < 0.001$ ) zu. Die Porosität

der TTCP-Zemente nimmt aufgrund eines veränderten Pulver- und Flüssigkeitsverhältnisses stetig zu (Tabelle 4.3).

**Tab. 4.2:** Druckfestigkeiten und Pulver-/Flüssigkeitsverhältnisse der Calciumphosphatverbindungen

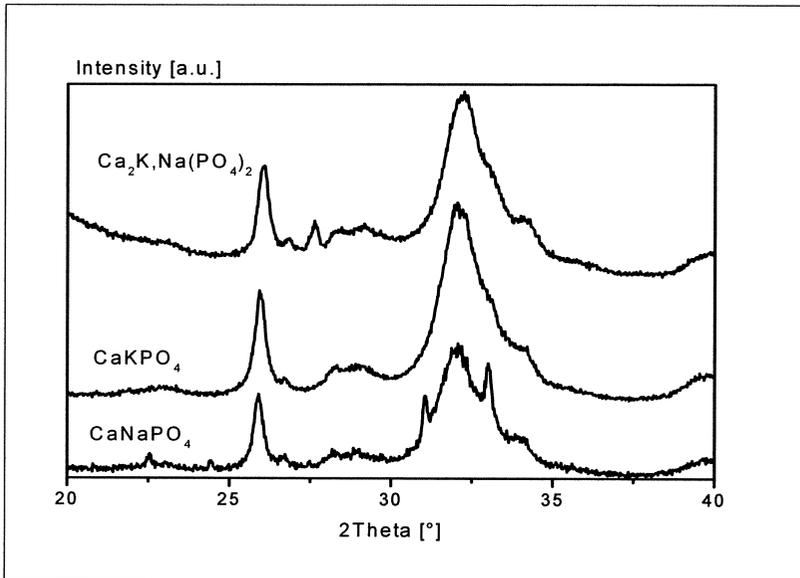
Verbindung	Pulver-/Flüssigkeitsverhältnis [g/ml]	Druckfestigkeit [MPa]
TTCP 24h nass gemahlen	2.0	9.76 +/- 1.55
CaKPO <sub>4</sub> 24h nass gemahlen	2.0	4.82 +/- 1.33
CaNaPO <sub>4</sub> 24h nass gemahlen	2.0	7.49 +/- 1.28
Ca <sub>2</sub> KNaPO <sub>4</sub> 24h nass gemahlen	2.0	10.58 +/- 1.55
TTCP 10min trocken gemahlen/ Ca <sub>2</sub> KPO <sub>4</sub> 24h nass gemahlen	3.3	12.61 +/- 4.07
TTCP 10min trocken gemahlen/ Ca <sub>2</sub> NaPO <sub>4</sub> 24h nass gemahlen	3.3	23.41 +/- 2.01
TTCP 10min trocken gemahlen/ Ca <sub>2</sub> KNaPO <sub>4</sub> 24h nass gemahlen	3.3	25.88 +/- 1.81

**Tab. 4.3:** Abbindezeiten, Druckfestigkeiten und relative Porosität für nanokristalline TTCP-Zemente in Abhängigkeit von der Mahldauer der einzelnen Zemente

Mahldauer [h]	P/L-Verhältnis [g/ml]	Abbindezeit [min]	Druckfestigkeit [MPa]	Relative Porosität [%]
0	2.5	-	15	-
1	2.67	5.6 ± 2.6	39	40 ± 1.0
2	2.50	7.2 ± 1.6	48	38 ± 0.2
4	2.35	7.5 ± 1.0	55	40 ± 0.5
8	2.22	8.5 ± 1.9	67	40 ± 0.9
12	2.10	10.3 ± 1.4	73	42 ± 0.9
24	2.00	10.0 ± 2.1	88	45 ± 0.2

### Röntgendiffraktometrie

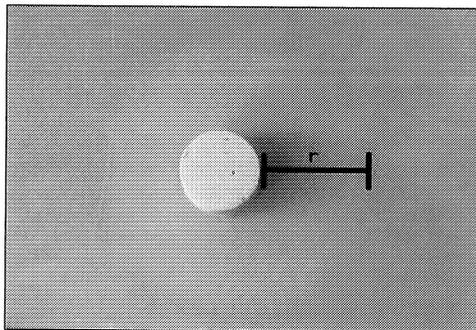
Typische Röntgendiffraktogramme ausgehärteter Zemente aus den alkalidotierten Calciumphosphaten sind in Abbildung 4.1 wiedergegeben. Die Calciumphosphate zeigen das typische Beugungsmuster einer Apatitstruktur, vergleichbar mit der von Hydroxylapatit, mit Beugungsreflexen bei  $2\theta = 25.9^\circ$  (0 0 2) und zwischen  $31.0 - 34.0^\circ$  [(3 -2 1), (2 -1 2), (3 0 0), (2 0 2)]. Weiter ließ sich feststellen, dass nur geringe Mengen der Ausgangsstoffe ohne Reaktion verblieben.



**Abb. 4.1:** Röntgendiffraktogramme von mechanisch aktivierten Zementen aus Calcium-Alkali-Phosphaten nach 24h Abbindezeit mit 2.5%-iger  $\text{NaPO}_4$ -Lösung bei  $37^\circ\text{C}$ .

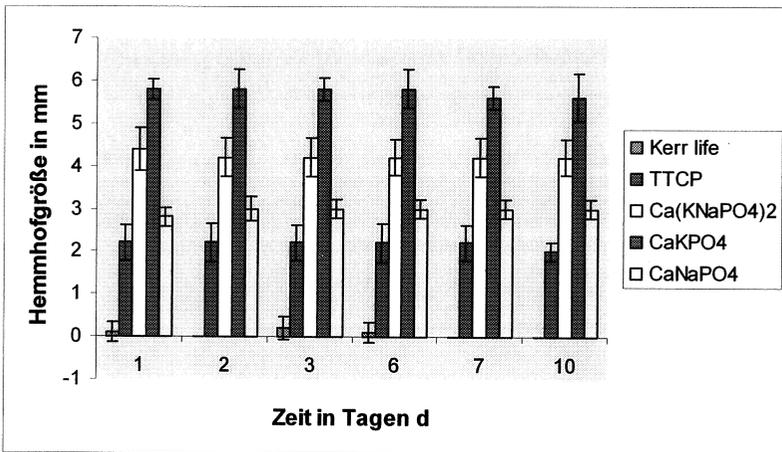
#### 4.2. Bestimmung der Hemmhofgrößen

Die Vermessung der Hemmhöfe wurde mittels eines handelsüblichen Lineals [Fa. Herlitz, Deutschland, Messgenauigkeit: 0,5 mm] durchgeführt. Definiert wird der Hemmhof über die Abmessung vom Prüfkörpertrand bis zum äußersten erkennbaren Rand des Hemmhofes.



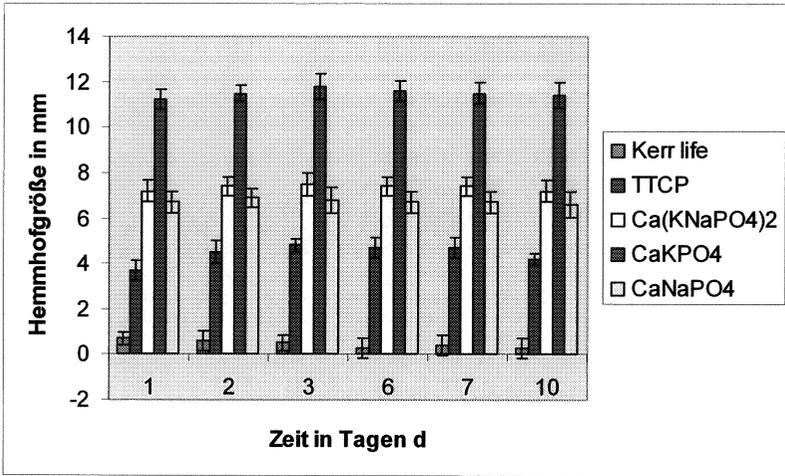
**Abb. 4.2:** Bestimmung der Hemmhofgröße anhand von *S. epidermidis* und  $\text{CaKPO}_4$ -Zement

Der erste Ergebnisteil umfasst die Messungen der Hemmhofradien bei den 24 Stunden lang in Ethanol gemahlene Alkaliphosphaten ( $\text{Ca}(\text{KNaPO}_4)_2$ ,  $\text{CaKPO}_4$  und  $\text{CaNaPO}_4$ ), und Tetracalciumphosphat (TTCP, 24 Stunden in Ethanol gemahlen) sowie dem Calciumhydroxid-Präparat als Referenz. Das Calciumhydroxid wirkt aufgrund seiner hohen basischen Aktivität auf die meisten grampositiven Keime bakterizid. Über ein zehntägiges Intervall wurde der antibakterielle Effekt der Calciumphosphate auf die Kulturen von *S. salivarius*, *S. epidermidis*, *C. albicans* und der Plaque-Mischflora getestet. Beurteilt wurden die Größen der Hemmhöfe sowie die Konstanz des antibakteriellen Effektes. Die in den folgenden Diagrammen angegebenen Messwerte beziehen sich auf die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Absolutwerte.

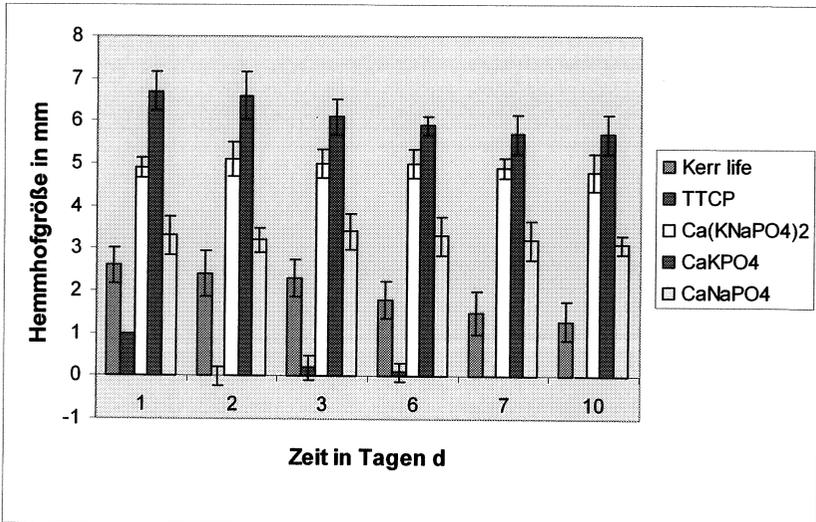


**Abb. 4.3:** Hemmhofgrößen im Agardiffusionstest verschiedener alkalidotierter CaP-Zemente und mechanisch aktivierten Tetracalciumphosphats im Vergleich zu Calciumhydroxid-/Salicylat-Zement für *S. salivarius* im Verlauf von 10 Tagen

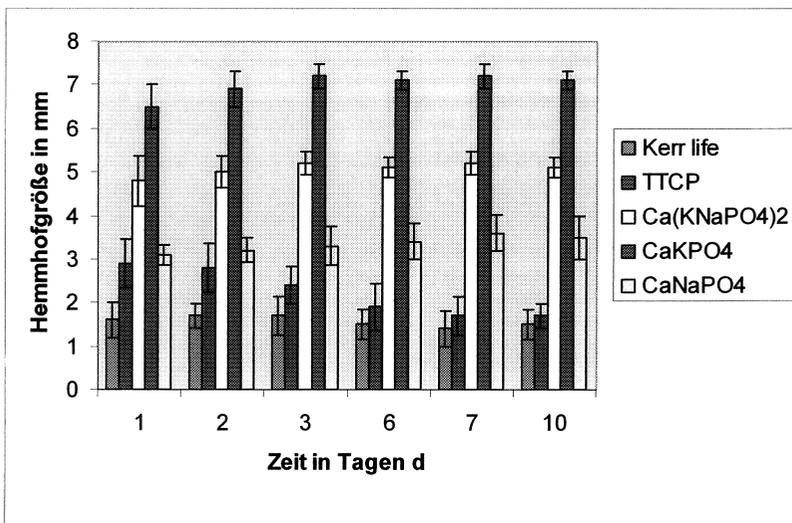
Die Ergebnisse zeigen, dass sich die mechanisch aktivierten Calciumphosphat-Zemente reaktiver gegenüber den Bakterienkulturen von *S. salivarius*, *S. epidermidis* und der Plaque-Mischflora verhalten als das Calciumhydroxid-/Salicylat-Präparat "Kerr Life". Unter den Calciumphosphatzementen wiesen die mit den Alkaliionen ( $\text{Na}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ) substituierten Calciumphosphate eine höhere Reaktivität gegenüber den Bakterienkulturen auf als das mechanisch aktivierte Tetracalciumphosphat.



**Abb. 4.4:** Hemmhofgrößen im Agardiffusionstest verschiedener alkalidotierter CaP-Zemente und mechanisch aktivierten Tetracalciumphosphats im Vergleich zu Calciumhydroxid-/Salicylat-Zement für *S. epidermidis* im Verlauf von 10 Tagen

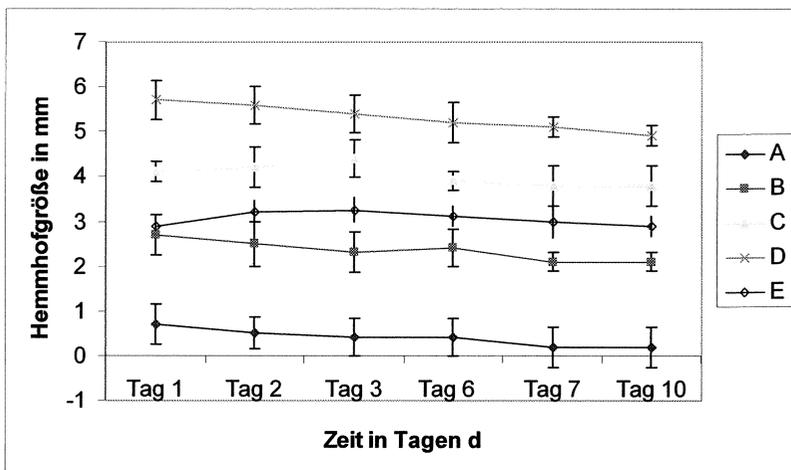


**Abb. 4.5:** Hemmhofgrößen im Agardiffusionstest verschiedener alkalidotierter CaP-Zemente und mechanisch aktivierten Tetracalciumphosphats im Vergleich zu Calciumhydroxid-/Salicylat-Zement für *C. albicans* im Verlauf von 10 Tagen

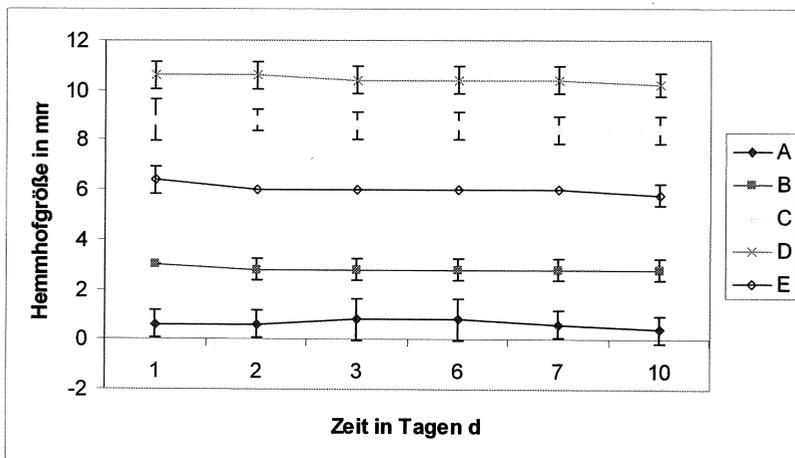


**Abb. 4.6:** Hemmhofgrößen im Agardiffusionstest verschiedener alkalidotierter CaP-Zemente und mechanisch aktivierten Tetracalciumphosphats im Vergleich zu Calciumhydroxid-/Salicylat-Zement für den Plaque-Mundhöhlen-Mix im Verlauf von 10 Tagen

Der  $\text{CaKPO}_4$ -Zement zeigte von allen getesteten Zementen die größten Hemmhöfe, und wirkte somit bakterizider als die anderen Zemente. Bei der Hefe *C. albicans* ließ sich für den Tetracalciumphosphatzement die geringste Hemmhofausdehnung beobachten, hier zeigte der Calciumhydroxidzement einen größeren antibakteriellen Effekt. Als besonders wirkungsvolle Antimykotika gegenüber *C. albicans* stellten sich die alkalidotierten Calciumphosphatzemente  $\text{CaKPO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{KNaPO}_4)_2$  und  $\text{CaNaPO}_4$  dar. Insgesamt ließ sich aber beobachten, dass die Hemmhöfe bei der inokulierten *C. albicans* im Vergleich zu den Bakterienkulturen einen geringeren Radius aufwiesen. Dieses korreliert nicht mit dem Sachverhalt, dass die *C. albicans*-Kultur vor dem Beimpfen der Agarplatten noch mit dem YPD-Nährmedium im Verhältnis 1:8 verdünnt wurde, die Bakterienstämme von *S. salivarius*, *S. epidermidis* und der Plaque-Mischflora mit ihren entsprechenden Medien aber nur im Verhältnis von 1:4 verdünnt wurden. Eine Erklärung für diese Feststellung ist zum einen die mögliche höhere Resistenz der Pilz-Kultur in Bezug auf die getesteten Calciumhydroxid- bzw. Calciumphosphatzemente oder auch ein schnelleres Wachstum. Im Verlauf dieser Versuchsreihe wurde auch die Stabilität der Hemmhofradien der Zemente bei den einzelnen Mikroorganismen kritisch beurteilt.



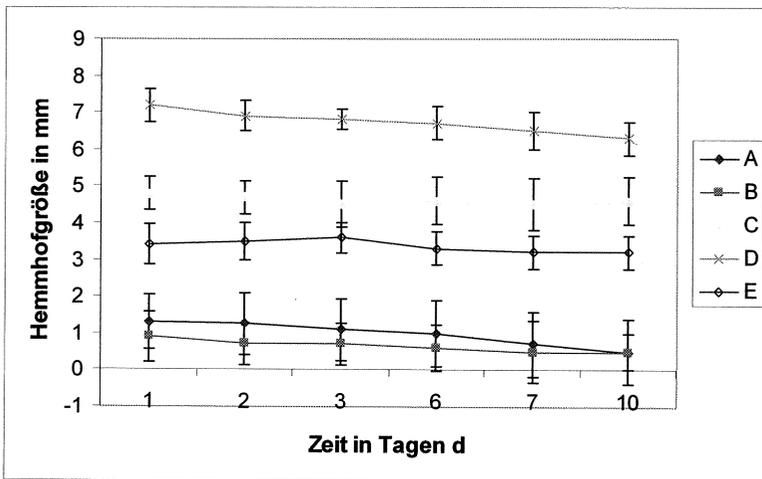
**Abb. 4.7:** Stabilität der Hemmhoftgrößen bei *S. epidermidis* im Verlauf von 10 Tagen, mit A= Calciumhydroxid-/Salicylat-Zement, B= TTCP, C=  $\text{Ca}(\text{KNaPO}_4)_2$ , D=  $\text{CaK PO}_4$  und E=  $\text{CaNaPO}_4$ ; B-E wurden 24h mechanisch durch Mahlung in Ethanol aktiviert



**Abb. 4.8:** Stabilität der Hemmhoftgrößen bei *S. salivarius* im Verlauf von 10 Tagen, mit A= Calciumhydroxid-/Salicylat-Zement, B= TTCP, C=  $\text{Ca}(\text{KNaPO}_4)_2$ , D=  $\text{CaK PO}_4$  und E=  $\text{CaNaPO}_4$ ; B-E wurden 24h mechanisch durch Mahlung in Ethanol aktiviert

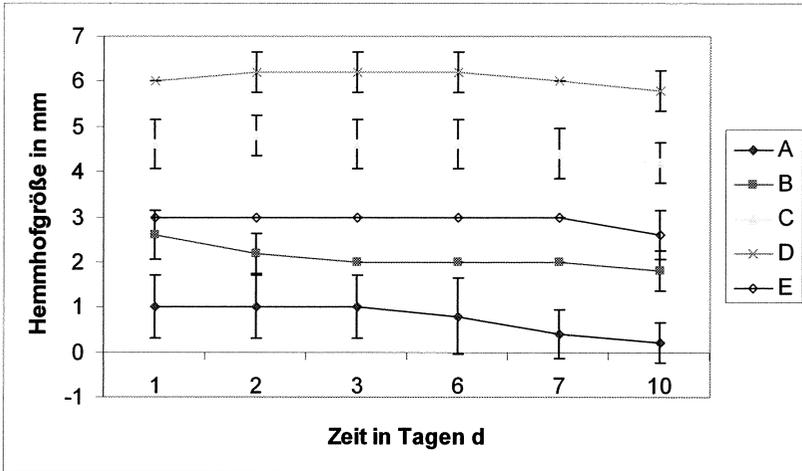
Eine generelle Aussage für alle getesteten Zemente ließ sich nicht treffen, die Stabilität der Größe des Hemmhofes differierte bei den unterschiedlichen Bakterienpezies und dem Fungus. Beim *S. salivarius* zeigten zwei der Calciumphosphat-Zemente ( $\text{CaKPO}_4$ , TTCP) und der Calciumhydroxidzement einen

stetigen Rückgang im Ausmaß der Hemmhöfe, das  $\text{Ca}(\text{KNaPO}_4)_2$  verzeichnete erst einen geringen Anstieg, fiel dann aber unter den Ausgangswert zurück. Als Ausnahme erwies sich  $\text{CaNaPO}_4$ , dieses zeigte über die Dauer von zehn Tagen konstante Hemmhofgrößen. Diese Konstanz konnte bei *S. epidermidis* für fast alle getesteten Zemente beobachtet werden, über den Zeitraum von zehn Tagen ließ sich nur bei  $\text{CaNaPO}_4$  ein geringer Rückgang bezüglich der Größe des Hemmhofes erkennen. In Verbindung mit *C. albicans* zeigen die mit Kalium und Natrium versetzten Calciumphosphatzemente eine relative Konstanz bzw. nur einen minimalen Rückgang des Hemmhofes, wobei mechanisch aktiviertes Tetracalciumphosphat und der Calciumhydroxidzement eine kontinuierliche Abnahme bezüglich der Größe des Hemmhofes vorweisen.



**Abb. 4.9:** Stabilität der Hemmhofgrößen bei *C. albicans* im Verlauf von 10 Tagen, mit A= Calciumhydroxid-/Salicylat-Zement, B= TTCP, C=  $\text{Ca}(\text{KNaPO}_4)_2$ , D=  $\text{CaKPO}_4$  und E=  $\text{CaNaPO}_4$ ; B-E wurden 24h mechanisch durch Mahlung in Ethanol aktiviert.

Bei der Plaque-Mischflora ließ sich sowohl für den Calciumhydroxidzement, als auch für die Calciumphosphatzemente eine Verringerung der Größe der Hemmhöfe beobachten, auffällig dabei war, dass  $\text{CaKPO}_4$  und  $\text{Ca}(\text{KNaPO}_4)_2$  zunächst einen geringen Anstieg bis zum dritten Tag verzeichneten, im weiteren Verlauf aber wieder abnahmen und unter ihre Ausgangswerte fielen.

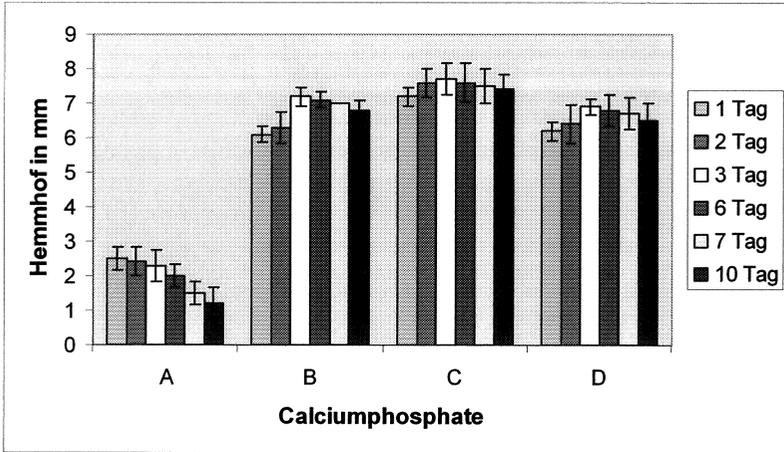


**Abb. 4.10:** Stabilität der Hemmhofgrößen bei der *Plaque-Mischflora* im Verlauf von 10 Tagen, mit A= Calciumhydroxid-/Salicylat-Zement, B= TTCP, C=  $\text{Ca}(\text{KNaPO}_4)_2$ , D=  $\text{CaK PO}_4$  und E=  $\text{CaNaPO}_4$ ; B-E wurden 24h mechanisch durch Mahlung in Ethanol aktiviert.

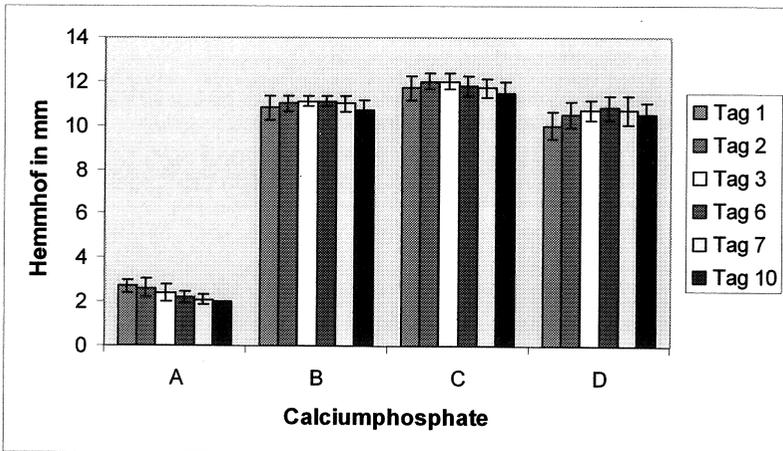
Eine Begründung für dieses unterschiedliche Verhalten könnte in der Wachstumskurve der Bakterien- bzw. Pilzkulturen (vgl. Abbildung 3.1) liegen, oder aber in der abfallenden pH-Kapazität der Calciumhydroxid- bzw. Calciumphosphat-Zemente.

#### 4.2.1 Zusatz von gemahlenem TTCP

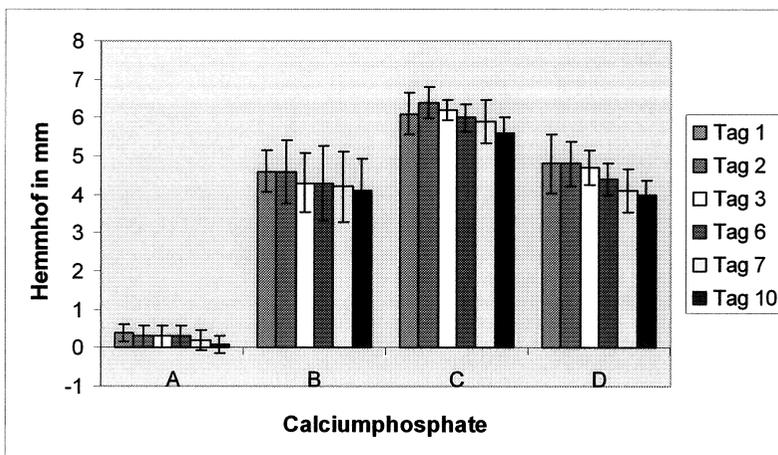
In einer weiteren Versuchsreihe wurden die 24 Stunden mechanisch aktivierten Calciumphosphate (TTCP, CSP, CPP und CPSP) im Verhältnis von 1:1 mit kurz gemahlenem TTCP (10 min Mahldauer) versetzt. Ziel war eine Steigerung der mechanischen Festigkeit durch eine geringere Porosität der Zementmatrix, wie sie in Kap. 4.1 nachgewiesen werden konnte. Die Hemmhofgrößen dieser Zemente im Agardiffusionstest gegenüber den getesteten Kulturen von *S. salivarius*, *S. epidermidis*, *C. albicans* und dem *Plaque-Mundhöhlen-Mix* sind in den Abbildungen 4.11-4.14 wiedergegeben.



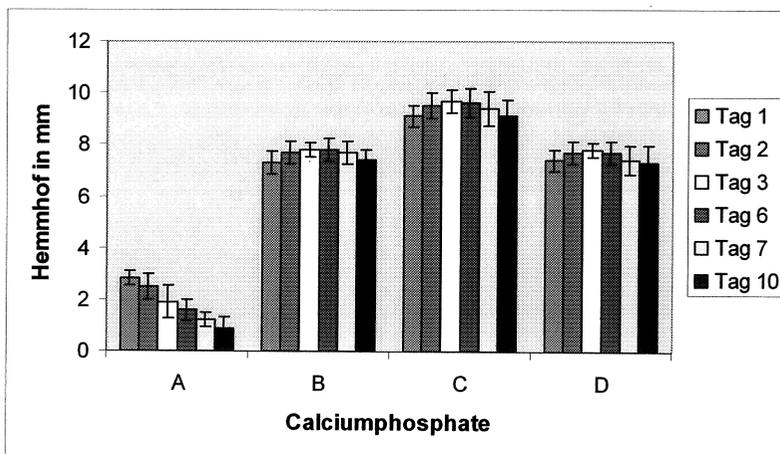
**Abb. 4.11:** Verteilung der Hemmhöfe im Agardiffusionstest über einen Zeitraum von 10 Tagen von Zementmischungen aus TTCP (10 min gemahlen) mit A = TTCP (24h gemahlen), B =  $\text{Ca}(\text{KNaPO}_4)_2$  (24h gemahlen), C =  $\text{CaKPO}_4$  (24h gemahlen) und D =  $\text{CaNaPO}_4$  (24h gemahlen) gegenüber *S. salivarius*.



**Abb. 4.12:** Verteilung der Hemmhöfe im Agardiffusionstest über einen Zeitraum von 10 Tagen von Zementmischungen aus TTCP (10 min gemahlen) mit A = TTCP (24h gemahlen), B =  $\text{Ca}(\text{KNaPO}_4)_2$  (24h gemahlen), C =  $\text{CaKPO}_4$  (24h gemahlen) und D =  $\text{CaNaPO}_4$  (24h gemahlen) gegenüber *S. epidermidis*.



**Abb. 4.13:** Verteilung der Hemmhöfe im Agardiffusionstest über einen Zeitraum von 10 Tagen von Zementmischungen aus TTCP (10 min gemahlen) mit A = TTCP (24h gemahlen), B =  $\text{Ca}(\text{KNaPO}_4)_2$  (24h gemahlen), C =  $\text{CaKPO}_4$  (24h gemahlen) und D =  $\text{CaNaPO}_4$  (24h gemahlen) gegenüber *C. albicans*.



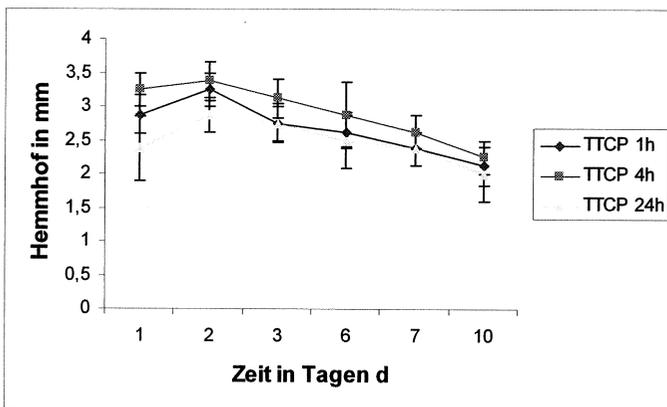
**Abb. 4.14:** Verteilung der Hemmhöfe im Agardiffusionstest über einen Zeitraum von 10 Tagen von Zementmischungen aus TTCP (10 min gemahlen) mit A = TTCP (24h gemahlen), B =  $\text{Ca}(\text{KNaPO}_4)_2$  (24h gemahlen), C =  $\text{CaKPO}_4$  (24h gemahlen) und D =  $\text{CaNaPO}_4$  (24h gemahlen) gegenüber der Plaque-Mischflora.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich durch den Zusatz von gemahlenem Tetracalciumphosphat der antimikrobielle Effekt der einzelnen Calciumorthophosphate in Bezug auf die Bakterienart *S. salivarius*, *S. epidermidis* und der Plaque-Mischflora verstärkt hat. Bei der Kombination der beiden

Tetracalciumphosphate stellte sich kein vergrößernder Effekt ein, im Vergleich zu den Reinzementen zeigte sich kein Unterschied.

Bei der Pilzkultur *C. albicans* stellte sich generell kein verstärkter Hemmeffekt ein, ein Vergleich mit den Reinzementen zeigte hier nur minimale Unterschiede in der Hemmhofausdehnung. Der  $\text{Ca}(\text{KNaPO}_4)_2$ -Zement weist bei *S. salivarius* eine durchschnittliche Zunahme von 3 mm in der Größe des Hemmhofes auf, bei *S. epidermidis* beträgt diese 4 mm und bei der Plaque-Mischflora 2.5 mm. Der  $\text{CaNaPO}_4$ -Zement verhält sich bezüglich der entsprechenden Bakterienkulturen wie  $\text{Ca}(\text{KNaPO}_4)_2$ . Beim  $\text{CaKPO}_4$ -Zement, der in den Versuchsreihen zuvor die größten Hemmhöfe aufwies, fiel die Steigerung nach der Zugabe von TTCP deutlich geringer aus. In Verbindung mit *S. salivarius* vergrößerte sich der Hemmhof durchschnittlich um 1.5 mm, bei *S. epidermidis* um 1 mm. Einzig bei der Plaque-Mischflora zeigte er vergleichbare Ergebnisse zu den anderen Calciumphosphaten mit einer Steigerung von 2.5 mm. Die Kombination von TTCP mit den Alkaliphosphaten zeigt somit einen größeren antimikrobiellen Effekt im Vergleich zu den Reinzementen.

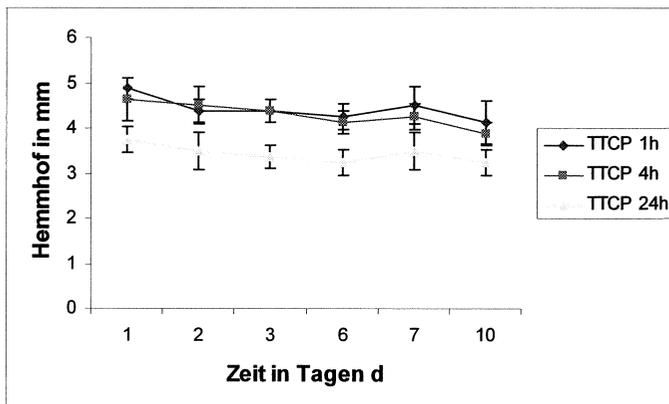
#### 4.2.2 Variation der Mahldauer bei TTCP



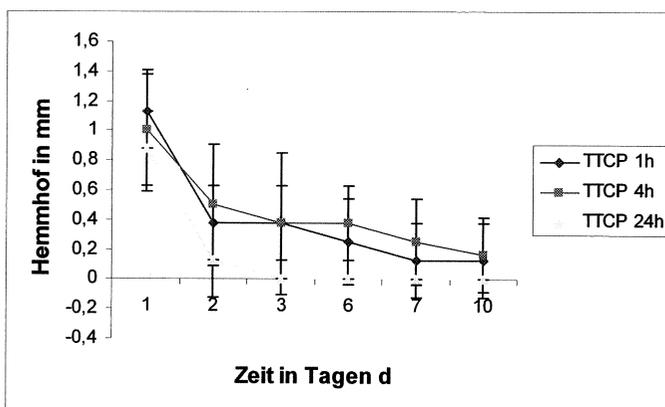
**Abb. 4.15:** Ausdehnung der Hemmhöfe im Agardiffusionstest bei *S. salivarius* in Abhängigkeit von der Mahldauer von mechanisch aktiviertem Tetracalciumphosphat.

In dieser Versuchsreihe wurden die Auswirkungen unterschiedlicher mechanischer Aktivierung durch Variation in der Mahldauer beim Tetracalciumphosphat auf die antimikrobiellen Eigenschaften getestet. Das Tetracalciumphosphat wurde hierzu bei

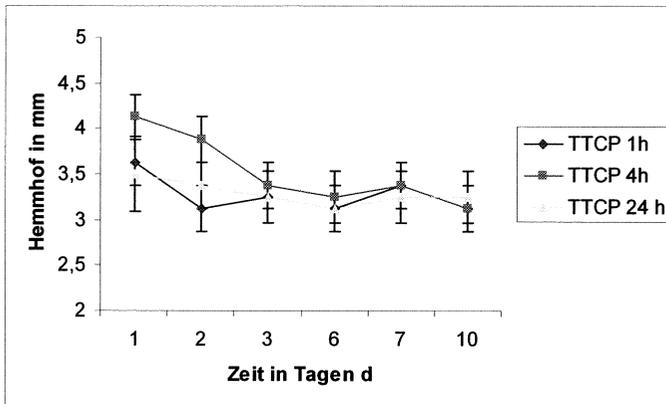
250 U/min, jeweils für 1 Stunde, 4 Stunden und 24 Stunden, nass in Ethanol gemahlen.



**Abb. 4.16:** Ausdehnung der Hemmhöfe im Agardiffusionstest bei *S. epidermidis* in Abhängigkeit von der Mahldauer von mechanisch aktiviertem Tetracalciumphosphat.



**Abb. 4.18:** Ausdehnung der Hemmhöfe im Agardiffusionstest bei *C. albicans* in Abhängigkeit von der Mahldauer von mechanisch aktiviertem Tetracalciumphosphat.

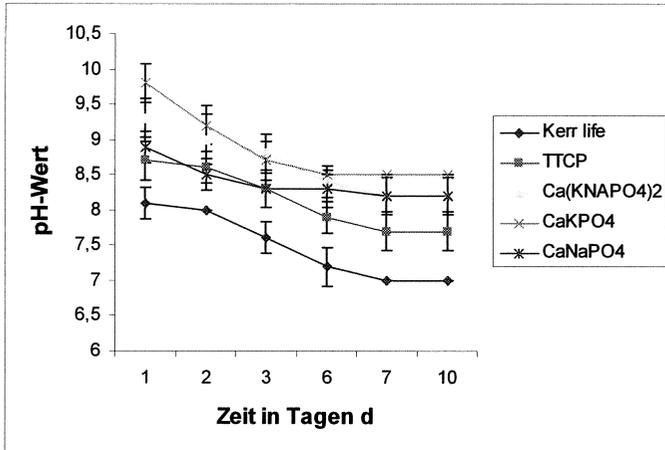


**Abb. 4.19:** Ausdehnung der Hemmhöfe im Agardiffusionstest bei der *Plaque-Mischflora* in Abhängigkeit von der Mahldauer von mechanisch aktiviertem Tetracalciumphosphat.

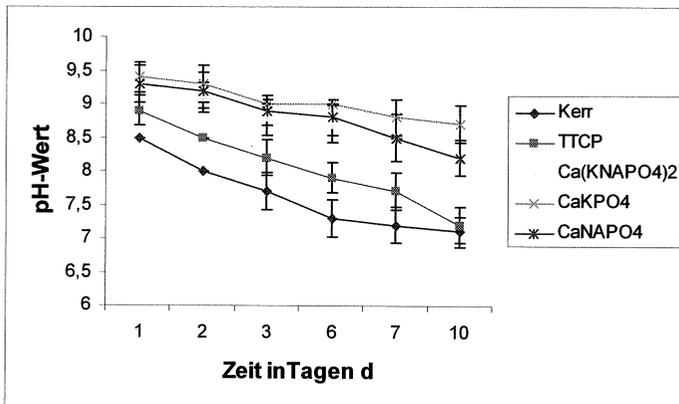
Die Testreihen bezüglich der unterschiedlich lang gemahlene Tetracalciumphosphatzemente (mechanische Aktivierung) zeigten nicht die erwarteten Ergebnisse. Anzunehmen war eine Steigerung der biologischen Aktivität, also eine Steigerung des Hemmverhaltens auf die Bakterien- bzw. Pilzkulturen mit zunehmender Mahldauer. Es zeigten sich jedoch relativ ausgeglichene Hemmhofgrößen der unterschiedlich lang gemahlene Tetracalciumphosphate.

#### 4.3 pH-Werte der Prüfkörper und im Agar

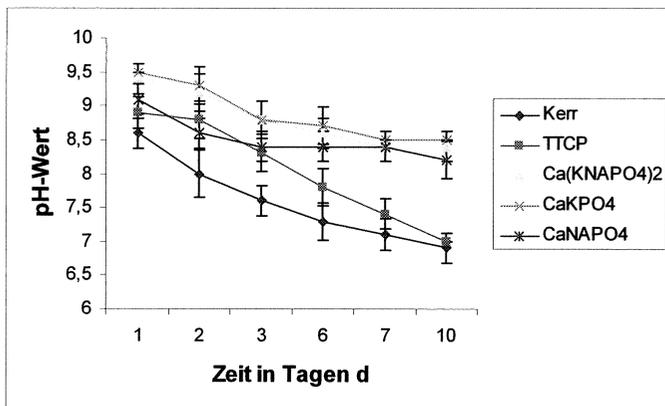
Die Ergebnisse zeigen für die alkalischen Calciumphosphatzemente ( $\text{CaKPO}_4$ ,  $\text{Ca}_2(\text{K, Na})(\text{PO}_4)_2$  und  $\text{CaNaPO}_4$ ) wesentlich höhere pH-Werte am Prüfkörper als das Tetracalciumphosphat oder das herkömmliche Calciumhydroxid-Präparat (Kerr Life). Die pH-Werte am Prüfkörper wurden mit Hilfe einer Universal – Indikatorlösung [Fa. Merck KGaA, Darmstadt] bestimmt. Diese war in zwei Ausführungen vorhanden, zum einen für den Indikationsbereich pH 4-10 und zum anderen für den Bereich pH 9-13. Bei den Versuchsreihen der pH-Wert-Bestimmung am Prüfkörper erfolgte eine Beimpfung der Agarträger mit den unter Kapitel 3.3 genannten Mikroorganismen. Bei der pH-Wert-Bestimmung im Agarmedium blieb eine Beimpfung der Agarplatten aus. Die in der Tendenz höheren pH-Werte bei den Calciumphosphaten zeigte sich bei allen getesteten Bakterien- und Pilzkulturen.



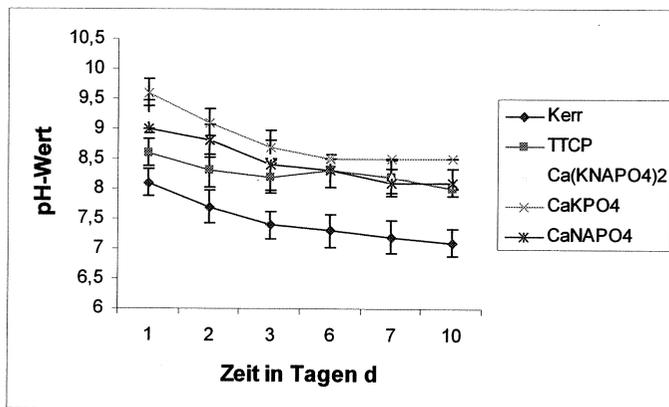
**Abb. 4.20:** pH-Wert-Verlaufskurve am Prüfkörper im Agardiffusionstest bei *S. salivarius* über einen Zeitraum von 10 Tagen. Der pH-Wert wurde bestimmt mit einer Universal-Indikatorlösung [Fa. Merck KGaA, Darmstadt].



**Abb. 4.21:** pH-Wert-Verlaufskurve am Prüfkörper im Agardiffusionstest bei *S. epidermidis* über einen Zeitraum von 10 Tagen. Der pH-Wert wurde bestimmt mit einer Universal-Indikatorlösung [Fa. Merck KGaA, Darmstadt].



**Abb. 4.22:** pH-Wert-Verlaufskurve am Prüfkörper im Agardiffusionstest bei *C. albicans* über einen Zeitraum von 10 Tagen. Der pH-Wert wurde bestimmt mit einer Universal-Indikatorlösung [Fa. Merck KGaA, Darmstadt].



**Abb. 4.23:** pH-Wert-Verlaufskurve am Prüfkörper im Agardiffusionstest bei der *Plaque-Mischflora* über einen Zeitraum von 10 Tagen. Der pH-Wert wurde bestimmt mit einer Universal-Indikatorlösung [Fa. Merck KGaA, Darmstadt].

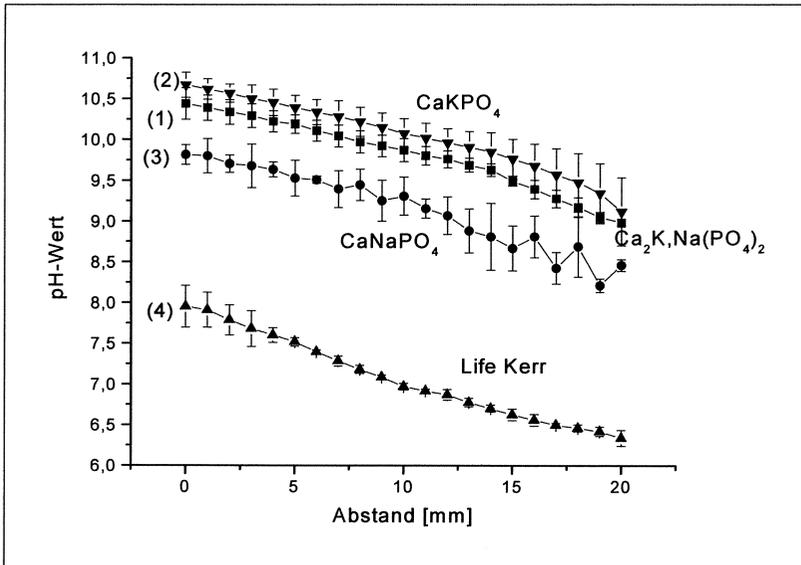
Die höchsten pH-Werte am Prüfkörper zeigte der CaKPO<sub>4</sub>-Zement mit pH 9,3 bis 9,8, die beiden anderen Alkaliphosphate variierten im Bereich zwischen 9,0 und 9,5. Über den Versuchszeitraum von zehn Tagen zeigten die genannten alkalischen Calciumphosphate auch einen relativ konstanten pH-Verlauf. Diese Ergebnisse beruhen wahrscheinlich auf der Tatsache, dass die getesteten Alkaliphosphate ein höheres alkalisches Potential aufweisen und eher in der Lage sind Ionen

abzugeben als das Calciumhydroxid. Letzteres weist nur ein geringes Löslichkeitsprodukt ( $LP = 8.9 \times 10^{-5} \text{ mol}^3/\text{l}^3$ ) auf, wodurch nur geringe Mengen an Hydroxylionen abgegeben werden können, die durch den Agar abgepuffert werden.

Die pH-Wert-Messungen im Agarmedium zeigen ähnliche Ergebnisse wie am Prüfkörper selbst. Auch hier lassen sich mit pH 10,7 die höchsten Werte für  $\text{CaKPO}_4$  messen. Die beiden anderen Alkaliphosphate  $\text{Ca}_2(\text{K,Na})(\text{PO}_4)_2$  und  $\text{CaNaPO}_4$  mit Werten zwischen pH 10,5 und 9,7 zeigen ebenfalls hohe Ausgangswerte, erreichen aber nicht den von  $\text{CaKPO}_4$ . Die geringsten Werte wurden für  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Salicylat-Zement gemessen, der durchschnittliche Wert liegt hier bei pH 8,0. Dieses lässt sich ebenfalls auf das geringere Löslichkeitsprodukt und die damit verbundene geringe Fähigkeit Ionen abzugeben zurückführen. Allen Calciumphosphaten gemeinsam war die stetige Abnahme des pH-Wertes im Verlauf des zehntägigen Messintervalls. Neben den allgemeinen pH-Wert-Messungen im Agarmedium wurde auch die Abhängigkeit des pH-Wertes in Bezug auf die Entfernung zum Prüfkörper bestimmt (Abbildung 4.24).

Die Kurven der einzelnen Alkaliphosphate und des Calciumhydroxids ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) verdeutlichen eine kontinuierliche Abnahme des pH-Wertes mit zunehmender Distanz zum Zementprüfkörper, wobei die drei Alkaliphosphate insgesamt eine geringere Abnahme des pH-Wertes zeigen, als  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Bei einer Entfernung von 20 mm zum Prüfkörper fällt die durchschnittliche Abnahme des pH-Wertes bei den Alkaliphosphaten deutlich geringer aus, als bei  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Für die Alkaliphosphate variiert die Abnahme zwischen 1,2 und 1,5 pH-Einheiten, das Calciumhydroxidpräparat verliert fast 2 pH-Einheiten auf diese Entfernung.

Die Pufferqualität des Agarmediums ist wahrscheinlich der Grund für diese Ergebnisse. Die Bestimmung des pH-Minimums, erforderlich für einen Hemmeffekt bezüglich des Bakterienwachstums, bei den Alkaliphosphaten, zeigte leicht abweichende Ergebnisse im Vergleich zu den zuvor gemachten Beobachtungen.



**Abb. 4.24:** pH-Werte gemessen im Agar nach einem Tag mit einer pH-Mikroelektrode in Abhängigkeit von der Entfernung zum Prüfkörper

## 5. DISKUSSION

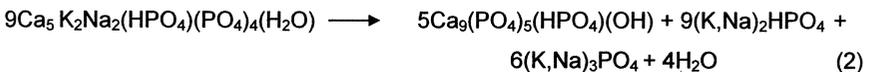
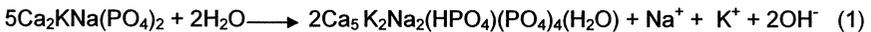
Calciumphosphat-Zemente befinden sich zum Ersatz verloren gegangener Hartschubstanz im klinischen Einsatz als Knochenersatzwerkstoffe für den nicht funktionell kraftbelasteten Bereich. Die hierfür eingesetzten CPC binden vorzugsweise im nahezu neutralen pH-Bereich von 8-9 Einheiten zu nanokristallinem Hydroxylapatit ab. Gegenstand dieser Arbeit war die Entwicklung stark basischer CPC auf Grundlage von Tetracalciumphosphat oder alkalidotierter Calciumphosphate, um antimikrobielle Zementeigenschaften für Anwendungen im dentalen Bereich zu erzeugen.

In bisherigen Arbeiten wurden antimikrobielle Eigenschaften von CPC eingestellt, indem der Zementmatrix diverse Antibiotika [78-80] oder Calciumhydroxid [81, 83, 84] beigefügt wurden. Die Zugabe von Antibiotika kann hierbei mit nachteiligen Änderungen der mechanischen Eigenschaften und des Abbindeverhaltens der Zemente einhergehen [87]. Außerdem besteht das Risiko der Resistenzentwicklung der Bakterienstämme, wenn die freigesetzten Antibiotikadosen, die über einen bestimmten Zeitraum von den Zementkörpern wieder abgegeben werden, zu gering sind. Der antimikrobielle Effekt von Calciumhydroxid-haltigen Calciumphosphat-Zementen basiert dagegen auf dem hohen Ausgangs-pH-Wert während und nach der Abbindereaktion mit der Abgabe von Hydroxylionen an das umliegende Milieu. Die antimikrobielle Wirksamkeit der so modifizierten Calciumphosphat-Zemente ist jedoch beschränkt und zeigt kaum Unterschiede im Vergleich zu reinem Calciumhydroxid.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Calciumphosphat-Zemente mit einem hohen antimikrobiellen Potential, durch Verwendung stark alkalischer Verbindungen wie Tetracalciumphosphat oder alkalidotierter Calciumphosphate als Reaktanden erhalten werden können. Alle Verbindungen sind zugänglich durch Sinterung von Pulvermischungen entsprechender Stöchiometrie, liegen aber hiernach als hochkristalline Modifikationen mit nur geringer Reaktivität vor. Eine Reaktivitätssteigerung war durch länger andauernde Mahlung möglich, dieser Vorgang der mechanischen Aktivierung führte analog zu anderen Verbindungen, etwa  $\beta$ -Tricalciumphosphat [18, 88] oder Tetracalciumphosphat [19, 89], zur Bildung

amorpher Domänen im Pulver mit hoher Löslichkeit und Reaktivität [90], so dass hier einkomponentige Zemente zugänglich sind.

Die so behandelten Pulver binden hiernach mit einem wässrigen Elektrolyten zu nanokristallem Apatit mit einer strukturellen Verfestigung der Zementpaste ab. Nach Driessens et al. [91] wird eine in zwei Schritten verlaufende Abbindereaktion für die alkalidotierten CaPs angenommen: Im ersten Schritt bildet sich eine Alkaliionen enthaltende Nano-Apatit-Struktur (Gleichung (1)), die für eine schnelle Aushärtung verantwortlich ist. Im zweiten Schritt wird die Apatitstruktur in einen calciumarmen Hydroxylapatit (Gleichung (2)) unter Freisetzung basischer Nebenprodukte, umgewandelt.



Zemente aus mechanisch aktiviertem TTCP binden nach Zusatz einer wässrigen Phase zu nanokristallinem Apatit und  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ab, letzteres weist nach früheren Untersuchungen einen röntgenamorphen Charakter auf [18]:



Die Abbindezeiten der Calciumphosphate zeigen klinisch akzeptable Werte im Bereich von 5-6 Minuten nach Zusatz einer Natriumphosphatlösung als füssige Phase. Dies ist vergleichbar mit den Abbindezeiten von klinisch im Einsatz befindlichen Calciumhydroxidpräparaten [92], die ebenfalls nur wenige Minuten zum Abbinden benötigen. Hervorzuheben ist, dass nur bei den mechanisch aktivierten Calciumphosphaten eine Abbindereaktion stattgefunden hat, die Rohmaterialien zeigten in Verbindung mit Wasser oder  $\text{NaHPO}_4$ -Lösung nur ein geringes Abbindeverhalten und keine nennenswerte Verfestigung der Zementpaste. Dabei ließ sich auch der direkte Zusammenhang von Mahldauer und Abbindezeit herausstellen (siehe Tabelle 4.3). Beim Tetracalciumphosphat verringerten sich die Abbindezeiten kontinuierlich mit der Steigerung des Mahlintervalls.

Diese Tendenz ließ sich auch bei den Druckfestigkeiten nachweisen, diese konnten durch ein verlängertes Mahlintervall gesteigert werden. Eine weitere Verbesserung der Druckfestigkeiten der Alkaliphosphate konnte durch Zusatz von kurzzeitig gemahlenem TTCP (10 min) erreicht werden. Dies ist auf die Einstellung einer bimodalen Partikelgrößenverteilung durch Kombination des grobkörnigen, kurz gemahlene Tetracalciumphosphats (ca. 15 µm mittlere Partikelgröße) mit den feinkörnigen, langfristig gemahlene alkalidotierten Calciumphosphaten zurückzuführen. In der bimodalen Verteilung können kleinere Partikel die Lücken einer dichten Packung größerer Partikel füllen und zu einer wesentlich höheren Packungsdichte gegenüber einer monomodalen Partikelverteilung führen. Dies resultiert in einer geringeren Porosität, die in der Vergangenheit als maßgeblicher Faktor für die mechanischen Kennwerte von Calciumphosphat-Zementen erkannt wurde [93]. Im Vergleich zum Calciumhydroxid zeigen alle Calciumphosphate höhere Druckfestigkeiten [94].

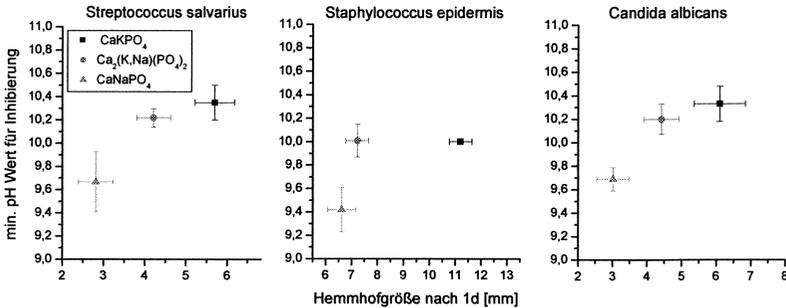
Die so hergestellten Zemente zeigen im Agardiffusionstest ein hohes antimikrobielles Potential. Das Testverfahren zur Bestimmung des Hemmpotentials ist eine weit verbreitete und in der Literatur anerkannte Methode zur Prüfung der Wirkung verschiedener Antinfektiva oder (Bio-)materialien wie Calciumhydroxid [95, 96] Calciumphosphat-Zemente [97], Magnesiumoxide [98] oder MgO-ZnO-Komplexe [99] auf Bakterien- und Pilzkulturen. Die im Zuge dieser Arbeit verwendeten Bakterien- bzw. Pilzkulturen bildeten eine Auswahl von Erregern, die besonders für dentale (*Streptococcus salivarius*, *Candida albicans*, Plaque-Mix [100, 101]) und osteogene, fremdkörperassoziierte (*Staphylococcus epidermidis*) Infektionen [102] verantwortlich sind. Als Fremdkörper sind dabei Metallplatten und Schrauben bei Osteosynthesen zu bezeichnen.

Interessanterweise zeigte der in dieser Arbeit als Referenz verwendete Calciumhydroxidzement nur einen geringen Hemmeffekt bezüglich des Bakterienwachstums, obwohl er klinisch häufig erfolgreich eingesetzt wird. Dies ist wahrscheinlich primär auf die schwache Löslichkeit von Calciumhydroxid ( $LP = 8.9 \times 10^{-5} \text{ mol}^3/\text{l}^3$ ) zurückzuführen, wodurch nur geringe Hydroxylionenkonzentrationen freigesetzt werden, die zusätzlich durch das Agarmedium abgepuffert werden

können. Im Vergleich dazu zeigten die mit Alkaliionen substituierten Calciumphosphate einen weitaus größeren Hemmeffekt auf das Wachstum der Bakterien- bzw. Pilzkulturen. Die Hemmhofgrößen fielen dabei um ein vielfaches größer aus als bei  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , das Verhalten wurde sowohl für einkomponentige Zemente als auch für Formulierungen, denen 50 Gew.% TTCP als Füller zugesetzt wurde, beobachtet. Die Werte für mechanisch aktiviertes Tetracalciumphosphat zeigten hingegen ebenfalls - wenn auch geringer ausgeprägt - Zunahmen für die Ausdehnung der Hemmhöfe im Vergleich mit  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

Das hohe antimikrobielle Potential der Alkaliphosphat-Zemente lässt sich zurückführen auf die stark basischen Produkte ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ), die während des Abbindevorgangs gebildet werden. Diese sind weitaus löslicher als  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  und diffundieren somit leichter in das Agarmedium. Dieses bestätigten die pH-Wert-Messungen im Agarmedium um die Prüfkörper. Das antimikrobielle Potential der einzelnen Alkali- bzw. Calciumphosphate stellte sich in folgender Reihenfolge dar:  $\text{CaKPO}_4 > \text{Ca}_2\text{K,Na}(\text{PO}_4)_2 > \text{CaNaPO}_4 \gg \text{TTCP} > \text{Ca}(\text{OH})_2$ . Des Weiteren war es abhängig von der getesteten Bakterien- bzw. Pilzkultur. Dies lässt sich über die Fähigkeit einzelner Bakterien- und Pilzstämmen erklären, Veränderungen des pH-Wertes in ihrer Umgebung unterschiedlich stark zu tolerieren. So sind Bakterienformen (z. B. *Enterococcus faecalis*) bekannt, die selbst bei alkalischen Bedingungen noch ein Wachstum zeigen [103].

Weiterführend stellt sich die Frage nach einem Zusammenhang zwischen der Hemmhofgröße und den gemessenen pH-Werten im Randbereich der Hemmhöfe. Hier zeigt sich, dass das antimikrobielle Potential der einzelnen Zemente nicht auf einen konstanten pH-Wert im Agar schließen lässt, vielmehr differieren die Werte für die unterschiedlichen Agarmedien und Zemente. Der minimale pH-Wert, der für einen Hemmeffekt des Bakterienwachstums notwendig ist, war ebenfalls zementabhängig. Bezüglich des pH-Wertes, der als Minimum für die Hemmung des Bakterienwachstums benötigt wird, stellen sich die Alkaliphosphate in umgekehrter Reihenfolge dar:  $\text{CaKPO}_4 > \text{Ca}_2\text{K,Na}(\text{PO}_4)_2 > \text{CaNaPO}_4$ . Bei den getesteten Bakterien- bzw. Pilzkulturen zeigt das Alkaliphosphat  $\text{CaNaPO}_4$  hierbei die geringsten pH-Werte, die erforderlich sind für eine Hemmung des Bakterienwachstums.



**Abb. 5.1:** Zusammenhang zwischen der Größe des Hemmhofes und dem minimalen pH-Wert, der für eine Hemmung des Bakterienwachstums erforderlich war.

Die Natriumionen enthaltenden Zemente hatten folglich einen größeren Einfluss auf das Wachstum der Bakterien als die mit Kalium substituierten Zemente, selbst bei niedrigen pH-Werten. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass nicht nur der pH-Wert alleine für den Hemmeffekt verantwortlich ist, sondern auch die Art der Alkaliionen, die in das Agarmedium abgegeben werden. Ausschlaggebend hierfür dürfte die unterschiedliche Größe der beiden Alkaliionen sein, die kleineren Natriumionen ( $d = 1.02 \text{ \AA}$ ,  $M_W = 23$ ) können im Vergleich zu Kaliumionen ( $d = 1.38 \text{ \AA}$ ,  $M_W = 39$ ) [104] schneller durch das Agarmedium diffundieren, und erreichen folglich auch früher eine ausreichende Ionenkonzentrationen für einen Hemmeffekt. Nach Vega et al. [105] kann der Diffusionskoeffizient von Ionen in Agarmedien über den Diffusionskoeffizienten  $D_0$  in der Lösung, den Volumenanteil  $\phi^s$ , und die Porengröße  $\zeta$  des Agarmediums, den Ionenradius  $r_i$  und den Materialparametern  $\alpha$  in folgender Gleichung (4) ermittelt werden:

$$D = D_0 \cdot e^{-\alpha \cdot \left(\frac{r_i}{\zeta} \cdot \phi^s\right)^{0.5}} \quad (4)$$

Da sich in dieser Arbeit der Volumenanteil und die Porengröße des Agargels konstant verhalten haben, kann das Verhältnis des Diffusionskoeffizienten von Natrium- und Kaliumionen  $D^{\text{Na}^+} / D^{\text{K}^+}$  als proportional  $r_{\text{K}^+} / r_{\text{Na}^+}$  angesehen werden. Wird ein durchschnittliches Gewicht der Prüfkörper von 600 mg angenommen, so enthält jeder einzelne Prüfkörper ungefähr 3.5 mmol an Natrium- und/oder

Kaliumionen. Eine vollständige Abgabe der gesamten Ionenmenge würde zu einer Konzentration von 220 mmol/l im Agarmedium (d=100mm, h=2mm) führen, und wäre somit um ein vielfaches höher als die normalen Ionenkonzentrationen im Körperelektrolyten, die bei 142  $\mu\text{mol/l}$  für Natriumionen und bei 5  $\mu\text{mol/l}$  für Kaliumionen liegen.

Eine gegenüber  $\text{Ca(OH)}_2$ -Salicylat-Zement ebenfalls erhöhte antimikrobielle Potenz zeigten die im Rahmen der Arbeit untersuchten mechanisch aktivierten Tetracalciumphosphat-Zemente. Die Größe der Hemmhöfe war hier allerdings mit ca. 3 bis 5 mm geringer als für die alkalidotierten Werkstoffe, und wurde bereits nach kurzer Mahldauer des Werkstoffs von 1 Stunde erreicht. Einzig gegenüber *C. albicans* wurde kein nennenswerter Hemmeffekt beobachtet. Die erhöhte antimikrobielle Potenz von mechanisch aktiviertem TTCP gegenüber  $\text{Ca(OH)}_2$ -Salicylat-Zement überrascht hierbei, da die antimikrobiell wirksame Komponente ein durch die Abbindereaktion gebildetes  $\text{Ca(OH)}_2$  darstellt. Ortsaufgelöste Messungen im Agargel zeigten, dass der pH-Wert im Gel um Prüfkörper aus MA TTCP mit Wertem um 7.8 - 8.7 Einheiten deutlich höher war als im Umfeld von  $\text{Ca(OH)}_2$  / Salicylat Zement mit nur 7.0 - 8.0 Einheiten. Dieser Unterschied dürfte das unterschiedliche Verhalten beider Zementtypen erklären; die höheren pH-Werte im Fall von MA TTCP sind vermutlich auf höhere Löslichkeit des bei der Abbindereaktion gebildeten Calciumhydroxyids rückführbar. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um eine röntgenamorphe Phase handelt [18], und es ist aus der Literatur bekannt, dass amorphe Werkstoffe oftmals eine höhere Löslichkeit als ihre kristallinen Modifikationen aufweisen, wie am Beispiel der  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Modifikation gezeigt werden konnte [17].

Die Ergebnisse hinsichtlich der mechanischen und antimikrobiellen Eigenschaften der Alkaliphosphate implizieren einen Einsatz dieser Werkstoffe im Bereich der Zahnerhaltung, für die direkte oder indirekte Überkappung der Pulpa, als Unterfüllungsmaterial oder als medikamentöse Wurzelkanaleinlage. Im Vergleich zum klinisch erprobten Calciumhydroxid zeigten alle Calciumphosphate bessere antimikrobielle und mechanische Eigenschaften, welche den Einsatz rechtfertigen würden.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Im Mittelpunkt der Arbeit stand die Untersuchung der materialwissenschaftlichen und antimikrobiellen Eigenschaften mechanisch aktivierter Calciumphosphatzemente aus Tetracalciumphosphat und alkalidotierten Calciumphosphaten. Hierzu wurden über einen Zeitraum von 10 Tagen der Einfluss der Zemente auf das Wachstum von Bakterienkulturen von *S. salivarius*, *S. epidermidis* und einer Plaque-Mischflora sowie des Sprosspilzes *C. albicans* im Agardiffusionstest geprüft. Als Messparameter dienten die Größe der Hemmhöfe, pH-Wert-Verschiebungen am Prüfkörper und im Agarmedium und die Zusammensetzung der Calcium- bzw. Alkaliphosphate. Als Referenzprobe wurde ein handelsüblicher und im klinischen Einsatz befindlicher Calciumhydroxid-/Salicylat-Zement eingesetzt. Über das Verfahren der mechanischen Aktivierung konnte ein definiertes Abbindeverhalten, der einzelnen Calciumphosphatzemente eingestellt werden. So zeigten die Ausgangsstoffe in Verbindung mit der Natriumphosphatlösung ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) nur eine unzureichende Abbindereaktion, während nach langzeitiger Mahlung abbindefähige Zementpasten erhalten wurden. In der röntgendiffraktometrischen Analyse ließ sich nach Aushärtung bei allen Alkaliphosphaten die typische Apatitstruktur von Hydroxylapatits nachweisen. Im weiteren Verlauf der Arbeit zeigte sich das hohe antimikrobielle Potential der Alkaliphosphate im Vergleich zu herkömmlichen Calciumhydroxidprodukten. Dieser Effekt beruht auf der Freisetzung tertiärer Alkaliphosphate die als Abbindeprodukt entstehen. Das bessere Löslichkeitsverhalten der tertiären Phosphate im Vergleich zu den schwerer löslichen Hydroxylionen des Calciumhydroxids, verstärkt die antimikrobiellen Eigenschaften der Alkaliphosphate, und führt folglich auch zu einem höheren alkalischen Potential dieser Stoffe. Ebenso zeigten Zemente aus mechanisch aktiviertem Tetracalciumphosphat eine verbesserte antimikrobielle Wirksamkeit, offenbar durch die Bildung einer leichter löslichen, amorphen  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  Phase während der Abbindereaktion begründet. Aufgrund der Ergebnisse zeigte sich, dass sich die Werkstoffe für einen Einsatz im Bereich der Zahnerhaltung, für die direkte oder indirekte Überkappung der Pulpa, als Unterfüllungsmaterial oder als medikamentöse Wurzelkanaleinlage, eignen. Ziel weiterer Arbeiten müsste der Nachweis der biologischen Verträglichkeit der Alkaliphosphate gegenüber eukaryontischen Zellen sein, um einen späteren klinischen Einsatz zu ermöglichen.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Hermann BW. Dentinobliterationen der Wurzelkanäle nach der Behandlung mit Kalzium, Zahnärztl. Rundschau 1930;39:21
- [2] Tronstad L. Clinical endodontics. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1991
- [3] Grossman LI, Oliet S, Del Ripo CE. Endodontic Practice. 11th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1998
- [4] Schroeder H.E.; Orale Strukturbioogie, S. 278 Klinisch relevante Zusammenhänge, 4. überarbeitete Auflage: Georg Thieme Verlag, 1992
- [5] Weber, T.; Memorix Zahnmedizin, S. 114 Vitalamputation der Pulpa. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1999
- [6] Cox CF, Bergenholtz G, Heys DR, Saied SA, Titzgerald M, Heys RJ. Pulp Capping of dental pulp mechanically exposed to oral microflora: a 1-2 year observation of wound healing in the monkey. J Oral Pathol 1985; 14:156-68
- [7] Schroder U. Effects of calcium hydroxide containing pulp capping agent on pulp cell migration, proliferation and differentiation, J Dent Research 1985; 64:541-8
- [8] Imai M, Hayashi Y. Ultrastructure of wound healing following direct pulp capping with calcium- $\beta$ -glycerophosphate (Ca-BGP). J Oral Pathol Med 1993; 22:502-8
- [9] Brown WE, Chow LC. A new Calcium phosphate, Water-Setting Cement. Cements Research Progress 1986, 352-79
- [10] LeGeros RZ, Chohayeb A, Shulman A. Apatatic Calcium phosphates: Possible Restorative Materials. J Dent Res, Abstr. No. 1482, 1992; 343
- [11] Flatley TJ, Lynch KL, Benson M. Tissue response to implants of calciumphosphate ceramic in the rabbit spine. Clin Orthop 1983; 179: 246-51
- [12] Ducheyne P. Bioglass coatings and bioglass composites as implant materials. J Biomed Mater Res 1985; 19: 273-91
- [13] Gross U, Struntz V. The interface of various glasses and glassceramics with a bony Implantation bed. J Biomed Mater Res 1985; 19: 251-71
- [14] Hench LL, Etheridge EC. Biomaterials, an interfacial approach, Academic Press, New York, 1982
- [15] Holmes RE, Mooney V, Buchholz R. A coralline hydroxyapatite bone graft substitute Clin Orthop 1984; 188: 252-62
- [16] Costantino PD, Friedmann CD, Jones K, Chow LC, Sisson GA. Experimental Hydroxyapatite Cement Cranioplasty. Plas Reconstr Surgery 1992; 90: 174-91

- [17] Gbureck U, Grolms O, Barralet JE, Grover LM, Thull R. Mechanical Activation and Cement Formation of  $\beta$ -Tricalcium Phosphate, *Biomaterials* 2003; 24: 4123-4131.
- [18] Gbureck U, Barralet JE, Hofmann M, Thull R: Mechanical Activation of Tetracalcium Phosphate, *J Am Ceram Soc* 2004; 87 (2): 311-313
- [19] Barralet JE, Gaunt T, Wright AJ, Gibson IR, Knowles JC. Effect of porosity reduction by compaction on compressive strength and microstructure of calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res* 2002; 63: 1-9.
- [20] Schaffhausen P. Aspektoptimierung von  $\beta$ -Calciummetaphosphat-Fasern, Dissertation Universität Würzburg 2001; 5: 52-58
- [21] Larsson S, Bauer TW. Use of injectable calcium phosphate cement for fracture fixation: a review. *Clin Orthop Rel Res* 2002; 395: 23-32
- [22] Ginebra MP, Rillard A, Fernandez E, Elvira C, San Roman J, Planell JA. Mechanical and rheological improvement of  $\beta$ -calcium phosphate cement by the addition of a polymeric drug. *J Biomed Mater Res* 2001; 57(1): 113-118
- [23] Leroux L, Hatim Z, Freche M, Lacout JL. Effects of various adjuvats (lactic acid, glycerol and chitosan) on the injectability of a calcium phosphate cement. *Bone* 1999; 25(2): 31-34
- [24] Gbureck U, Barralet JE, Grover LM, Spatz K, Thull R. Ionic Modification of Calcium Phosphate Cement Viscosity Part I: Hypodermic injection and strength improvement of apatite cements; *Biomaterials*, 2004; 25(11): 2187-2195
- [25] Blom EJ, Klein-Nulend J, Wolke JGC, Krashina K, van Waas MAJ, Burger EH. Transforming growth factor beta 1 incorporation in an alpha-tricalcium-phosphate / dicalcium phosphate dihydrate / tetracalcium phosphate monoxide cement: release characteristics and physicochemical properties. *Biomaterials* 2002; 23(4): 1261-1268
- [26] Ruhe PQ, Kroese-Deutman HC, Wolke JGC, Spauwen PHM, Jansen JA. Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate bone cement implants in cranial defects in rabbits. *Biomaterials* 2004; 25(11): 2123-2132
- [27] Ratier A, Gibson IR, Best SM, Freche M, Lacout JL, Rodriguez F. Setting characteristics and mechanical behaviour of a calcium phosphate bone cement containing tetracycline. *Biomaterials* 2001; 22(9): 897-901

- [28] Bohner M, Lemaitre J, Merkle HP, Gander B. Control of gentamicin release from a calcium phosphate cement by admixed poly(acrylic acid). *J Pharm Sci* 2000; 89(10): 1262-1270
- [29] Bohner M, Lemaitre J, VanLanduyt P, Zambelli PY, Merkle HP, Gander B. Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system. *J Pharm Sci* 1997; 86(5): 565-572
- [30] Takechi M, Miyamoto Y, Ishikawa K, Nagayama M, Kon M, Asaoka K, Suzuki K. Effects of added antibiotics on the basic properties of anti-washout-type fast setting calcium phosphate cement. *J. Biomed Mater Res* 1998; 39: 308 -316
- [31] Rosin 1992 – Antibiotika und Chemotherapeutika – Antiinfektiöse Therapie. In: Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.; Starke, K. (Hrsg): *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 6. Aufl. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 613-721
- [32] Ackerknecht, EH. *Geschichte der Medizin*; 7. überarbeitete Aufl. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart 1992, S. 163-165
- [33] Frey, Löscher 1996 – *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. 1. Aufl. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag
- [34] Toellner R. *Illustrierte Geschichte der Medizin*; Bechtermünz Verlag 2000, Bd.5 S. 2407-2409
- [35] Frimmer 1986 – *Antibakterielle Wirkstoffe – Geschichte*. In: *Pharmakologie und Toxikologie*. 3. Aufl. Stuttgart, New York: Schattauer Verlag, 374-376
- [36] Schadewinkel-Scherkl, Scherkl 1995 – *Antibiotika und Chemotherapeutika in der tierärztlichen Praxis*. 1. Aufl. Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag
- [37] Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM 1998 – *Medizinische Mikrobiologie* 9. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag
- [38] Lüllmann H, Mohr K, Ziegler A 1996 – *Taschenatlas der Pharmakologie*. 3. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag
- [39] Oberdisse E, Hackenthal E, Kuschinsky K 1997 – *Pharmakologie und Toxikologie*. 1. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 34: 610-648
- [40] Hellwig E, Klimek J, Attin T 1999 – *Einführung in die Zahnerhaltung*. 2. Aufl. München, Jena: Urban & Fischer Verlag, 1: 49
- [41] Staehle HJ, Pioch T. Antimicrobial efficacy and alkalizing effect of different calcium hydroxide compounds. *Dtsch Zahnärztl Z*. 1989 May; 44(5): 344-8

- [42] Boeckh C, Schumacher E, Podbielski A, Haller B. Antibacterial activity of restorative dental biomaterials in vitro. *Caries Res.* 2002 Mar-Apr; 36(2): 101-7
- [43] Cobankara FK, Altinoz HC, Ergani o, Kav K, Belli S. In vitro antibacterial activities of root-canal sealers by using two different methods. *J Endod.* 2004 Jan; 30(1): 57-60
- [44] Morrier JJ, Benay G, Hartmann C, Barsotti O. Antimicrobial activity of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  dental cements: an in vitro study. *J Endod.* 2003 Jan; 29(1): 51-4
- [45] Vokus RP, Cisneros GJ, Levi M. Antibacterial properties of current orthodontic band cements. *Pediatr. Dent.* 1991 Jan-Feb; 20(1): 43-8
- [46] Boyd D, Towler MR. The processing, mechanical properties and bioactivity of zinc based glass ionomer cements. *J Mater Sci Mater Med.* 2005 Sep; 16(9): 843-50
- [47] Lewinstein I, Matalon S, Slutzkey S, Weiss EI. Antibacterial properties of aged dental cements evaluated by direct-contact and agar diffusion tests. *J Prosthet Dent.* 2005 Apr; 93(4): 364-71
- [48] Perez CR, Hirata R Jr, Sergio PP. Evaluation of antimicrobial activity of fluoride-releasing dental materials using a new in vitro method. *Quintessence Int.* 2003 Jun; 34(6): 473-7
- [49] Molgatini SL, Bertacchini SM, Abate PF, Macchi RL, Neuron MB. Germicide effect of several glass ionomer cements
- [50] Bermudez O, Boltong MG, Driessens FCM, Planell JA. Compressive strength and diametral tensile strength of some calcium-orthophosphate cements: A pilot study *J. Mater. Sci.* 1993, 4, 389-393
- [51] Mc Dowell H, Brown WE, Solubility Study of Calcium Hydrogen Phosphate: Ion Pair Formation. *Inorg. Chem.* 1971; 10: 1638-43
- [52] Gregory TM, Moreno EC, Patel JM, Brown WE, Solubility of a  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in the System  $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$  at 5, 15, 25 and 37°C. *J Res Nat Bur Stand* 1974; 78(A): 667-74
- [53] Matsuya Y, Takagi S, Chow LC. Hydrolysis of Tetracalcium Phosphate in  $\text{H}_3\text{PO}_4$  and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . *J Mater Sci* 1996; 31: 3263-9
- [54] Bell LC, Mika H, Kruger BJ. Synthetic Hydroxyapatite-Solubility Product and Stoichiometry of Dissolution. *Archs oral Biol* 1978; 23: 329-36
- [55] Chow LC. Development of Self-setting Calcium Phosphate Cements. *J. Ceramic Soc Japan*, 99: 954-964, 1991

- [56] Chow LC, Markovic M, Takagi S. "Calcium Phosphate Cements" in *Cements Research Progress 1997*, ed. L. J. Struble, pp. 215-238, Westerville, OH; The Am Ceram Soc 1998
- [57] Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements, *Injury* 2000; 31(4): 37-47
- [58] Sanin N, Takagi S, Chow LC, Matsuya S. Particle size effects on pH and strength of calcium phosphate cement. *IADR* 1991, Abstract NO. 2411
- [59] Zawacki SJ, Koutsoukos PB, Salimi NH, Nancollas GH. The growth of calcium phosphates. In Davis JA, Hayes KF (eds): *Geochemical processes at mineral surfaces*. Am Chem Soc Symp Series 1996; 323: 650-662
- [60] Fulmer MT, Brown PW. Effects of  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  on hydroxyapatite formation. *J Biomed Mater Res* 1993; 27: 1095-1102
- [61] Chow LC, Markovic M, Takagi S. Formation of hydroxyapatite in cement systems: Effects of phosphate, Phosphorous, Sulfur and Silicone and the related Elements 1999; 146: 129-132
- [62] Brown PW, Hocker N, Hale S. Variations in Solution Chemistry During Low-Temperature Formation of Hydroxyapatite, *J Am Ceramic Soc* 1991; 74 (8).
- [63] Xie L, Monroe EA. The Hydrolysis of Tetracalcium Phosphate and other Calcium Orthophosphates. *CRC Handbook of Bioactive Ceramics*, Vol. 2, Boca-Raton Florida, 1990; S. 29-37
- [64] Fernandez E, Gill FJ, Ginebra MP, Driessens FCM. Calcium phosphate bone cements for clinical applications Part 2: Precipitate formation during setting reactions. *J Mater. Sci: Mat Med* 1999; 10: 177-83
- [65] Matsuya S, Takagi S, Chow LC. Effect of mixing ratio and pH on the reaction between  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$  and  $\text{CaHPO}_4$ . *J Mater Sci: Mater Med* 2000; 11: 305-311
- [66] Fernandez E, Gill FJ, Ginebra MP, Driessens FCM. Calcium phosphate bone cements for clinical applications Part 2: Precipitate formation during setting reactions. *J Mater. Sci: Mat Med* 1999; 10: 177-83
- [67] Chow LC, Costantino PD, Takagi S, Friedmann CD. Self setting calcium phosphate cements. *Mater. Res. Symp. Proc.* 1991, 179: 3-24
- [68] Gruninger SE, Siew C, Chow LC, Young AO. Evaluation of biocompatibility of a new calcium phosphate setting cement. *J. Dent. Res.* 1984, 63: 200-270
- [69] Lu JH, Siew C, Robinson PJ. New attachment following the use of a novel calcium phosphate system. *J. Dent. Res.* 1988, 67: 352

- [70] Sugawara A, Chow LC, Takagi S, Chohayeb H. In vitro evaluation of the sealing ability of a calcium phosphate cement when used as a root canal sealer-filler. *J. Endodontics* 1990, 16, 162-165
- [71] Pistner H, Reuther J, Reinhart E, Kübler N, Priessnitz B. Ein neuer Hydroxylapatit-zement für die Craniofaciale Chirurgie. *Mund-, Kiefer-, Gesichtschir.* 2, 1998; 7: 37-40
- [72] Moore DC, Maitra RS, Farjo LA, Graziano GP, Goldstein SA. Restoration of pedicle screw fixation with in situ setting calcium phosphate cement. *Spine* 1997; 22(15): 1696-1705
- [73] Doi Y, Takezaww Y, Shibata S, Wakamatsu N, Kamemizu H, Goto T, Iijima M, Moriwaki Y, Uno K, Kubo F, Haeuchi Y. Self setting apatite cement: Physicochemical properties. *J. Japn. Soc. Dent. Mater. Dev.* 1987, 6, 53-58
- [74] Cerng A, Takagi S, Chow LC. Effects of hydroxypropyl methylcellulose and other gelling agents on handling properties of calcium phosphate cement. *J. Biomed. Mat. Res.* 1997, 35, 273-277
- [75] Sugawara A, Nishiyama M, Chow LC, Takagi S. A new biocompatible material: Calcium phosphate cement – biomedical applications. *Tokyo Shika Ishikai Zashi* 1990, 38, 348-354.
- [76] Lemaitre J, Munting E, Mirtichi AA. Setting, hardening and resorption of calcium phosphate hydraulic cements. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 1992; 93: 163-65
- [77] Bohner M, Merkle HP, Van Landuyt P, Trophard G, Lemaitre J. Effect of several additives and their admixtures on the physico-chemical properties of calcium phosphate cement. *J Mater Sci: Mater Med* 2000; 11: 111-116
- [78] Yu D, Wong J, Matsuda Y, Fox J, Higuchi W, Otsuka M. Self-setting hydroxyapatite cement: a novel skeletal drug delivery system for antibiotics. *J Pharm Sci* 1992; 81(6): 529-531
- [79] Ratier A, Gibson IR, Best SM, Freche M, Lacout JL, Rodriguez F. Setting characteristics and mechanical behaviour of a calcium phosphate bone cement containing tetracycline. *Biomaterials* 2001; 22 (9): 897-901
- [80] Takechi M, Miyamoto Y, Ishikawa K, Nagayama M, Kon M, Asaoka K, Suzuki K. Effects of added antibiotics on the basic properties of anti-washout-type fast setting calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res* 1998; 39: 308-316

- [81] Serraj S, Michailiesci P, Margerit A, Bernard B, Boudeville P. Study of a hydraulic calcium phosphate for dental applications. *J Mater Sci (Mater Med)* 2002; 13: 125-131
- [82] Yoshiba K, Yoshiba N, Iwaku M. Effects of antibacterial capping agents on dental pulps of monkeys mechanically exposed to oral microflora. *J Endod.* 1995 Jan; 21(1): 16-20
- [83] Kouassi M, Michailiesco P, Lacoste-Armynot A, Boudeville P: Antibacterial effect of a hydraulic calcium phosphate cement for dental applications, *J Endodont* 2003; 29(2), 100-105.
- [84] Michailiesco P, Kouassi M, El Briak H, Armynot A, Boudeville P. Anti microbial activity and tightness of a DCPD-CaO-based hydraulic calcium phosphate cement for root canal filling. *J Biomed Res B Appl Biomater.* 2005 Aug; 74(2): 760-7
- [85] American Dental Association Specification No. 9 for dental silicate cement: Guide to dental materials and devices. *Amer. Dent. Association* 1975, 7, 194-202
- [86] Gbureck U, Barralet JE, Hofmann MP, Thull R. Nanocrystalline Tetracalcium Phosphate Cement. *J Dent Res* 2004; 83(5): 425-428
- [87] Gbureck U, Probst J, Thull R: Surface Properties of Calcium Phosphate Particles for self setting Bone Cements, *J. Biomolec. Engin.*, 2002; 19: 51-55
- [88] Gbureck U, Hofmann M, Barralet JE, Grover LM, Thull R: Thermodynamic study of formation of amorphous  $\beta$ -tricalcium phosphate for calcium phosphate cements; *Key Engin. Mater.* 2004; 254-256: 249-252
- [89] Gbureck U, Barralet JE, Hofmann M, Thull R: Nanocrystalline TTCP Cement. *J Dent Res* 2004, 83(5): 425-428
- [90] Weeber AW, Bakker H. Amorphisation by ball milling: a review. *Physica B* 1988; 153: 93-122
- [91] Driessens FCM, Boltong MG, de Maeyer EAP, Wenz R, Nies B, Planell JA. The Ca/P range of nanoapatitic calcium phosphate cements. *Biomaterials* 2002; 23 (19): 4011-4017
- [92] Lewis BA, Burgess JO, Gray SE. Mechanical properties of dental base materials. *Am J Dent.* 1992 Apr; 5(2): 69-72

- [93] Gbureck U, Barralet JE, Grover LM, Hofmann M, Thull R. Mechanische Eigenschaften und Porosität von Calciumphosphat-Zementen, *Biomaterialien*, 2003; 4(4): 258-264
- [94] Shazad N, Kennedy JG. A comparison of the compressive strength of calcium hydroxide based lining materials. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 1994; 3(1): 33-40
- [95] Siqueira JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int. Endod J* 1999; 32: 361-9
- [96] Morrier JJ, Benay G, Hartmann C, Barsotti O: Antimicrobial activity of Ca(OH)<sub>2</sub> dental cements: an in vitro study, *J Endodont* 2003; 29(1): 51-54.
- [97] Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS. *Microbiology*, Third Edition, Harper & Row, Philadelphia 1980, p. 583
- [98] Sawai J, Kojima H, Igarashi H, Hashimoto A, Shoji S, Sawaki T, Hakoda A, Kawada E, Kokugan T, Shimizu M: Antibacterial characteristics of magnesium oxide powder, *World J Microbiol & Biotechnol* 2000; 16 (2): 187-194
- [99] Yamamoto O, Sawai J, Sasamoto T: Change in antibacterial characteristics with doping amount of ZnO in MgO-ZnO solid solution, *Int J Inorg Mater* 2000; 2 (5): 451-454
- [100] Newman MG, Nisengard R: *Oral Microbiology and Immunology*; W.B. Saunders, Philadelphia, 1988, p.334
- [101] Marsh P, Martin MV: *Orale Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York 2003, p. 25
- [102] Ruchholtz S, Träger G, Nast-Kolb D: Die infizierte Hüftgelenksprothese, *Unfallchirurg* 2004; 4: 307-319
- [103] McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD: pH required to kill enterococcus faecalis in vitro, *J Endodont* 2004; 30(4): 218-219
- [104] Elliott JC: *Structure of the apatites and other calcium orthophosphates*, Elsevier, Amsterdam - London - New York - Tokyo 1994, p.84
- [105] Vega AL, Yao H, Gu WY. Effects of ionic strength and porosity on ion diffusion in agarose gels, *Summer Bioengineering Conference* 2003, Key Biscayne, Florida, p.1003-4

## **Danksagungen**

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr.- Ing. R. Thull für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, sowie Herrn Prof. Dr. U. Schlagenhauf für die Übernahme des Korreferates.

Ein herzlicher Dank gilt auch allen Mitarbeitern aus der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnmedizin, im besonderen Frau I. Biermann, für die Unterstützung zur Erstellung dieser Arbeit. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern aus dem Institut für molekulare Infektionsbiologie für die hervorragende Unterstützung bei den bakteriologischen Experimenten bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. U. Gbureck für seine stets vorbildliche Betreuung und seine konstruktiven Anregungen, die im großen Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Abschließend möchte ich mich noch bei meiner Familie und meiner Freundin Stephanie Glückermann für Ihre Unterstützung bedanken. Sie hatten immer ein offenes Ohr für meine Probleme und schenkten mir immer Vertrauen.



# Oliver Knappe

Schirmstrasse 6, 90762 Fürth, Telefon: 0911/7874898  
E-MAIL: O.Knappe@gmx.de

## PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 24.08.1976  
Geburtsort: Oldenburg / Oldenburg  
Eltern: Joachim Knappe  
Inge Knappe (geb. Schoon)  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Konfession: evangelisch

## SCHULBILDUNG

- 1983 - 1987 Brakenhoff Grundschule , Westerstede
- 1987 - 1989 Orientierungsstufe Robert-Dannemann-Schule, Westerstede
- 1989 - 1993 Gymnasium Westerstede
- 1993 - 1994 Purcell Highschool , Austauschschüler in der zwölften Klasse , Abschluss Highschool Diploma
- 1994 - 1997 Gymnasium Westerstede
- 1997 Abschluss mit Abitur

## ZIVILDienst

- 1997 - 1998 Zivildienst im diakonischen Kinderhaus Collstede

## HOCHSCHULAUSSBILDUNG

- WS 1998 - SS 2003 Studium der Zahnmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- 10.11.2003 Abschluss des Studiums der Zahnmedizin

## BERUFSTÄTIGKEIT

- seit 1.05. 2004 Tätigkeit als Vorbereitungsassistent in der zahnärztlichen Praxis Dr. med. dent. W. Gleiss in Fürth

Fürth, 5 März 2006

