

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme

Westdeutsche Kieferklinik

Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

Heinrich Heine Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. Becker

Einfluss unterschiedlicher Titanoberflächenmodifikationen auf die frühe supragingivale Plaque-Biofilmformation unter besonderer Berücksichtigung eines intraoralen Schienensystems

Dissertation

**Zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Zahnmedizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Nadine Horn

2006

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg

Dekan

Referent: PD Dr. med. dent. Frank Schwarz

Korreferent: PD Dr. med. dent. Claudia Barthel-Zimmer

Gewidmet meinen Eltern, Yvonne und Frank Horn,
die meine Ausbildung und meinen Lebensweg stets mit liebevoller
Aufmerksamkeit und aller erdenklicher Unterstützung bedacht haben.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Verzeichnis der Abkürzungen	5
2. Einleitung.....	6
2.1. Enossale Implantattypen.....	6
2.1.1. Makrostruktur.....	7
2.1.2. Mikrostruktur.....	7
2.2. Biologischer Verbund.....	9
2.3. Ätiologie periimplantärer Entzündungen.....	10
2.3.1. Plaque.....	12
2.4. Supra- und subgingivale Biofilme.....	14
2.5. Biofilmformation auf natürlichen und künstlichen Oberflächen.....	15
2.6. Risikofaktoren bei der Progression periimplantärer Läsionen: Genetische Faktoren... 24	
2.6.1. Rauchen.....	25
2.6.2. Keratinisierte Gingiva.....	25
2.6.3. Funktionelle Belastung von Implantaten.....	26
2.6.4. Systemische Erkrankungen.....	26
2.7. Klinische Manifestation periimplantärer Infektionen.....	27
2.8. Therapiekonzepte.....	29
2.8.1. Mechanische Therapieansätze.....	29
2.8.2. Antimikrobielle, antiphlogistische Therapieansätze.....	30
2.9. Lasertherapie.....	31
2.10. Biokompatibilität.....	33
2.11. Ziele der Arbeit.....	33
3. Material und Methoden.....	34
3.1. Intraorales Schienensystem.....	34
3.2. Titanprüfkörper.....	37
3.3. Probanden.....	43
3.4. Morphometrische Bestimmung der Plaque-Biofilm-Areale (PBA).....	43
3.5. Statistische Auswertung.....	45
3.6. Zellkultur.....	45
3.7. Bestimmung der mitochondrialen Zellaktivität.....	46
3.8. Statistische Auswertung der ATP-Messung.....	48
4. Ergebnisse.....	49
4.1. Morphometrische Bestimmung der Plaque-Biofilm-Areale (PBA).....	49
4.2. Bestimmung der mitochondrialen Aktivität der SAOS2 Osteoblasten.....	53
5. Diskussion.....	62

6. Literaturverzeichnis.....	72
7. Danksagungen.....	80
8. Lebenslauf.....	81
9. Zusammenfassung.....	82

1. Verzeichnis der Abkürzungen

A	nur säuregeätzte, hydrophobe Oberfläche
G_{adh}	Adhäsionsenergie für Bakterien
G_{TOT}	Gibbs freie Energie
modA	nur säuregeätzte, hydrophile Oberfläche
modSLA	sandgestrahlte, säuregeätzte, hydrophile Oberfläche (= SLActive [®])
P	polierte Oberfläche
PBA	Plaque-Biofilm-Areale
SASO2	Osteosarkomzellen; Osteoblasten ähnliche Zellen
sfe	surface free energy
SLA [®]	sandgestrahlte und säuregeätzte Oberfläche

2. EINLEITUNG

2.1. Enossale Implantattypen

Die Therapiemöglichkeiten nach Zahnverlust sind durch die Versorgung mit enossalen Implantaten grundlegend erweitert worden.

Ein osseointegriertes Implantat soll den Zahn funktionell ersetzen, und im günstigsten Fall zum Erhalt der knöchernen Strukturen, im Sinne einer Atrophieprophylaxe beitragen. Als elektiver Eingriff wird jede Implantation mit dem Ziel einer dauerhaften dentalen Rehabilitation des Patienten unternommen.

Bis heute hat sich Titan als Werkstoff für enossale Implantate sowohl aufgrund seiner günstigen mechanischen, als auch biologischen Materialeigenschaften gegenüber einer Vielzahl anderer Materialien, wie z.B. Aluminiumoxidkeramiken und Biogläser behauptet. Neben der großen Bruch- und Korrosionsfestigkeit bei gleichzeitig geringem Gewicht, ist besonders die Ausbildung einer stabilen Oxidschicht für die Überlegenheit von Titan, im Hinblick auf seine Biokompatibilität verantwortlich. Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Einheilung ist ein stabiler Implantat-Knochen-Verbund, welcher wiederum entscheidend am Langzeiterfolg der Implantation beteiligt ist. Diesen Verbund, der von Brånemark 1985 beschrieben und als Osseointegration definiert wurde, zu optimieren, ist das angestrebte Ziel der heute gebrauchten Oberflächenkonditionierungen von Titanimplantaten in ihrer Makro- und Mikrostruktur. Durchgesetzt haben sich hierbei rotationssymmetrische Implantatkörper, die man nach ihrer Grundform in Zylinderimplantate, Schraubenimplantate, sowie konisch gestaltete Schrauben- oder Stufenförmige Implantate einordnen kann. Ihre Auswahl erfolgt unter anderem nach der erreichbaren Primärstabilität, der Beschaffenheit des Knochenlagers und des Implantationsmodus. Letzterer kann nach dem Zeitpunkt der Implantatinsertion nach Zahnverlust weiter in Sofort- bzw. verzögerte Sofortimplantation oder Spätimplantation, sowie nach der Art der Belastung in einphasig- oder zweiphasig einheilende Implantattypen

unterteilt werden. Konische Implantatkörper wurden dabei oft mit der Idee entwickelt beim Einbringen des Implantates eine Kompression und Kondensation des periimplantären Knochens zu erreichen, und somit die Primärstabilität vor allem in weichem Knochen zu erhöhen. Unter Primärstabilität versteht man die rein mechanisch, intraoperativ durch die Implantation selbst erreichbare Stabilität im Knochenlager.

2.1.1. Makrostruktur

Neben makroskopischen Oberflächenmodifikationen wie Lakunen, Perforationen, Poren und Rillen, ist die Gewindeform am weitesten verbreitet. Zur Vermeidung von Druckspitzen wurden die Kanten der meisten Schraubengewinde abgerundet. Während Implantate mit durchgängigem Gewinde unter anderem von Brånemark[®], Astra[®], Duraplant[®] und IMZ[®] entwickelt wurden, besitzen einige dieses nur im apikalen Bereich, z.B. Frialit2[®], HaTi-Schraube[®], oder am Implantathals, z.B. Camlog[®]. So genannte progressive Gewinde, d.h. zur Spitze hin zunehmende Gewindetiefe besitzen unter anderem Ankylos[®], Pitt-Easy[®] und Xive[®]-Implantate.

2.1.2. Mikrostruktur

Verschiedene Oberflächenmodifikationen im Bereich der Mikrostruktur dienen der Vergrößerung der Kontaktfläche zwischen Implantat und Knochen. Diese Mikrorauigkeiten können grundsätzlich rein maschinell (z.B. Brånemark), additiv, d.h. durch Beschichtung der Oberfläche oder ablativ, durch Abtragung erzeugt werden.

Zu den additiven Verfahren zählt die Titan-Plasma-Beschichtung, bei der im Plasma-Flame-Verfahren Titanpartikel aufgebracht werden. Hydroxylapatitbeschichtete Titanimplantate sind im Bereich der Orthopädie erfolgreich im Einsatz. Bei den oralen enossalen Implantaten ergaben sich jedoch Schwierigkeiten durch das Ablösen der Hydroxylapatitschicht vom Titangrundkörper. Ein Trend ist derzeit vorwiegend zu den

ablativen Verfahren zu erkennen, bei denen v. a. durch Sandstrahlung und Säureätzung ein Mikrorelief erzeugt wird, wie es z.B. mit der SLA[®]-Oberfläche (Straumann) des ITI-Systems[®] verwirklicht wurde. Während alle bisher genannten Oberflächenmodifikationen hydrophobe Eigenschaften besitzen, soll die Weiterentwicklung der SLA-Oberfläche, die so genannte SLActive[®]-Oberfläche (in der vorliegenden Untersuchung als modSLA bezeichnet) durch einen modifizierten Produktionsprozess hydrophile Eigenschaften besitzen, und den Prozess der Osseointegration durch erleichterte Anlagerung von Blut- und Serumbestandteilen erleichtern und beschleunigen. Die ursprüngliche Strukturierung der Oberfläche durch Sandstrahlung und Säureätzung (SLA[®]) wurde auch bei SLActive[®] beibehalten. In einem sich anschließenden modifizierten Aufbereitungsprozess soll jedoch nun die Implantatoberfläche unter Stickstoffatmosphäre derart konditioniert werden können, dass die Hydrophilie der Oberfläche aufrechterhalten wird. Bei der konventionellen SLA[®]-Oberfläche wurde diese chemisch aktive Schicht bisher nach Luftkontakt durch eine passive Schicht aus Kohlenwasserstoff ersetzt, welche vor der Osseointegration zunächst wieder vom Organismus entfernt werden musste. Aufgrund fehlender klinischer Untersuchungen kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig beurteilt werden inwieweit, die vom Hersteller proklamierte kürzere Einheilzeit der Implantate durch die gewünschte beschleunigte Osseointegration zutrifft, und welche Auswirkungen eine hydrophile Oberfläche auch in Hinblick auf eine möglicherweise erleichterte Plaqueakkumulation haben könnte. Die Untersuchung dieser neuen Oberflächenmodifizierung war auch ein Teilaspekt der vorliegenden Arbeit. Zahlreiche Studien befassen sich mit dem Einfluss einer rauhen Implantatoberfläche auf das biologische System. So konnten z.B. Kieswetter 1996 in Zellkulturen eine gesteigerte Proliferation von Osteoblast-like-cells durch Veränderung der Oberflächenrauigkeit nachweisen (Kieswetter et al. 1996). Abrahamsson et al. fanden 2001 im Hundemodell einen signifikant größeren Implantat-Knochen Kontakt an geätzten, rauheren Implantaten im Vergleich zu glatten Implantaten (Abrahamsson et al. 2001).

2.2. Biologischer Verbund

Brånemark beschrieb 1985 die wissenschaftlichen Grundlagen des Knochen-Implantat-Verbundes und definierte den Begriff der Osseointegration als direkten funktionellen und strukturierten Verbund zwischen dem organisierten lebenden Knochengewebe und der Oberfläche eines belasteten Implantats (Brånemark et al. 1985).

Die bei der Implantatbettpräparation auftretende Blutung führt dazu, dass Blutbestandteile wie Fibrin, Thrombozyten und Proteasen bereits nach wenigen Sekunden an der Titanoberfläche haften bleiben. Danach sind Zeichen der akuten Inflammation, wie die Migration von Makrophagen und polymorphkernigen Granulozyten zu erkennen. Im sich bildenden Koagulum soll Fibrin für das einsprossende regenerative Gewebe ein Leitgerüst darstellen. Angestrebt werden daher Oberflächenmodifikationen der Mikrostruktur, die vor allem die Adhäsion von Fibrin erleichtern sollen. Einwachsende Kapillaren, Präosteoblasten und Kollagenfasern organisieren das Koagulum innerhalb von 7-14 Tagen. Anschließend differenzieren sich Präosteoblasten zu Osteoblasten und beginnen mit der Knochenbildung an der Implantatoberfläche. Interleukin 1a und 1b und anderen Signalproteinen wird hierbei eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Davies et al. beschrieben die Sekretion zweier nicht kollagener Proteine, sog. Osteopontin und Knochen-Sialoprotein als einleitenden Schritt, an deren Bindungsstellen der Kristallisationsprozeß, durch Anlagerung von Kalziumphosphatkomplexen einsetzt (Davies et al. 1998). In der späten Phase der Implantateinheilung kommt es durch Umbauvorgänge, sog. Bone-Remodelling zunächst zur Geflechtknochenbildung, der innerhalb von ungefähr zwei Monaten zu lamellären Knochen umgebaut wird (Brånemark et al. 1985).

Der genaue Mechanismus des Verbundes zwischen Implantat und periimplantärem Weichgewebe ist unklar. Im Gegensatz zur knöchernen Einheilung finden sich zu diesem Thema weniger und zum Teil kontroverse Daten in der aktuellen Literatur. Lindhe und Berghlund stellen trotz Ähnlichkeiten im Weichgewebsabschluss an Zahn und Implantat

grundlegende Unterschiede in Bezug auf Morphologie und Abwehrmechanismus des periimplantären Epithels, im Vergleich zur den natürlichen Zahn umgebenden Gingiva fest. Eine postulierte Ausbildung von Hemidesmosomen soll an der Implantatoberfläche schwächer ausgeprägt sein (Lindhe und Berghlund 1999). Die obere Begrenzung des transgingivalen Bereiches sollte durch keratinisiertes Epithel, das nach kaudal hin in ein Saumepithel übergeht, gebildet werden. Im sich daran anschließenden supraalveolären Bindegewebe finden sich, im Gegensatz zur radiären Anordnung dentogingivaler Fasern, hauptsächlich circular verlaufende, neben wenigen parallel zur Oberfläche angeordneten Fasern. Die Blutversorgung des periimplantären Bindegewebes erfolgt ausschließlich über Gefäße des vestibulären Alveolarknochens, da eine zusätzliche Versorgung über den Gefäßplexus des periodontalen Ligamentes wie bei der natürlichen Alveole nicht existiert.

2.3. Ätiologie periimplantärer Entzündungen

Eine wesentliche Ursache für den Misserfolg und ggf. endgültigen Verlust eines Implantats in seiner Belastungsphase liegt in der Zerstörung des Implantat-Knochen Kontaktes, primär bedingt durch entzündliche Veränderungen im periimplantären Gewebe. Die Besiedlung der Implantatoberfläche mit bakteriellem Biofilm ist Ausgangspunkt für die Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe. Bleibt die Infektion unbehandelt bestehen kann sie sich auf den Alveolarknochen ausbreiten. Dabei führen, wie bei der Parodontitis, die Toxine (Endo- und Exotoxine) und Metaboliten der Mikroorganismen sowie die körpereigene, immunologische Reaktion letztendlich zu einem fortschreitenden Abbau von periimplantären Stützgewebe. Ein Prozess der von Albrektsson als Peri-implantitis bezeichnet wurde (Albrektsson et al. 1994). So wurde in zahlreichen Untersuchungen die mikrobielle Besiedlung der Titanoberfläche als die Hauptursache für einen Implantationsmisserfolg beschrieben. Eine physiologische periimplantäre Mikroflora, bestehend hauptsächlich aus grampositiven Keimen, darunter vor allem Streptokokken, lässt sich bereits kurz nach Implantatinsertion nachweisen (Mombelli et

al. 1988). Alcoforado et al. untersuchten die kultivierbare Mikroflora von 18 Implantaten, die wegen starker periimplantären Läsionen explantiert werden mussten (Alcoforado et al. 1991). Sie fanden eine komplexe Vielfalt parodontopathogener Mikroorganismen, ähnlich dem Keimspektrum parodontaler Läsionen. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt eine mikrobiologische Untersuchung von Becker (Becker et al. 1990). Die Autoren vermuten in dem Nachweis von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Prevotella intermedia* einen möglichen Risikofaktor bei gefährdeten Implantaten, der zum „Gewebe-breakdown“ führen könnte.

Den beschriebenen positiven Effekten einer Oberflächenrauigkeit für die Adhäsion der knochenbildenden Matrix gegenüber, steht das unter anderem von Quirynen beschriebene Phänomen, der ebenfalls erleichterten mikrobiellen Adhäsion und Kolonisation auf strukturierten Implantatoberflächen (Quirynen et al. 1993). Die Autoren fanden einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen steigender Oberflächenrauigkeit und Quantität der ansässigen Mikroorganismen. Ein weiterer interessanter Aspekt war die Beobachtung, dass die Plaquezusammensetzung bei teilbezahnten Patienten eine größere Vielfalt und Pathogenität der gefundenen parodontopathogenen Keime vermuten lässt als das bei unbezahnten Patienten der Fall ist (Quirynen et al. 1993). Mikroporositäten schützen Bakterien vor säubernden Kräften des Speichelflusses, Kauvorgangs und Hygienemaßnahmen (Rimondini et al. 1997). Periimplantäre Infektionen müssen gegenüber Frühkomplikationen wie Wundinfektionen und Wundheilungsstörungen abgegrenzt werden. Erstere manifestieren sich nach primär erfolgreicher Implantateinheilung. In ihrer Entstehung und Progression nimmt die Plaqueakkumulation den herausragenden ätiologischen Stellenwert ein.

2.3.1. Plaque

Die Ätiologie periimplantärer Entzündungen wird, in Analogie zum Ursachenkomplex der Parodontitis als multifaktoriell und bis heute nicht restlos geklärt angesehen (Rateitschak und Wolf 2003). Hierbei konnte in einer Vielzahl von Studien ein kausaler Zusammenhang zwischen der Präsenz einer pathogenen Mikroflora und dem Auftreten periimplantärer Infektionen nachgewiesen werden. Dabei führt das alleinige Vorhandensein von Plaque nicht unweigerlich zur Ausbildung einer Periimplantitis, mit dem sie definierenden Verlust an Knochenlager. Das Risiko für die Entstehung dieser Erkrankung wird von mehreren Faktoren bestimmt. Wobei man in Hinblick auf die Rolle der Plaqueakkumulation, sowohl die Virulenz der Mikroorganismen, als auch die Resistenzlage des Wirtsorganismus berücksichtigen muss. Plaque ist ein strukturierter, zäher Belag, der aus Bakterien, Speichelbestandteilen, Nahrungsresten und Stoffwechselprodukten der Bakterien besteht, von denen besonders die von *Streptococcus mutans* gebildeten extrazellulären Polysaccharide die Adhäsion untereinander, und zur die Unterlage bildenden Oberfläche erhöhen. Am natürlichen Zahn wird hierbei zwischen supra- und subgingivalem Zahnbelag unterschieden. Beiden gemeinsam ist die initiale Entstehung eines Schmelzoberhäutchens, bestehend aus Glykoproteinen des Speichels. Auf diesem Film siedeln sich zunächst grampositive Kokken und Actinomyceten, später gramnegative Kokken sowie grampositive- und negative Stäbchen und Filamente an. Wird diese festhaftende Plaque nicht mechanisch entfernt, kann sie durch Speichelbestandteile mineralisieren, es entsteht Zahnstein. Zahnstein selbst löst keine Entzündungsreaktion im umliegenden Bindegewebe aus, bietet aber wiederum selbst, aufgrund seiner Oberflächenrauigkeit, ideale Voraussetzungen für die vermehrte und erleichterte Adhäsion von weiteren Mikroorganismen. Das von Loe 1965 formulierte Gingivitis-Modell wurde 1994 von Pontoriero auf die periimplantäre Situation übertragen (Loe et al. 1965; Pontoriero et al. 1994) Die bakterielle Kolonisation führt zu einer gesteigerten Migration polymorphkerniger Granulozyten im angrenzenden

Gefäßbindegewebe und zur Ausbildung eines entzündlichen Infiltrates. Die Pathogenität der Mikroorganismen wird vor allem von ihrer Fähigkeit bestimmt, spezielle Enzyme, wie Kollagenasen, Hyaluronidasen und verschiedene Proteasen zu produzieren, welche die Invasion ins Gewebe erleichtern. Becker hob hervor, dass sich die Zusammensetzung der ansässigen Mikroflora von gesunden und entzündeten Implantaten signifikant unterscheidet (Becker et al. 1990). Bezüglich der Art der Mikroorganismen ergab sich bei gefährdeten Implantaten eine Dominanz gramnegativer Anaerobier und Spirochäten, ähnlich dem Keimspektrum bei marginalen Parodontopathien (Mombelli et al. 1987). Zu den parodontopathogenen Mikroorganismen zählen insbesondere *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Prevotella intermedia*, des weiteren *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides forsythus*, *Eikenella corrodens* sowie Spirochäten. Zu den weiteren Virulenzfaktoren der Bakterien zählen spezifische Toxine, bei denen man Endotoxine von Exotoxinen unterscheidet. Endotoxine, wie Lipopolysaccharide aus der Wand gramnegativer Bakterien provozieren eine gesteigerte Entzündungsreaktion im Wirtsorganismus. Exotoxine sind schädliche Polypeptide, die von einigen Bakterienarten aktiv sezerniert werden können. So schüttet *Actinobacillus actinomycetemcomitans* das Exotoxin Leukotoxin aus, welches besonders polymorphkernige Granulozyten schädigt (Rateitschak und Wolf 2003). Eine von Lindhe et al. 1992 gemachte Beobachtung lässt vermuten, dass der Verlauf periimplantärer Entzündungen im Vergleich zur marginalen Parodontitis beschleunigt stattfindet (Lindhe et al. 1992). In der tierexperimentellen Studie konnte nachgewiesen werden, dass bei periimplantärer Plaqueakkumulation, die durch Applikation von Seidenligaturen verstärkt wurde, die entstehende Infektion der periimplantären Mukosa auf den Alveolarknochen übergreift und zur Resorption führt. Im Gegensatz dazu, wurde das entzündliche Infiltrat am natürlichen Zahn im gleichen Zeitraum noch durch ein schützendes subepitheliales Bindegewebe abgegrenzt. Einen weiteren Hinweis auf das Risiko der Erkrankung durch das Vorhandensein parodontopathogener Keime ergab

die Beobachtung der Übertragbarkeit dieser Keime von erkrankten Parodontien auf gesunde Implantatlager beim Teilbezahnten. Insbesondere erscheinen Porphyromonas gingivalis und Actinobacillus actinomycetemcomitans zur Transmission befähigt zu sein (Aspe et al. 1989). Ein Umstand, der auch die Notwendigkeit der Vorbehandlung von parodontal erkrankten Patienten vor einer Implantatversorgung verdeutlicht.

2.4. Supra- und subgingivale Biofilme

Wie am natürlichen Zahn unterscheidet man auch am Implantat die supragingivale von der subgingivalen Plaqueanlagerung (Abb. 1). Obwohl man subgingival zwischen adhärenter und nicht adhärenter, so genannter „swimming plaque“ unterscheidet, sind die plaquefördernden Faktoren in diesem Bereich im Gegensatz zum supragingivalen Bereich weitestgehend ungeklärt, da auch experimentell sehr viel schwieriger rekonstruierbar. Zu den supragingivalen plaquefördernden natürlichen Faktoren zählen unter anderem Engstand und Schachtelstellung der Zähne, Wurzeleinziehungen, Mundatmung, schlecht zugängliche Fissuren sowie zu den iatrogenen, supragingivalen Faktoren überstehende Kronen- und Füllungsänder als auch Prothesenklammern und – Sättel.

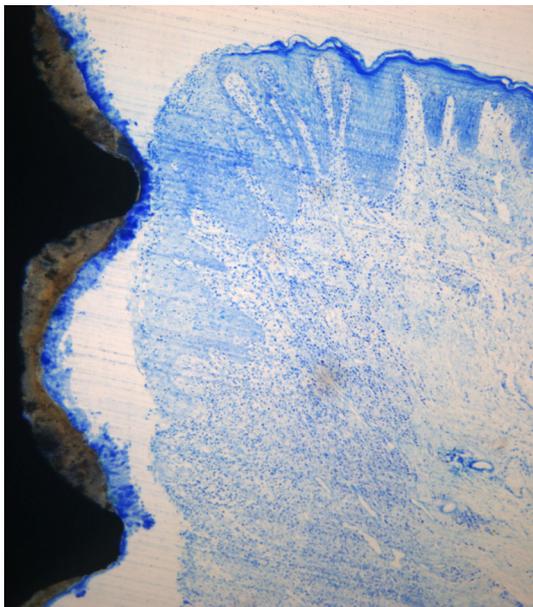


Abb. 1

**Supra- und subgingivale Plaque-
Biofilmanlagerung an einem Titanimplantat**

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete intraorale Schienensystem zur Anzüchtung eines Plaque-Biofilms untersucht daher insbesondere den Einfluss der Oberflächenmodifikation auf das supragingivale Plaqueswachstum, wobei gleichzeitig möglichst viele der oben genannten Faktoren durch eine modifizierte Konstruktion des Schienensystems ausgeschlossen wurden.

2.5. Biofilmformation auf natürlichen und künstlichen Oberflächen

In der Mundhöhle existiert ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Kräften, die Mikroorganismen eine Adhäsion ermöglichen und reinigenden Kräften wie Kauvorgang, Zungenbewegung und Spülwirkung des Speichels. Die meisten Mikroorganismen können hier nur überleben, wenn es ihnen gelingt, sich an harte Oberflächen, wie dem Zahnschmelz anzuheften, die im Gegensatz zu epithelialen Oberflächen nicht abgeschilfert und somit ständig erneuert werden. Die Adhäsion von Bakterien auf harten Oberflächen ist somit eine *conditio sine qua non* für die Entwicklung von Krankheitsbildern wie Karies, sowie parodontalen und periimplantären Infektionen. Bis heute ist der genaue Mechanismus der bakteriellen Adhäsion nicht restlos geklärt und gilt als komplex. Der Prozess kann vereinfacht in vier Phasen gegliedert werden (Busscher und Weerkamp 1987). Die erste Phase umfasst den initialen Transport des Bakteriums zur Oberfläche. Dabei kann ein zufälliger Kontakt durch die Brownsche Bewegung (durchschnittliche Verschiebung $40\mu\text{m}$), Sedimentation, Flüssigkeitsbewegung oder aktive bakterielle Bewegung (chemotaktische Aktivität) entstehen. In der zweiten Phase wird eine reversible Bindung zwischen Bakterium und Oberfläche bis zu einer bestimmten Distanz (ca. $50\mu\text{m}$) ausgebildet. Die Kräfte, die für diese initiale Adhäsion verantwortlich sind, kann man nach der Strecke, die sie in der Lage sind zu überbrücken weiter unterscheiden. Zu den weiterreichenden Kräften, über $1\mu\text{m}$ bis über $50\mu\text{m}$ Distanz, zählen die Van der Waals und die elektrostatischen Kräfte. Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek (DLVO-Theorie; Rutter & Vincent 1984) gaben an, dass oberhalb einer Distanz von $1\mu\text{m}$ die Summation beider Kraftarten die komplette Interaktion beschreibt.

Die Energie dieser Wechselwirkung zwischen Mikroorganismus und Oberfläche, auch Gibbs totale Energie genannt (G_{TOT}), kann somit als Funktion der Separationsstrecke zwischen einem negativ geladenem Partikel (G_A) und einer negativ geladenen Oberfläche (G_F) in einem ionisierten Medium, in vorliegendem Fall Speichel, aufgefasst werden. Für die meisten Bakterienarten nimmt G_{TOT} einen charakteristischen Verlauf. In einem Abstand von 5-20 μm zur Oberfläche wird dieser als sekundäres Minimum bezeichnet, hier besteht eine schwache reversible Bindung, die in ein positives Maximum übergeht und unterhalb von 2 μm in ein erneutes Minimum (= primäres Minimum) übergeht. Das positive Maximum stellt eine Energiebarriere dar. Meist ist diese so niedrig, dass Partikel sie passieren und zum primären Minimum gelangen können. Ab hier ist die Bildung einer irreversiblen Bindung möglich (Abb. 2).

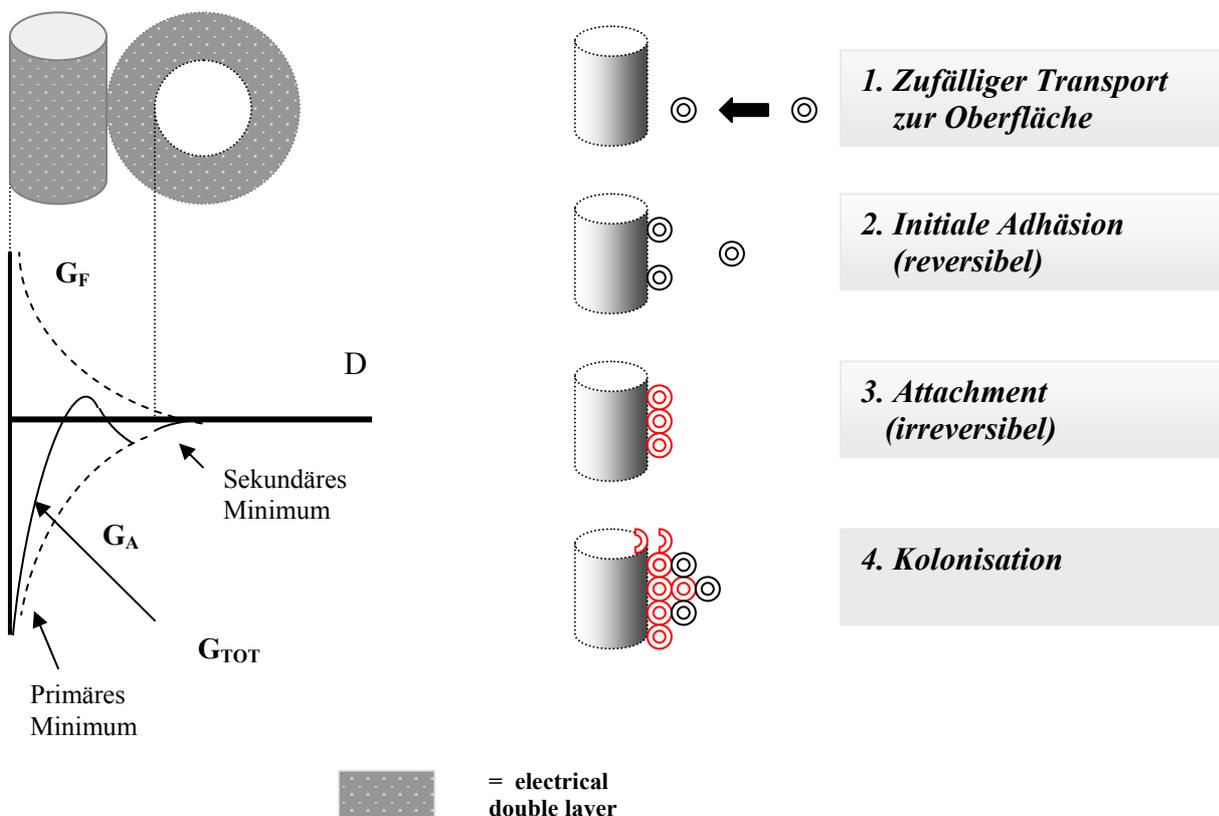


Abb. 2

Schematische Darstellung des dynamischen Prozesses der Biofilmbildung als vierphasige Sequenz

Wird der Abstand zur Oberfläche kleiner als 1 μm , dominieren andere Kräfte die Adhäsion. Zu diesen zählen Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenpaarbindungen und sterische Interaktionen. Beim direkten Kontakt eines Bakteriums mit der Oberfläche, vorausgesetzt der Flüssigkeitsfilm zwischen beiden Grenzflächen konnte entfernt werden, wird die Energie von der Annahme hergeleitet, dass die Grenzflächen Bakterium/Flüssigkeit (bf) und Festkörper/Flüssigkeit (kf) durch die Grenzfläche Festkörper/Bakterium (kb) ersetzt wurden. Bezogen auf Gibbs freie Energie für die Adhäsion von Bakterien beschreibt die Formel $\Delta G_{\text{adh}} = \gamma_{\text{kb}} - \gamma_{\text{kf}} - \gamma_{\text{bf}}$ diesen Umstand. Die Natur tendiert dazu, die freie Energie zu minimieren. Wenn ΔG_{adh} negativ wird, ist diese Bindung thermodynamisch günstig und wird spontan entstehen. Bakterien müssen demnach entweder die Energiebarriere überwinden, oder die Distanz mit Zytoplasmaausläufern, wie Fibrillen und Fimbrien, überbrücken. In beiden Fällen ist die vorherige Entfernung des Flüssigkeitsfilms Voraussetzung. Diese dehydrierende Fähigkeit der Bakterien scheint von hydrophoben Gruppen ihrer Zelloberfläche auszugehen, und ist womöglich einer der entscheidenden Schritte im Adhäsionsprozess. Jedoch scheinen für einige Bakterienarten andere Faktoren eine größere Rolle zu spielen. So können sie dazu gezwungen werden auf Distanz zur Oberfläche zu bleiben, weil diese von Polymeren ummantelt wird oder elektrostatische Kräfte zu groß sind. In diesen Fällen wird das oben beschriebene thermodynamische Konzept überspielt. In Phase 3 wird eine feste Bindung (kovalente oder ionische Bindung) ausgebildet. Diese Bindungen werden durch spezifische extrazelluläre Proteinkomponenten des Mikroorganismus (Adhäsine) und komplementären Rezeptoren der Oberfläche (Pellikel) vermittelt und sind speziesspezifisch. Unmittelbar nach der Zahnreinigung bedeckt ein Pellikel, bestehend aus Muzinen, Glykoproteinen, prolinreichen Proteinen und anderen Proteinen, die Schmelzoberfläche. Einige Moleküle unterlaufen eine Konformationsänderung wenn sie an die Oberfläche adsorbieren, so dass neue Rezeptoren verfügbar werden. Solche versteckten Rezeptoren für die bakteriellen Adhäsine werden als Kryptitope bezeichnet. In Phase 4 beginnt die Koloniebildung, in der

vor allem anfänglich durch Zellteilung die Anzahl adhärenter Bakterien wächst, so dass Biofilme entstehen. Durch das Auftreten von intrabakteriellen Bindungen wird die Situation komplex. Jede Art bindet spezifische Speichelmoleküle. Identisch ummantelte Zellen können wiederum untereinander agglutinieren. Durch diese Prozesse wird die Vielfalt der zur Oberfläche exponierten Speichelmoleküle extrem gesteigert. Streptokokken und Aktinomyzeten sind die ersten kolonisierenden Bakterien. In den ersten 4 Stunden beträgt ihre Verdopplungszeit weniger als 1 Stunde. Erst später binden auch andere Mikroorganismen mit spezielleren Bedürfnissen an den entstehenden Biofilm. Koaggregationen zwischen Zellen unterschiedlicher Gattungen werden durch lektinähnliche Adhäsine vermittelt. Ein Beispiel für solch eine Koaggregation ist die Korn-Kolben-Formation, in der Streptokokken an die Filamente von *Bacteroides matruchotii* binden. In einer neueren Untersuchung zur Wachstumsdynamik von Biofilmen auf Zähnen beobachteten die Autoren eine Änderung der Wachstumsrate innerhalb der ersten 24 Stunden (Liljemark et al. 1997). Nachdem Streptokokken in den ersten 2-8 Stunden 3-30% der Bindungsstellen abgesättigt haben, folgt eine kurze Phase von rapidem Wachstum. Diese beschleunigte Wachstumsrate scheint Subjekt-, Oberflächen-, Zahn- und Zeitunabhängig zu sein. Die frühe ungestörte supragingivale Plaquebildung verläuft am ersten Tag bis zu einer Bedeckung der bukkalen Zahnflächen < 3% (Quirynen & van Steenberghe 1989). Danach steigt sie bis zum vierten Tag stark an, so dass 30% der Zahnkrone bedeckt sind. Nach dem vierten Tag steigt die gebildete Plaquemenge nicht weiter an, jedoch ändert sich ihre Zusammensetzung in Richtung einer gram-negativeren und anaeroberen Flora. Brex et al. (1983) zeigten, dass der initiale Anstieg primär der Proliferation bereits adhärenter Bakterien, und nur zu geringem Ausmaß neu adhätender Bakterien zuzuschreiben ist (Brex et al. 1983). Der Abfall der Generationsdauer (1 Stunde initial vs. 12 Stunden bei 3 Tage alter Plaque) mag die von Tag 4 an sinkende Wachstumsrate erklären. Generell folgt die Plaquebesiedlung einem Muster, beginnend am Zahnfleischsaum und im Interdentalraum, mit späterer Ausbreitung in Richtung

koronal. Abweichungen von diesem Muster ergeben sich hauptsächlich durch Unregelmäßigkeiten der Oberflächenstruktur. Die initiale Besiedlung der Schmelzoberfläche startet dann von diesen Kratzern, Rillen, Defekten und ähnlichem als Monolayer von Zellen. Bakterien sind in diesen Rauigkeiten vor abziehenden Kräften weitestgehend geschützt. Nicht zuletzt vergrößern Unregelmäßigkeiten die für die Adhäsion verfügbare Oberfläche um den Faktor 2-3. Viele Studien deuten auf eine positive Korrelation zwischen Rauigkeiten und bakterieller Adhäsion hin. Rauhe Oberflächen scheinen zudem eine reifere Plaque, charakterisiert durch mehr motile Mikroorganismen und Spirochäten, zu beherbergen. Bei der Untersuchung unterschiedlicher Oberflächenmodifikationen auf die Adhäsion von Bakterien fanden die Autoren einen speziesabhängigen Einfluss der Oberflächenrauigkeit. Während einige Bakterienarten (*P. gingivalis*, *P. intermedia*) in größerer Anzahl auf rauhen Oberflächen gefunden wurden, bevorzugten andere Arten (*S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitis*) glatte Oberflächen (Yamauchi et al. 1990). Der R_a -Wert von $0,2 \mu\text{m}$ wurde als Schwelle der Oberflächenrauigkeit vorgeschlagen, unter der die bakterielle Adhäsion nicht weiter reduziert werden kann (Bollen et al. 1997). Eine Pilotstudie beobachtete eine schnellere supragingivale Plaqueformation auf Titanabutments ($R_a = 0,3 \mu\text{m}$) im Vergleich zu Zähnen (Quirynen et al. 1986). Eine weitere Studie verglich die Plaqueakkumulation auf Standardabutments ($R_a = 0,3 \mu\text{m}$) mit der auf angerauhten Abutments ($R_a = 0,8 \mu\text{m}$). Nach 3 Monaten zeigte die rauhere Oberfläche signifikant weniger Kokken (64% vs. 81%), ein Zeichen für eine gereifere Plaque.

Um den Einfluss der freien Oberflächenenergie (sfe) auf die bakterielle Adhäsion, bzw. auf die Änderung der Adhäsionsenergie für Bakterien (ΔG_{adh}) darstellen zu können, müssen die sfe des Bakteriums γ_{bv} , die sfe des Substrates γ_{sv} , und die Oberflächenspannung des umgebenden Mediums γ_{lv} bekannt sein (Absolom et al. 1983). Im Fall $\gamma_{lv} > \gamma_{bv}$ wird G_{adh}

laufend negativer, je höher γ_{sv} , d.h. mit steigender Hydrophilie der Oberfläche. Im umgekehrten Fall ($\gamma_{lv} < \gamma_{bv}$) steigt G_{adh} bei steigender Hydrophilie (Abb. 3)

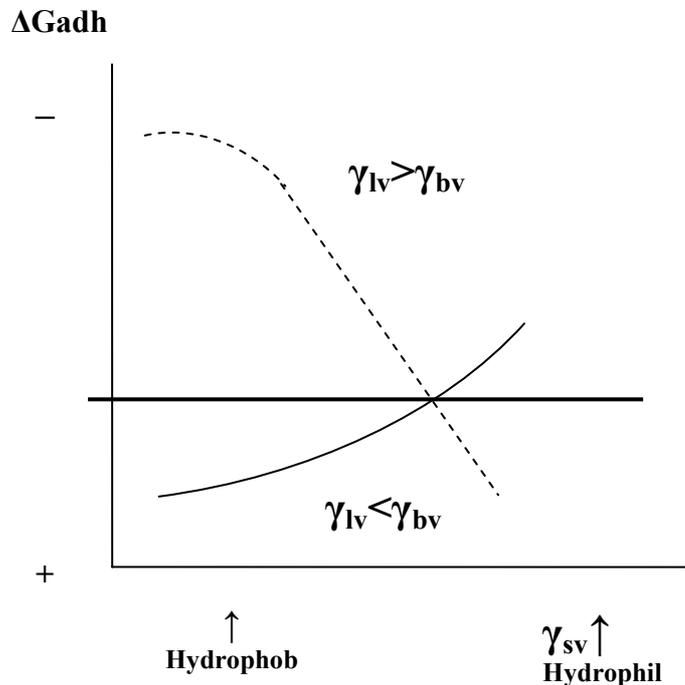


Abb. 3

Abb. 3 Theoretische Kalkulation von ΔG_{adh} eines einzelnen Bakteriums suspendiert in einem Medium mit $\gamma_{lv} < \gamma_{bv}$, oder $\gamma_{lv} > \gamma_{bv}$

Dieses Modell kann keine konkrete Zahl adhärerender Mikroorganismen, sondern lediglich das relative Ausmaß der wahrscheinlich zu beobachtenden Adhäsion beschreiben. Da die meisten oralen Mikroorganismen eine hohe Oberflächenenergie und Speichel verglichen dazu eine niedrige Oberflächenenergie besitzt, wird für die meisten Bakterienarten die Situation $\gamma_{lv} < \gamma_{bv}$ zutreffen, also eine verstärkte Adhäsion bei hoher Oberflächenenergie (Absolom et al. 1983, 1988). Adhäsionsexperimente, in denen Bakteriensuspensionen in Kontakt mit polymeren Oberflächen unterschiedlicher Oberflächenenergie gebracht wurden, korrelieren mit der oben genannten thermodynamischen Voraussage (Absolom et al. 1983). Ferner binden Bakterien reversibler an Oberflächen, wenn G_{adh} positiv ist (Busscher et al. 1986a). Andere Studien belegen diesen Zusammenhang, zeigen aber, dass die Beziehung zwischen

Oberflächenenergie und bakterieller Adhäsion über die Zeit weniger ausgeprägt verläuft (Busscher et al. 1986b). Ein Vergleich der Einflüsse von Oberflächenenergie und Rauigkeit wurde in der Studie von Quirynen et al. 1990 vorgenommen. Zwei schmale Streifen (Zelluloseacetat und Teflon) mit je einer rauhen ($R_a = 1,0 \mu\text{m}$) und einer glatten ($R_a = 0,1 \mu\text{m}$) Hälfte wurden auf die mittleren Inzisivi geklebt: Zelluloseacetat mit einer mittlerer Oberflächenenergie von 58 ergcm^{-2} und Teflon mit einer niedrigen Oberflächenenergie von 20 ergcm^{-2} . Nach 3 Tagen ohne Mundhygienemaßnahmen zeigten die glatten Regionen eine geringere Plaqueakkumulation, welche zudem bei geringerer Oberflächenenergie weniger stark ausgeprägt war. Im Gegensatz dazu zeigte die rauhe Hälfte keine signifikanten Unterschiede in der Menge der akkumulierten Plaque, was für ein Überwiegen des Faktors Rauigkeit gegenüber der Oberflächenenergie spricht (Quirynen et al. 1990). Trotz dieser Ergebnisse scheinen für bestimmte Mikroorganismen andere Faktoren, z.B. elektrostatisches Potential (Bellon-Fontaine et al. 1990), einen wesentlicheren Einfluss als die Oberflächenenergie zu besitzen.

In der Mundhöhle muss zusätzlich der Einfluss eines anhaftenden Pellikels auf die Oberflächenenergie berücksichtigt werden. Für Materialien mit niedriger Oberflächenenergie steigt die Oberflächenenergie durch die Proteinummantelung an, wohingegen die Oberflächenenergie von Materialien mit hoher Oberflächenenergie abfällt (Van Dijk et al. 1987). Für die natürliche Zahnoberfläche resultiert eine Senkung der Oberflächenenergie durch die Pellikelbildung (Van Pelt et al. 1983). Folglich nähern sich durch den Überzug die Oberflächenenergiewerte einander an (Van Dijk et al. 1988), so dass der Einfluss der oben beschriebenen thermodynamischen Annäherung sich mindert (Prall-Terpstra et al. 1989 und 1991). Absalom beobachtete sogar eine klare Beziehung zwischen adsorbierten Proteinen und Oberflächenenergie, und somit indirekt auch eine Abhängigkeit bezüglich der bakteriellen Adhäsion (Absalom et al. 1987). Glantz konnte die positive Korrelation zwischen Oberflächenenergien und akkumulierter Plaquemenge in vivo erstmals 1969 beobachten

(Glantz et al. 1969). Im Hundexperiment konnte beobachtet werden, dass Materialien mit niedriger Oberflächenenergie (Teflon) weniger Plaque ansammelten als Oberflächen wie Schmelz und Glas mit hoher Oberflächenenergie (Quirynen et al. 1989). Die mikrobielle Untersuchung von 3 Tage alter Plaque ergab darüber hinaus, dass Teflon bevorzugt von Bakterien mit niedriger Oberflächenenergie kolonisiert wurden (Weerkamp et al. 1989). Der Vergleich der mikrobiellen Zusammensetzung von 3 Monate alter Plaque von Titanabutments gegenüber Plaque, die auf Teflonabutments gewachsen war, zeigte für das hydrophobe Teflon eine weniger reife Komposition (weniger Motile und Spirochäten) gegenüber dem auf Titan gewachsenen Biofilm.

Individuelle personenabhängige Unterschiede mit einem Einfluss auf die Biofilmformation müssen bei der Betrachtung berücksichtigt werden. Gegebenenfalls können diese Unterschiede den Einfluss der Oberflächencharakteristika überspielen. Oft wird zwischen „schnellen“ und „langsamen“ Plaquebildnern unterschieden. Bis jetzt konnten nur geringfügige Unterschiede identifiziert werden. 90% der initialen Plaqueformation scheinen auf die Benetzbarkeit der Zahnoberfläche, der Speichelzusammensetzung und Flussrate zurückgeführt werden zu können (Simonsson et al. 1987). Qualitativ zeigte sich ein höherer Anteil gramnegativer Stäbchen in zwei Wochen alter Plaque bei schnellen Plaquebildnern (35%) im Gegensatz zu langsamen Plaquebildnern (17%) (Zee et al. 1996). Unterschiedliche Studien deuten auch auf eine beschleunigte Plaqueformation auf Zahnoberflächen, die entzündeten Gingivaverhältnissen benachbart sind, hin (Quirynen et al. 1991, Ramberg et al. 1994). Möglicherweise begünstigen die vermehrte Sulcus-Fluid-Fliessrate, und die, in diesem Exsudat enthaltenen Substanzen die Wachstumsrate der kolonisierenden Bakterien. Hinzu kommt als mechanischer Aspekt die erschwerte Reinigung durch geschwollenes Gingivagewebe. Das Alter scheint keinen Einfluss auf die de novo-Plaqueformation zu besitzen. Die Möglichkeit der Transmission bakterieller Organismen von einer oralen Nische auf eine andere, stellt einen weiteren wichtigen Faktor der Biofilmformation dar. Eine

besonders geeignete Situation für diese Beobachtung stellen zweiphasig einheilende Implantate, und hierbei das verzögerte Einsetzen des sterilen Abutments, dar. Die anfänglich keimfreien Abutments zeigen nach wenigen Monaten eine vergleichbare Zusammensetzung der Plaque (Quirynen et al. 1996a). Bei teilbezahnten Patienten wurden subgingival eine vergleichbare Mikroflora um Implantate und Zähne gefunden (Papaioannou et al. 1996). Das Vehikel für diesen intraoralen Transport ist bislang ungeklärt, der Speichel scheint aber eine wichtige Rolle zu spielen. Der dentale Status der verbliebenen Zähne schien in den Studien den Einfluss der Oberflächencharakteristika zu überbieten (Quirynen et al. 1993, 1994, 1996a&b).

Langzeitstudien (3 Monate – 1 Jahr) deuten darauf hin, dass eine gewisse Oberflächenrauigkeit der enossalen Implantate für einen optimalen Weichteilabschluss jedoch benötigt wird. In der Untersuchung wurden hochpolierte Abutments mit Standardabutments (Kontrollgruppe, $R_a = 0,21 \mu\text{m}$) verglichen. Abutments mit glatterer Oberfläche zeigten einen mittleren Attachmentverlust von $> 0,5 \text{ mm}$, während das klinische Attachment-Level in der Kontrollgruppe unverändert blieb. Diese Beobachtung kann möglicherweise durch den Umstand erklärt werden, dass Fibroblasten und Epithelzellen eine gewisse Oberflächenrauigkeit für die Adhäsion und Proliferation benötigen (Quirynen et al. 1996a, Bollen et al. 1996). Dieser Aspekt bedarf jedoch weiterer klinischer Untersuchungen. Eine Untersuchung, die sich mit dem Effekt der Oberflächenrauigkeit auf die subgingivale Biofilmformation an Implantaten beschäftigte, fand einen signifikanten, quantitativen und qualitativen Unterschied zwischen adhärenter und „swimming“ Plaque. So scheinen die Zusammensetzung und die Menge der adhärenen Plaque durch die Oberflächenstruktur beeinflussbar, während die durch Papierspitzen aufsaugbare Plaque von diesem Faktor unbeeinflusst scheint (Quirynen et al. 1993).

Nur wenige Studien untersuchen die Zusammensetzung und mögliche Unterschiede der Pellikelstruktur auf Titanoberflächen im Vergleich zur Pellikelbildung auf natürlichen

Zähnen. Beide Pellikelarten scheinen hochmolekulare Mucine und α -Amylase zu enthalten, jedoch werden beim Titanpellikel kein Zystatin und keine niedrigmolekulare Mucine gefunden. Zudem scheint das hochmolekulare prolinreiche Glykoprotein, welches im Schmelzpellikel nur in geringfügiger Anzahl nachweisbar ist, im Titanpellikel eine prominentere Komponente darzustellen (Edgerton et al. 1996). Viele Oberflächencharakteristika scheinen mitverantwortlich für die Variabilität der initialen Biofilmformation zu sein. Die Oberflächenrauigkeit scheint insgesamt eine etwas dominantere Rolle als die freie Oberflächenenergie zu spielen. Viele der gemachten Beobachtungen sind in anderen technischen Bereichen anzutreffen (Kardiovaskuläre Prothesen, Katheterassoziierte uropathogene Bakterien, Pipelines, etc.) (Quirynen & Bollen 1995).

2.6. Risikofaktoren bei der Progression periimplantärer Läsionen:

Genetische Faktoren

Interleukine sind Signalstoffe des Immunsystems und verantwortlich für die Induktion der T-Zell-vermittelten Immunreaktion, der B-Zell-Aktivierung (Antikörperproduktion), sowie der allgemeinen Entzündungsreaktion (z.B. Fieber). Interleukin 1 (IL-1) gehört zu den stärksten proinflammatorischen Mediatoren, sog. Zytokinen (u.a. $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-8). Interleukin 1 liegt in zwei Formen, als Interleukin 1α (IL- 1α) und Interleukin 1β (IL- 1β) vor. Die Synthese beider Formen wird durch die Gene IL-1A und IL-1B auf Chromosom 2 gesteuert. Gene können Mutationen ihrer Basensequenz aufweisen. Mutationen eines einzelnen Basenpaares sind häufig und werden als „single nucleotide polymorphism“ (SNP) bezeichnet. Allel -1 bezeichnet die normale, Allel-2 die veränderte, mutierte Sequenz. Von IL-1-positiven Genotyp spricht man, wenn Allel-2 homozygot in einem Gen oder heterozygot in mindestens beiden Interleukingenen auftritt. Bei Interleukin-1-positivem Genotyp werden Monozyten durch die Lipopolysaccharide gramnegativer Anaerobier zu einer bis zu 4-fach

stärkeren Ausschüttung von Interleukin-1 provoziert (Rateitschak und Wolf 2003). Daraus resultiert im Organismus eine erhöhte Entzündungsbereitschaft gegenüber mikrobiellen Infektionen. Im Rahmen einer periimplantären Entzündung führt dies zu einem verstärkten Gewebeabbau. Neuere Untersuchungen beobachten einen signifikanten Einfluss des Interleukin-Polymorphismus bereits in der frühen Einheilphase von Implantaten (Shimpuku et al. 2003).

2.6.1. Rauchen

Als weiterer Risikofaktor ist das Rauchen zu nennen. Teerprodukte vermindern die Fähigkeit polymorphkerniger Granulozyten zu Chemotaxis und Phagozytose, die Bildung proinflammatorischer Zytokine wird stimuliert. Nikotin als Sympathomimetikum führt zu reduzierten Stoffwechsellleistungen in Bindegewebe und Knochen, so dass Infektionen in ihrem Verlauf begünstigt werden. Zudem wird ein synergistischer Effekt von positivem Interleukin-1-Genotyp und Rauchen vermutet und steht im Interesse neuester Untersuchungen.

2.6.2. Keratinisierte Gingiva

Der Einfluss einer Zone fixierter Gingiva auf die Prävalenz und Progression periimplantärer Entzündungen konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Verschiedene Studien aus der Parodontologie zeigten, dass zur Gesunderhaltung parodontaler Verhältnisse ein Saum keratinisierter Gingiva nicht zwingend erforderlich ist (Lang und Loe 1972; Miyasato et al. 1977). Obwohl aus ästhetischen Gründen ein Vorhandensein keratinisierter Gingiva notwendig erscheinen kann, ist aufgrund fehlender wissenschaftlicher Untersuchungen ein kausaler Zusammenhang zwischen diesem Faktor und dem Auftreten periimplantärer Läsionen zum heutigen Zeitpunkt weder belegt noch widerlegt worden. So konnte im Tiermodell eine vergleichbare Progression periimplantärer Entzündungen bei

osseointegrierten Implantaten sowohl mit als auch ohne fixierte Gingiva gezeigt werden (Strub et al. 1991). Eine andere tierexperimentelle Studie kam im Gegensatz dazu zu dem Ergebnis, dass eine fehlende oder zu schmale keratinisierte Gingiva die Entwicklung der periimplantären Entzündung signifikant verstärkt (Hanisch et al. 1997). Die alltägliche Implantathygiene scheint jedoch durch das Vorhandensein keratinisierter Gingiva für den Patienten erleichtert zu sein.

2.6.3. Funktionelle Belastung von Implantaten

Der Einfluss der funktionellen Überbelastung auf die Knochendestruktion wird noch immer kontrovers beurteilt. Der experimentelle Nachweis einer belastungsinduzierten Knochenläsion gelang Isidor (Isidor et al. 1996). Er beobachtete im Tiermodell nach extremen Biegebelastungen Knochenabbauvorgänge und Implantatverluste, während die alleinige Plaqueakkumulation nicht zum kompletten Verlust der Osseointegration führte. Zu einem anderen Ergebnis kam Heitz - Mayfield 2004. Ebenfalls im Tierexperiment konnte hier weder bei periimplantär gesunden, als auch bei erkrankten Implantaten ein signifikanter Einfluss der funktionellen Überbelastung auf die Osseointegration nachgewiesen werden (Heitz - Mayfield 2004). Trotz kontroverser Datenlage ist davon auszugehen, dass sich die okklusale Belastung von Implantaten in physiologischen Grenzen halten sollte um Langzeiterfolge nicht zu gefährden.

2.6.4. Systemische Erkrankungen

Allgemeinerkrankungen als systemische Faktoren in deren Verlauf es auch zu pathologischen Veränderungen am Parodont und/oder der Gingiva kommen kann, müssen von rein plaquebedingten Erkrankungen unterschieden werden. Als wichtigste Stoffwechselerkrankung ist vor allem der Diabetes Typ I zu nennen. Im Rahmen der Erkrankung kommt es zur Erhöhung des Glukosegehalts der Sulkusflüssigkeit, und damit zu gesteigertem

Bakterienwachstum. Systemerkrankungen mit einhergehenden Funktionsstörungen in der Immunabwehr sind das Chediak-Higashi-Syndrom und das Antikörpermangelsyndrom. Zu den genetisch bedingten Syndromerkrankungen, die ebenfalls Erkrankungen des Parodonts hervorrufen können zählen des Weiteren das Down-Syndrom und das Papillon-Lefèvre-Syndrom. Der Lichen ruber planus und der Pemphigus vulgaris können sich neben ihren dermatologischen Manifestation auch in gingivoparodontalen Erscheinungen äußern. Als virale Systemerkrankung ist vor allem die HIV-Infektion zu nennen.

2.7. Klinische Manifestation periimplantärer Infektionen

Die periimplantären Entzündungen lassen sich in periimplantäre Mukositis, periimplantäre Mukosahyperplasie und Periimplantitis gliedern (Abb. 4a-c).

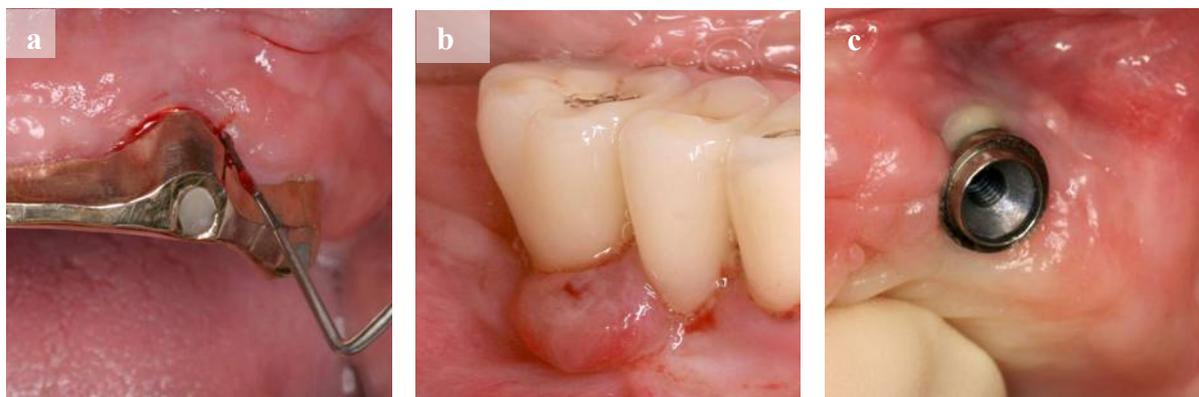


Abb. 4, a) periimplantäre Mukositis, b) periimplantäre Mukosahyperplasie, c) Periimplantitis

Während beide erstgenannten Formen auf das periimplantäre Weichgewebe beschränkt und somit reversibel sind, hat sich bei der Periimplantitis der Entzündungsprozess auf das knöcherne Lager ausgebreitet und zu einem irreversiblen Verlust an Hartgewebe geführt (Albrektsson et al. 1994). Klassische Entzündungszeichen wie verstärkte Reiz- bzw. Spontanblutung, putride Sekretion, Schmerzen, Schwellung und Rötung können gegebenenfalls bereits im Stadium der Mukositis nachweisbar sein. Durch die hyperplastische Mukosa kann in Analogie zur Gingivitis eventuell eine Erhöhung der periimplantären

Sulkustiefe gemessen werden. Die Diagnose der Periimplantitis erfordert den Nachweis der knöchernen Beteiligung. Zu den sicheren klinischen Parametern zählt hierbei der radiologisch erkennbare horizontale und / oder vertikale Abbau des Alveolarknochens. Spiekermann unterscheidet hierbei spaltförmige von schüsselförmigen und trichterförmigen Defekten (Spiekermann 1994). Des Weiteren schlägt der Autor eine Einteilung in 4 Klassen der Periimplantitis vor, welche im Hinblick auf die notwendige Therapie, vor allem eine klinische Entscheidungshilfe darstellen soll. So liegt der Einteilung Spiekermanns vor allem das knöcherne Erscheinungsbild des periimplantären Defektes zugrunde, wobei zwischen den Klassen fließende Übergänge bestehen. Bei der Beurteilung sind jedoch die immer stattfindenden physiologischen, periimplantären Resorptionsvorgänge zu berücksichtigen. Adell et al. geben eine mittlere Resorption von 0,9-1,6 mm im ersten postoperativen Jahr, sowie 0,02-0,15 mm für die nachfolgenden Jahre bei zweiphasig einheilenden Implantaten an, während Weber et al. für transgingival einheilende Implantate einen mittleren, jährlichen, periimplantären Knochenabbau von 0,09 mm im Unterkiefer und 0,01 mm im Oberkiefer ermittelten (Adell et al. 1981; Weber et al. 1992). Als weiteres sicheres Zeichen der verloren gegangenen Osseointegration gilt die spürbare Implantatlockerung. Die vorsichtige Sondierung kann ebenfalls Hinweise auf die Ausbildung einer periimplantären Tasche geben. Schmerzen treten wie bereits erwähnt schon im Initialstadium der Entzündung auf und können somit nicht als sicheres Zeichen für eine Periimplantitis herangezogen werden. Zur Erhebung klinischer Parameter hat sich die Parodontalsonde als hilfreich erwiesen (Mombelli et al. 1994). Als Referenzpunkt wird hierbei die Implantatschulter herangezogen um in Analogie zur parodontalen Diagnostik u.a. Attachmentlevel (Implantatschulter bis Taschenboden), Sondierungstiefe (marginale Gingiva bis Taschenboden), Rezessionen (Implantatschulter bis marginale Gingiva), sowie Sekretionsverhalten und Hygieneindices zu erheben. Weiterhin sei noch die Beurteilung des Klopfschalls mit der Unterscheidung

zwischen hypersonor und osseointegriertem gegenüber hyposonor und bindegewebig eingeeiltem Implantat genannt.

2.8. Therapiekonzepte

Die Reduzierung der pathogenen Mikroflora entspricht einer kausalen Behandlung periimplantärer Infektionen (Mombelli et al. 1998). Erschwert wird die suffiziente Reinigung der Implantatoberfläche durch die unterschiedlichsten Oberflächenstrukturierungen. Sowohl beschichtete als auch sandgestrahlte bzw. säuregeätzte Titanimplantate weisen Mikroporositäten auf, welche für konventionell mechanische Instrumente wie Plastikküretten oder Polierkelche nicht vollständig zugänglich sind. Fox et al. zeigten, dass Metallküretten die Titanoberfläche sogar derart schädigen, dass dadurch neue, tiefere Plaqueretentionsstellen entstehen können (Fox et al. 1990). Ferner wird neben der mechanischen Entfernung des Biofilms eine Dekontamination der Oberfläche von Toxinen und Bakterien gefordert. Um dies zu erreichen wird von einigen Autoren die gleichzeitige Anwendung chemisch aktiver Substanzen wie Chlorhexidin, Zitronensäure oder Tetrazyklin vorgeschlagen. Modifizierte Ultraschall und Pulverstrahlgeräte werden derzeit ebenfalls zur Bearbeitung der Oberfläche eingesetzt.

2.8.1. Mechanische Therapieansätze

Fox et al. verglichen Kunststoff-, Edelstahl und Titanküretten in ihrem Effekt auf die Titanoberfläche (Fox et al. 1990). Sowohl Titanküretten als auch übliche Metallküretten erzeugten eine signifikant erhöhte Rauigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für die Behandlung mit Kunststoffküretten ergab sich kein signifikanter Unterschied. Augtun et al. bezogen in ihrer vergleichenden Studie ein Pulverstrahlgerät mit ein, und kamen zu dem Schluss, dass sowohl Kunststoffküretten als auch das Pulverstrahlgerät die am wenigsten schädlichen Behandlungsmethoden der Oberflächenaufbereitung waren (Augtun et al. 1998).

Darüber hinaus beobachteten sie eine Überlegenheit des Pulverstrahlgerätes in der Gründlichkeit der Reinigung im Vergleich zu Kunststoffküretten. Auch Parham et al. sprach dem Pulverstrahlgerät eine effektive und die Oberfläche schonende Anwendung zu (Parham et al. 1989). Als nachteilig beim Einsatz dieses Gerätes ist aber das Risiko einer Emphysembildung zu nennen (Van de Velde et al. 1991). Bei der Verwendung konventioneller Ultraschallsysteme wird die unkontrollierte Hitzeentwicklung am Arbeitsende, sowie die Aerosolbildung von einigen Autoren kritisch beurteilt. Eine neuere Entwicklung stellt das Vector[®]System (Dürr), ein modifiziertes Ultraschallsystem da. Das Gerät lenkt horizontale Schwingungen über einen Resonanzkörper in rein vertikale Schwingungen der Arbeitsspitze um. Dadurch soll die applizierte Flüssigkeit stärker an das Arbeitsende gebunden sein, und zu einer Reduktion der Aerosolbildung beitragen. Eine der wenigen Studien zum Vector[®]System beurteilt dieses vorläufig als Zahnschmelz schonend aber weniger effektiv in Bezug auf die Belagentfernung als Handinstrumente und konventionelle Ultraschallsysteme (Hartschen et al. 2002).

2.8.2. Antimikrobielle, antiphlogistische Therapieansätze

Aufgrund fehlender klinischer Untersuchungen kann zum jetzigen Zeitpunkt keine definitive Therapieempfehlung gemacht werden. Verschiedenste Substanzen werden derzeit als adjuvante Mittel in der Behandlung periimplantärer Infektionen eingesetzt. Bei den in Frage kommenden Substanzen handelt es sich sowohl um antimikrobielle Wirkstoffe, wie Chlorhexidindigluconat, nichtsteroidale Antirheumatika, sowie systemisch oder lokal verabreichte Antibiotika. Ericsson et al. untersuchten die Effektivität einer Kombinationstherapie im Hundemodell (Ericsson et al. 1996). Periimplantäre Infektionen wurden durch Seidenligaturen induziert und einen Monat nach deren Entfernung wurde mit der Therapie begonnen. Diese bestand aus der mechanischen Konkremententfernung, sowie gleichzeitiger dreiwöchiger, systemischer Behandlung mit Amoxicillin und Metronidazol. Im

Vergleich zur Kontrollgruppe beobachteten die Autoren bei adjuvanter Antibiotikatherapie einen signifikanten Rückgang der Entzündungsparameter, jedoch keine Knochenneubildung im Sinne einer Reosseointegration. Ziel der klinischen Untersuchung von Schenk et al. war die Beurteilung der Wirksamkeit einer Kombinationstherapie aus mechanischer Reinigung und lokaler Applikation von Tetrazyklin HCL bei acht Patienten mit mindestens zwei enossalen Implantaten, die Zeichen einer periimplantären Mukositis und/oder Mukosahyperplasie zeigten (Schenk et al. 1997). Die Ergebnisse lassen auch hier einen positiven Effekt der Kombination von mechanischer Konkremententfernung und antimikrobieller Therapie vermuten. Jedoch sind noch weitere Studien mit größerer Probandenzahl nötig um statistische Signifikanz zu erlangen. Unabdingbar, bei allen Therapieansätzen ist die Etablierung und Aufrechterhaltung einer adäquaten Mundhygiene und somit Plaquekontrolle durch den Patienten selbst, welche durch ein entsprechendes Recallsystem analog zur Parodontaltherapie optimiert wird.

2.9. Lasertherapie

Neuerdings wird neben den beschriebenen konventionellen Therapieansätzen der Einsatz verschiedener Lasersysteme zur Dekontamination von Implantatoberflächen empfohlen. Verschiedene in vitro Studien weisen daraufhin, dass nur der CO₂-Laser, der Diodenlaser und der Erbium-YAG Laser (erbium-doped: yttrium, aluminium and garnet) für die Bestrahlung von Implantatoberflächen geeignet sind. Eine Voraussetzung für die Anwendung von Lasersystemen auf Titanoberflächen ist das Vermeiden von Temperaturanstiegen im Implantatkörper und somit im angrenzenden Gewebe. Nötig hierfür sind Laser, deren spezifische Wellenlänge eine minimale Absorption in Titan und maximale Absorption in Wasser aufweisen. Diese Forderung scheinen nur der CO₂-Laser und der Erbium-YAG Laser erfüllen zu können, immer in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und der Energieeinstellung (Kreisler et al. 2002; Oyster et al. 1995). Trotz dieser positiven

Bewertungen des Diodenlasers und des CO₂-Lasers bezüglich Dekontaminations- und Absorptionsverhalten, kann deren klinischer Einsatz in der Therapie periimplantärer Infektionen zur Zeit lediglich als adjuvante Maßnahme erfolgen (Bach et al. 2000), da ein schonender Abtrag des Biofilms als auch subgingivaler Konkrementen bisher nur mit dem Er:YAG Laser gelang (Aoki et al. 1994).

Der Diodenlaser versagte bei der Aufgabe der mechanischen Belagentfernung von parodontal erkrankten Wurzeloberflächen (Schwarz et al. 2003). Beim CO₂-Laser fehlen bis zum jetzigen Zeitpunkt geeignete optische Systeme, die den Laserstrahl gezielt in den periimplantären Bereich führen. So ist zu dessen Einsatz bisher die Bildung eines Mukoperiostlappens notwendig. Für den Er:YAG Laser wurde hingegen eine spezielle Faser mit axialem und radiärem Strahlungsmuster entwickelt, die den nichtchirurgischen Zugang auch bei Gewindestruktur der Oberfläche möglich macht. Zum jetzigen Zeitpunkt stellt der Er:YAG Laser somit das einzige verfügbare Lasersystem da, welches ein effektives Entfernen subgingivaler Konkrementen und bakterieller Plaques ermöglicht.

Der Erbium YAG Laser ist ein gepulster Festkörperlaser mit einer Wellenlänge von 2,94 µm. Die Wellenlänge des Er:YAG Lasers stimmt mit dem Absorptionsmaximum in Wasser überein. Daraus ergibt sich ein Hinweis auf die Eignung des Er:YAG Lasers zur Abtragung von biologischem Gewebe, welches z.B. für Hydroxylapatit einen Wassergehalt von 40-70 % aufweist. Eine Besonderheit des Er:YAG Lasers gegenüber anderen Lasertypen besteht in dem Effekt der so genannten thermo-mechanischen Ablation. Während die abtragende oder schneidende Wirkung der übrigen Lasersysteme auf dem Effekt des Verdampfens von biologischem Gewebe beruht, also einen rein thermischen Vorgang beschreibt, besteht die Wirkung des Er:YAG Lasers aus einer Kombination von thermischen und mechanischen Effekten. Durch die Absorption der Laserstrahlung wird das Wasser explosionsartig vom flüssigen in den gasförmigen Aggregatzustand überführt. Der entstehende hohe Druck,

resultierend aus einer Volumenexpansion ist in der Lage Substanz, wie Konkremente abzusprengen (Keller und Hibst 1989).

2.10. Biokompatibilität

In Gegenwart von Sauerstoff bildet sich auf der Oberfläche von Titan eine Passivschicht aus TiO_2 , TiO_3 und TiO aus, welche Titan sehr inert und damit biokompatibel macht. Diese Oxidschicht wirkt als Schutzschicht zwischen Metall und umliegenden Gewebe. Wie bereits erwähnt wird neben der rein mechanischen Belagentfernung, auch eine Dekontamination der Implantatoberfläche gefordert, welche Bakterien und speziell deren Endotoxine (u.a. Lipopolysaccharide) und Exotoxine (u.a. Leukotoxin) entfernen soll. Experimentelle Untersuchungen weisen daraufhin, dass bereits die bakterielle Besiedlung diese für Titan spezifischen Oberflächeneigenschaften negativ verändern könnten. Baier et al. sowie Sennerby et al. vermuten dafür ursächlich eine Reduktion der Oberflächenenergie, welche das Potenzial zur Gewebeintegration nachhaltig einschränken würde (Baier et al. 1988; Sennerby et al. 1993).

2.11. Ziele der Arbeit

Die Ziele der nachfolgenden Untersuchung lassen sich demnach wie folgt definieren:

1. Die Etablierung eines intraoralen Schienensystems zur Gewinnung supragingivaler Plaque-Biofilme.
2. Die Untersuchung von Entstehung und Wachstum von Biofilmen in Abhängigkeit von der Oberflächenmodifikation unter besonderer Berücksichtigung der Faktoren Oberflächenrauigkeit und Hydrophilie/Hydrophobie.
3. Die Untersuchung der Beeinflussung der Biokompatibilität durch unterschiedliche Titanoberflächenmodifikationen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Intraorales Schienensystem

Für die vorliegende Untersuchung wurde eine speziell angefertigte Trägerschiene für den Oberkiefer entwickelt. Sie dient als Trägersystem der zu untersuchenden Materialproben, auf denen unter möglichst neutralen Verhältnissen ein Biofilm in einer bestimmten Tragezeit angezüchtet werden soll. Als Halteelemente an den natürlichen Zähnen dienten vier einfache Drahtelemente (C-Klammer und Haltedorne), zwei von ihnen in der seitlichen Frontzahnregion, zwei weitere jeweils in der Region des ersten, oberen Molaren. Verbunden wurden die Halteelemente durch den Autopolymerisatkunststoff, der die Basis der Trägerschiene bildet. Die Grundform ähnelt hierbei erkennbar einer kieferorthopädischen Platte. Die Testmaterialien wurden in diese Schiene als plättchenförmige Materialproben integriert. Hierzu wurden im Kunststoffteil der Schiene, der Gaumenseite zugewandt entsprechende Aussparungen angelegt. Die zu untersuchenden Titanplättchen wurden mit Wachs in den Vertiefungen befestigt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich kein Wachs auf der freien, später dem Gaumen exponierten Fläche befand, um die erwünschte Biofilmanlagerung nicht zu beeinträchtigen. Die Tiefe der Aussparungen im Kunststoff wurde so gewählt, dass sich die Proben nach ihrer Befestigung mit Wachs, im Abstand von ungefähr 1mm zur Gaumenschleimhaut befanden.



Abb. 5

Intraorales Schienensystem zur Anzüchtung eines Biofilms.

Die zur Gaumenseite gerichteten Titanplättchen sind mit Wachs in entsprechenden Vertiefungen befestigt.

Materialproben hier mit quadratischer Grundform (vergleiche auch Abb. 6)

Die gewählte Distanz zur Schleimhaut sollte ein ungestörtes, plaquebildendes Milieu ermöglichen. Die Ausrichtung zum Gaumen wurde gewählt, um die Proben vor den reinigenden, mechanischen Einfluss der Zunge zu schützen. Des Weiteren wurde bewusst auf die Platzierung der Proben an bekannten, stärker plaquebildenden Lokalisationen, wie zum Beispiel der bukkalen Molarenregion im Oberkiefer und den Lingualflächen der Unterkieferfront verzichtet, um diesen Faktor aus der Beobachtung auszuschließen. Die Positionierung im Oberkiefer bietet zudem den Vorteil, dass die Schiene durch den physiologischen Zungendruck in situ gehalten wird, so dass nicht allein durch die Befestigung mit Wachs ein sicherer Halt der Proben gewahrt werden kann. Ein versehentliches Verschlucken der Proben ist somit weitestgehend ausgeschlossen. Da die Titanprüfkörper teilweise eine quadratische, teils eine runde Grundform, abhängig vom Hersteller aufwiesen, mussten die Aussparungen der Trägerschienen individuell an die jeweilige Geometrie der Materialproben angepasst werden (Abb. 5 und 6).



Abb. 6
Intraorales Schienensystem (vergleiche auch
Abbildung 5) für Materialproben mit
runder Grundform

Die pro Trägerschiene anzubringende Probenzahl wurde zum einen durch die Geometrie der Prüfkörper, zum anderen auch durch die anatomische Ausformung des Gaumens mitbestimmt. Da die Gesamtoberfläche eines experimentelles Trägersystem gegenüber der Gesamtfläche des Testmaterials möglichst klein sein sollte um eine Beeinflussung der

Plaquebildung durch das Trägersystem selbst so gering wie möglich zu halten, wurde der Kunststoffteil der Schiene weitestgehend reduziert und zugleich der Platz für die Materialproben größtmöglich ausgenutzt. Für das Tragen der Schienen wurden zwei Zeitintervalle mit 12 und mit 24 Stunden gewählt. Während des Tragevorganges durften die Teilnehmer der Untersuchung ihre normale Ernährung beibehalten, wurden jedoch dazu angehalten, die Schienen während der gesamten Zeit ununterbrochen zu tragen, außer für die Zeit ihrer täglichen Zahnreinigung. Diese sollte in der experimentellen Phase nur mit Leitungswasser, jedoch ohne den Gebrauch von Zahnpasta oder Mundspüllösungen und Ähnlichem durchgeführt werden, da die zum Teil anhaltende, bakterizide Wirkung von Chlorhexidinpräparaten und Aminofluoridverbindungen den Verlauf des Biofilmwachstums beeinflussen würde. Nach abgelaufener Tragezeit von 12 bzw. 24 Stunden wurden die Materialproben vorsichtig von den Schienen entfernt, ohne dabei die ehemals zum Gaumen exponierte Testoberfläche zu berühren. Dieser Versuchsablauf wurde mit jeweils neu angebrachten, ungetragenen Titanplättchen in zeitlicher Abfolge solange wiederholt, bis ein Kollektiv von 84 geeigneten getragenen Testproben entstand. Da nur Proben, die einen gleichmäßig, homogen entwickelten Biofilm aufwiesen in die weitere Untersuchung mit einbezogen werden sollten, wurden aus den einzelnen Tragedurchläufen unterschiedlich viele, die genannten Kriterien erfüllende Proben gesammelt. Die Beurteilung einer homogenen Besiedlung mit Plaque erfolgte bei Auflicht unter dem Lichtmikroskop (Olympus BX50, Olympus, Hamburg, Germany, 40-fache Vergrößerung). Hierfür wurden alle Materialproben unmittelbar nach Entnahme aus den Trägerschienen mit Erythrosin angefärbt. Die Plättchen wurden dazu jeweils einzeln für 20 Sekunden in die Färbelösung getaucht. Die in die weitere Untersuchung einbezogenen Proben wiesen somit alle innerhalb einer Testgruppe eine annähernd ähnlich starke und homogene Biofilmbesiedlung auf. Hierzu wurden die Proben des zwölfstündigen und des vierundzwanzigstündigen Durchlaufs getrennt voneinander beurteilt.

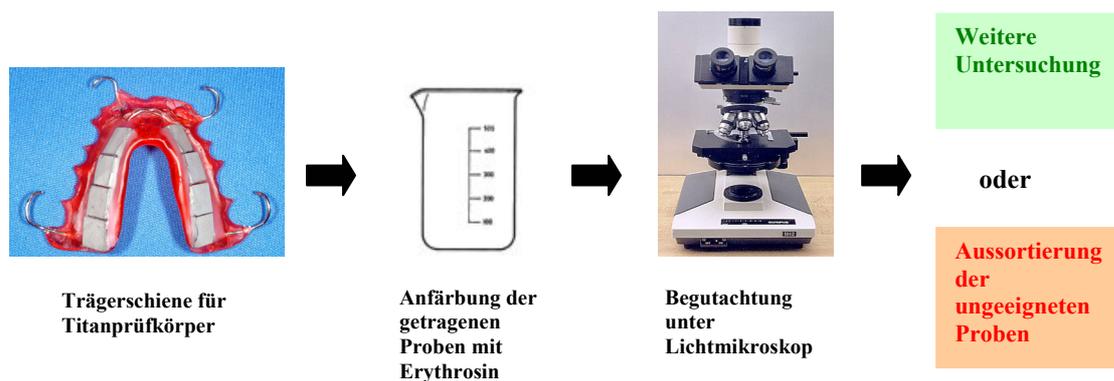


Abb. 7 Schematische Darstellung des Versuchablaufs

3.2. Titanprüfkörper

In die Untersuchung wurden sieben unterschiedliche Titanoberflächenmodifikationen miteinbezogen. Sechs der Testoberflächen waren Fabrikate von Straumann[®] mit runder Grundform (alle 1 cm Ø und 1mm dick), zu ihnen zählen eine polierte Oberfläche (Testgruppe 1; P), eine gebeizte Oberfläche (Testgruppe 2) , zwei nur säuregeätzte Oberflächen (Testgruppe 3: hydrophil; Testgruppe 4: hydrophob) und zwei säuregeätzte/sandgestrahlte Oberflächen (Testgruppe 5: SLA[®]; Testgruppe 6: modSLA=SLActive[®]) Die siebte Oberflächenmodifikation war die Promote[®] Oberfläche von Altatec mit quadratischer Form der Prüfkörper (Promote[®], Altatec, Wimsheim, Germany, sandgestrahlt und säuregeätzt, 0,7cm², 2mm dick). Die Titanoberflächen unterschieden sich entweder in der Art des Herstellungsverfahrens der jeweiligen Oberflächenstruktur (Sandstrahlung; Säureätzung; Beizung; Politur) und/ oder in ihren hydrophoben/hydrophilen Eigenschaften sowie in ihrer Oberflächenrauigkeit bezogen auf den R_a-Wert. Die sieben zu untersuchenden Oberflächenmodifikationen wurden auf sechs Testgruppen (2-7) und eine Kontrollgruppe (1) (polierte, hydrophobe Oberfläche) aufgeteilt.

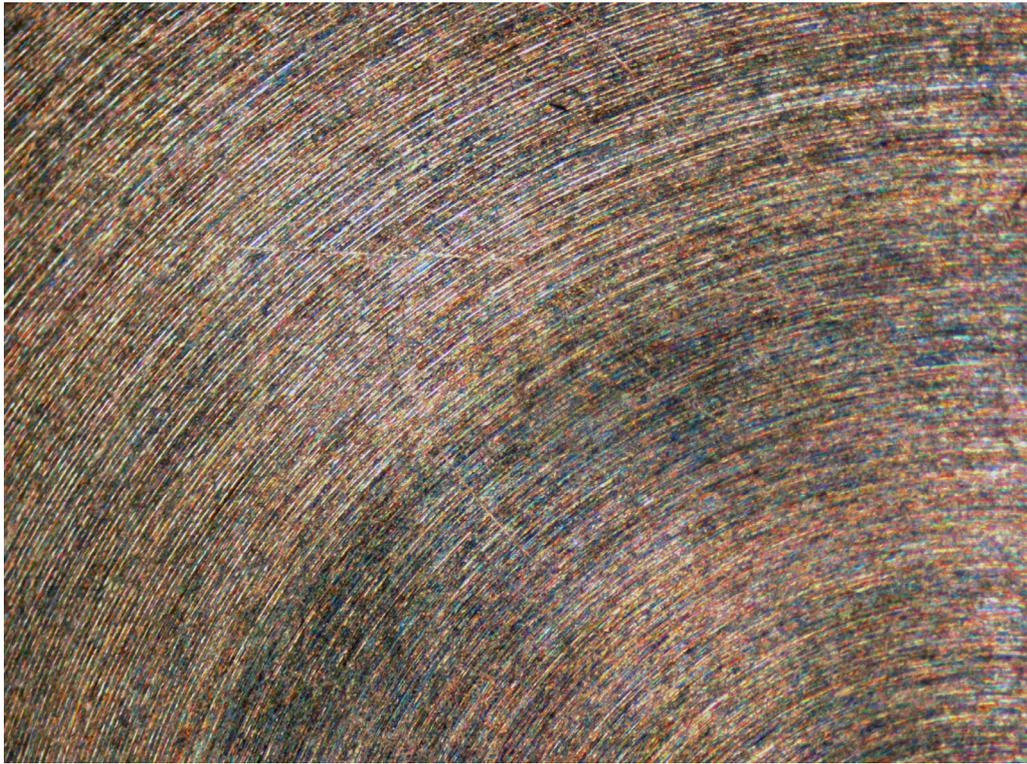


Abb. 8a Polierte Oberfläche der Kontrollgruppe (P)

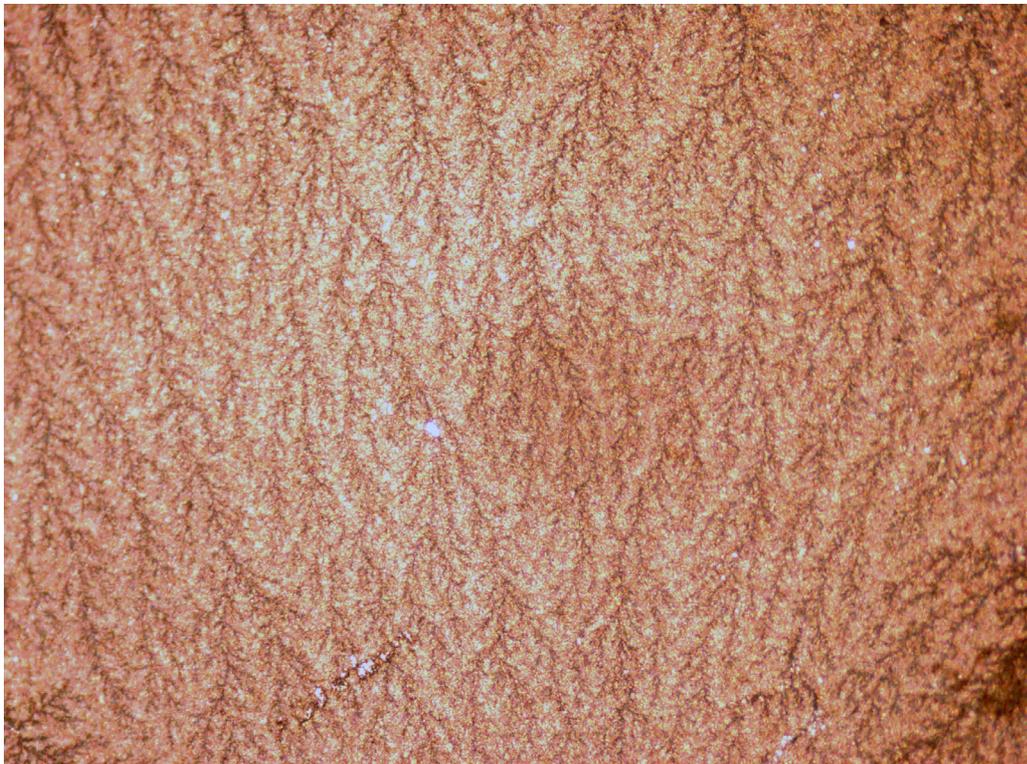


Abb. 8b modSLA: SLActive[®]-Oberfläche (hydrophil)

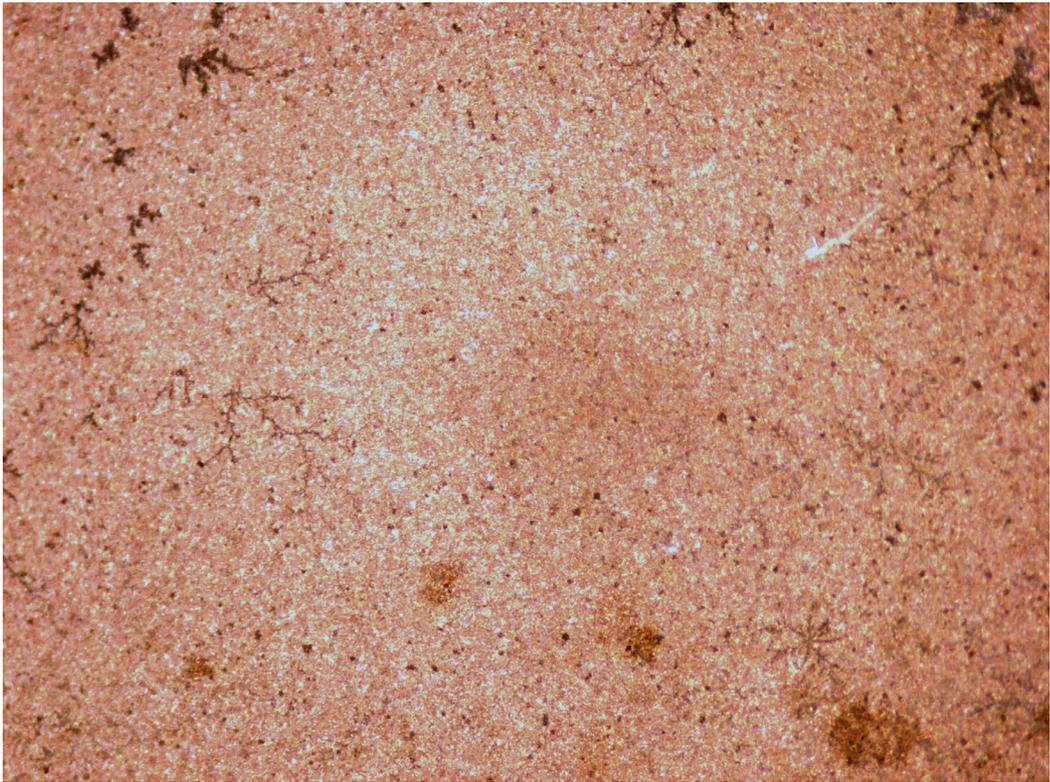


Abb. 8c modA-Oberfläche (nur säuregeätzt, hydrophil)

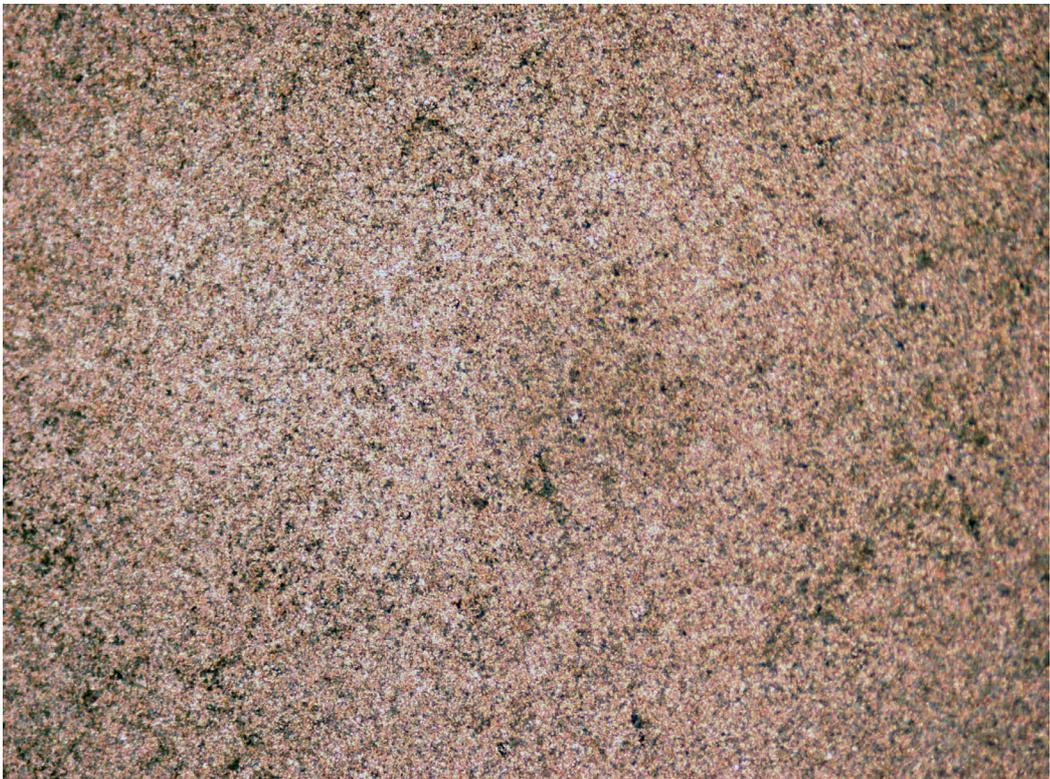


Abb. 8d gebeizte Oberfläche (hydrophob)

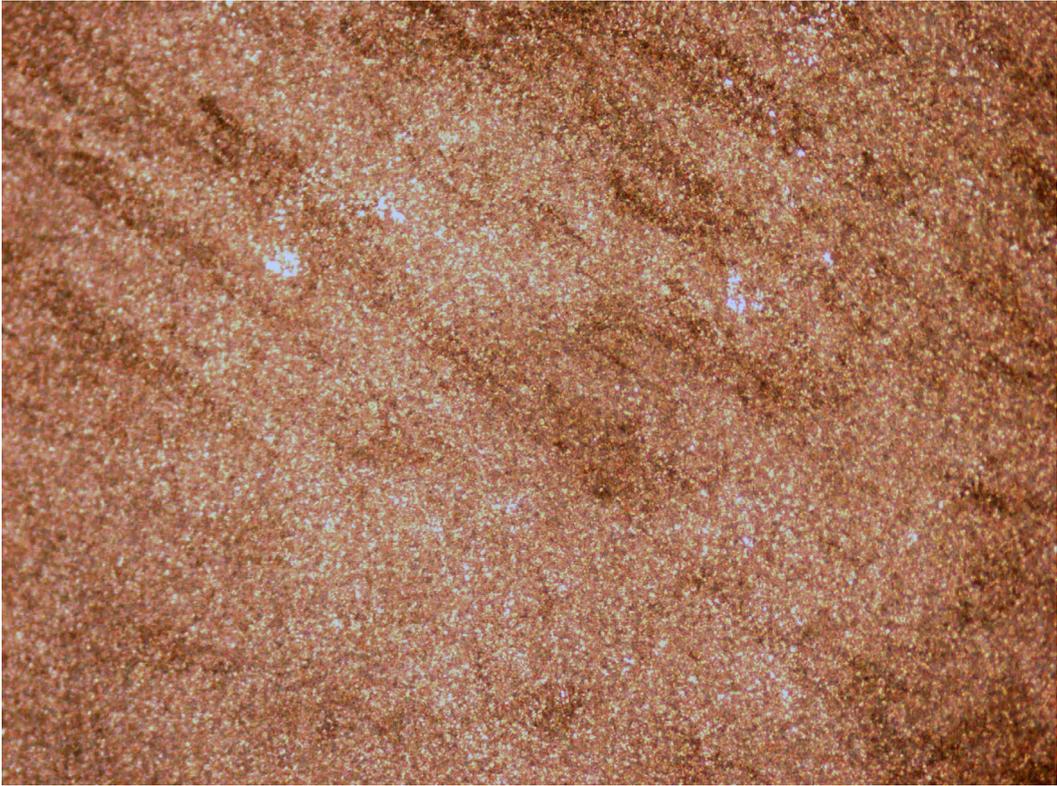


Abb. 8e A-Oberfläche (nur säuregeätzt, hydrophob)

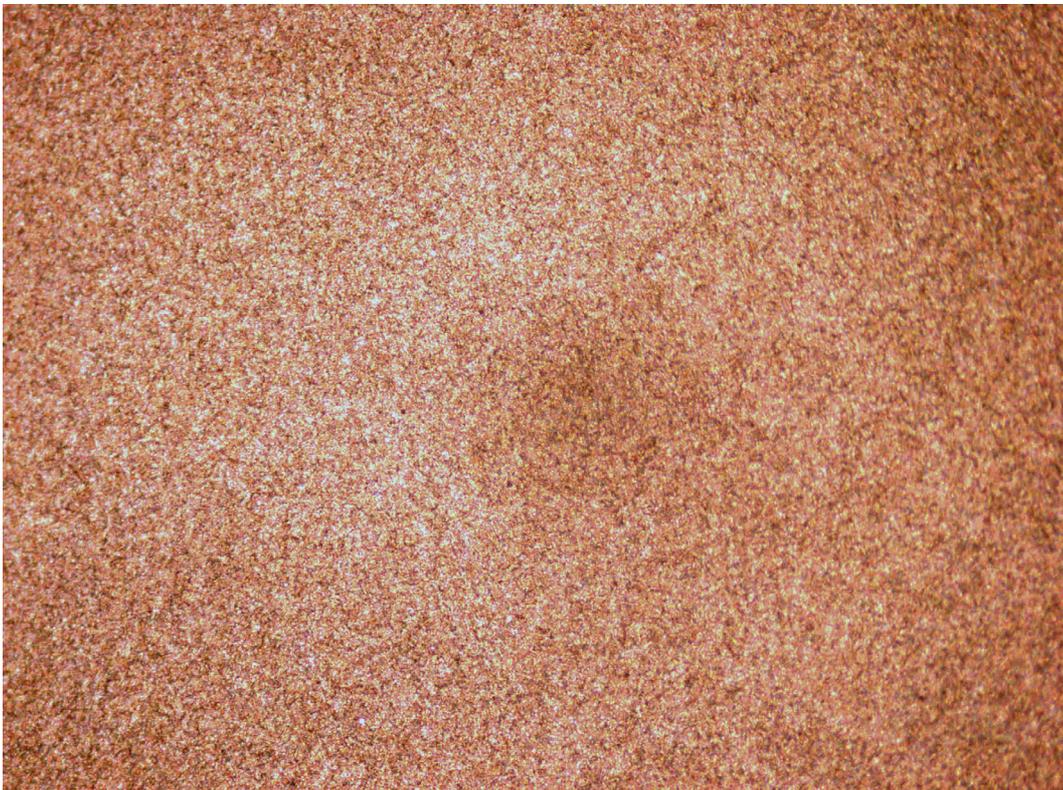


Abb. 8f SLA[®]-Oberfläche (hydrophob)



Abb. 8g Promote[®]-Oberfläche (hydrophob)

Abb. 8 a-g)

Lichtmikroskopische Aufnahmen der Titanoberflächenmodifikationen
bei 40-facher Vergrößerung

a) Kontrollgruppe P

c) modA

e) A

g) Promote[®]

b) modSLA (SLActive[®])

d) gebeizt

f) SLA[®]

Ra-Werte der Proben:

Kontrollgruppe 1 (P) 0,03 µm

Testgruppe 2 (gebeizt) 0,1 µm

Testgruppe 3 (modA) 0,56 µm

Testgruppe 4 (A) 0,56 µm

Testgruppe 5 (SLA[®]) 1,24 µm

Testgruppe 6 (modSLA) 1,24 µm

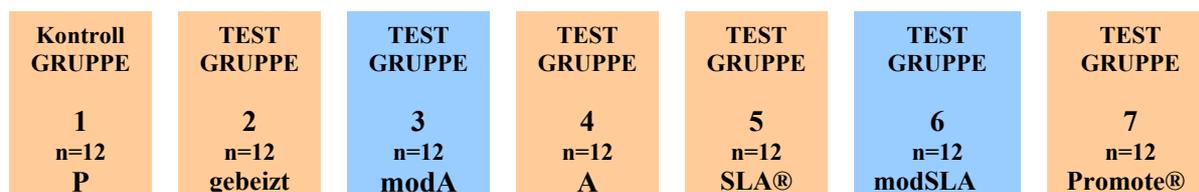
Testgruppe 7 (Promote[®]) 1,24 µm



Abb. 9 Zunahme des Ra-Wertes innerhalb der untersuchten Oberflächenmodifikationen

	Oberflächenbearbeitung (Herstellungsverfahren)	Oberflächeneigenschaft (Hydrophobie/Hydrophilie)	Name/Abkürzung
Kontrollgruppe 1	poliert	hydrophob	P
Testgruppe 2	gebeizt	hydrophob	gebeizt
Testgruppe 3	nur säuregeätzt	hydrophil	modA
Testgruppe 4	nur säuregeätzt	hydrophob	A
Testgruppe 5	Sandgestrahlt und säuregeätzt	hydrophob	SLA®
Testgruppe 6	Sandgestrahlt und säuregeätzt	hydrophil	modSLA
Testgruppe 7	Sandgestrahlt und säuregeätzt	hydrophob	Promote®

Abb. 10 Schematische Darstellung der gebildeten Testgruppen 2-7 und der Kontrollgruppe



Hydrophobe Oberfläche

Hydrophile Oberfläche

Abb. 11 Schematische Darstellung der gebildeten Testgruppen

3.3. Probanden

Vier gesunde freiwillige Probanden (2 Frauen, 2 Männer, Alter $31,5 \pm 1,8$ Jahre) wurden in die Studie einbezogen. Jeder Proband erhielt eine detaillierte Beschreibung des Studienablaufes und wurde gebeten eine Einverständniserklärung zu unterschreiben. Die Untersuchung wurde von der ansässigen Ethikkommission genehmigt. Die Einschlusskriterien für die Probanden waren:

1. Keine systemische Antibiotikagabe innerhalb der letzten 6 Monate
2. gute Mundhygiene ($PI < 1$) (Löe 1967)
3. keine Anzeichen der parodontalen Destruktion oder Entzündungszeichen der umliegenden Weichgewebe
4. Nichtraucher

Vor der Untersuchung wurde bei allen Probanden eine professionelle Zahnreinigung durchgeführt. Unter Berücksichtigung der genannten Bedingungen wurde die Tragezeit von 12 Stunden, bzw. 24 Stunden für die zweite Reihe eingehalten. Das beschriebene Prozedere wurde solange durchlaufen, bis pro zu untersuchender Oberflächenmodifikation (Testgruppe 1-7) 12 Platten gesammelt waren, die einen ähnlich homogenen Biofilm aufwiesen. Insgesamt wurde der Vorgang solange wiederholt durchgeführt bis ein Kollektiv von 84 Proben, die die genannten Bedingungen erfüllten, entstand (Abb. 11).

3.4. Morphometrische Bestimmung der Plaque-Biofilm-Areale (PBA)

Unmittelbar nach der Beurteilung unter dem Lichtmikroskop wurden von jeder Probe der Test- und Kontrollgruppen ($n=84$) digitale Aufnahmen angefertigt. Hierzu wurde eine Digitalkamera (Nikon D100, Nikon GmbH, Düsseldorf, Germany) auf einem Lichtmikroskop (Olympus BX50, Olympus, Hamburg, Germany) installiert. Bei einer 40-fachen Vergrößerung unter Auflicht wurden von jeder Titanscheibe 10 Aufnahmen an jeweils

zufällig eingestellter Position gemacht. Auf diese Weise entstanden pro Oberflächenmodifikation 120 Aufnahmen (insgesamt n= 840). Die weitere Auswertung des Bildmaterials erfolgte mit Hilfe des Softwareprogrammes Image J (ImageJ[®], Scion Corp., Maryland, USA). Durch die vorangegangene Färbung mit Erythrosin waren Plaqueareale deutlich von der unbesiedelten Titanoberfläche zu unterscheiden. Mit Hilfe der so genannten Lassostruktur des Bildbearbeitungsprogrammes wurden die Plaqueareale jeweils einzeln umfahren und markiert (Abb. 10 a-c). Dieses Instrument erlaubte eine präzise, individuelle Markierung der Plaqueareale. Das markierte Areal wurde ausgeschnitten und gleichzeitig die Fläche als prozentualer Anteil der Gesamtfläche des Bildausschnittes berechnet.

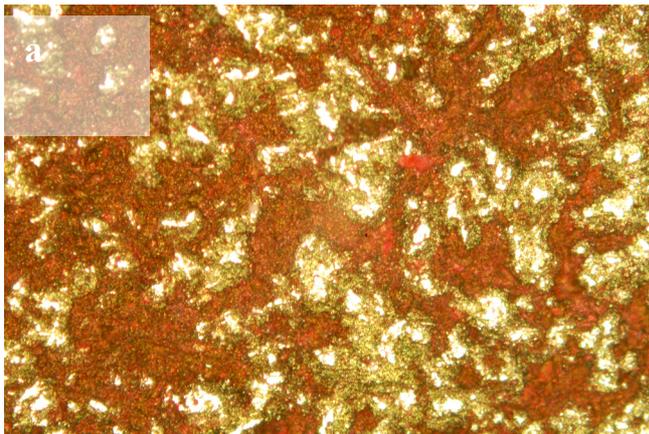


Abb. 12 a

Digitale Aufnahme eines Titanprüfkörpers bei 40-facher Vergrößerung. Plaque-Biofilm-Areale heben sich nach Erythrosin-Färbung rötlich von unbesiedelter Titanoberfläche ab

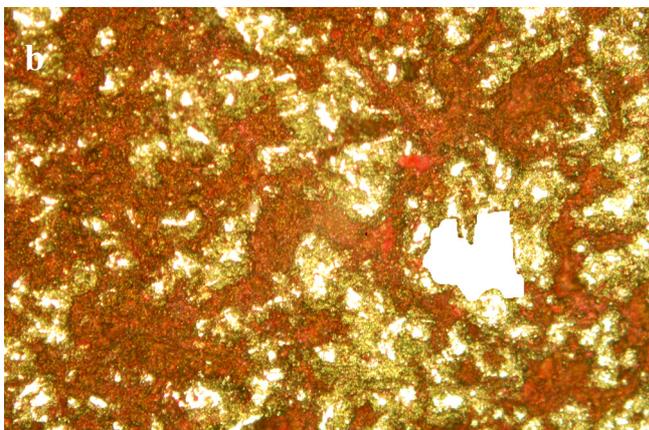


Abb. 12 b

„Ausgeschnittenes“ Areal zur Flächenberechnung

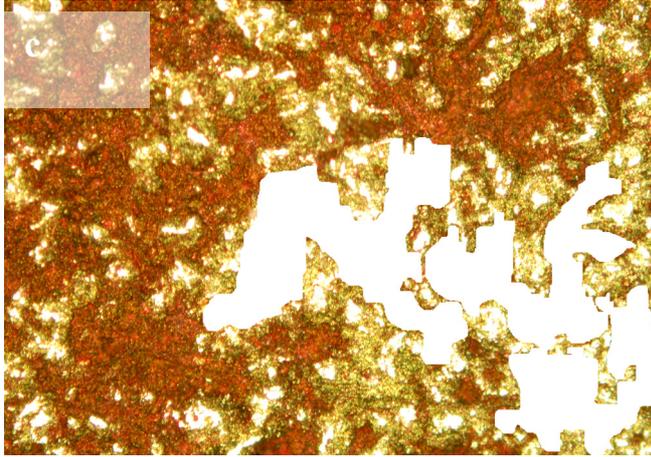


Abb. 12 c

Vorgang der Flächenmarkierung weiter fortgeschritten

Alle Messungen wurden von einer geblindeten und kalibrierten Untersucherin durchgeführt.

3.5. Statistische Auswertung der Plaque-Biofilmanlagerung

Das Datenmaterial wurde unter Zuhilfenahme des Softwareprogrammes Statistical Package of Social Science (SPSS 11.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ausgewertet. Die Titanscheiben wurden hierbei als statistische Einheiten definiert und für alle Test- und Kontrollgruppen Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) sowie Post-Hoc-Tests mit Bonferroni-Korrektur wurden verwendet um Unterschiede zwischen und innerhalb der Gruppen zu überprüfen. Das Signifikanzniveau wurde bei $\alpha=5\%$ gesetzt. In der vorliegenden Untersuchung stehen daher im nachfolgenden die Bezeichnungen $p\leq 0,05$ für signifikant, $p\leq 0,01$ für sehr signifikant und $p\leq 0,001$ für hoch signifikant.

3.6. Zellkultur

Für die Untersuchung der Biokompatibilität wurden acht ungetragene Proben jeder untersuchten Oberflächenmodifikation ($n=8$; insgesamt $n=56$) autoklaviert und in 24-Well Kulturplatten überführt (Abb.13). Die Titanscheiben wurden mit einer Lösung humaner Osteoblast-like cells (vierte Passage, 2×10^4 Zellen), gelöst in 2ml McCoy's 5A Medium unter

Zusatz von 1% Penicillin/Streptomycin und 10 % fetalem Kälberserum, für 5 Tage inkubiert. Bei der verwendeten Zelllinie (SAOS2) handelte es sich um adhärenz, epithelial-ähnlich wachsende Zellen, die Monolayer bilden. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂.



Abb. 13

24-Well Kulturplatten zur Inkubation der Materialproben mit einer Lösung humaner Osteoblast-like cells

Materialien für die Zellkultur:

- 24-Well Kulturplatten (Lap Tek Chamber Slide, Nalge Nunc, Naperville, IL, USA)
- Osteoblast-like cells (SaOs-2, ATCC, No. HTB 85, Manassas, USA)
- McCoy's 5A Medium (MCM, Gibco No. 21017-025, Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Germany)
- Penicillin/Streptomycin (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Germany)
- Fetales Kälberserum (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Germany)

3.7. Bestimmung der mitochondrialen Zellaktivität

Die mitochondriale Zellaktivität der SAOS2-Zellen wurde am fünften Tag unter Zuhilfenahme des CellTiter-Glo[®] luminescent cell viability assay (Promega, Madison, WI, USA) bestimmt. Dieser Test quantifiziert den Adenosintri-phosphatgehalt (ATP) mittels Lumineszenzmessung (counts per second). ATP spielt eine zentrale Rolle beim

Energieaustausch in biologischen Systemen. Zellschädigungen oder Sauerstoff- sowie Substratmangel führen zu einem rapiden Abfall der zytoplasmatischen ATP-Konzentration. Der Nachweis von ATP signalisiert die Anwesenheit metabolisch aktiver Zellen basierend auf der Luciferase-katalysierten Reaktion von Luciferin und ATP (Abb. 15). Bei der Reaktion wird Luciferin in Gegenwart von ATP, Mg^{2+} und molekularem Sauerstoff durch Aktivität der Luciferase in der CellTiter-Glo[®]-Lösung oxygeniert. Neben Oxyluciferin, AMP, Phosphat und CO^2 als entstehende Produkte, wird bei der Reaktion Energie in Form von Licht freigesetzt. Da die Reaktion abhängig von der Anwesenheit von ATP abläuft, wurden für den Test Bedingungen geschaffen, die das Lumineszenzsignal proportional zur vorhandenen Menge ATP, und somit zur Anzahl lebensfähiger Zellen machen. Gleichzeitig inhibiert die spezielle Luciferase des CellTiter-Glo[®] Assays die endogenen ATP-asen, so dass die Luciferase-Reaktion unbeeinflusst ablaufen kann.

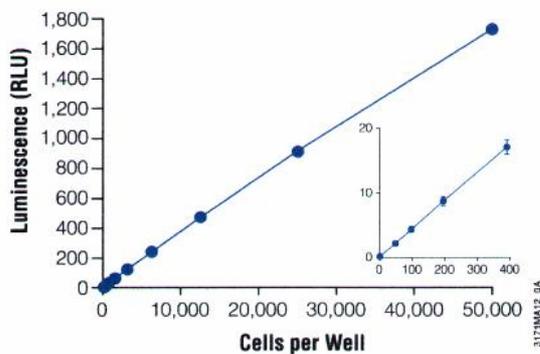


Abb. 14a Korrelation der Zellzahl mit dem Lumineszenzsignal

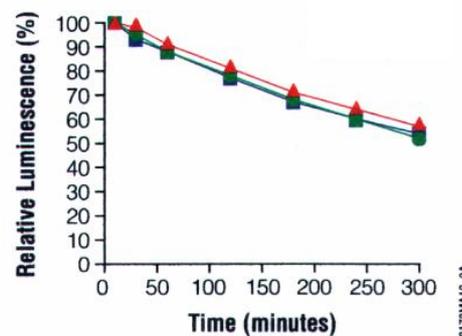


Abb. 14b Extendierte Halbwertszeit des Lumineszenzsignals für verschiedene Zelllinien

Der CellTiter-Glo[®] Assay beruht auf den speziellen Eigenschaften der thermostabilen Luciferase (Ultra-Glo[™] Recombinant Luciferase), welche in der Lage ist ein stabiles Lumineszenzsignal zu generieren und das über eine große Spannweite von

Versuchsbedingungen. Die Halbwertszeit des Lumineszenzsignals, welches aus der unten aufgezeichneten Reaktion resultiert, beträgt mehr als fünf Stunden.

Der Test ermöglicht die direkte Zugabe der homogenen Reagenzlösung (CellTiter-Glo[®] Reagent) zur Zellkultur. Zellwaschungen, Medienwechsel oder multiple Pipettierschritte entfallen. 100 µl der CellTiter-Glo[®] Reagenzlösung wurden auf die 24-Well Kulturplatten verteilt und für 10 Minuten, entsprechend den Herstellerangaben bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lumineszenzsignal wurde in einer Zählkammer (Top Count, Canberra-Packard GmbH, Dreieich, Germany) jeweils für eine Sekunde pro Well registriert.

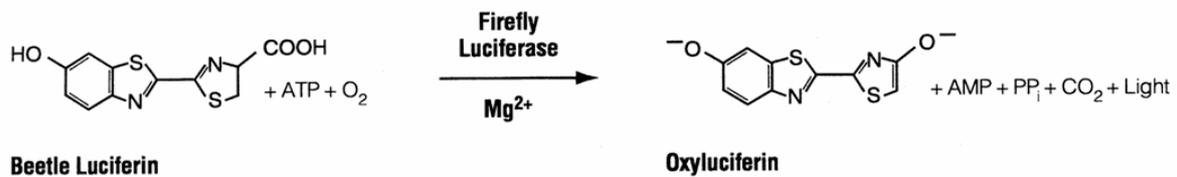


Abb. 15 Luciferase katalysierte Reaktion von Luciferin und ATP im CellTiter-Glo[®] luminescent cell viability assay (Promega, Madison, WI, USA)

3.8. Statistische Auswertung der ATP-Messung

Der ungepaarte T-test (unpaired t-test) wurde verwendet um Unterschiede zwischen den Gruppen zum Zeitpunkt der ATP-Messung zu überprüfen. Dieser Test wird angewendet zum Vergleich unabhängiger Proben bzw. Gruppen miteinander bezüglich einer Eigenschaft, hier der mitochondrialen Zellaktivität. Das Signifikanzniveau wurde bei $\alpha = 5\%$ gesetzt. In der vorliegenden Untersuchung stehen daher im nachfolgenden die Bezeichnungen $p \leq 0,05$ für signifikant, $p \leq 0,01$ für sehr signifikant und $p \leq 0,001$ für hoch signifikant.

4. ERGEBNISSE

4.1. Morphometrische Bestimmung der Plaque-Biofilm Areale

Der mittlere, prozentuale Anteil der Plaque-Biofilm-Areale (PB Areale = PBA) wurde für jede untersuchte Test- und die Kontrollgruppe nach 12 und nach 24 Stunden bestimmt. Für die Kontrollgruppe (polierte, hydrophobe Oberfläche) betrug der mittlere prozentuale Anteil der PB Areale nach 12 Stunden 29,6% und nach 24 Stunden 61%, was einer Steigerung der mittleren Plaqueanlagerung um 31,4% entspricht. In der Testgruppe mit gebeizter, hydrophober Oberfläche ergab sich nach 12 Stunden ein mittlerer, prozentualer Anteil von 14,6 % PBA, nach 24 Stunden von 53,8 %. Für die SLA[®]-Oberfläche (hydrophob) betrug nach zwölfstündiger Tragezeit der mittlere Anteil der PB Areale 56,6%, nach der doppelten Tragezeit 88%. Ähnliche Werte zeigte die Promote[®]-Oberfläche mit 62% mittlerer, prozentualer Anteil PBAreale nach 12 und 89% PB Areale nach 24 Stunden. Die hydrophile modSLA-Oberfläche erreichte nach 12 Stunden einen Wert von 48,8% mittlerer PB Areale, nach 24-stündiger Tragezeit betrug dieser 59,8%. Die ebenfalls hydrophile, jedoch nur säuregeätzte Oberfläche der Testgruppe modA erreichte mit 10,4% nach 12 Stunden und 24,8% nach 24 Stunden jeweils den niedrigsten Anteil mittlerer PB Areale, bei einem mittlerem Ra-Wert von 0,56 µm. Die zweitniedrigste mittlere Plaquebiofilmanlagerung nach beiden Untersuchungszeitpunkten zeigte die ebenfalls nur säuregeätzte, hydrophobe Oberfläche A. Hier betrug nach 12 Stunden der mittlere Anteil PBA 11,6 %, so wie nach 24 Stunden 41,6 %.

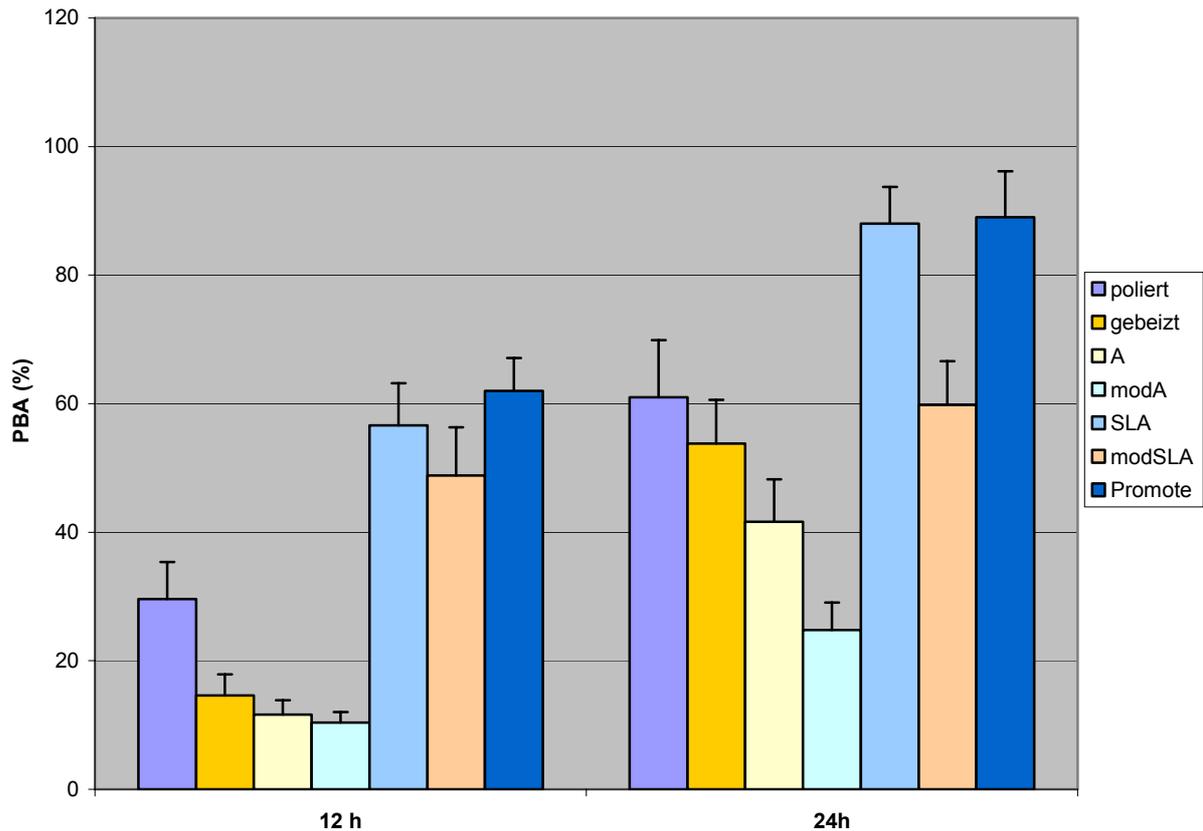


Abb. 16 Mittlere prozentuale Anteile der Plaque-Biofilmareale (PBA%) in den unterschiedlichen Testgruppen und der Kontrollgruppe nach 12 und nach 24 Stunden

Die höchste Plaqueanlagerung nach jeweils beiden Zeitintervallen zeigte die Promote[®]-Oberfläche (62 % mittlere PBA nach 12 h ; 89 % nach 24h), dicht gefolgt von der SLA[®]-Oberfläche (56,6 % mittlere PBA nach 12h; 88 % nach 24h). Beide Oberflächenmodifikationen haben innerhalb der untersuchten Testoberflächen mit 1,24µm den höchsten Ra-Wert. Eine Steigerung der mittleren, prozentualen PB Areale betrachtet für die Einzelwerte konnte demnach in folgender Reihenfolge der untersuchten Oberflächenmodifikationen beobachtet werden (Ra-Werte in jeweils Klammern):
 modA (0,56µm) < A (0,56µm) < gebeizt (0,1µm) < P (0,03µm) < modSLA (1,24µm) < SLA[®] (1,24µm) < Promote[®] (1,24µm).

	Mittlere PB Areale nach 12 Stunden	Mittlere PB Areale nach 24 Stunden
Testgruppe 3 modA	10,4 %	24,8 %
Testgruppe 4 A	11,6 %	41,6 %
Testgruppe 2 gebeizt	14,6%	53,8 %
Kontrollgruppe 1 P	29,6 %	61 %
Testgruppe 6 modSLA	48,8 %	59,8 %
Testgruppe 5 SLA®	56,6%	88%
Testgruppe7 Promote®	62%	89%



Abb. 17 mittlerer prozentualer Anteil der PB Areale innerhalb aller Testgruppen und der Kontrollgruppe nach 12 und nach 24 Stunden

Vergleicht man den mittleren Zuwachs der PB Areale zwischen den Gruppen ergibt sich eine andere Reihenfolge. Die niedrigste Steigerung der PB Areale betrug 11% in der modSLA Testgruppe, bei dritthöchstem PB Anteil nach 12 Stunden mit 48,8%. Gefolgt wurde dieses Ergebnis von der ebenfalls hydrophilen Oberflächenmodifikation der Testgruppe modA mit 14,4 % mittleren Zuwachs der PB Areale. Es folgten die Promote®-Oberfläche mit einem mittleren Zuwachs von 27% (von 62% mittlere PBA nach 12h auf 89% nach 24h), und die Testoberfläche A mit 30-prozentigem mittleren Anstieg PB Areale. Die polierte Oberfläche der Kontrollgruppe zeigte mit 31,4% den zweithöchsten mittleren Zuwachs an PB Arealen, bei niedrigstem Ra-Wert der untersuchten Proben (Ra: 0,03µm). Den größten Anstieg der mittleren Plaque-Biofilm-Anlagerung nach Verdopplung der Tragezeit zeigte jedoch die

gebeizte, hydrophobe Oberflächenmodifikation der Testgruppe 2 mit einem Anstieg von 14,6% mittlere PB Areale nach 12 Stunden auf 53,8% mittlere PB Areale nach 24 Stunden (zweitniedrigster Ra-Wert mit 0,1 µm), dies entspricht einem mittleren Zuwachs von 39,2 % der Plaque-Biofilmareale nach doppelter Tragezeit.



Abb. 18 mittlerer prozentualer Zuwachs der PB Areale innerhalb aller Testgruppen und der Kontrollgruppe nach 24 Stunden

Auf unterschiedlich hohem Niveau zeigten über die Zeit betrachtet die beiden hydrophilen Testgruppen mit der modSLA-Oberfläche und der geätzten modA-Oberfläche einen ähnlichen Zuwachs der PB Areale (modSLA: 11%; modA: 14,4%). Von beiden SLA®-Oberflächen zeigte die hydrophile modSLA-Oberfläche zu beiden Untersuchungszeitpunkten einen geringeren Anteil an PB Arealen als ihr hydrophobes Ursprungsmodell SLA®. Ebenso war der mittlere Zuwachs an PB Arealen über die Zeit betrachtet bei der SLA®-Oberfläche höher als in der modSLA-Testgruppe. Die Werte der Promote®-Testgruppe entsprachen annähernd denen der SLA®-Testgruppe, beide Oberflächenstrukturierungen werden durch Säureätzung und Sandstrahlung hergestellt. Die Kontrollgruppe (P) und die ebenfalls hydrophobe Testgruppe mit gebeizter Oberfläche, sowie die SLA®-Oberfläche zeigten den höchsten Anstieg der mittleren prozentualen PB Areale über die Zeit. Obwohl der mittlere prozentuale Anteil der PB Areale nach 12 Stunden in der Kontrollgruppe 29,6% betrug, und somit fast 20% unter des ermittelten Wertes der modSLA-Testgruppe lag, nivellierte sich der Unterschied nach 24 Stunden nahezu vollständig, da der mittlere Anstieg der PB Areale über die Zeit betrachtet in der Kontrollgruppe (P) fast dreimal so groß war wie in der modSLA-Testgruppe. Bei annähernd ähnlichem mittlerem Anteil PB Areale nach 12 Stunden in der

Testgruppe modA (geätzt, hydrophil) mit 10,4% und Testgruppe 2 (gebeizt, hydrophob) mit 14,6%, belief sich der Unterschied zwischen beiden Gruppen nach 24 Stunden Tragezeit auf 53,8% mittlere PB Areale für die gebeizte Oberflächenmodifikation und 24,8% mittlere PBA für die hydrophile modA-Oberfläche, da der mittlere Zuwachs über die Zeit auf der gebeizten Oberfläche mehr als doppelt so hoch verlief wie in Testgruppe modA (gebeizt 39,2% : modA 14,4%; s. Abb.). Eine derartige Annäherung der mittleren PB Areale nach 24 Stunden zeigte sich auch zwischen der Testgruppe mit gebeizter Oberflächenstruktur und SLA[®]- bzw. Promote[®]- Oberfläche. Betrug nach 12 Stunden der mittlere prozentuale Anteil an PB Arealen für SLA[®]/ Promote[®] noch ungefähr das 4-fache der gebeizten Testgruppe, betrug nach 24 Stunden Tragezeit dieses Verhältnis noch 53,8% (gebeizt) : 88% (SLA[®]) bzw. 89% (Promote[®]).

Alle untersuchten Oberflächenmodifikationen zeigten einen hoch signifikanten Anstieg der mittleren prozentualen Plaque-Biofilmareale zwischen 12 und 24 Stunden ($p < 0,001$). Die Oberflächen SLA[®], modSLA und Promote[®] zeigten dabei einen signifikant höheren mittleren prozentualen Anteil PB Areale ($p < 0,001$) als die restlichen untersuchten Oberflächenmodifikationen (P, gebeizt, A, modA).

4.2. Bestimmung der mitochondrialen Aktivität der SAOS2 Osteoblasten

Im Verlauf der experimentellen Phase gab es keine Anzeichen für eine bakterielle Kontamination oder einen Pilzbefall der Proben. Die mitochondriale Aktivität der Zellen wurde als Lumineszenzsignal (counts/s) mit Hilfe des CellTiter-Glo[®] luminescent assay erfasst (Abb.11). Die höchste Zellaktivität wurde für die Kontrollgruppe (P) mit 5.630950 ± 1.394213 counts/s registriert. Es folgte Testgruppe 2 mit gebeizter Oberfläche mit 4.586074 ± 1.786606 counts/s ($p < 0,001$) und die modA-Oberfläche mit 4.349953 ± 730.531 counts/s. Die modSLA-Oberfläche mit 3.004733 ± 639.738 counts/s und die A-Oberfläche mit 2.856190 ± 670.035 counts/s zeigten eine ähnliche Zellaktivität. Das zweitniedrigste

Lumineszenzsignal wurde für die SLA[®]-Oberfläche mit 1.915432 ± 423.539 counts/s gemessen. Die geringste mitochondriale Aktivität wurde in der Promote[®]-Gruppe gemessen, sie betrug hier 1.831234 ± 198.956 counts/s ($p < 0,001$).

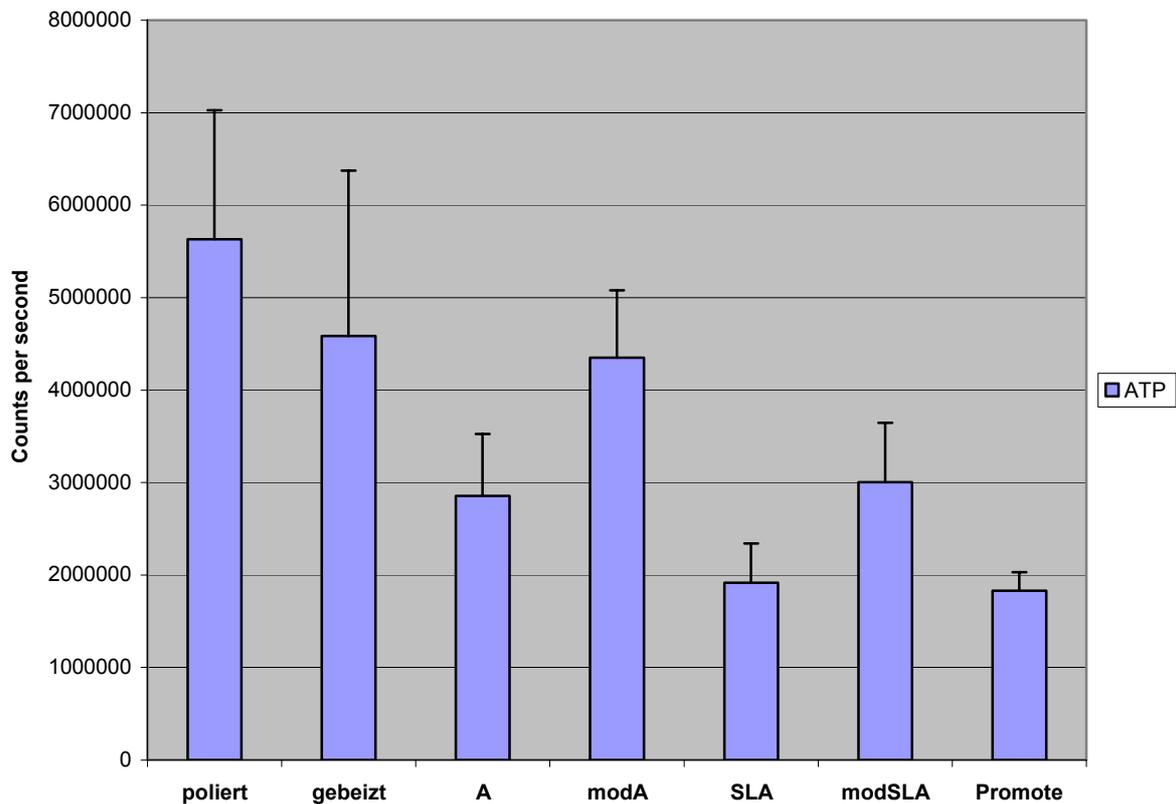


Abb. 19 Mittlere mitochondriale Aktivität von SAOS2 Osteoblasten (counts per second) in den verschiedenen Gruppen

Die polierte Oberfläche der Kontrollgruppe (P), die gebeizte Oberfläche sowie die Oberflächenmodifikation modA zeigten auf einem Signifikanzlevel von $p < 0,05$ eine signifikant höhere mitochondriale Zellaktivität als die restlichen untersuchten Oberflächenmodifikationen. Die polierte und die gebeizte Oberfläche haben mit $0,03\mu\text{m}$ (poliert) und $0,1\mu\text{m}$ (gebeizt) die geringsten Ra-Werte innerhalb der untersuchten Oberflächenmodifikationen.

Abb. 20 a+b Lichtmikroskopische Aufnahmen der polierten Kontrollgruppe (P) bei 40-facher Vergrößerung nach 12 und nach 24 Stunden

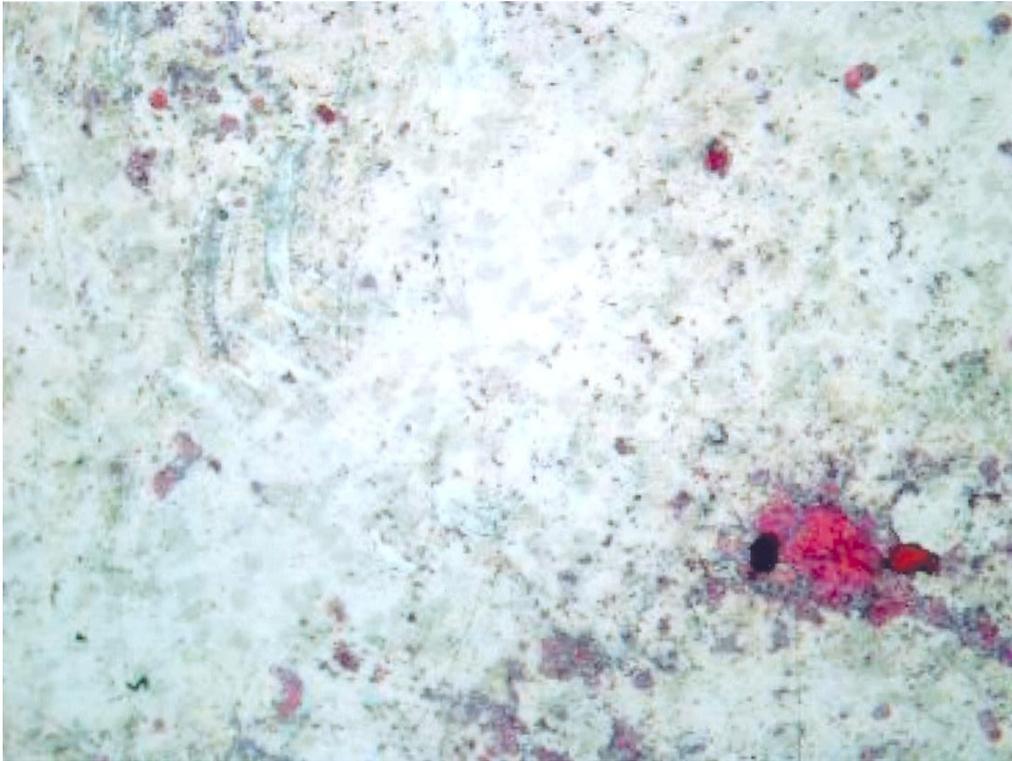


Abb. 20a

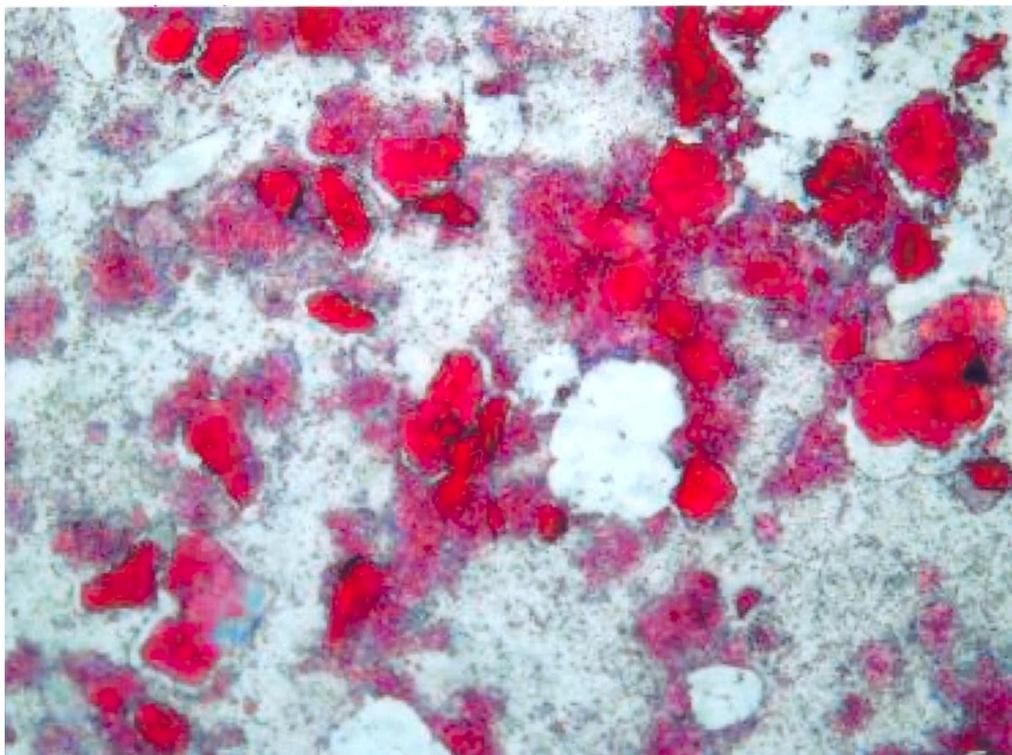


Abb.20b

Abb. 21 a+b Lichtmikroskopische Aufnahmen der gebeizten Oberfläche bei
40-facher Vergrößerung nach 12 und nach 24 Stunden



Abb. 21a

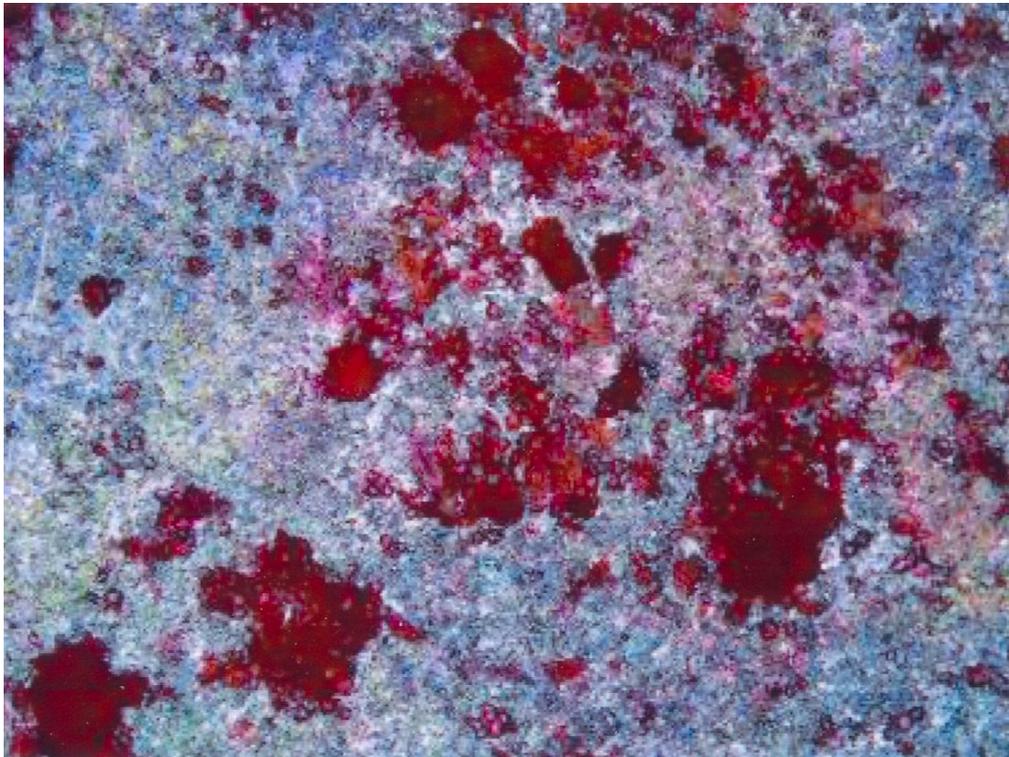


Abb. 21b

Abb. 22 a+b Lichtmikroskopische Aufnahmen der modA-Oberfläche bei 40-facher Vergrößerung nach 12 und nach 24 Stunden

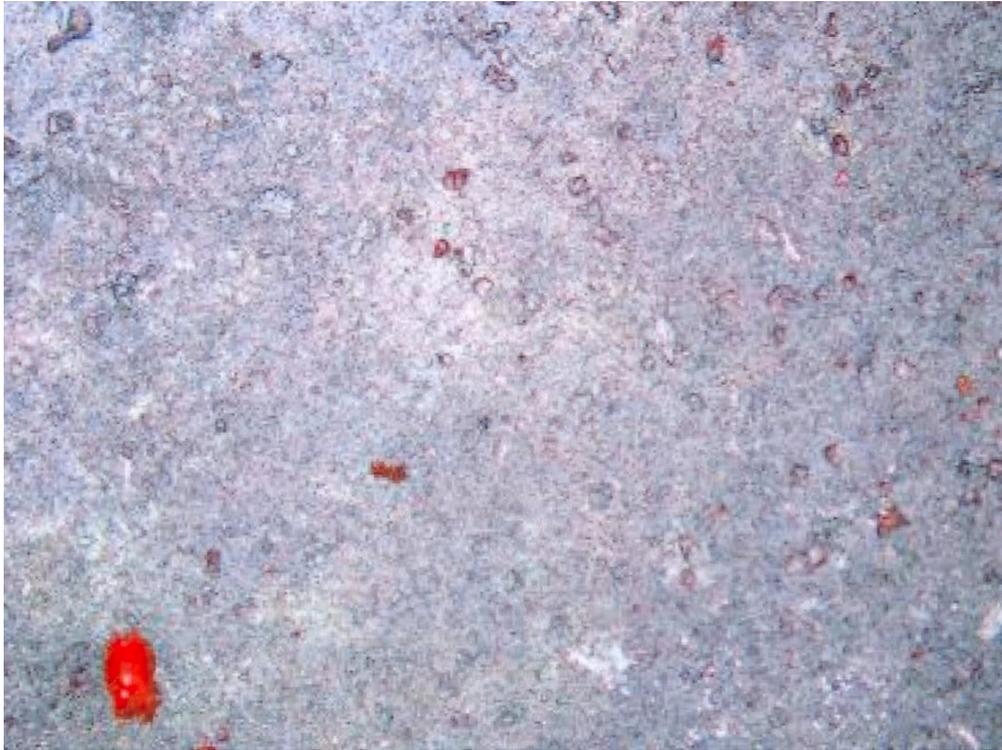


Abb. 22a

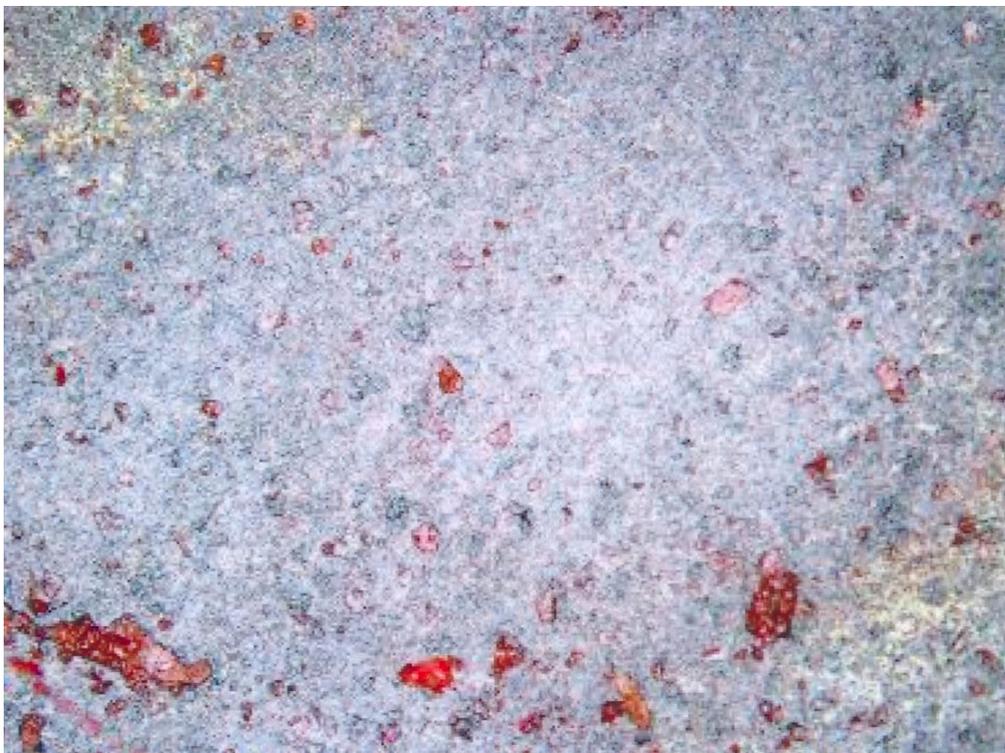


Abb. 22b

Abb. 23 a+b Lichtmikroskopische Aufnahmen der A-Oberfläche
bei 40-facher Vergrößerung nach 12 und nach 24 Stunden



Abb. 23a

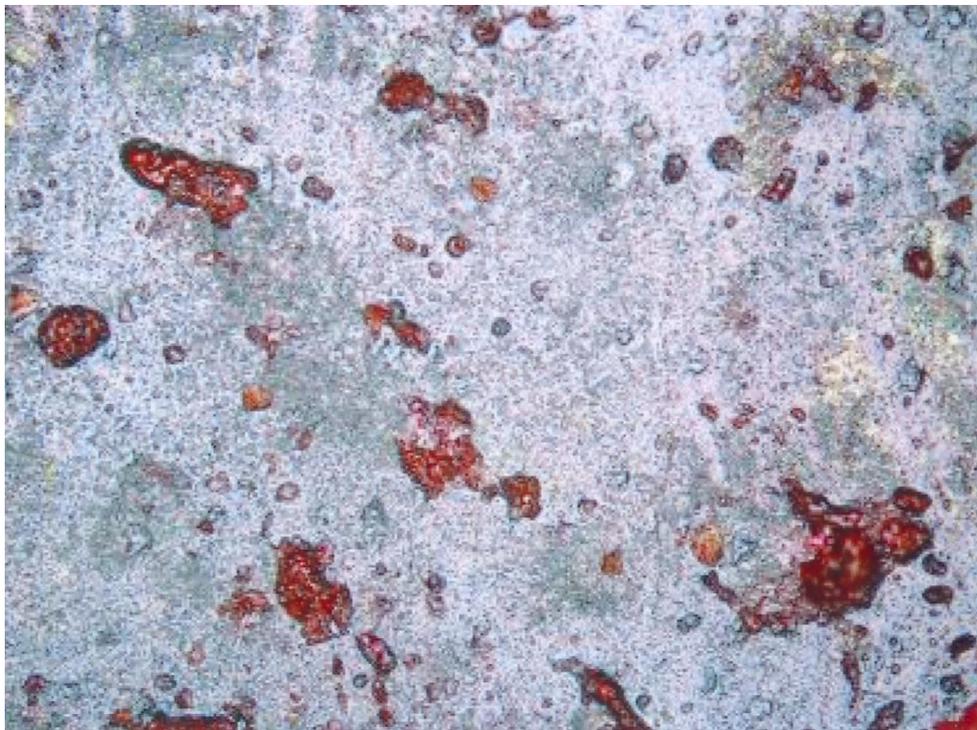


Abb. 23b

Abb. 24 a+b Lichtmikroskopische Aufnahmen der SLA[®]-Oberfläche bei 40-facher Vergrößerung nach 12 und nach 24 Stunden

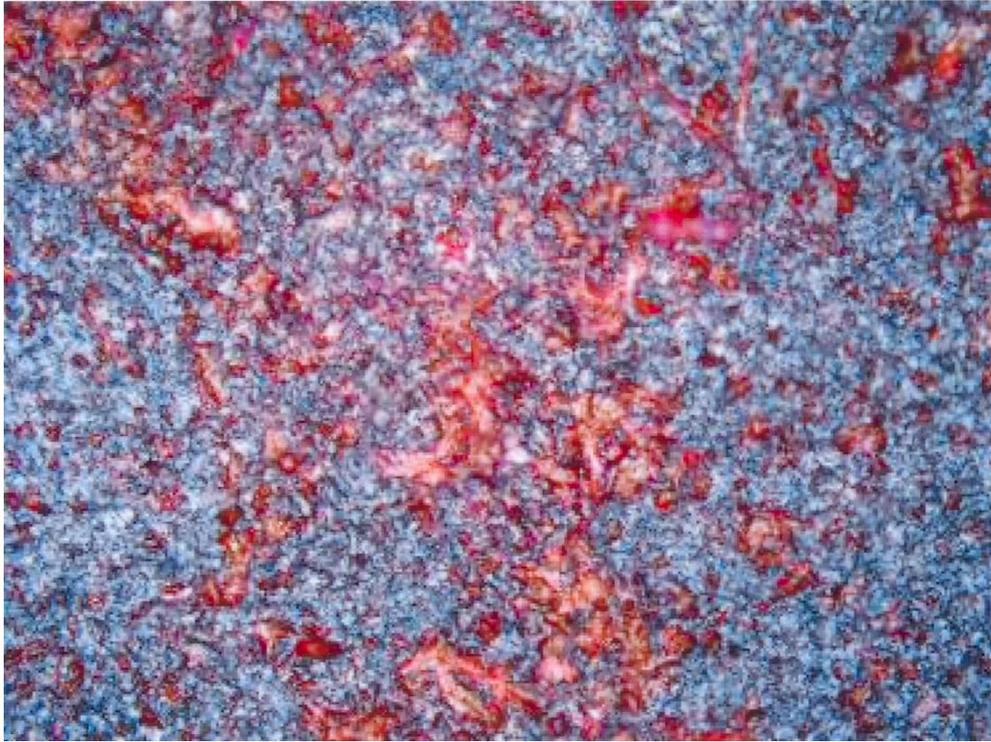


Abb. 24a



Abb. 24b

Abb. 25 a+b Lichtmikroskopische Aufnahmen der modSLA-Oberfläche bei 40-facher Vergrößerung nach 12 und nach 24 Stunden

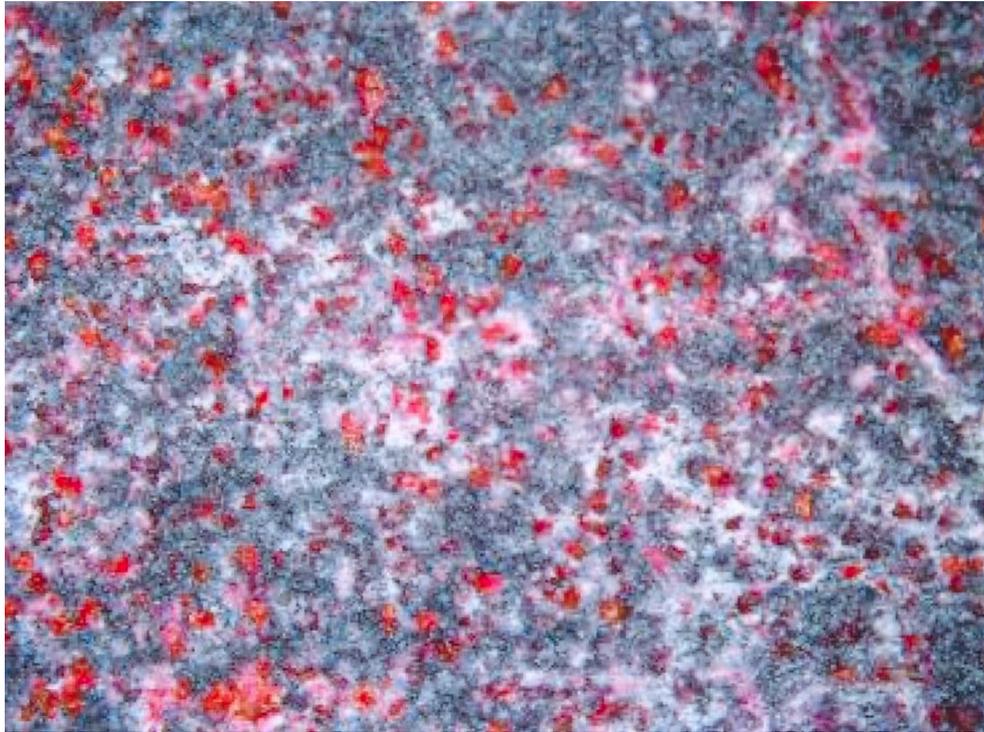


Abb. 25a



Abb. 25b

Abb. 26 a+b Lichtmikroskopische Aufnahmen der Promote[®]-Oberfläche bei 40-facher Vergrößerung nach 12 und nach 24 Stunden



Abb. 26a



Abb. 26b

5. DISKUSSION

Das intraorale Schienensystem, welches in der vorliegenden Untersuchung zur Anzüchtung eines *in vivo* Biofilms verwendet wurde ähnelt im Allgemeinen dem Vorgehen früherer Untersuchungen (Auschill et al. 2001, Hahn et al. 1992). Einzelne Modifikationen des Splintdesigns erlaubten jedoch ein besseres und ungestörtes Plaquewachstum. Die Exposition der Materialproben zum Gaumen hin schützte die Oberflächen vor dem reinigenden, mechanischen Einfluss der Zunge. Gleichzeitig ermöglichte die gewählte Distanz von ungefähr einem Millimeter zur Schleimhaut ein plaquebildendes, ungestörtes Milieu. Der Verzicht der Positionierung der Materialproben an bekannten, stärker plaquebildenden Lokalisationen, wie der Unterkieferfront und der Bukkalseite der Oberkiefermolaren, schloss diesen Faktor aus der Beobachtung weitestgehend aus. So gelang in der vorliegenden Untersuchung die Anzüchtung eines homogenen Biofilms auf allen untersuchten Titanplättchen.

Obwohl bis heute kein eindeutiges, endgültiges Konzept für die bakterielle Adhäsion an harten, desquamationsfreien Oberflächen existiert (Morra & Cassinelli 1997), und die Vielfalt an Faktoren, welche die adhäsive Tendenz der Mikroorganismen beeinflussen können, die Situation sehr komplex machen (Ho 1986), war es das Ziel der vorliegenden Untersuchung, zwei der Oberflächenfaktoren, für die in verschiedenen Studien eine entscheidende Rolle bei der bakteriellen Adhäsion von harten Oberflächen nachgewiesen wurde, zu untersuchen, und so weit wie möglich auch miteinander zu vergleichen. Bei den zwei Oberflächeneigenschaften handelt es sich um die Oberflächenrauigkeit und die freie Oberflächenenergie (surface free energy) als Maß für die zu erwartende Hydrophobie/Hydrophilie der Oberfläche.

Der Prozess der bakteriellen Adhäsion wurde bereits vereinfacht als vierphasige Sequenz beschrieben (s. Abb. 2), in deren Verlauf es nach einer initialen reversiblen Bindung zwischen dem Bakterium und der besiedelten Oberfläche zur Ausbildung einer festen irreversiblen

Bindung kommen kann, welche im folgenden die Bedingung für das Wachstum von Biofilmen darstellt. Der Einfluss der Oberflächenrauigkeit wurde unter anderem von Lie untersucht (Lie et al. 1978, 1979). Die frühe initiale Besiedlung der Schmelzoberfläche beginnt an Unregelmäßigkeiten, in deren Vertiefungen die Bakterien besonders supragingival gegen abscherende Kräfte geschützt sind, und sich die feste irreversible Bindung einfacher und häufiger ausbilden kann (Quirynen & Bollen 1995). Zudem vergrößert eine Zunahme der Oberflächenrauigkeit die zur Adhäsion verfügbare Oberfläche um den Faktor 2-3 (Quirynen & Bollen 1995). Der Anstieg der Plaquemenge während der frühen Biofilmformation ist maßgeblich durch die Proliferation bereits adhärenter Mikroorganismen bedingt, und nicht durch appositionell, neu adhärierende Bakterien (Brex et al. 1983). Diese Beobachtung könnte gegebenenfalls eine Erklärung für die Wichtigkeit der Oberflächenrauigkeit in dieser frühen Phase der Plaque-Biofilmformation sein (Quirynen & Bollen 1995). So zeigten in der vorliegenden Untersuchung die Oberflächenmodifikationen mit dem höchsten Ra-Wert von $1,24\mu\text{m}$ (SLA[®]-, Promote[®] und modSLA-Oberfläche) nach 12 Stunden die höchste mittlere Plaqueanlagerung. Die Unterschiede zu den anderen Testgruppen und selbst zur polierten Kontrollgruppe waren aber bereits nach 24 Stunden sehr viel weniger stark ausgeprägt. Dennoch deuten verschiedene Ergebnisse darauf hin, dass die Oberflächenrauigkeit erst ab einem Grenzwert von $0,2\mu\text{m}$ klinisch an Bedeutung gewinnt. Unterhalb dieses Wertes soll die bakterielle Adhäsion nicht weiter reduziert werden können. So fanden Quirynen et al. keine signifikanten Unterschiede weder in der Plaqueakkumulation noch bei der qualitativen Zusammensetzung beim Vergleich von vier Titanabutments mit Ra-Werten von $0,05\mu\text{m}$ - $0,21\mu\text{m}$ in vivo (Quirynen et al. 1996). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigte eine andere in vivo Studie eine deutliche Korrelation zwischen Oberflächenrauigkeit und akkumulierter Plaquemenge. Die verglichenen Ra-Werte ($0,1\mu\text{m}$ und $2,2\mu\text{m}$) lagen hierbei weiter auseinander, und der rauhere Wert lag zudem deutlich über dem vermuteten Grenzwert von $0,2\mu\text{m}$ (Quirynen et al. 1990). Bestätigt wurden diese Beobachtungen durch eine in vivo

Studie von Rimondini et al. (1997), die die initiale supragingivale Biofilmformation (24 Stunden) auf intraoral fixierten Titanprüfkörpern untersuchten. Die Ra-Werte reichten von 0,1µm bis 2,4µm. Während die glatteren Oberflächen vergleichbare Mengen an Bakterien beherbergten, wurden die rauheren Oberflächen von signifikant größeren Mengen von Mikroorganismen besiedelt (Rimondini et al. 1997). Diese Beobachtung könnte auch eine Erklärung dafür sein, warum in der vorliegenden Untersuchung die Kontrollgruppe mit der glattesten Oberfläche (Ra-Wert 0,03 µm) und die gebeizte Testgruppe (Ra 0,1µm) eine initial ähnlich geringe Plaqueanlagerung zeigten, trotz dreifach größerem Ra-Wert in der Testgruppe. Auch ein Vergleich der beiden hydrophilen Testgruppen (modSLA und modA) lässt auf einen initialen Einfluss der Oberflächenrauigkeit schließen. Trotz der hydrophilen Oberflächeneigenschaften beider Materialproben ergab sich eine deutliche Diskrepanz an PB Arealen nach 12 Stunden (modSLA : 48,8%; modA: 10,4% mittlere PB Areale). Ein Grund hierfür könnte die mehr als doppelt so hohe Oberflächenrauigkeit der modSLA-Oberfläche sein (Ra-Werte: modSLA 1,24µm; modA: 0,56µm). Über die Zeit betrachtet wiesen jedoch beide Oberflächenmodifikationen die geringste Steigerung der Plaqueareale nach 24 Stunden auf.

Der Einfluss der freien Oberflächenenergie (surface free energy = sfe) auf die bakterielle Adhäsion wurde bereits durch die Formel von Absolom, $\Delta G_{adh} = \gamma_{sb} - \gamma_{sl} - \gamma_{bl}$ beschrieben (Abb. 3). In diesem mathematischen Modell müssen um den Einfluss der freien Oberflächenenergie (sfe) auf die bakterielle Adhäsion, bzw. auf die Änderung der Adhäsionsenergie für Bakterien (ΔG_{adh}) darstellen zu können, die sfe des Bakteriums γ_{bv} , die sfe des Substrates γ_{sv} , und die Oberflächenspannung des umgebenden Mediums γ_{lv} bekannt sein. Da die meisten oralen Mikroorganismen eine hohe Oberflächenenergie und Speichel verglichen dazu eine niedrige Oberflächenenergie besitzt, wird für die meisten Bakterienarten die Situation $\gamma_{lv} < \gamma_{bv}$ zutreffen, also eine verstärkte Adhäsion bei hoher Oberflächenenergie (Absolom et al. 1983, 1988). Allgemein wird die Adhäsion favorisiert, wenn die freie Energie

des Systems (Gibbs Energie), und in unserem Fall die freie Energie der Grenzflächen, die aufeinander treffen (Mikroorganismus, Festkörper und Suspensionsmedium), dadurch gesenkt werden kann. Unter *in vitro* Bedingungen ist demnach zu beobachten, dass Bakterien mit niedriger eigener sfe besser an Oberflächen mit niedriger Oberflächenenergie adhäreren, also an hydrophoben Oberflächen, während das umgekehrte Prinzip für hydrophile Bakterien und Oberflächen gilt (Busscher & Weerkamp 1987). Wie bereits erwähnt besitzen die meisten oralen Mikroorganismen hohe sfe-Werte, was implizieren würde, dass sie die Adhäsion an hydrophilen Oberflächen, wie zum Beispiel dem Schmelz präferieren. Busscher et al. beobachteten zudem, dass die Kraft der Bindung zwischen Bakterium und Oberfläche bei positiver G_{adh} schwächer ausgeprägt war (Busscher et al. 1986).

Will man die gemachten Beobachtungen zum Einfluss der Oberflächenenergie auf ihre klinische Relevanz prüfen, muss berücksichtigt werden, dass in der Mundhöhle natürliche wie auch artifizielle Oberflächen unmittelbar von einem proteinreichen Pellicel umhüllt werden. Diese Ummantelung resultiert in einer Annäherung der Werte für Oberflächenenergien verschiedenen Materialien, indem durch die proteinreiche Umhüllung für ursprünglich hydrophobe Oberflächen eine Steigerung der sfe resultiert, für ursprünglich hydrophile Substanzen eine Senkung der sfe, die Werte nähern sich demnach einander an (Van Dijk 1988). Dennoch scheint es Anhaltspunkte dafür zu geben, dass Informationen über die ursprünglichen Materialeigenschaften wenigstens teilweise auch an die Grenzfläche zwischen Protein und adhärrender Zelle transferiert werden (Pratt-Terpstra et al. 1989 & 1991). Absalom et al. beobachteten sogar eine klare Korrelation zwischen adsorbierten Proteintypen und der jeweiligen freien Oberflächenenergie (Absalom et al. 1987). Welche genauen Mechanismen diesen Beobachtungen zu Grunde liegen könnten ist noch nicht gut verstanden. In der vorliegenden Untersuchung konnte kein deutlicher Einfluss der freien Oberflächenenergie beobachtet werden. Vergleicht man die hydrophobe SLA[®]-Oberfläche

mit der hydrophilen modSLA- Oberfläche (beide Ra-Wert 1,24 μm) betrug nach 12 Stunden der mittlere prozentuale Anteil an Plaque-Biofilm-Arealen (PBA) 56,6% für die SLA[®]-Oberfläche und 48,8% für die modSLA- Oberfläche. Nach 24 Stunden zeigte sich eine Fortsetzung dieses Trends, (SLA[®]: 88% mittlere PBA; modSLA: 59,8% mittlere PBA), da der mittlere Zuwachs an PB-Arealen in der hydrophoben Testgruppe mit 31,4% noch über dem Wert der hydrophilen Testgruppe mit nur 11 % mittlerem Zuwachs an PB-Arealen lag. Vergleicht man die beiden untersuchten hydrophilen Testgruppen miteinander, zeigen sich nach 12 Stunden deutliche Unterschiede in der Menge der akkumulierten Plaque. Für die modA-Testgruppe betrug der mittlere prozentuale Anteil PB-Areale nach 12 Stunden gerade einmal 10,4%, während er in der ebenfalls hydrophilen Testgruppe modSLA zu diesem Zeitpunkt bereits 48,8% betrug. Eine Erklärung hierfür könnten die unterschiedlichen Ra-Werte der beiden Oberflächenmodifikationen sein. Der Ra-Wert der modSLA-Oberfläche liegt mit 1,24 μm mehr als doppelt so hoch wie der Ra-Wert der modA-Oberfläche mit 0,56 μm . Dies würde ein Hinweis auf den bereits erläuterten initial stärkeren Einfluss der Oberflächenrauigkeit sein. Allerdings scheint über die Zeit betrachtet auch dieser Faktor an Dominanz zu verlieren, da der mittlere Zuwachs an PB-Arealen über die Zeit betrachtet in beiden Testgruppen ähnlich verlief (modSLA 11% mittlerer Zuwachs an PBA; modA 14,4%), trotz der initial stark differierenden Werte. Die Promote[®] und die SLA[®]-Oberfläche, die Oberflächen mit der stärksten gemessenen Plaque-Biofilmanlagerung in der vorliegenden Untersuchung, haben mit jeweils 1,24 μm auch den höchsten Ra-Wert. Beide Oberflächen verhielten sich sowohl zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten (12 und 24 Stunden), als auch über die Zeit betrachtet sehr ähnlich in ihrem Verhalten Biofilm anzulagern. Beide Oberflächenmodifikationen werden durch eine Kombination von Sandstrahlung und Säureätzung hergestellt.

Der relative Einfluss beider Parameter, Oberflächenrauigkeit und freie Oberflächenenergie in Kombination, auf die supragingivale Biofilmformation wurde in einer in vivo Studie von

Quiryne et al. (1990) untersucht. Hierzu wurden zwei Streifen, einer aus Fluorethylenpropylen (FEP) mit geringer sfe und einer aus Celluloseacetat (CA) mit höherer sfe (20 und 58 erg/cm²) auf die Labialfläche der oberen mittleren Incisivi von 16 Probanden geklebt. Eine Hälfte jedes Streifens war glatt, (Ra-Wert $\pm 0,1\mu\text{m}$) die andere rau (Ra-Wert $\pm 2,2\mu\text{m}$). Am dritten und sechsten Tag wurde die Plaqueanlagerung bestimmt. Nach drei Tagen zeigten sich nur signifikante Unterschiede beim Vergleich von rauher und glatter Oberfläche. Nach sechs Tagen ergab sich zwischen den zwei glatten Oberflächen ein signifikanter Unterschied (FEP- glatt 19,4% Plaquebesiedlung; CA-glatt 39,5%), während zwischen FEP-rauh und CA-rauh kein signifikanter Unterschied bestand. Diese Beobachtung legt nahe, dass für die Plaqueanlagerung, die Oberflächenrauigkeit den dominanteren Faktor als die freie Oberflächenenergie darstellt (Quiryne et al. 1990).

Der Einfluss der freien Oberflächenenergie auf die subgingivale Region ist bisher nur in wenigen Studien untersucht worden. In einer in vivo Studie an neun Patienten, denen je zwei unterschiedliche Abutments (als transmukosaler Teil eines zweiteiligen Implantatsystems), eines aus Fluorethylenpropylen (FEP), das andere aus Titan eingesetzt wurden, sollte der Einfluss der Oberflächenenergie beobachtet werden. Nach drei Monaten wurden Plaqueproben jeweils supra- und subgingival entnommen. Die Komposition der supragingivalen Plaque unterschied sich zwischen den zwei Abumenttypen signifikant. Titanabutments (höherer sfe) beherbergten eine geringere Konzentration an kokkoide Zellen, was als höherer Reifungsgrad der Plaque gedeutet werden kann (Theilade et al. 1966). Für die subgingivale Region ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, dafür können verschiedene Gründe verantwortlich gemacht werden. Zum einen bietet die subgingivale Umgebung mehr Schutz vor abscherenden Kräften. Des Weiteren bieten sich hier mehr und verschiedenartige Oberflächen zur Adhäsion an, als auch die Möglichkeit in der Sulkusflüssigkeit zu schwimmen. Darüber hinaus scheint die subgingivale Mikroflora stärker beeinflusst von der übrigen natürlichen Dentition und deren parodontologischen Zustand

(Aspe et al. 1989). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines intraoralen Schienensystems zur Gewinnung supragingivaler Plaque-Biofilme, die Untersuchung von Entstehung und Wachstum von Biofilmen in Abhängigkeit von der Oberflächenmodifikation unter besonderer Berücksichtigung der Faktoren Oberflächenrauigkeit und Hydrophilie/Hydrophobie. Darüber hinaus deutet eine in vitro Studie von Schwartz et al. (1999) daraufhin, dass gegebenenfalls nicht die Oberflächenrauigkeit per se ausschlaggebend für die Adhäsion von Zellen ist, sondern eine wellige Oberflächenstruktur trotz gleichem Ra-Wert wie eine stacheligere Oberflächenstruktur von den adhärierenden Zellen als glatter und somit ungünstiger für den Adhäsionsprozess empfunden wird (Schwartz et al. 1999). Eine unregelmäßige Rauigkeit, wie sie bei der Sandstrahlung von Titan auftritt wurde in vielen Studien als notwendig für die Osseointegration eines Implantates beschrieben (Albrektsson et al. 1981; Michaels et al. 1989; Bowers et al. 1992), da Osteoblasten rauhe Oberflächen für die Adhäsion favorisieren. Rauhe Oberflächen scheinen darüber hinaus auch Entzündungszellen aus der Monocytenzellreihe anzuziehen (Salthouse et al.), ein Aspekt der auch die interessante Frage aufwirft, inwieweit dieser Effekt wünschenswert ist, da unter anderem Osteoklasten aus der Monocytenzellreihe stammen. Für den supragingivalen bis transmukosalen Teil eines Implantates wurde ein möglichst glattes Oberflächendesign vorgeschlagen, um die Plaqueanlagerung in diesem kritischen Bereich als „Eintrittspforte“ zu reduzieren (Salthouse et al. 1984). Allerdings gibt es auch für diesen Bereich eines Implantates Hinweise dafür, dass eine gewisse, wenn auch geringere Oberflächenrauigkeit als im osseointegrierten Teil, notwendig zu sein scheint um auch einen optimalen Weichteilabschluss zu erreichen (Quirynen et al. 1996a, Bollen et al. 1996). In den zwei Studien zeigten hochpolierte Abutments einen mittleren Attachmentverlust von $\geq 0,5$ mm nach einem Jahr, während Abutments mit einem Ra-Wert von $0,21 \mu\text{m}$ nach dem selben Zeitraum keinen Attachmentverlust zeigten. Der Aspekt eines möglicherweise negativen

Einflusses einer Oberflächenpolitur auf den Weichteilabschluss bei Implantaten bedarf noch genauerer Untersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde neben dem Aspekt der Plaque-Biofilmformation auch der Einfluss der Oberflächenmorphologie auf die Lebensfähigkeit von Osteoblasten ähnlichen Zellen untersucht. Die für die Zellkultur verwendeten humanen Osteosarkom-Zellen (SAOS2-Osteoblasten) wurden in verschiedenen Studien als den menschlichen Osteoblasten ähnliche Zellen charakterisiert (Murray et al. 1987, Rodan et al. 1987). In Langzeit in vitro Studien zeigten primäre humane Osteoblastenkulturen ein ähnliches Verhalten gegenüber Implantatoberflächen wie SAOS2-Osteoblasten (Ahmad et al. 1999). Die mitochondriale Aktivität wurde in der vorliegenden Untersuchung mit Hilfe eines auf dem ATP-Gehalt basierenden Lumineszenztest gemessen (CellTiter-Glo[®] luminescent cell viability assay). Dieser Test wurde in zahlreichen Studien als sensitiver gegenüber anderen Methoden beschrieben (Maehara et al. 1987, Petty et al. 1995, Cree et al. 1995). Crouch et al. wiesen eine signifikante Korrelation sowohl zwischen gemessenem Lumineszenzsignal und vorhandener ATP-Menge, als auch eine direkte Proportionalität zwischen ATP-Menge und Anzahl lebender Zellen in der Kultur nach (Crouch et al. 1993). Die Auswertung der ATP-Messung in der vorliegenden Arbeit ergab, dass die glattesten Oberflächenmodifikationen (polierte und gebeizte Oberfläche) die höchste Zellaktivität aufwiesen. Während für die Plaqueakkumulation eine deutliche Korrelation zur vorhandenen Oberflächenrauigkeit in der vorliegenden Untersuchung gezeigt werden konnte, scheint das Ergebnis der Biokompatibilitätstestung in Diskrepanz zu gemachten Erfahrungen zahlreicher anderer Studien zu stehen.

Der Einfluss der Oberflächentopographie auf die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Zellen konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden (Brunette et al. 1988, Inoue et al. 1987). In der Mehrzahl der Fälle wird dabei beschrieben, dass Osteoblasten ähnliche Zellen rauhe Oberflächen bevorzugen, während Fibroblasten sich stärker und

einfacher auf glatten oder nur leicht strukturierten Oberflächen ansiedeln (Bowers et al. 1992, Kononen et al. 1992, Martin et al. 1995). Bowers et al. untersuchten *in vitro* die Anlagerung Osteoblasten ähnlicher Zellen auf Titanoberflächen mit unterschiedlicher Oberflächenmorphologie. Sie fanden eine ausgeprägtere Anlagerung an den rauhen Materialproben als an polierten Oberflächen. Allerdings differenzierten die Forscher die Materialprobenrauigkeit nicht nur quantitativ nach den Ra-Werten, sondern darüber hinaus auch qualitativ nach der Art der Oberflächenstruktur. So zeigten die rauhesten (nach dem Ra-Wert) Materialproben (Ra-Wert= 1,15µm, maschinenpoliert) eine geringere Zellanheftung als die „glattere“, sandgestrahlte Oberfläche mit einem Ra-Wert von 0,87µm. Bowers et al. schlossen daraus, dass nicht die Oberflächenrauigkeit *per se*, sondern auch deren Beschaffenheit das Verhalten der Zellen beeinflussen kann. Die sandgestrahlte Oberfläche besaß eine unregelmäßige Topographie, während die, nach dem Ra-Wert rauhere, maschinenpolierte Oberfläche ein gleichmäßiges Muster besaß (Bowers et al. 1992). Inwieweit diese Beobachtung eine Erklärung für die in der vorliegenden Untersuchung entstandenen Ergebnisse sein könnte bleibt unklar. Die Anlagerung von Zellen an ein dentales Implantat ist ein komplexes Zusammenspiel vieler unterschiedlicher Zellen und Moleküle, da allein drei verschiedene Gewebearten (Epithel, Bindegewebe und Knochen) miteinander agieren. Hinzu kommt eine Vielzahl unterschiedlichster Moleküle aus Serum und umgebenden Gewebe, deren einzelne Bedeutungen längst noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnten (Brunette 1988). Ein enossales Implantat zum Beispiel ist nach seiner Insertion umgeben von einer Mixtur von Plasma und Serumbestandteilen, darunter Proteine, Glycoproteine, Lipide und Elektrolyte. Diese Situation verdeutlicht auch den Umstand, dass eine *in vitro* Situation, wie sie der vorliegenden Untersuchung zu Grunde lag keinesfalls unmittelbar auf die *in vivo* Situation übertragen werden kann. Inwieweit die Sterilisation im Autoklaven, die Oberflächeneigenschaften beeinflusst, wird in der Literatur zum Teil kontrovers diskutiert (Martin et al. 1995).

Ein wesentlicher Unterschied zwischen *in vivo* und *in vitro* Situation ist die bereits im Zusammenhang mit der Adhäsion von Mikroorganismen erwähnte Ausbildung eines Pellicels auf allen Oberflächen sobald sie in die Mundhöhle eingebracht werden. Albumin, Präalbumin und Immunglobulin G wurden unter anderem als Proteine identifiziert, die an Titanoberflächen adsorbieren (Ellingsen et al. 1991). In einer *in vitro* Betrachtung wie der vorliegenden fehlt der Einfluss der diesen Pellicel bildenden adsorbierten Proteine gänzlich.

Für hydrophile Oberflächenmodifikationen wie die untersuchte modSLA und die modA-Oberfläche konnten hier keine Verbesserung der Zellanlagerung beobachtet werden. Ein Einfluss der freien Oberflächenenergie auf die Plaqueanlagerung konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden, so dass, zumindest als Schlussfolgerung der vorliegenden Arbeit, die Gestaltung einer „hydrophilen“ Oberfläche als nicht notwendige Modifikation angesehen werden kann.

Die nur säuregeätzten Oberflächenmodifikationen stellen, betrachtet man die Ergebnisse beider Messungen, den besten Kompromiss zwischen Biokompatibilität und mäßiger Plaqueanlagerung da.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Abrahamsson I, Zitzmann N U, Bone and soft tissue integration to titanium implants with different surface topography: An experimental study in the dog. *Int J Oral Maxillofac Implants* 16(3): 323-32.

Absolom, D.R. , Lamberti, F.V., Policova, Z., Zingg, W., van Oss, C.J. & Neumann, A.W. (1983) Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 90-97.

Absolom, D.R., Zingg, W. & Neumann, A.W. (1987) Protein adsorption to polymer particles: role of surface properties. *Journal of Biomedical Materials Research* 21, 161-171.

Absolom, D.R. (1988) The role of bacterial hydrophobicity in infectin : Bacterial adhesion and phagocytic ingestion. *Canadian Journal of Microbiology* 34, 287-298.

Adell, R., Lekholm, U., Rockler, Brane,ark, P.I., (1981) A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw, *Int J Oral Surg*, 6:387-416.

Ahmad M, Mc Carthy MB, Gronowicz G: An *in vitro* model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials. *Biomaterials* 1999; 20: 211-220.

Albrektsson T, Branemark P I, Hansson H.-A., and Lindström J, Osseointegrated titanium implants: requirements for ensuring a longlasting, direct bone-to-implant anchorage in man; *Acta Orthop Scand*, 52,155-170 (1981)

Albrektsson T, Isidor F (1994) Consensus report of session IV. In: Lang NP Karring T (eds) Proceedings of the First European Workshop on Periodontology. *Quintessence*, London, pp 365-369.

Alcoforado GA, Rams TE, Feik D, Slots J (1991) Microbial aspects of failing osseointegrated dental implants in humans. *J Parodontol* 10:11-18.

Aoki A, Ando Y, Watanabe H, Ishikawa I : *In vitro* studies on laser scaling of subgingival calculus with an erbium:YAG laser. *J Periodontol* 1994; 65: 1097-1106.

Aspe P, Ellen RP, Overall CM, Zarb GA. Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus : A comparison of sites in edentulous and partial edentulous patients. *J Periodont Res* 1989; 24: 96-105.

Aughtun M, Tinschert J, Huber A (1998) *In vitro* studies on the effect of cleaning methods on different implant surfaces. *J Periodontol* 69: 857-864.

- Auschill T M, Arweiler N B, Netuschil L, Brex M, Reich E, Sculean A, Artweiler NB (2001) Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol* 46: 471-476.
- Bach G, Neckel C, Mall C, Krekeler G (2000) Conventional versus laser-assisted therapy of periimplantitis : a five-year comparative study. *Implant Dent* 9: 247-251.
- Baier RE, Meyer AE (1988) Implant surface preparation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 3: 9-20.
- Becker W, Becker BE, Newman MG, Nyman S (1990) Clinical and micribiologic findings that may contribute to dental implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants* 5:31-38
- Bellon-Fontaine, M-N., Mozes, N., Van der Mei, H.C., Sjollema, J., Cerf, O. Rouxhet, P.G. & Busscher, H.J. (1990) A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. *Cell Biophysics* 17, 93-106
- Bollen, C.M.L., Papaioannou, W., Van Eldere, J., Schepers, E., Quirynen, M., van Steenberghe, D. (1996) The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clinical Oral Implants Research* 7, 201-211.
- Bowers K T, Keller J C, Randolph B A, Wick D G, Michaels C M. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses *in vitro*. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992; 7: 302-310.
- Brånemark P.I. : Einführung in die Osseointegration. In: Brånemark P.I., Zarb G., Albrektsson T.: Gewebeintegrierter Zahnersatz. *Quintessenz*. Berlin 1985
- Brex M; Theilade J & Attström, R (1983) An ultrastructural quantitative study of the significance of microbial multiplication during early dental plaque growth. *Journal of Periodontal Res* 18,177-186.
- Brunette D M: The effects of implants surface topography on the behavior of cells. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1988;3: 231-246.
- Busscher, H.J., Uyen, M.H.W.J.C., Van Pelt, A.W.J., Weerkamp,A.H. & Arends, J. (1986a) Kinetics of adhesion of the oral bacterium *Streptococcus sanguis* CH3 to polymers with different surface free energies, *Applied and Environmental Microbiology* 51, 910-914.
- Busscher, H.J., Uyen, M.H.W.J.C., Weerkamp,A.H., Postma, W.J. & Arends, J. (1986b) Reversibility of adhesion of oral streptococci to solids. *FEMS Microbiology Letters* 35, 303-306.
- Busscher, H.J. & Weerkamp, A.H. (1987) Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiology Reviews* 46, 165-173.

Cree I A, Pazzagli M, Mini E, Mazzei T, Hunter E M, Sutherland L A, Pinzani P, Gerli A, Andreotti P E: Methotrexate chemosensitivity by ATP luminescence in human leukemia cell lines and in breast cancer primary cultures: comparison of the TCA-100 assay with a clonogenic assay. *Anticancer drugs* 1995;6:398-404.

Crouch S P, Kozlowski R, Slater K J, Fletcher J: The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1993; 160: 81-88.

Davies J.E., Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 1998; 11:391-401)

Edgerton, M., Lo, S.E. & Scannapieco, F.A. (1996) Experimental salivary pellicles formed on titanium surfaces mediate adhesion of streptococci. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 11, 443-449.

Ellingsen JE. A study on the mechanisms of protein adsorption to TiO₂. *Biomaterials* 1991; 15:593-6

Ericsson I, Persson Lg, Berghlund T, edlund T, Lindhe J (1996) The effect of antimicrobial therapy on periimplantitis lesions. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* 7: 320-328.

Fox SC, Moriarty JD, Kusy RP (1990) The effects of scaling a titanium implant surface with metal and plastic instruments: an *in vitro* study. *J Periodontol* 61:485-490.

Glantz, P.-O. (1969) On wettability and adhesiveness. *Odontologisk Revy* 20, suppl 17, 1-132.

Hahn R, Netuschil L, Löst C (1992) Initiale Plaquebesiedlung auf keramischen Restaurationsmaterialien. *Dtsch Zahnärztl Z* 47: 330-334.

Hanisch O, Cortella C.A., Experimental peri-implant tissue breakdown around hydroxyapatite coated implants. *J Periodontol* 68(1) 59-66

Hartschen VJ, Frentzen M, (2002) Effects of the ultrasonic Vector system compared to conventional ultrasonic and hand instruments (in German). *Parodontologie* 13:133-142.

Heitz - Mayfield L.J., Schmid B, Does excessive occlusal load affect osseointegration? An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 15(3):259-68

Ho C.S. (1986); An understanding of the forces in the adhesion of microorganisms to surfaces. *Process Biochemistry* 21, 148-153.

Inoue T, Cox J E, Pilliar R M, Melcher A H: Effect of the surface geometry of smooth and porous-coated titanium alloy on the orientation of fibroblasts *in vitro*. *J Biomed Mater Res* 1987; 21: 107-126

Isidor F, Loss of osseointegration caused by occlusal load of oral implants. A clinical and radiographic study in monkeys (1996). *Clin Oral Implants Res* 7(2):143-52

Keller U, Hibst R: Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances: II. Light microscopic and SEM investigations. *Lasers Surg Med* 1989; 9:345-351.

Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, Boyan BD: The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996; 7(4)329-345

Kononen M, Hormia M, Kivilahti J, Hautaniemi J, Thesleff I: Effect of surface processing on the attachment, orientation and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mater Res* 1992; 26: 1325-1341.

Kreisler M, Götz H, Duschner H (2002) Effect of Nd:YAG, Ho:YAG, Er:YAG, CO₂, and GaAIAs laser irradiation on surface properties of endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 17:202-211

Lang, N.P. , Løe, H. ; The relationship between the width of keratinized gingiva and gingival health. *J Periodontol* 43(10):623-7

Lie T, (1979) ; Morphologic studies on dental plaque formation. *Acta Odontologica Scandinavica* 37,73-85.

Liljemark, W.F., Bloomquist, C.G., Reilly, B.E., Bernards, C.J., Townsend, D.W., Pennock, A.T. & LeMoine, J.L. (1997) Growth dynamics in a natural biofilm and its impact on oral disease management. *Advances in Dental Research* 11, 14-32.

Lindhe, J. , Berghlund, T. (1992). Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res* 3(1): 9-16

Lindhe J und Berghlund T: Die periimplantäre Mukosa. In: Klinische Parodontologie und Implantologie (Hrsg:Lindhe J), Quintessenz, Berlin 1999).

Løe H, Theilade E, Jensen S B: Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965; 36:177-187.

Maehara Y, Anai H, Tamada R, Sugimachi K: The ATP assay is more sensitive than the succinate dehydrogenase inhibition test for predicting cell viability. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987; 23: 273-276.

Martin J Y, Schwartz Z, Hummert T W, Schrauhb D M, Simpson J, Lankford J, Jr., Dean D D, Cochran D L, Boyan B D: Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res* 1995; 29: 389- 401.

Michaels C M, Keller J C, Stanford C M, Solursh M: In vitro cell attachment of osteoblast-like cells to titanium. *J Dent Res* 1989; 68 (special issue): 276

Miyasato M, Crigger M, Gingival conditions in areas of minimal and appreciable width of keratinized gingiva. *J Clin Periodontol* 4(3):200-9

Mombelli A, Buser D, Lang NP, (1988) Colonization of osseointegrated titanium implants in edentulous patients. Early results. *Oral Microbiol Immunol* 3:113-120.

Mombelli A, Lang N P (1998), The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontol* 2000, 17:63-76

Mombelli A, Lang NP (1994) Microbial aspects of implant dentistry. *Periodontol* 2000 4:74-80

Morra M & Cassinelli C (1997) Bacterial adhesion to polymer surfaces: a critical review of surface thermodynamic approaches. *J of Biomaterials Sciences, Polymer Edition* 9,55-74.

Murray E, Provvedini D, Curran D, Catherwood B, Sussman H, Manolagas S: Characterization of a human osteoblastic osteosarcoma cell line (SaOs-2) with high bone alkaline phosphatase activity. *Journal of Bone and Mineral Research* 1987; 2: 231-238.

Oyster DK, Parker WB, Gher ME (1995) CO₂ lasers and temperature changes of titanium implants. *J Periodontol* 66: 1017-1024

Papaoannou, W., Quirynen, M. & van Steenberghe, D. (1996) The influence of peridontitis on the subgingival flora around implants in partially edentulous patients. *Clinical Oral Implants Research* 7, 405-409.

Parham PL Jr, Cobb CM, French AA, Love JW, Drisko CL, Killoy (1989) Effects of an air-powder abrasive system on plasma-sprayed titanium implant surfaces: an in vitro evaluation. *J Oral Implantol* 15: 78-86.

Petty R D, Sutherland L A, Hunter EM, Cree I A: Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. *J Biolumin Chemilumin* 1995; 10: 29-34.

Pontoriero R, Tonelli M P, Carnevale G, Mombelli A, Nyman S R, Lang N P: Experimentally induced periimplant mucositis. A clinical study in humans. *Clin Oral Implants Res* 1994; 5: 254-259

Prall-Terpstra, I.H., Weerkamp, A.H. & Busscher, H.J. (1989) The effects of pellicle formation on streptococcal adhesion to human enamel and artificial substrata with various surface free-energies. *Journal of Dental Research* 68, 463-467.

Pratt-Terpstra, I.H., Mulder, J., Weerkamp, A.H., Feijen, J. & Busscher, H.J. (1991) Secretory IgA adsorption and oral streptococcal adhesion to human to human enamel and artificial solid substrata with various surface free-energies. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2, 239-253.

Quiryneen, M. (1986) Anatomical and inflammatory factors influence bacterial plaque growth and retention in man. *Thesis*, Catholic University Leuven.

Quiryneen, M., Marechal, M., Busscher, H.J., Weerkamp, A.H., Arends, J. Darius, P.L. & van Steenberghe, D. (1989) The influence of surface free energy on planimetric plaque growth in man. *Journal of Dental Research* 68; 796-799.

Quiryneen, M. & van Steenberghe, D. (1989) Is early plaque growth rate constant with time? *Journal of Clinical Periodontology* 16, 278-283.

Quiryneen, M., Marechal, M., Busscher, H.J., Weerkamp, A.H., Darius, P.L. & van Steenberghe, D. (1990) The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. *Journal of Clinical Periodontology* 17,138-144.

Quiryneen, M., Dekeyser, C. & van steenberghe D. (1991). The influence of gingival inflammation, tooth type, and timing on the rate of plaque formation. *Journal of Periodontology* 62,219-222.

Quiryneen, M., Van der Mei, H.C., Bollen, C.M.L., Schotte, A., Marechal, M., Doornbusch, G.I., Naert, I., Busscher, H.J. & van Steenberghe, D. (1993) An *in vitro* study of the influence of surface roughness of implants on the microbiology of supra-and subgingival plaque. *Journal of Dental Research* 72,1304-1309.

Quiryneen, M., Van der Mei, H.C., Bollen, C.M.L., Van Den Bossche, L.H., Doornbusch, G.I., van Steenberghe, D. & Busscher, H.J. (1994) The influence of surface free energy on supra- and subgingival plaque microbiology. An *in vivo* study on implants. *Journal of Periodontology* 65, 162-167.

Quiryneen, M. & Bollen, C.M.L. (1995) The influence of surface roughness and surface free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *Journal of Clinical Periodontology* 22, 1-14.

Quiryneen, M., Bollen, C.M.L., Papaioannou, W., Van Eldere, J. & van Steenberghe, D. (1996a) The influence of titanium abutments surface roughness on plaque accumulation and gingivitis. Short term observations. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 11,169-178.

Quiryneen, M., Papaioannou, W. & van Steenberghe, D. (1996b) Intra-oral transmission and the colonization of oral hard surfaces. *Journal of Periodontology* 67,986-993.

Ramberg, P., Lindhe, J. Dahlén, G. & Volpe, A.R. (1994) The influence of gingival inflammation on *de novo* plaque formation. *Journal of Clinical Periodontology* 21,51-56.

Rateitschak K H, Wolf H F: Farbatlanten der Zahnmedizin 1, Parodontologie. *Thieme Verlag Stuttgart, New York* 2003; 3.Auflage.

Rimondini, L., Farè, S., Brambilla, E., Felloni, A., Consonni, C., Brossa, F. & Carrassi, A. (1997) The effect of surface roughness on early *in vivo* plaque colonization on titanium. *Journal of Periodontology* 68,556-562.

Rodan S B, Imai Y, Thiede M A, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, Shull S, Mann K, Rodan G A: Characterization of a human osteosarcoma cell line (SaOs-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res* 1987; 47: 4961-4966.

Rutter, P.R. & Vincent, B. (1984) Physicochemical interactions of the substratum, microorganisms and the fluid phase. In *Microbial adhesion and aggregation*, ed. Marshall K.C., pp. 21-38. Berlin: Springer Verlag.

Salthouse T N (1984), Some aspects of macrophage behavior at the implant interface. *J Biomed Mater Res*: 18(4), 395-401.

Schenk G, Flemmig TF, Betz T, Reuther J, Klaiber B (1997) Controlled local delivery of tetracycline HCl in the treatment of periimplant mucosal hyperplasia and mucositis. A controlled case series. *Clin Oral Implants Res* 8:427-433.

Schwartz Z, Lohmann C H, Oefinger J, Bonewald, Dean D D, Boyan B D (1999): Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Adv Dent Res* 13: 38-48.

Schwarz F, Sculean A, Berakdar M, Szathmari L, Georg T, Becker J (2003) *In vivo* and *in vitro* effects of an Er:YAG laser, a GaAlAs diode laser, and scaling and root planning on periodontally diseased root surfaces: a comparative histologic study. *Lasers Surg Med* 32:359-366.

Sennerby L, Lekholm U (1993) The soft tissue response to titanium abutments retrieved from humans and reimplanted in rats. A light microscopic study. *Clin Oral Implants Res* 4:23-27.

Shimpuku H, Nosaka Y, Genetic polymorphisms of the interleukin-1 gene and early marginal bone loss around endosseous dental implants. *Clin Oral Implants Res* (2003) 14(4):423-9

Simonsson, T., Rönstrom, A., Rundegren, J. & Birkhed, D. (1987) Rate of plaque formation-some clinical and biochemical characteristics of "heavy" and "light" plaque formers. *Scandinavian Journal of Dental research* 2,38-46.

Spiekermann H, Donath K, Jovanovic S, Richter J, in : Farbatlant der Zahnmedizin Bd. 10, Herausgeber: Rateitschak K H, Wolf H F, *Thieme Verlag Stuttgart New York* (1994).

Strub J R, Gaberthuel, T W. The role of attached gingiva in the health of peri-implant tissue in dogs. 1. Clinical findings. *Int J Periodontics Restorative Dent* 11(4): 317-33

Theilade J, Wright WH, Jensen SB, Loe H. Experimental gingivitis in man. II A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodont Res* 1966; 1:1-13

Van de Velde E, Thielens P, Schauteet H, Vanclooster R (1991) Subcutaneous emphysema of the oral floor during cleaning of a bridge fixed on an IMZ implant. Case report. *Rev Belge Med Dent* 46:64-71.

Van Dijk, J., Herkströter, F., Busscher, H., Weerkamp, A., Jansen, H. & Arends, J. (1987) Surface- free energy and bacterial adhesion. An *in vivo* study in beagle dogs. *Journal of Clinical Periodontology* 14,300-304.

Van Dijk, L.J., Goldsweer, R. & Busscher, H.J. (1988) Interfacial free energy as driving force for pellicle formation in the oral cavity: An *in vivo* study in beagle dogs. *Biofouling* 1, 19-25.

Van Pelt, A.W.J., De Jong, H.P., Busscher, H.J.& Arends, J. (1983) Dispersion and polar surface free energies of human enamel. *Journal of Biomedical Materials Research* 17 637-641.

Weber H.P., Buder D (1992) Radiographic evaluation of crestal bone levels adjacent to nonsubmerged titanium implants. *Clin Oral Implants Res* 3(4):181-8

Weerkamp, A.H., Quirynen, M., Marechal, M., Van der Mei, H.C., van Steenberghe, D. & Busscher, H.J. (1989) The role of surface free energy in the early *in vivo* formation of dental plaque on human enamel and polymeric substrata. *Microbial Ecology in Health an Disease* 2, 11-18.

Yamauchi M, Yamamoto K, Wakabayashi M & Kawano J (1990) *In vitro* adherence of microorganisms to denture base resin with different surface texture. *Dental Materials Journal* 9,19-24.

Zee, K., Samaranayake, L.P. & Attstrom, R. (1996) Predominant cultivable supragingival plaque in Chinese “rapid“ and “slow” plaque formers. *Journal of Clinical Periodontology* 23, 1025-1031.

7. DANKSAGUNGEN

Herrn PD Dr. F. Schwarz (Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme, Westdeutsche Kieferklinik, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich Heine Universität) danke ich für die Überlassung des Themas, die großzügige Förderung dieser Arbeit, seine Beratung und die freundliche Unterstützung bei ihrer Erstellung.

Frau Dr. rer. nat. Monika Herten (Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme, Westdeutsche Kieferklinik, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich Heine Universität) danke ich für die freundliche Bereitstellung der Laboreinrichtungen- und materialien.

Frau Brigitte Beck (Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme, Westdeutsche Kieferklinik, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich Heine Universität) danke ich für die Hilfe bei der Anfertigung der Zellkultur und der Durchführung des ATP-Assays.

Meinen Eltern, Yvonne und Frank Horn und meiner Schwester, Sibylle Horn danke ich für Ihre uneingeschränkte Unterstützung, Aufmerksamkeit und Liebe.

8. LEBENSLAUF

Persönliche Informationen

1. Familienstand: ledig
2. Staatsangehörigkeit: deutsch
3. Geburtstag: 17.12.1979
4. Geburtsort: Solingen
5. Eltern:

Yvonne Horn
geboren am 9.11.1949 in Offenbach am Main
Bankkauffrau

Frank Horn
geboren am 26.09.1950 in Solingen
Betriebswirt/ Bankkaufmann

Ausbildung

- | | |
|-----------------------|--|
| 1986 - 1990 : | Grundschule der Gemeinde Solingen-
Aufderhöhe |
| 1990 - 1999 : | Humboldtgynasium der Stadt Solingen |
| 25.05.1999 : | Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
(Humboldtgynasium Solingen) |
| 2000- 2005: | Studium der Zahnmedizin
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf |
| 05.10.2001 : | Vorphysikum |
| 25.03.2003 : | Physikum |
| August-November 2005: | Staatsexamen Zahnmedizin |
| November 2005: | Approbation |
| April 2006: | Beginn der Anstellung als Assistenz Zahnärztin |

9. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Etablierung eines intraoralen Schienensystems zur Gewinnung supragingivaler Plaque-Biofilme, deren Entstehung und Wachstum in Abhängigkeit von sieben unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen untersucht werden sollte. Hierbei fanden die Faktoren Oberflächenrauigkeit und freie Oberflächenenergie besondere Berücksichtigung. Darüber hinaus wurde der Einfluss der verschiedenen Oberflächenstrukturierungen auf deren Biokompatibilität untersucht. Die Materialproben wurden in das intraorale Trägersystem integriert und von den Probanden in zwei getrennten Durchgängen je für zwölf und für 24 Stunden getragen. Nach Anfertigung digitaler Aufnahmen der Proben erfolgte die weitere Auswertung mit Hilfe eines Softwareprogrammes zur morphometrischen Bestimmung des mittleren prozentualen Anteils der Plaque-Biofilm-Areale. Ungetragene, autoklavierte Proben aller Gruppen wurden in einer Lösung humaner Osteoblast-like cells inkubiert. Die mitochondriale Aktivität der Zellen wurde am fünften Tag unter Zuhilfenahme des CellTiter-Glo[®] luminescent cell viability assay bestimmt. Die höchste Plaqueanlagerung nach jeweils beiden Zeitintervallen zeigte die SLA[®]- und die Promote[®]- Oberfläche. Beide Oberflächenmodifikationen haben innerhalb der untersuchten Testoberflächen mit 1,24 µm den höchsten Ra-Wert. Die Messung des Lumineszenzsignals (counts per second), als Zeichen mitochondrialer Aktivität zeigte folgende Reihenfolge abnehmender Zellaktivität: Polierte Oberfläche > gebeizte Oberfläche (MP) > modA (säuregeätzt/hydrophil) > modSLA (SLActive[®]) > A(säuregeätzt/hydrophob) > SLA[®] > Promote[®]. Auf Grundlage der hier vorgestellten Untersuchung können nachfolgende Schlussfolgerungen gezogen werden: Bei der frühen supragingivalen Biofilmformation scheint die Oberflächenrauigkeit den dominanteren Faktor gegenüber der freien Oberflächenenergie darzustellen. In der vorliegenden Untersuchung konnte kein deutlicher Einfluss der freien Oberflächenenergie beobachtet werden. Über die Zeit betrachtet scheint auch der Einfluss der Oberflächenrauigkeit an Dominanz zu verlieren. Hydrophile Oberflächen zeigten in der Untersuchung keine verbesserte Zellanlagerung. Die rein säuregeätzten Oberflächen scheinen einen günstigen Kompromiss zwischen Biokompatibilität und mäßiger Plaqueanlagerung darzustellen.

PD Dr. med. dent. Frank Schwarz