

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Jürgen Becker

Experimentelle periimplantäre Mukositis an
unterschiedlichen Implantatoberflächen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Theresa Iglhaut
2017

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Frank Schwarz

Zweitgutachterin: PD Dr. Rita Depprich

Meiner Familie gewidmet.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Schwarz F., Mihatovic I., Golubovic V., Eick S., Iglhaut T, Becker J. (2014) :
Experimental peri-implant mucositis at different implant surfaces.
J Clin Periodontol; 41: 513–520. doi: 10.1111/jcpe.12240.

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war die histologische und immunologische Untersuchung experimentell induzierter, periimplantärer Mukosiden an oberflächenverbesserten (= modifizierten, mod) hydrophilen Titanimplantaten.

Diese Untersuchungen wurden an sechs Foxhoundhunden im Oberkiefer mittels *Split-Mouth Design* durchgeführt. Dabei wurden jedem Tier vier unterschiedliche Implantate pro Kieferseite implantiert: drei Titan-Zirkonoxid-Implantate (TiZr), eines davon mit sandgestrahlter, angeätzter und chemisch modifizierter Oberfläche (= modSLA), das zweite mit einer maschinieren, angeätzten und chemisch modifizierten Oberfläche (= modMA) und das letzte mit einer maschinieren Oberfläche (= M) im transmukosalen Bereich.

Beim vierten Implantat pro Kieferhälfte handelte es sich um ein reines Titanimplantat mit einem maschinieren transmukosalen Anteil (= TiM).

An einer zufällig ausgewählten Kieferhälfte wurde eine experimentelle periimplantäre Mukositis durch Unterlassen der Plaquekontrolle (*NPC*) induziert. Auf der kontralateralen Seite wurde regelmäßig dreimal wöchentlich die Plaque mechanisch entfernt (*PC*).

Nach 16 Wochen wurden Gewebeproben zur histologischen und immunhistochemischen Untersuchung entnommen.

Das primäre Ergebnis der histologischen Analyse war die Etablierung und apikale Ausdehnung eines entzündlichen Zellinfiltrates (gemessen vom Mukosarand, PM-aICT). Immunhistochemisch wurde die Aktivität des Antigens CD68 untersucht, sowie die Aktivität von IL-1 β , IL-8, Matrixmetalloproteinase 8 (MMP-8) und Myeloperoxidase (MPO) in der periimplantären Sulkusflüssigkeit.

Die Analysen ergaben Durchschnittswerte von PM-aICT zwischen 1.86 mm (TiZrmodSLA) und 3.40 mm (TiM) in der *NPC*-Gruppe und zwischen 0.88 mm (TiZrmodSLA) und 2.08 mm (TiZrM) in der *PC*-Gruppe.

Die durchschnittlichen Werte von CD68, IL-1 β , IL-8, MMP-8 und MPO waren gleichmäßig zwischen den modifizierten Implantaten und den Kontrollimplantaten verteilt.

Im Rahmen dieser Studie lässt sich schlussfolgern, dass das Fortschreiten einer experimentellen periimplantären Mukositis an allen untersuchten Implantatoberflächen vergleichbar ist.

Abstract

Aim of the present study was to histologically and immunologically assess experimental periimplant mucositis at surface enhanced modified (mod) hydrophilic titanium implants.

Four different implants were inserted on each side of the maxilla of six Foxhound dogs in a split-mouth design:

Three titanium-zirconium alloy implants (TiZr), with either sand-blasted, acid etched and chemically modified (= modSLA), machined, acid etched and chemically modified (= modMA) or machined (= M) surfaces in the transmucosal portion and one titanium implant with a machined transmucosal portion (= TiM).

At one randomly selected side experimental mucositis was induced (= NPC, no plaque control) by omitting any kind of oral hygiene. The contra-lateral maxillary side received mechanical plaque removal three times per week (= PC, plaque control).

After a period of 16 weeks tissue biopsies were processed for histological and immunohistological analysis.

The primary outcome of the histological analysis revealed an apical extension of the inflammatory cell infiltrate measured from the mucosal margin (= PM-aICT).

The specific focus of the immunohistochemical analysis was the CD68 antigen reactivity. Furthermore the present study analysed peri-implant sulcus fluid for interleukin (IL-) 1b, IL-8, matrix metalloproteinase (MMP-) 8 and myeloperoxidase (MPO).

The analyses resulted in mean PM-aICT values between 1.86 mm (TiZrmodSLA) and 3.40 mm (TiM) in the NPC group, and between 0.88 mm (TiZrmodSLA) and 2.08 mm (TiZrM) in the PC group.

Mean CD68, IL-1b, IL-8, MMP-8 and MPO values were equally distributed between the investigated modified and control implants in both NPC and PC

groups.

In conclusion the present results have shown that the progression of experimental peri-implant mucositis was comparable at all implant surfaces investigated.

Abkürzungsverzeichnis

aICT	apikale Ausdehnung des Entzündungszellinfiltrats
aJE	apikale Ausdehnung des langen Saumepithels
BIC	<i>Bone-Implant-Contact</i> , Knochen-Implantat-Kontakt
CBI	am weitesten koronaler Anteil des Knochens mit Implantatkontakt
CD68	Glykoprotein, Marker für Makrophagenlinie
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GCF	<i>Gingival crevicular fluid</i> , Sulkusfluid
IL-1α	Interleukin 1 α
IL-1β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
MMA	Methylmethacrylat
MMP-8	Matrixmetalloproteinase 8
MPO	Myeloperoxidase
ng	Nanogramm = 10 ⁻⁹ g
NPC	<i>No plaque control</i> , keine Plaquekontrolle
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PC	<i>Plaque control</i> , Plaquekontrolle (3x pro Woche)
pg	Pikogramm = 10 ⁻¹² g
PM	Mukosarand
PNM	<i>Polymorphonuclear neutrophil</i> , polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt
Sa	arithmetischer Mittenrauwert
TNFα	Tumornekrosefaktor α

TiZrmodSLA	sandgestrahltes, angeätztes und chemisch modifiziertes Titan-Zirkonoxid-Implantat
TiZrmodMA	maschiniertes, angeätztes und chemisch modifiziertes Titan-Zirkonoxid-Implantat
TiZrM	maschiniertes Titan-Zirkonoxid-Implantat
TiM	maschiniertes Titanimplantat

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG 1

1.1	Hintergrund	1
1.2	Vergleich umgebender Gewebestrukturen von Zahn und Implantat.....	2
1.3	Biofilm am natürlichen Zahn	3
1.4	Biofilm am zahnärztlichen Implantat.....	6
1.4	Vergleich von parodontalen und periimplantären Erkrankungen.....	7
1.5	Oberflächenbeschaffenheit unterschiedlicher Implantatsysteme	9
1.6	Ziel der Studie	13

2. MATERIAL UND METHODEN 14

2.1	Tiere	14
2.2	Studiendesign	14
2.3	Zahnärztliche Implantate.....	15
2.4	Anästhesieprotokoll und Versuchsdurchführung.....	16
2.5	Entnahme der Proben	19
2.6	Immunologische Analyse	19
2.7	Histologische Aufbereitung.....	19
2.8	Vorgehen für die immunhistochemischen Untersuchungen	20
2.9	Histologische Analyse	21
2.10	Statistische Analyse.....	23

3. ERGEBNISSE 24

3.1	Klinische Beobachtungen.....	24
-----	------------------------------	----

3.2	Immunologische Analyse	24
3.3	Histomorphometrische Analyse.....	27
3.4	Immunhistochemische Analyse	34

4. DISKUSSION 38

4.1	Diskussion von Material und Methode.....	38
4.2	Limitationen der Studie	44
4.3	Weitere Forschung	45
4.4	Fazit.....	46

5. LITERATUR 47

6. ANHANG 56

6.1	Abbildungsverzeichnis.....	56
6.2	Tabellenverzeichnis	56

8. DANKSAGUNG 59

1. Einleitung

1.1 Hintergrund

Die orale Implantologie ist als Querschnittsfach mit einer oralchirurgischen, prothetischen und parodontologischen Komponente zu einer bedeutenden Therapieform innerhalb der Zahnmedizin geworden und steigert den Komfort und die Lebensqualität von Patienten (Nickenig *et al.* 2016). Forschungsergebnisse und die daraus resultierenden technischen Innovationen haben sich in den vergangenen Jahren deshalb neue Perspektiven für implantatgetragenen und somit festsitzenden Zahnersatz eröffnet. Laut der Deutschen Gesellschaft für Implantologie werden jährlich in Deutschland mehr als eine Millionen Implantate gesetzt – mit steigender Tendenz. Dieser breite Einsatz von implantatgetragendem Zahnersatz stellt jedoch auch hohe Anforderungen an die Nachsorge der Patienten (Abbas *et al.* 1984; Burt *et al.* 1994). Ihr Anteil dürfte sich durch Veränderung der Altersstruktur in vielen Populationen zukünftig vergrößern (Destatis 2009, S. Rupf *et al.* 2014), da höheres Lebensalter von Menschen deren Betreuungsbedarf steigert (Albandar *et al.* 2002). Es bedarf folglich einer regelmäßigen Kontrolle und Aktualisierung der Befunde und Anamnese, um eventuellen Veränderungen schnellstmöglich entgegenzuwirken.

Gemäß einer Studie des Instituts der Deutschen Zahnärzte von 2016 (Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie, DMS V) ist die Parodontitis (28,5%) neben Karies (29,5%) die häufigste Ursache für Zahnverlust in Deutschland. Ab dem 40. Lebensjahr ist die Parodontitis in dieser Untersuchung sogar der Hauptgrund des Zahnverlustes. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass sich die überwiegende Mehrheit der deutschen Bevölkerung in ihrem Mundgesundheitsverhalten, Kontrollorientierung und Inanspruchnahme professioneller Prophylaxeangebote bewusster ist, als es noch 2007 der Fall war.

Die Parodontopathien von Zähnen sind als akute oder chronische bakterielle Entzündungen des Zahnfleisches eine der häufigsten ubiquitären Erkrankung (Al Jehani 2014). Als bedeutende Risikofaktoren werden mangelhafte

Mundhygiene (Loesche 1979, Theilade 1986), Rauchen (Vouros *et al.* 2009, Kubota *et al.* 2011, Zini *et al.* 2011) und Diabetes (Graves *et al.* 2004, Campus *et al.* 2005, Nishimura *et al.* 2005) diskutiert. Im Mundraum besteht eine Vielfalt an Bakterien, welche in der Regel harmlos sind (Paster *et al.* 2006, Berezow et Darveau 2011). Werden diese jedoch nicht durch regelmäßige Hygienemaßnahmen entfernt, kommt es zur Ansammlung (Biofilmmakkumulation) und letztendlich zu entzündlichen Prozessen am Zahnfleischsaum (Haffajee et Socransky 1994, Moore et Moore 1994, Lovegrove 2004).

1.2 Vergleich umgebender Gewebestrukturen von Zahn und Implantat

Die Weichgewebsmanschette um Zähne oberhalb des Knochens wird als dento- gingivaler Verbund bezeichnet und hat eine Dimension ca. 3 mm (Gargiulo *et al.* 1991, Vacek *et al.* 1994). Die Breite von bindegewebigem Attachment und Epithelansatz beträgt zusammen im Durchschnitt ca. 2 mm und scheint eine Konstante darzustellen. Sie wird als „biologische Breite“ bezeichnet. In einer klinischen Untersuchung (Kois 1994) wurde die Weichgewebedimension vom Knochenrand bis Gingivarand als dento- gingivaler Komplex bezeichnet und in drei Gruppen unterteilt. Mittels einer klinischen Sondierung unter Lokalanästhesie bis zum Knochenrand, Sounding genannt, definierte er eine bukkale Sondierungstiefe von ca. 3 mm als *normal crest* Typ (85 % der Untersuchten), eine Sondierungstiefe von 3.5- 4 mm als *low crest* Typ (13 % der Untersuchten) und eine Sondierungstiefe von 2 – 2.5 mm als *high crest* Typ (2 % der Untersuchten).

Das Saumepithel ist über Hemidesmosomen physikalisch mit der Zahnoberfläche (Schmelz und Wurzelzement), das Bindegewebe über radiär einstrahlende Kollagenfaserbündeln, den Sharpeyschen Fasern, mit dem Wurzelzement mechanisch und chemisch verbunden (Lindhe et Lang, 2015). Diese Verbindung wird als Attachment des gingivalen Weichgewebes an der Wurzeloberfläche bezeichnet.

Das Epithel steht demnach in einer Distanz von etwa 1 mm zum Knochen. Dieser Gewebeansatz am Wurzelzement dient der Abdichtung und scheint die Abwehr eindringender Mikroorganismen zu unterstützen.

Das periimplantäre Weichgewebe zeigte im Tierversuch ähnliche Dimensionen von 3 - 3.5 mm (Berglundh *et al.* 1991), ein Vergleich von drei verschiedenen Implantatsystemen ergab keine Unterschiede (Abrahamsson *et al.* 1996). Eine epitheliale Anlagerung an Titanoberflächen konnte ebenfalls über Hemidesmosomen nachgewiesen werden (Lindhe et Lang, 2015). Das Fehlen von Wurzelzement bedingt jedoch eine unterschiedliche Anlagerung von Bindegewebe. Die kollagenen Faserbündel sind im Gegensatz zum Zahn nicht radiär, sondern mehr parallel zur Implantatoberfläche ausgerichtet (Berglundh *et al.* 1991). Eine mechanische und chemische Verbindung zur Titanoberfläche ähnlich zu der des Zahnes konnte nicht nachgewiesen werden. Vielmehr findet sich eine 20 nm dicke Grenzschicht von Proteoglykanen. Diese eher schwächere Verbindung wird als Adhäsion bezeichnet. Unterschiede ergeben sich auch in der Zusammensetzung des Bindegewebes. Um Zähne beträgt der kollagene Faseranteil ca. 60 % und der Fibroblastenanteil zwischen 5 und 15 %, um Titanimplantate findet sich ein kollagener Faseranteil von ca. 85 % und ein Fibroblastenanteil von nur 1 – 3 %. Dieses Gewebe ähnelt narbigen Bindegewebsstrukturen. Blutgefäße sind im periimplantären Weichgewebe ebenfalls reduziert, gänzlich fehlt die Blutversorgung des Parodontalspalt (Berglundh *et al.* 1994). Dies könnte eine Schwächung der Immunabwehr um orale Implantate bewirken.

In einer Tierstudie wurde gezeigt, dass sich sowohl um chemisch modifizierte, säuregeätzte als auch chemische modifizierte, sandgestrahlte und säuregeätzte Titanoberflächen partiell ein gut vaskularisiertes, subepitheliales Bindegewebe mit teilweise radiär zur Implantatoberfläche ausgerichtete Kollagenfasern entwickeln kann (Schwarz *et al.* 2007). Eine hohe Hydrophilie von Oberflächen scheint die Weichgewebeintegration zu begünstigen. Die mechanische Stabilität bei einer Sondierung erwies sich in einer weiteren Untersuchung jedoch als sehr gering (Schwarz *et al.* 2010).

1.3 Biofilm am natürlichen Zahn

Ältere Forschungsarbeiten zeigen, dass die Grenzflächen des Körpers einer Ansammlung von adhärennten Mikroorganismen ausgesetzt sind, eingebettet in eine extrazelluläre polymere Matrix (Costerton *et al.* 1995). Diese besteht

primär aus Polysacchariden, Proteinen, Glycolipiden und bakterieller DNA. und ermöglicht die Aggregation von Mikroorganismen zu komplexen symbiotischen Gemeinschaften (Flemming et Wingender 2010). Grundlage der Bildung dieser synergistischen Mikrokolonien ist die feste Adhäsion der extrazellulären Matrix an Oberflächen und deren intermikrobielle Kohäsion. Diese Organisationsform im Biofilm erhöht die Widerstandsfähigkeit von Mikroorganismen gegenüber pH-Wert-Schwankungen, antibakteriellen Agenzien (Antibiotika, Desinfizientien) und mechanischen Abscherkräften (Xiao *et al.* 2012). In der Mundhöhle werden Biofilme auf epithelialen Oberflächen der Weichgewebe (Gingiva, Mukosa von Wange, Mundboden, Zunge und Gaumen) und Festkörperoberflächen gebildet. Durch eine konstante Abschilferung dieser Oberflächen wird eine zu starke Bakterienakkumulation verhindert (Hannig et Hannig 2009). Da jedoch Zähne in der Mundhöhle eine harte und nicht abschilfernde Oberfläche besitzen, sind diese oftmals von großen Bakterienmengen besiedelt.

Die Biofilmbildung auf Zahn- und Implantatoberflächen zeigt grundsätzlich keine Unterschiede (Lang *et al.* 2011). Sie wird durch Adsorption von Proteinen, Glykoproteinen, Lipiden und anderen Makromolekülen des Speichels initiiert und als Pellicel bezeichnet (Hannig et Joiner 2006). Diese Bioadhäsion erfolgt durch elektrostatische, thermodynamische und hydrophobe Wechselwirkungen und entwickelt nachfolgend eine komplexe, heterotype Proteinaggregation. Über den Speichel kommt es zur Kolonisation von Bakterien und der Ausbildung einer Biofilmmatrix aus extrazellulären Polysacchariden (Marsh et Martin 2009). Die anfängliche mikrobielle Diversität nimmt mit zunehmender Reife des Biofilms ab. Dieser Prozess kann als hochgradig geordneter sequenzieller Vorgang angesehen werden (Kolenbrander *et al.* 2006).

Bei gesunden Verhältnissen besteht ein Gleichgewicht zwischen Mikroflora und Wirtsorganismus. Die sogenannte residente Mikroflora wird der körpereigenen Abwehr zugeordnet und verhindert die Ausbreitung pathogener Mikroorganismen im Körper. Veränderungen von extrinsischen und intrinsischen Faktoren können die Balance zwischen oralem Biofilm und Wirtsorganismus negativ beeinflussen (Marsh et Devine 2011). Dazu gehören beispielsweise eine insuffiziente Mundhygiene, übermäßiger Zucker- und Nikotingenuss sowie ein geschwächtes Immunsystem.

Die Präsenz von und die Stoffwechselfvorgänge in pathogenem Biofilm gelten als Hauptursache nicht nur für Karies, sondern auch für parodontale und periimplantäre Erkrankungen (Bowen *et al.* 2011, Darveau 2010). Klassische Experimente zeigen, dass eine große Ansammlung von Bakterien auf der Zahnoberfläche eine reproduzierbare entzündliche Reaktion des benachbarten Gewebes erzeugt (unspezifische Plaque-Hypothese). Entfernt man jedoch die Plaque vollständig, kommt es zu einer Regeneration des Gewebes und die klinischen Anzeichen einer Entzündung verschwinden (Loe *et al.* 1965, Theilade *et al.* 1986). Eine ähnliche Ursache-Wirkungsbeziehung lässt sich auch im Falle einer periimplantären Mukositis nachweisen (Pontoriero *et al.* 1994). Im Gegensatz dazu zeigen Untersuchungen, dass bei Karies und Parodontitis bestimmte Keime in stark erhöhter Anzahl gefunden werden (Loesche 1979). Dies wurde als spezifische Plaque-Hypothese bezeichnet. In der sogenannten ökologischen Plaque-Hypothese wurden Faktoren wie Ökologie der Mundhöhle und spezielle Zusammensetzungen des bakteriellen Biofilms als ursächlich für die Entstehung einer Krankheit postuliert (Marsh 1994).

Laut der sechsten Edition des *Clinical Periodontology and Implant Dentistry* (Lindhe et Lang 2015) hat 1mm³ Plaque ein Gewicht von circa 1mg und enthält mehr als 10⁸ Bakterien. Auch wenn bereits über 300 Spezies bestimmt werden konnten, ist es immer noch nicht möglich alle vorhandenen zu bestimmen. Im Vergleich zu parodontal gesunden und an Parodontitis erkrankten Patienten enthält die Mikrobiota bei periimplantären Läsionen hauptsächlich gram-negative Spezies und zeigt eine größere Diversität. Parodontopathogene Bakterien wie *Porphyromonas gingivalis* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* kommen in nur geringen Anteil vor, wohingegen *Chloroflexi*, *Tenericutes*, *Parvimonas micra*, *Peptostreptococcus stomatis*, *Pseudoramibacter alactolyticus* und *Solobacterium moorei* ausschließlich bei periimplantären Erkrankungen nachgewiesen werden konnten (Koyanagi *et al.* 2010, Koyanagi *et al.* 2013).

Die Abwesenheit dieser Bakterien ist mit optimaler Gesundheit der Dentition und der umgebenden Weichgewebe assoziiert. Eine regelmäßige tägliche Plaqueentfernung durch mechanische Reinigung der Zahnoberflächen scheint irreversible Erkrankungen wie die Parodontitis an natürlichen Zähnen beziehungsweise eine Periimplantitis an Implantaten vermeiden zu können und

ist somit die wichtigste Maßnahme zur Prävention (Skudutyte-Rysstad *et al.* 2007, Hugoson *et al.* 2008, Renvert et Quirynen 2015). Die oben beschriebenen Bakterienstämme produzieren eine Vielzahl irritierender Stoffe wie Endotoxine, Säuren und Antigene, die bei längerer Einwirkung die Zahnhartsubstanz irreversibel auflösen und die Stützgewebe zerstören. Auch wenn die Gingivitis den umliegenden Knochen nicht befällt, somit also nicht zum Attachmentverlust des Zahnes führt, ist sie dennoch Voraussetzung für die Entstehung und somit Vorstufe der Parodontitis mit möglichem Zahnverlust (Loesche 1979, Theilade 1986).

1.4 Biofilm am zahnärztlichen Implantat

Hauptursache für die Entstehung von periimplantären Erkrankungen ist die bakterielle Besiedlung der Implantatoberflächen und die darauffolgende Biofilmbildung (Quirynen *et al.* 2002). Die Ausbildung von Biofilm ist eng mit der Anwesenheit von *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Prevotella intermedia* verbunden (Leonhardt *et al.* 1999; Shibli *et al.* 2007).

Zahnärztliche Implantate in der Mundhöhle werden direkt nach ihrer Exposition von einer organischen Schicht benetzt, welche größtenteils aus Pellicel besteht. Dieser Vorgang bildet den Ausgangspunkt der bakteriellen Besiedlung (Fürst *et al.* 2007; Salvi *et al.* 2008). Verschiedene Implantatoberflächen bieten unterschiedliche Bedingungen für die bakterielle Adhäsion und Biofilmbildung (Rasperini *et al.* 1998). So zeigte eine Studie von John *et al.* (2016), dass eine hydrophile Oberfläche eine langsamere und signifikant geringere Biofilmbildung aufwies. Diese Ergebnisse betätigen frühere Untersuchungen (John *et al.* 2015a). Hydrophile Implantatoberflächen scheinen im Vergleich zur Rauigkeit bei der Biofilmbildung eine bedeutendere Rolle zu spielen (Bollen *et al.* 1997; Zitzmann *et al.* 2002). Ihr Einfluss scheint jedoch nicht so gravierend zu sein, wie zuvor angenommen (Rimondini *et al.* 1997).

In der Tat ist die initiale Biofilmbildung viel komplexer und wird beeinflusst von einer Kombination aus Hydrophilie, Oberflächenenergie und Rauigkeit. Nach 48 Stunden ist die Oberfläche eines zahnärztlichen Implantates bereits

vollständig von anfänglichem Biofilm bedeckt (Siegrist *et al.* 1991; Rimondini *et al.* 1997; Schwarz *et al.* 2005; John *et al.* 2013, 2015b, 2016).

Maschinierete Oberflächen mit einer glatten Oberfläche zeigten in histomorphometrischen Untersuchungen die größte Biofilmmakkumulation (Schwarz *et al.* 2007; John *et al.* 2015a; John *et al.* 2016). Im Falle einer stetigen Plaqueakkumulation kommt es folglich zuerst zu einer reversiblen periimplantären Mukositis und im weiteren Verlauf ohne eingreifende Hygienemaßnahmen zu einer irreversiblen Periimplantitis (Skudutyte-Rysstad *et al.* 2007, Hugoson *et al.* 2008, Renvert et Quirynen 2015).

1.4 Vergleich von parodontalen und periimplantären Erkrankungen

Löe *et al.* (1965) haben bereits eingehend eine direkte Korrelation zwischen dem Grad der Plaqueentwicklung und der Entstehung einer Gingivitis beschrieben. Allerdings kann sich die Wirtsantwort auf die bakterielle Besiedlung durch Plaque unterschiedlich äußern. So kann der Krankheitsverlauf zum Beispiel durch den allgemeinmedizinischen Zustand eines Patienten und bestimmte Lebensphasen mit Hormonumstellungen deutlich beeinflusst werden (Trombelli *et al.* 2004a, 2008).

Die Entwicklung der Gingivitis und auch der Parodontitis wurde nach Page und Schroeder (1976) grob in eine „initiale“, „frühe“ und eine „etablierte“ Läsion eingeteilt. Nach einer 2 – 4-tägigen Plaqueakkumulation spricht man von einer Initialläsion (Lindhe et Lang 2015). Es bestehen noch keine klinisch auffälligen Entzündungsparameter, die Läsion lässt sich nur histologisch feststellen. Charakteristisch für die Initialläsion ist ein leichtes Ödem mit einer gesteigerten Sulkusflussrate (*GCF flow*), der Verlust von Bindegewebe und eine Anhäufung polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (*PNMs*).

Die „frühe“ Läsion entwickelt sich nach ungefähr 4 bis 7 Tagen ungestörter Plaqueakkumulation (Lindhe et Lang 2015). Deren Mikroorganismen bewirken eine Gewebedestruktion. Dies geschieht direkt durch die Freisetzung von Endotoxinen, Lipopolysacchariden und Enzymen und indirekt durch eine Aktivierung der Immunantwort des Wirtsorganismus (Kinane *et al.* 2008). Neben den *PNMs* sind in diesem Stadium eine große Anzahl von Leukozyten und Makrophagen nachweisbar. Diese Abwehrzellen exprimieren verschiedene

Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF α . Diese Zytokine mobilisieren Entzündungszellen zur Freisetzung von proteolytischen Enzymen (Kollagenasen, Elastasen, MMPs, MPOs) und verursachen somit den Abbau der extrazellulären Matrix des Bindegewebes (Lang et al. 2011). Weiter bewirken verschiedene bakterielle Antigene die Produktion von Antikörpern und aktivieren das Komplementsystem.

Wichtige Parameter der frühen Läsion sind eine gesteigerte Flüssigkeitszunahme im betroffenen Gewebe und eine deutliche Zunahme der Sulkusfluidrate. Dieses Fluid verändert sich in diesem Zustand von einer ursprünglich harmlosen interstitiellen Flüssigkeit zu einem entzündlichen Exsudat (Ödem). Nach 12 – 21 Tagen etabliert sich aus dieser „frühen“ Läsion ein perivaskuläres Infiltrat, das aufgrund seiner Größe klinisch nachweisbar ist. Zu diesem Zeitpunkt sind bereits bis zu 70 % des Kollagens innerhalb des infiltrierten Gewebes abgebaut (Page et Schroeder 1976).

Die „etablierte“ Läsion unterscheidet sich histologisch durch eine große Anzahl an B-Zellen und Plasmazellen. Wird der Biofilm mechanisch entfernt, kommt es zur Gewebereparation ohne dass ein permanenter Schaden verbleibt. Finden bis zu diesem Zeitpunkt keine Mundhygienemaßnahmen statt, kann die Gingivitis in eine Parodontitis übergehen (Lindhe et Lang 2015). Durch den Abbau von Bindegewebe kommt es zum Verlust des bindegewebigen Attachments am Zahn. Als Folge daraus migriert das Saumepithel nach apikal, es kommt zur Ausbildung einer parodontalen Tasche.

Die Bakterien in der dentalen Plaque sind die Ursache beider Erkrankungen (Lindhe et Lang 2015). Zwar ist die Gingivitis die Vorläuferläsion der Parodontitis, doch entwickelt sich nicht aus jeder Gingivitis eine Parodontitis (reversible Läsion). Abhängig von der Stärke der Immunabwehr des Patienten kann sich jedoch eine Parodontitis mit Verlust von umgebendem Weichgewebe und Knochen sowie einem nach apikal verschobenen Saumepithel ausbilden (Cullinan *et al.* 2001, Seymour et Taylor 2004).

Die periimplantäre Mukositis ist als eine entzündliche Läsion der Mukosa ohne Knochenverlust definiert (Lindhe et Meyle 2008). Lindhe *et al.* (2008) formulierten im *Consensus of the Sixth European Workshop on Periodontology*, dass die periimplantäre Mukositis 80 % der implantologisch versorgten Patienten und 50 % der gesetzten Implantate betrifft.

Die Reaktion auf den Biofilm um ein Implantat herum, unterscheidet sich nicht wesentlich von jener auf den Biofilm eines normalen Zahnes (Heitz-Mayfield 2008, Lang *et al.* 2011). In präklinischen Studien an Hunden fand sich nach 3 Wochen ungestörter Biofilmbildung ein identisch entzündliches Zellinfiltrat als Folge insuffizienter Mundhygiene (Berglundh *et al.* 1992, Ericsson *et al.* 1992). Jedoch konnte im Weichgewebe um Implantate eine tiefere apikale Ausdehnung des entzündlichen Zellinfiltrates und ein größerer Umfang der Läsion festgestellt werden (Ericsson *et al.* 1992). Diese Folgen einer verstärkten Immunabwehr konnte an verschiedenen Implantatsystemen demonstriert werden (Abrahamsson *et al.* 1998).

In zwei kontrollierten klinischen Studien wurde der Effekt einer dreiwöchigen Biofilmbildung auf die Entstehung einer Immunantwort untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Entzündungszellinfiltrate bei der Ausbildung einer Gingivitis und periimplantären Mukositis keine Unterschiede aufweisen (Pontoriero *et al.* 1994; Zitzmann *et al.* 2001, 2002). Damit konnte nachgewiesen werden, dass eine Ursache-Wirkungs-Beziehung zwischen der Biofilmbildung und der Entstehung einer periimplantären Mukositis ähnlich wie bei einem experimentellen Gingivitismodell besteht (Løe *et al.* 1965). Im Hinblick auf die Pathogenese und Diagnose unterscheiden sich die Gingivitis und die periimplantäre Mukositis folglich nicht elementar.

1.5 Oberflächenbeschaffenheit unterschiedlicher Implantatsysteme

Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Einheilung eines zahnärztlichen Implantates bezeichnet man als Osseointegration. Diese ist definiert als direkter funktioneller und struktureller Verbund zwischen dem organisierten, lebenden Knochen und der Oberfläche eines Implantates (Branemark 1983). Im Prozess der stabilen Einheilung eines Implantates sind zwei Faktoren von besonderer Bedeutung: die Primär- und Sekundärstabilität des Implantates. Die Primärstabilität im Knochen wird zum einen durch Klemmwirkung, Gewindegeometrie und Reibung während der Implantatinsertion erreicht. Von Bedeutung ist hierbei die passgenaue und formkongruente Aufbereitung des Implantatbettes, um eine Retention im

Knochen zu erhalten. Für den Erfolg der Primärstabilität sind sowohl Knochenqualität als auch –quantität entscheidend. Mikrobewegungen sollen durch diese primäre Stabilität verhindert werden, um eine bindegewebige Einheilung des Implantates zu vermeiden. Ziel ist die knöcherne Einheilung des Implantates (Weibrich et Wagner 2004, Watzek et Mailath-Pokorny 2000). Die Sekundärstabilität beschreibt die Stabilität bezogen auf die biologische Retention des enossalen Implantates durch die Osseointegration. Knochen und Implantatoberfläche sind dabei mechanisch verzahnt und durch eine biologische Adhäsion miteinander verbunden. Um eine ideale Sekundärstabilität zu erreichen, sollen während der Heilungsphase, in welcher sich der Knochen umbaut und Kontaktbereiche mit dem Implantat ausbildet, möglichst gering belastet und Relativbewegungen vermieden werden.

Um den Vorgang der Osseointegration zu beschleunigen und deren Qualität zu steigern wird die Oberfläche von Implantaten permanent neu untersucht und verbessert. Dabei wird die Oberfläche nicht nur chemisch verändert – zum Beispiel durch Integration anorganischer Bestandteile auf oder in die Titanoxidschicht –, sondern auch physikalisch zur Veränderung der Rauigkeit modifiziert. Durch bestimmte elektrochemische Prozesse an der Titanoberfläche können beide Techniken auch kombiniert werden (Ehrenfest et al. 2011).

Vergleicht man eine raue mit einer maschinieren Implantatoberfläche, zeigen sich histomorphometrisch signifikant bessere Knochen-Implantat-Kontakte (BIC) bei einer rauen Oberfläche (Lazarra *et al.* 1999). Laut dem Konsensusreport von Lang et Jepsen (2009) ermöglicht eine „moderat raue beziehungsweise raue Implantatoberfläche eine verbesserte Integration im Knochen“.

Wichtig ist jedoch, neben der Betrachtung der Implantatoberfläche, auch die Abutments und ihre Variationen genauer zu analysieren.

In diversen klinischen Studien in einem Beobachtungszeitraum von vier Wochen bis fünf Jahren (Wennerberg *et al.* 2003, Wennström *et al.* 2004, Zetterqvist *et al.* 2010) konnten keine erhöhten Risiken für periimplantäre Erkrankungen durch oberflächenveränderte Abutments festgestellt werden.

Zitzmann *et al.* untersuchten 2002 präklinisch die Weichgewebsreaktion der periimplantären Mukosa auf die Plaqueakkumulation an Abutments mit unterschiedlicher Oberflächenbeschaffenheit. Es konnten keine wesentlichen Unterschiede in der Plaquebildung festgestellt werden. Dies gilt auch für die Ergebnisse einer ähnlichen präklinischen Studie (Pongnarisorn *et al.* 2007).

Die Oberflächenbeschaffenheit von Implantaten und Implantatabutments scheint also keinen Einfluss auf die Entstehung einer periimplantären Erkrankung zu haben (Bollen *et al.* 1996, Zitzmann *et al.* 2002, Wennerberg *et al.* 2003, Renvert *et al.* 2011).

In anderen, teilweise aktuelleren experimentellen Studien wurde speziell die Weichgewebeadhäsion an chemisch modifizierten, hydrophilen Implantatoberflächen untersucht (Schwarz *et al.* 2007a,b, 2009, 2010, 2013).

Bei den mikrorauen Implantaten wird auf der Titanoberfläche durch eine grobe Sandstrahlung eine Makrorauheit erzeugt, die anschließend durch Säureätzung in eine Mikrorauheit verändert wird. Die hydrophile und chemisch aktive Oberfläche soll die Anlagerung von Zellen verbessern und die Sekundärstabilität sublimieren und beschleunigen. Die größere zugängliche Oberfläche ermöglicht eine verbesserte Blutproteinadsorption und erleichtert die Bildung des Fibrinnetzwerkes, was für eine optimale Einheilung erforderlich ist (Rupp *et al.* 2006, De Wild 2005, Maniura 2013).

Der Aufbau eines funktionierenden Gefäßsystems ist für eine erfolgreiche Osseointegration von großer Bedeutung. Chemisch modifizierte, hydrophile Oberflächen scheinen eine Stimulation des Blutgefäßwachstums zu ermöglichen (Schwarz *et al.* 2008, Rausch-fan *et al.* 2008).

Ein wichtiger Faktor für die Osseointegration eines Implantates ist neben der Blutversorgung der Aufbau der Knochenbasis. In einer präklinischen Studie (Schwarz *et al.* 2007) wurde an hydrophilen Oberflächen ein höherer Mineralisierungsgrad der Knochenzellen beschrieben und in einer in-vitro-Studie validiert (Maniura 2013). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass diese Oberflächen den Heilungsprozess positiv beeinflussen. Bereits zwei Wochen postoperativ konnte histologisch bereits ein größerer Knochen-Implantat-Kontakt (BIC) festgestellt werden, als zu Beginn. Dieser hatte sich nach vier Wochen signifikant erweitert (Lang *et al.* 2011).

Im Jahre 2009 wurde eine neue Titan-Zirkonium Legierung (TiZr) eingeführt, um physikalische Eigenschaften wie die Dauer- und Zugfestigkeit von Implantaten (Bernhard *et al.* 2009) zu verbessern. Diese Legierung besteht in der Regel aus 85% Titan und 15 % Zirkonium. Sie soll die oben genannten Eigenschaften vergleichbarer Titan-Implantate (Gottlow *et al.* 2012) übersteigen. Titan-Zirkonium (TiZr) Implantate scheinen mechanisch stärker belastbar zu sein und eignen sich als kleinere durchmesserreduzierte Implantate für minimalinvasive Techniken, von denen besonders Patienten mit einem begrenzten Knochenangebot profitieren können (Altuna *et al.* 2016).

Hydroxylierte Oberflächen mit einer speziellen Nanostruktur (Wennerberg *et al.* 2012), einer hohen Benetzbarkeit (Rupp *et al.* 2011) und einer erweiterten Titandioxid-Oberfläche (Zhao *et al.* 2005) zeigten sowohl qualitativ, als auch quantitativ nach einer Einheilungsphase von sechs Monaten einen besseren epithelialen und subepithelialen Bindegewebekontakt an der transmukosalen Schnittstelle (Schwarz *et al.* 2010, 2013). Obgleich die festgestellten Ergebnisse nicht direkt mit der rauen Oberflächenbeschaffenheit in Verbindung gebracht werden konnten, beeinflusste offensichtlich das Abutmentmaterial (Titan-Zirkon Legierung > Titan) die quantitative Gewebefixierung (Schwarz *et al.* 2007a,b, 2013).

Als wichtiger Parameter für die periimplantäre Gesundheit gilt die Mundhygiene des Patienten. Ist die Mundhygiene eingeschränkt oder mangelhaft, kommt es zu einer erhöhten Plaqueakkumulation und schließlich zu einer periimplantären Läsion (Zetterqvist *et al.* 2010). Die Anwesenheit von Mikroorganismen und somit des subgingivalen Biofilms, der mit einer Parodontitis assoziiert wird, sind folglich eine grundlegende Voraussetzung für die Entstehung periimplantärer Erkrankungen (van Winkelhoff *et al.* 2000, Quirynen *et al.* 2006).

Sowohl die chemische Zusammensetzung, als auch die Rauigkeit der Implantatoberfläche können einen Einfluss auf die Qualität und Quantität der Plaqueformation haben (Teughels *et al.* 2006).

John *et al.* (2013) zeigten in einer Studie, dass modifizierte Oberflächen mit einer langsameren Biofilmentstehung verknüpft sein können.

1.6 Ziel der Studie

In einer tierexperimentellen Untersuchung sollte die Progression einer experimentell induzierten, periimplantären Mukositis an oberflächenmodifizierten und konventionellen zahnärztlichen Implantaten histologisch und immunologisch bewertet werden.

2. Material und Methoden

Die vorliegende Studie wurde unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2012.A012 registriert und genehmigt.

2.1 Tiere

Die Studie wurde an sechs Foxhoundhunden durchgeführt. Davon waren vier männlich und zwei weiblich. Das durchschnittliche Gewicht betrug dabei $35,6 \pm 3,1$ kg, wobei alle Hunde eine komplett ausgebildete Dentition besaßen.

Die Hunde wurden einmal täglich mit weicher Kost gefüttert und mit unbegrenzter Trinkwassermenge versorgt. Genehmigt wurde das Studienprotokoll durch das Landesamt für Natur und Verbraucherschutz in Recklinghausen (Deutschland).

Der experimentelle Teil der Studie begann nach einer Eingewöhnungsphase von 4 Wochen.

2.2 Studiendesign

Es fand eine Unterteilung in drei Phasen statt: Sowohl im Ober-, als auch im Unterkiefer wurden die ersten, zweiten, dritten und vierten Prämolaren sowie die ersten beiden Molaren extrahiert (Phase 1). Nach einer Heilungsphase von acht Wochen wurden vier einteilige Titanimplantate gesetzt, davon waren drei als Test- und eines als Kontrollobjekt vorgesehen. Die Zuordnung in eine der vier experimentellen Seiten jeder Kieferhälfte erfolgte willkürlich. Jedem Hund wurden acht Implantate inseriert. Es schloss sich eine vierwöchige Einheilungsphase dieser transmukosalen Implantate an (Phase 2).

Nachfolgend wurde eine experimentelle periimplantäre Mukositis induziert. Entsprechend dem *Split-Mouth Design* wurde auf einer Seite des Kiefers eine ungehinderte Plaqueakkumulation zugelassen (*no plaque control – NPC*) und auf der kontralateralen Kieferseite die Plaque dreimal pro Woche entfernt (*plaque control – PC*) (Phase 3). Nach 16 Wochen wurden die Tiere eingeschläfert.

2.3 Zahnärztliche Implantate

In der vorliegenden Studie wurden einteilige Soft Tissue Level Implantate (RN, Standard plus, Institut Straumann AG, Basel, Schweiz), mit einem Durchmesser von 3,3 mm und einer Länge von 8 mm angefertigt und jedem Tier im Oberkiefer inseriert.

Bei der Testgruppe handelte es sich um eine Titan-Zirkonium-Legierung (TiZr, Roxolid®, Institut Straumann AG, Basel, Schweiz). Untersucht wurden mit starkem Abrieb sandgestrahlte und im transmukosalen Bereich angeätzte Implantate (TiZrmodSLA, n=12), im transmukosalen Bereich angeätzte Implantate (TiZrmodMA, n= 12) und Implantate mit einem bearbeiteten transmukosalen Bereich (TiZrM, n= 12).

Als Kontrollgruppe implantierte man Implantate mit transmukosal bearbeitetem Bereich (TiM, Institut Straumann AG, Basel, Schweiz, n= 12).

Tabelle 1

Übersicht der verwendeten Implantatmaterialien mit zugehörigem Sa-Wert

	Material	Sa-Wert	sandgestrahlt	transmukosal angeätzt	transmukosal maschiniert
TiZrmodSLA	Titan- Zirkonium	1.033 ± 0.10 µ	•	•	
TiZrmodMA	Titan- Zirkonium	0.218 ± 0.011 µ		•	
TiZrM	Titan- Zirkonium	0.093 ± 0.010 µ			•
TiM	Titan	0.105 ± 0.009 µ			•

2.4 Anästhesieprotokoll und Versuchsdurchführung

Bei jedem chirurgischen Eingriff wurde ein standardisiertes Anästhesieprotokoll geführt. Als intramuskuläres Sedativum kam Acepromazin (Vetranquil 1%, Ceva Tiergesundheit, Düsseldorf, Deutschland) mit einer Dosis von 0,01mg/kg zum Einsatz. Nachfolgend wurde die Anästhesie durch 21,5 mg/kg Thiopentalnatrium (Trapanal 2,5%, Atlanta GmbH, Konstanz, Deutschland) eingeleitet und eine Inhalationsnarkose mittels Lachgas, Isofluran und Sauerstoff durchgeführt.

Während der Anästhesie erhielten alle Tiere intravenös eine konstante Ringer-Laktat-Lösung, um eine angemessene Hydratation zu gewährleisten.

Zur Schmerzausschaltung und zusätzlichen Sedierung verabreichte man den Tieren intravenös entweder 0,1 mg/kg Piritramid (Dipidolor, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland), oder 0,15 mg/kg des Opioids Methadon.

Als zusätzliche intraoperative Analgesie erfolgte eine Injektion von 4,5 mg/kg Carprofen (Rimadyl, Pfitzer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland), postoperativ wählte man zur Schmerzausschaltung 0,01 mg/kg Buprenorphin für die ersten beiden Tage bei zweimal täglicher subkutaner Applikation und 4,5 mg/kg Carprofen per os Tag 1-7 postoperativ.

Beim ersten chirurgischen Eingriff entfernte man durch minimal-invasives Vorgehen sorgfältig bilateral sowohl die Prämolaren, als auch die ersten und zweiten Molaren im Ober- und Unterkiefer. Die Wundadaption erfolgte je nach Bedarf durch resorbierbare Matratzennähte.

In den Unterkiefern wurde eine getrennte experimentelle Untersuchung durchgeführt.

In der zweiten Operation wurden die jeweiligen Stellen im Oberkiefer durch Vollschichtlappen freigelegt. Daraufhin erfolgte unter Berücksichtigung des Bohrprotokolls und nach Empfehlung des Herstellers die Aufbereitung des Implantatbetts.

Spezielle Sorgfalt galt der Positionierung der Implantate. Jede Seite des Implantats musste mit einem Abstand von mindestens 10 mm voneinander

lokalisiert sein. Außerdem sollten die Implantate von mindestens 1 mm starkem Knochen sowohl vestibulär, als auch oral umgeben sein, um einen Knochenwanddefekt mit eventuellem Verlust des Implantats zu verhindern. Die Implantatschulter wurde dabei so positioniert, dass der Grenzbereich zwischen dem transmukosalen und dem enossalen Bereich bestenfalls mit dem geglätteten Alveolarkamm zusammentrifft. (Abb. 1a)

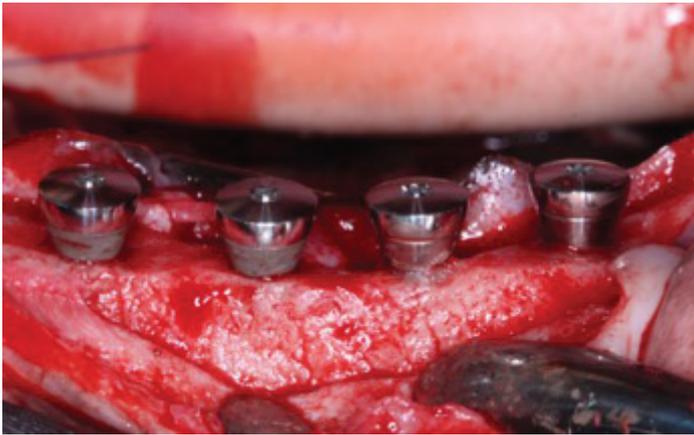


Abb. 1a

Der transmukosale Bereich eines jeden Implantats (1.8 mm) wurde gleichmäßig in einer subkrestalen Position freigelegt. Von links nach rechts: TiZrmodSLA, TiZrmodMA, TiM, TiZrM



Abb. 1b

Klinische Darstellung nach 16 Wochen ungehinderter Plaquebildung (NPC – „no plaque control“)



Abb. 1c

Klinische Darstellung nach 16 Wochen gehinderter Plaquebildung (PC – „plaque control“, bedeutet dreimal wöchentlich mechanische Plaqueentfernung)

Abbildung 1 a-c

Postoperativer Zustand nach Implantatinsertion

Abschließend brachte man die jeweiligen Gingivaformer ein und repositionierte die Mukoperiostlappen mit resorbierbaren Matratzennähten (Resorba®, Nürnberg, Deutschland), um eine transmukosale Einheilung zu ermöglichen.

Alle operativen Eingriffe wurden durch einen erfahrenen Operateur durchgeführt.

Während der vierwöchigen Einheilungsphase wurden bei allen Tieren postoperativ dreimal pro Woche sowohl alle Implantate als auch die verbliebenen Zähne mechanisch gereinigt.

Nachfolgend erzeugte man eine randomisierte Liste (RandList®, DatInf GmbH, Tübingen, Deutschland) und teilte beide Hälften der Maxilla eines jeden Hundes entweder der Gruppe ohne Plaquekontrolle (= *NPC, no plaque control*) oder der mit Plaquekontrolle einschließlich dreimal wöchentlich mechanischer Plaqueentfernung (= *PC, plaque control*) zu.

2.5 Entnahme der Proben

Durch eine Überdosis an Natriumpentobarbital (3%) wurden die Tiere nach 16 Wochen euthanasiert.

Die Mundschleimhaut wurde durch Perfusion einer 10%igen, gepufferten Formalinlösung fixiert, welche durch die Halsschlagadern verabreicht wurde.

Anschließend zerteilte man die Kiefer und entnahm Blöcke mit den experimentellen Proben. Alle entnommenen Proben wurden vier bis sieben Tage in 10%iger, neutral-gepufferter Formalinlösung fixiert.

2.6 Immunologische Analyse

Bevor die Mundschleimhaut durch Formalin perfundiert wurde, wurde mit Hilfe von sterilen Papierstreifen (Periopaper; Oraflow Inc., Smithtown, NY, USA) Sulkusfluid im interproximalen Bereich jeder Implantatseite entnommen. Die Papierstreifen wurden dabei am Eingang des Spaltes zwischen periimplantärer Mukosa und Implantat positioniert und für 30 Sekunden dort belassen. Anschließend wurden die Papierstreifen in vorgesehene Röhrchen überführt, auf Eis platziert und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Außerdem spülte man Stichproben bei 4°C über Nacht in $600\mu\text{l}$ Phosphat-gepufferter Salzlösung mit Proteaseinhibitoren (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). In diesen Stichproben wurden das Vorhandensein von Interleukin 1β und 8, Matrix-Metalloprotease (MMP)-8 und Myeloperoxidase (MPO) durch den kommerziell erhältlichen enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) nach Anweisungen des Herstellers (IL- 1β und IL-8: Usbn Life Science Inc., Wuhan, China; MPO und MMP-8: BlueGene Biotech, Shanghai, China) bestimmt.

2.7 Histologische Aufbereitung

Das Vorgehen bei der histologischen Fixierung erfolgte standardisiert nach Schwarz *et al.* 2011.

Wichtig ist hierbei zu erwähnen, dass die Gewebebiopsien mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylole dehydriert und anschließend von

Methylmetacrylat (MMA, Technovit 9100 NEU; Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland) durchsetzt und eingebettet wurden, um eine nicht-entkalkende Schnitfführung zu ermöglichen.

Damit es zu keinem negativen Einfluss einer unerwünschten Polymerisation kommen konnte, wurde während diesem standardisierten Vorgehen eine kalte Atmosphäre bei -4°C gewählt. Somit konnte eine durch Wärme verursachte, verfrühte Polymerisation verhindert werden.

Nach etwa 20 Stunden waren die Proben vollkommen polymerisiert und in vestibulo-oraler Richtung entlang der Implantatachse mit einer Diamant-Bandsäge (Exakt®, Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) geschnitten.

Es wurden zwei Bereiche von ungefähr $300\mu\text{m}$ Dicke ausgehend vom zentralsten gelegenen Punkt präpariert und darauffolgend mit Acrylzement (Technovit® 7210 VLC, Heraeus Kulzer) an silanisierte Glasplatten (Super Frost; Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) geklebt und dann auf eine finale Dicke von ca. $40\mu\text{m}$ gepresst.

Im Anschluss wurde eine der Proben mit Toluidinblau eingefärbt, der Rest der Proben wurde für immunhistochemische Kennzeichnung eingesetzt.

2.8 Vorgehen für die immunhistochemischen Untersuchungen

Für den immunhistochemischen Teil wurden die zuvor in MMA eingebetteten Schleimhautpräparate für zweimal 30 Minuten in Xylol aufgelöst, danach mit 2-Methoxyethylacetat (zweimal 20 Minuten) und abschließend mit Aceton (zweimal 5 Minuten) behandelt. Nach der Rehydrierung durch eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) wurden die Schnitte 15 Minuten in Trypsin (0,05% in PBS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) bei 37°C inkubiert, um eine verlorengegangene Immunreaktivität des zuvor formalin-fixierten Gewebes teilweise wiederherzustellen (Antigendemaskierung). Nach diesem Vorgang wurde die körpereigene Peroxidase mit 0,9%igem Wasserstoffperoxid in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur zerstört. Die Proben wurden ausgewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen 30 Minuten mit einer Blockierungslösung (DakoCytomation, Hamburg, Germany) gehemmt.

Der primäre monoklonale Maus-Antikörper zu CD68 (1:100 Verdünnung, DakoCytomation), ein Zellmarker des Makrophagenstammes und der korrespondierenden unspezifischen Antikörper (Maus IgG 1, 1:184, DakoCytomation), wurde zur Negativkontrolle den Gewebeproben hinzugegeben und diese bei 8°C in einer luftbefeuchteten Kammer über Nacht inkubiert.

Die Schnitte wurden danach noch einmal in PBS gespült und mit sekundär biotinylierten Anti-Maus-Antikörpern (Verdünnung 1:50, DakoCytomation) für 90 Minuten bei Raumtemperatur ausgebrütet.

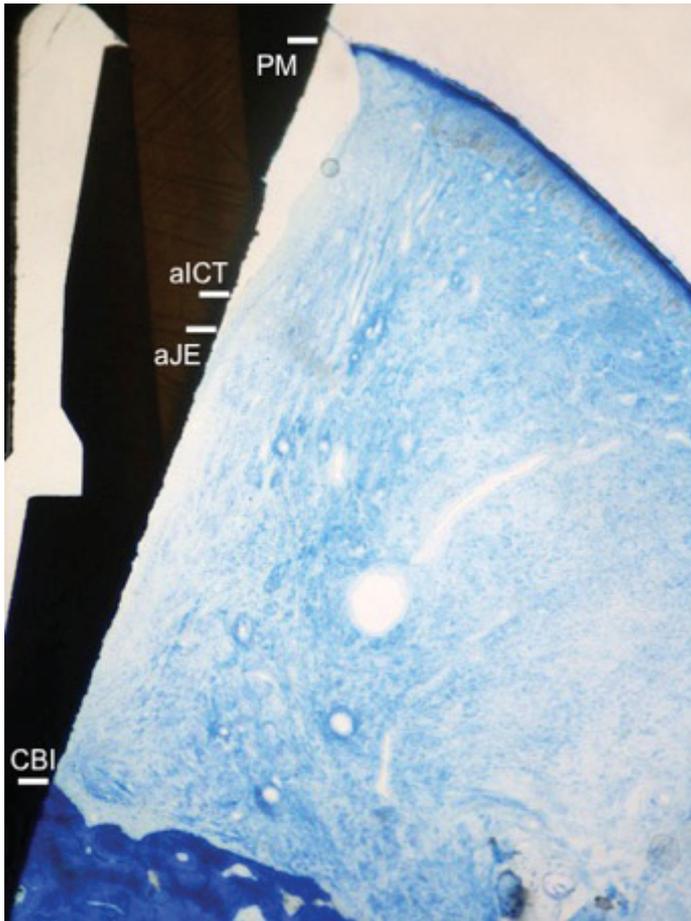
Nach erneuter PBS-Waschung wurde die Anwesenheit von Antigen-Antikörper-Komplexen durch eine 1:250 verdünnte Streptavidin-Peroxidase-Lösung (DakoCytomation) und AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) als Chromogen der Firma DakoCytomation sichtbar gemacht.

2.9 Histologische Analyse

Für die bildliche Darstellung wurde eine CCD-Farbkamera verwendet (Color View III, Olympus, Hamburg, Deutschland), welche an einem binokularen Lichtmikroskop (Olympus BX50, Olympus, Hamburg, Deutschland) befestigt war.

Mit der Software Cell D® der Firma Soft Imaging Systems (Münster, Deutschland) wurden die digitalen Aufnahmen (Originalvergrößerung x 200) ausgewertet.

Folgende Orientierungspunkte wurden in den gefärbten Schnitten sowohl von vestibulär, als auch von oral gekennzeichnet:



Der Mukosarand (PM), die apikale Verlängerung des langen Saumepithels (aJE), die apikale Verlängerung des entzündlichen Zellinfiltrats (aICT) und der am weitesten koronal liegende Knochenabschnitt mit Implantatkontakt (CBI). Die Längenmessungen erfolgten durch das Ziehen einer vertikalen Linie, die sich entlang der Implantatachse sowohl in vestibulärer als auch oraler Ansicht befand. Innerhalb des abgegrenzten ICT-Bereichs, dem Bereich

des entzündlichen Zellinfiltrats, wurde die CD68 Antigenreaktivität durch die Bildanalyse-Software mittels eingebautem Grenzerkennungswerkzeug automatisch bewertet. Vor dem Beginn der histomorphometrischen Analyse wurde ein Kalibrierungsverfahren eingeleitet. Somit waren wiederholte Messungen von n=6 unterschiedlichen Proben in mehr als 95% ähnlich.

Tabelle 2

Übersicht der verwendeten Orientierungspunkte mit gemessenen Strecken

	Orientierungspunkte	Strecken
PM	Mukosarand	<ul style="list-style-type: none"> • PM nach CBI • PM nach aJE • PM nach aICT
aJE	apikale Verlängerung des langen Saumepithels	<ul style="list-style-type: none"> • aJE nach CBI
aICT	apikale Verlängerung des entzündlichen Zellinfiltrats	<ul style="list-style-type: none"> • aICT nach CBI
CBI	Am weitesten koronal liegende Knochenabschnitt mit Implantatkontakt	

2.10 Statistische Analyse

Bei der statistischen Analyse kam ein kommerziell erhältliches Softwareprogramm (SPSS Statistics 21.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) zum Einsatz. Durchschnittswerte und Standardabweichungen unter den Tieren wurden für jedes Individuum und jede Gruppe berechnet. Die Datenzeilen wurden mit dem Kolmogorow-Smirnow Test untersucht. Dieses Testverfahren ist ein statistischer Test und dient der Übereinstimmung zweier Wahrscheinlichkeitsverteilungen. Es kann somit überprüft werden, ob zwei Zufallsvariablen die gleiche Verteilung haben oder ob eine Zufallsvariable einer zuvor angenommenen Wahrscheinlichkeitsverteilung folgt. Innerhalb der Gruppen, *NPC* (= *no plaque control*, ohne Mundhygienemaßnahmen) und *PC* (= *plaque control*, Mundhygienemaßnahmen dreimal wöchentlich) wurden Vergleiche (n = 6 Tiere) durch eine einfache Varianzanalyse (*ANOVA*) und der Bonferroni-Methode bei Massenvergleichen durchgeführt. Mit der Bonferroni-Methode wird in der Statistik die Alpha-Fehler-Kumulierung bei multiplen Paarvergleichen neutralisiert. Der Alpha-Fehler wurde auf 0.05 festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Klinische Beobachtungen

Während des gesamten Studienzeitraums gab es weder beim Gesundheitszustand noch bei der Verhaltensweise und der Ernährung der Tiere zu Komplikationen. Darüber hinaus wurden keine lokalen Komplikationen in Form von Wundinfektionen, Schwellungen oder Abszessbildungen beobachtet.

Nach 16 Wochen hatte die ungehinderte Plaqueakkumulation im Allgemeinen zu einer leichten Hyperplasie und einer Rötung der Gingiva um das Implantat herum geführt. Im Gegensatz dazu konnten bei den Implantaten mit häufigen Mundhygienemaßnahmen keine klinischen Symptome einer Entzündung festgestellt werden. Durch eine regelmäßige mechanische Reinigung der Implantate scheinen mögliche Entzündungszeichen erfolgreich verhindert worden zu sein.

3.2 Immunologische Analyse

Die immunologische Analyse von IL-1 β , IL-8, MMP-8 und MPO innerhalb der unterschiedlichen Gruppen ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3

Immunologische Analyse von IL-1 β (pg/Seite), IL-8 (ng/Seite), MMP-8 (ng/Seite) und MPO (ng/Seite) in unterschiedlichen Gruppierungen von vestibulär und oral (n = 6 Hunde); Mittelwerte \pm SD

a) Keine Plaquekontrolle

Modifikation	IL-1 β	IL-8	MMP-8	MPO
TiZrmodSLA	7.17 \pm 4.63	606.16 \pm 634.68	282.33 \pm 93.69	5724.16 \pm 1772.96
TiZrmodMA	6.60 \pm 3.84	742.80 \pm 607.91	307.60 \pm 114.74	6140.20 \pm 1857.71
TiZrM	4.53 \pm 2.34	246.50 \pm 130.98	275.50 \pm 80.07	5785.16 \pm 1249.06
TiM	5.64 \pm 1.92	618.00 \pm 230.83	284.33 \pm 62.58	5629.83 \pm 853.65

b) Mit Plaquekontrolle (3 x pro Woche)

Modifikation	IL-1 β	IL-8	MMP-8	MPO
TiZrmodSLA	5.86 \pm 5.04	326.00 \pm 195.65	316.66 \pm 103.08	5414.00 \pm 1481.17
TiZrMA	6.41 \pm 4.13	284.50 \pm 153.97	309.50 \pm 55.59	5930.66 \pm 1225.27
TiZrM	7.00 \pm 3.62	219.20 \pm 46.34	437.60 \pm 206.60	5834.60 \pm 1553.27
TiM	5.81 \pm 3.24	320.60 \pm 252.46	306.60 \pm 75.11	5197.00 \pm 2065.75

Innerhalb der Gruppenvergleiche (einseitig – ANOVA) : p > 0.05;

Bei den IL-1 β Werten zeigten sich in beiden untersuchten Gruppen (PC/NPC) sehr ähnliche Werte. Auch bei unterschiedlichen Implantatoberflächen wurden ähnliche Werte vermerkt. In der Gruppe ohne Plaquekontrolle wurde der niedrigste Wert von IL-1 β (4.53 ± 2.34) für TiZrM-Implantate und der höchste Wert (7.17 ± 4.63) bei TiZrmodSLA-Implantaten registriert. Interessanterweise wurden in der Gruppe mit Plaquekontrolle Werte im selben Bereich berechnet. Der niedrigste Wert (5.81 ± 3.24) bei TiM- und höchster Wert bei TiZrM-Implantaten mit einem Wert von 7.00 ± 3.62 .

Auffallend bei den IL-8 Werten ist die scheinbare Korrelation mit der vorhandenen Plaquemenge. Die Werte stiegen bei ungehinderter Plaqueakkumulation an, weshalb sich in der Testgruppe deutlich erhöhte Werte feststellen ließen.

In der Testgruppe ohne regelmäßige Reinigungsmaßnahmen fand sich der niedrigste Wert von IL-8 bei TiZrM-Implantaten (246.50 ± 130.98) und der deutlich höchste Wert bei TiZrmodMA-Implantaten (742.80 ± 607.91). TiZrmodSLA- und TiM-Implantate lagen in ähnlichen Bereichen (606.16 ± 634.68 und 618.00 ± 230.83).

In der Gruppe mit Plaquekontrolle waren die Werte von IL-8 deutlich niedriger. Der geringste Wert wurde mit 219.20 ± 46.34 bei den TiZrM-Implantaten gemessen, der höchste Wert mit 326.00 ± 195.65 bei TiZrmodSLA-Implantaten. Für die Implantatoberflächen TiZrmodMA wurde ein Wert von 284.50 ± 153.97 und für TiM 320.60 ± 252.46 ermittelt.

In der Gruppe ohne Plaquekontrolle wurde bei TiZrmodMA-Implantaten der höchste Wert des körpereigenen Enzyms Matrixmetalloproteinase 8 ermittelt (307.60 ± 114.74), der niedrigste bei TiZrM-Implantaten (275.50 ± 80.07). Die Werte für TiZrmodSLA lagen bei 282.33 ± 93.69 und TiM bei 284.33 ± 62.58 .

Bei der Gruppe mit Plaquekontrolle lag der höchste Wert bei TiZrM-Implantaten (437.60 ± 206.60) und der niedrigste bei TiM (306.60 ± 75.11). Die Werte von TiZrmodSLA-Implantaten lagen bei 316.66 ± 103.08 , jene bei TiZrmodMA bei 309.50 ± 55.59 .

Bei der immunologischen Analyse der Myeloperoxidase waren die Ergebnisse in beiden untersuchten Gruppen ebenfalls sehr ähnlich. In der Gruppe ohne Plaquekontrolle lag der höchste Wert (6140.20 ± 1857.71) bei TiZrmodSLA- und der niedrigste Wert (5629.83 ± 853.65) bei TiM- Implantaten.

TiZrmodSLA-Implantate lagen bei 5724.16 ± 1772.96 und die untersuchten Systeme mit einer TiZrM-Oberfläche bei 5785.16 ± 1249.06 .

In der Gruppe mit Plaquekontrolle wurde mit 5930.66 ± 1225.27 der höchste Wert bei der TiZrmodMA-Oberfläche, niedrigste mit 5197.00 ± 2065.75 bei TiM gefunden. Der Wert für die TiZrmodSLA-Modifikation lag bei 5414.00 ± 1481.17 , jener für TiZrM bei 5834.60 ± 1553.27 .

Die durchschnittlichen Werte für IL-1 β , MMP-8 und MPO waren in beiden Gruppen vergleichbar. Ein Gruppenvergleich zeigte einen direkten Einfluss der Plaquebildung auf die IL-8 Werte.

Dieser Anstieg wurde insbesondere in der Gruppe ohne Plaqueentfernung bei TiZrmodMA-, TiZrmodSLA- und TiM-Implantaten beobachtet, ohne dass diese Unterschiede statistische Signifikanz erreichten. In der Gruppe mit Plaquekontrolle waren die immunologischen Parameter an allen untersuchten Implantatoberflächen vergleichbar.

3.3 Histomorphometrische Analyse

Die Mittelwerte von PM-CBI, PM-aJE, aJE-CBI, PM-aICT und aICT-CBI der unterschiedlichen Implantate in beiden Gruppen sind in Tabelle 4 a und b dargestellt.

Tabelle 4

Histomorphometrische Analyse von PM-aJE, aJE-CBI, PM-aICT und aICT-CBI (in mm, Mittelwert \pm SD) in unterschiedlichen Gruppen von vestibulär und oral (n = 6 Hunde)

a) Ohne Plaquekontrolle

Modifikation	PM – CBI	PM – aJE	aJE – CBI	PM – aICT	aICT – CBI
TiZrmodSLA	3.51 \pm 0.44	2.34 \pm 0.46	1.16 \pm 0.48	1.86 \pm 0.64	1.64 \pm 0.57
TiZrmodMA	3.95 \pm 0.66	2.72 \pm 0.62	1.22 \pm 0.27	2.05 \pm 1.08	1.90 \pm 1.52
TiZrM	3.97 \pm 0.70	2.67 \pm 0.49	1.29 \pm 0.66	2.92 \pm 0.68	1.03 \pm 0.44
TiM	5.18 \pm 1.96	3.27 \pm 1.12	1.90 \pm 1.35	3.40 \pm 1.41	1.77 \pm 0.71

b) Plaquekontrolle (3x pro Woche)

Modifikation	PM – CBI	PM – aJE	aJE – CBI	PM – aICT	aICT – CBI
TiZrmodSLA	3.42 \pm 0.93	2.13 \pm 0.79	1.28 \pm 0.18	0.88 \pm 0.65	2.53 \pm 1.43
TiZrmodMA	3.36 \pm 0.65	2.29 \pm 0.56	1.06 \pm 0.45	1.15 \pm 0.40	2.20 \pm 0.73
TiZrM	3.76 \pm 1.23	2.71 \pm 1.10	1.04 \pm 0.55	2.08 \pm 1.59	1.68 \pm 0.51
TiM	3.90 \pm 1.23	2.54 \pm 0.64	1.35 \pm 0.67	1.31 \pm 1.12	2.58 \pm 1.86

Innerhalb der Gruppenvergleiche (einseitig – ANOVA): p > 0.05

Histomorphometrisch wurden im Rahmen dieser Studie fünf Bereiche analysiert.

PM-CBI, der Abstand von Mukosarand zu dem am weitesten koronal liegende Knochenabschnitt mit Implantatkontakt.

PM-aJE, der Abstand zwischen Mukosarand und der apikalen Verlängerung des langen Saumepithels.

aJE-CBI, Abstand zwischen der apikalen Verlängerung des langen Saumepithels und dem am weitesten koronal liegenden Kieferabschnitt mit Implantatkontakt. Außerdem PM-aICT (= Abstand vom Mukosarand bis zur apikalen Verlängerung des entzündlichen Zellinfiltrats) und aICT-CBI (= apikale Verlängerung des entzündlichen Zellinfiltrats bis zum am koronalsten liegenden Knochenabschnitt mit Implantatkontakt).

In der Gruppe ohne Plaquekontrolle (2a) wurde der größte Wert für PM-CBI bei TiM-Implantatoberflächen ($5.18 \text{ mm} \pm 1.96 \text{ mm}$) und der geringste bei TiZrmodSLA-Oberflächen ($3.51 \text{ mm} \pm 0.44 \text{ mm}$) gemessen. Bei den Implantatoberflächen TiZrmodMA lag der Mittelwert bei $3.95 \text{ mm} \pm 0.66 \text{ mm}$ und bei TiZrM bei $3.97 \text{ mm} \pm 0.70 \text{ mm}$.

Im Vergleich hierzu fanden sich in der Gruppe mit Plaquekontrolle (2b) ähnliche Werte. Der geringste Abstand ($3.36 \text{ mm} \pm 0.65 \text{ mm}$) wurde bei TiZrmodMA-Modifikation und der größte Abstand ($3.90 \text{ mm} \pm 1.23 \text{ mm}$) bei TiM notiert. TiZrmodSLA-Werte lagen im Durchschnitt bei $3.42 \text{ mm} \pm 0.93 \text{ mm}$ und TiZrM bei $3.76 \text{ mm} \pm 1.23 \text{ mm}$.

Auch der Vergleich von PM-aJE innerhalb der beiden Gruppen zeigt ähnliche Werte. Bei der Gruppe ohne Plaquekontrolle (4a) zeigte sich der größte Wert ($3.27 \text{ mm} \pm 1.12 \text{ mm}$) bei der TiM-Modifikation und der niedrigste ($2.34 \text{ mm} \pm 0.46 \text{ mm}$) bei TiZrmodSLA. TiZrM-Werte lagen durchschnittlich bei $2.67 \text{ mm} \pm 0.49 \text{ mm}$ und TiZrmodMA bei $2.72 \text{ mm} \pm 0.62 \text{ mm}$.

Den größten Wert für PM-aJE zeigte in der Gruppe mit Plaquekontrolle TiZrM mit $2.71 \text{ mm} \pm 1.10 \text{ mm}$ und den geringsten Wert ($2.13 \text{ mm} \pm 0.79 \text{ mm}$) TiZrmodSLA. Werte von TiZrmodMA lagen bei $2.29 \text{ mm} \pm 0.56 \text{ mm}$ und von TiM bei $2.54 \text{ mm} \pm 0.64 \text{ mm}$.

Die Abstände von der apikalen Verlängerung des langen Saumepithels bis zum am koronalsten liegenden Knochenabschnitt mit Implantatkontakt (aJE-CBI)

lagen durchschnittlich bei 1.16 mm bis 1.90 mm in der Gruppe ohne Plaquekontrolle und zwischen 1.04 mm und 1.35 mm mit Plaquekontrolle. In Tabelle 4a wurde als höchster Wert ($1.90 \text{ mm} \pm 1.35 \text{ mm}$) bei TiM-Modifikation und als niedrigster ($1.16 \text{ mm} \pm 0.48 \text{ mm}$) bei TiZrmodSLA vermerkt (4a). Für die TiZrmodMA-Oberfläche wurde ein Mittelwert von $1.22 \text{ mm} \pm 0.27 \text{ mm}$ und für TiZrM $1.29 \text{ mm} \pm 0.66 \text{ mm}$ aufgezeichnet.

In der Gruppe mit Plaquekontrolle (4b) lag die größte Messung ($1.35 \text{ mm} \pm 0.67 \text{ mm}$) bei der TiM-Modifikation und die niedrigste bei TiZrM ($1.04 \text{ mm} \pm 0.55 \text{ mm}$). Bei der TiZrmodSLA-Oberfläche ergab sich ein Mittelwert von $1.28 \text{ mm} \pm 0.18 \text{ mm}$ und bei TiZrmodMA $1.06 \text{ mm} \pm 0.45 \text{ mm}$.

Die histologische Analyse zeigte allgemein die Bildung eines gemischten, chronischen Entzündungszellinfiltrats im Bereich des subepithelialen Bindegewebes. Die Mittelwerte von PM-aICT, dem Bereich vom Mukosarand zur apikalen Verlängerung des entzündlichen Zellinfiltrats, variierten zwischen 1.86 und 3.40 mm (NPC, 4a) und 0.88 und 2.08 mm (PC, 4b). Der höchste Wert ($3.40 \text{ mm} \pm 1.41 \text{ mm}$) wurde dabei in der Gruppe ohne Plaquekontrolle bei der TiM-Modifikation, der niedrigste ($1.86 \text{ mm} \pm 0.54 \text{ mm}$) bei TiZrmodSLA gemessen. Die Mittelwerte für die TiZrmodMA-Oberfläche lagen bei $2.05 \text{ mm} \pm 1.08 \text{ mm}$ und für TiZrM bei $2.92 \text{ mm} \pm 0.68 \text{ mm}$.

In der Gruppe mit Plaquekontrolle wurde der niedrigste Wert ($0.88 \text{ mm} \pm 0.65 \text{ mm}$) für die TiZrmodSLA-Oberfläche und der höchste Wert ($2.08 \text{ mm} \pm 1.59 \text{ mm}$) für TiZrM vermerkt. Bei TiZrmodMA wurde ein Mittelwert von $1.15 \text{ mm} \pm 0.40 \text{ mm}$ und bei TiM $1.31 \text{ mm} \pm 1.12 \text{ mm}$ protokolliert.

Die mittleren Werte für aICT-CBI zeigten jeweils gruppeninterne Ähnlichkeit.

Bei der Gruppe ohne Plaquekontrolle (4a) zeigte die TiZrmodMA-Oberfläche den höchsten Wert ($1.90 \text{ mm} \pm 1.52 \text{ mm}$) und TiZrM den niedrigsten mit $1.03 \text{ mm} \pm 0.44 \text{ mm}$. Für TiZrmodSLA wurde ein Wert von $1.64 \text{ mm} \pm 0.57 \text{ mm}$ und für TiM $1.77 \text{ mm} \pm 0.71 \text{ mm}$ aufgezeichnet.

Im Vergleich dazu sind in Tabelle 4 folglich auch die jeweiligen Mittelwerte für die Gruppe mit Plaquekontrolle aufgelistet. Den höchsten Wert erreichte mit $2.58 \text{ mm} \pm 1.86 \text{ mm}$ die TiM- und den niedrigsten mit $1.68 \text{ mm} \pm 0.51 \text{ mm}$ die TiZrM-Oberfläche.

Bei TiZrmodSLA ergab sich als Mittelwert $2.53 \text{ mm} \pm 1.43 \text{ mm}$ und bei TiZrmodMA $2.20 \text{ mm} \pm 0.73 \text{ mm}$.

Die Werte im Bereich zwischen Mukosarand und der apikalen Verlängerung des langen Saumepithels (PM-aJE), dem Mukosarand und dem am weitesten koronal liegende Knochenabschnitt mit Implantatkontakt (PM-CBI) und der apikalen Verlängerung des langen Saumepithels und dem am weitesten koronal liegende Knochenabschnitt mit Implantatkontakt (aJE-CBI) waren in der Gruppe ohne Plaquekontrolle an allen untersuchten Implantatoberflächen kaum unterschiedlich.

Waren leichte Unterschiede erkennbar, erlangten diese jedoch keine statistische Signifikanz. Außerdem zeigte die histologische Analyse, dass das entzündliche Zellinfiltrat sowohl bei TiZrM-, als auch bei TiM-Gruppen dichter ist und mit einer Ulzeration des Saumepithels sowie einem extremen Verlust der angrenzenden Kollagenstrukturen einhergeht. Dieser Verlust resultierte in einer Taschenbildung (Abb. 2a,b)

Tabelle 5

Kreuztabelle: Diagnose nach histologischer Untersuchung der jeweiligen Gruppen

a) Keine Plaquekontrolle (= Hygiene 0)

Material		TiZrmodSLA	TiZrmodMA	TiZrM	TiM	Gesamt
Diagnose	Gesund	0	1	0	0	1
	Periimplantäre Mukositis	5	5	5	4	19
	Periimplantitis	0	0	1	0	1
Gesamt		5	6	6	4	21

b) Plaquekontrolle (3 x pro Woche = Hygiene 1)

Material		TiZrmodSLA	TiZrmodMA	TiZrM	TiM	Gesamt
Diagnose	Gesund	1	0	0	2	
	Periimplantäre Mukositis	4	6	5	4	
Gesamt		5	6	5	6	

In Tabelle 5 ist die Diagnose nach histologischer Untersuchung der jeweiligen Gruppierung aufgelistet. Dabei handelte es sich bei den TiZrmodSLA-Implantaten in der Gruppe ohne Plaquekontrolle fünf mal um eine periimplantäre Mukositis, bei TiZrmodSLA fünf mal um eine periimplantäre Mukositis und einem gesunden Implantat. Bei TiZrM war neben fünf periimplantären Mukositisfällen nach histologischer Analyse sogar bereits eine Periimplantitis diagnostizierbar. Bei der Kontrollgruppe (TiM) handelte es sich bei vier untersuchten Implantaten um vier Mukositiden.

Im Hinblick auf die Gruppe mit dreimal wöchentlicher Plaquekontrolle handelte es sich bei allen untersuchten Fällen der TiZrmodMA und TiZrM um periimplantäre Mukositiden. Bei den TiZrmodSLA Implantaten waren von fünf untersuchten Implantaten eines gesund, die restlichen fünf wiesen bereits eine periimplantäre Mukositis auf. In der Kontrollgruppe (TiM) war die Mukosa von sechs untersuchten Implantaten bei zwei gesund und bei vier entzündet.

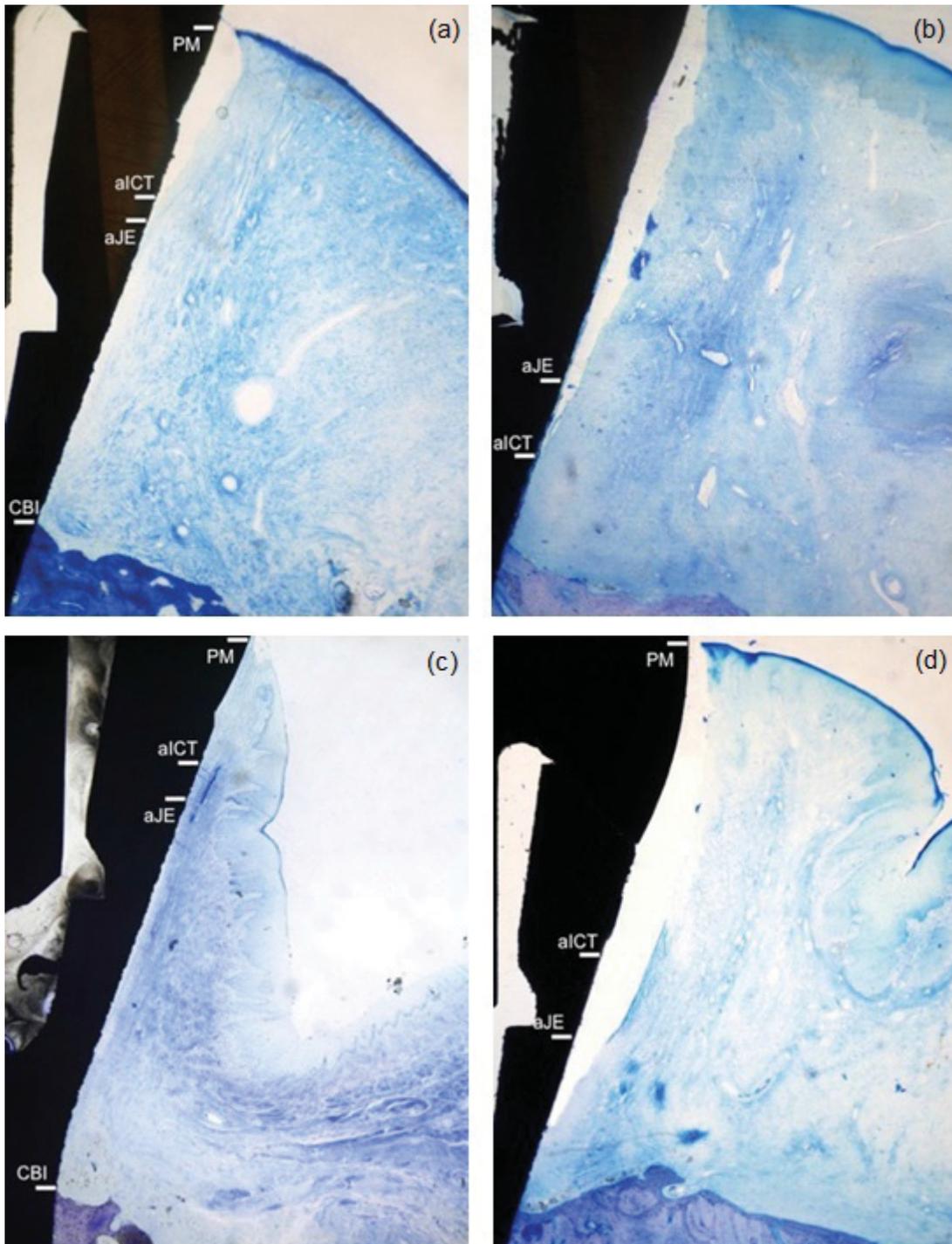


Abbildung 2

Charakteristische, histologische Aufnahmen vom Anfang und Verlauf einer periimplantären Erkrankung in unterschiedlichen Gruppen nach 16 Wochen (Toluidinblau-Färbung, Originalvergrößerung x 40).

Die apikale Ausbreitung des gemischt, chronisch entzündlichen Zellinfiltrats war bei TiZrmodMA und TiZrmodSLA Implantaten weniger ausgeprägt, aber allgemein durch eine ungehinderte Plaquebildung beeinflusst.

(a) TiZrmodMA Gruppe – ungehinderte Plaquekontrolle

(b) TiZrM Gruppe – ungehinderte Plaquekontrolle

(c) TiZrmodSLA Gruppe – gehinderte Plaquekontrolle

(d) TiM Gruppe – gehinderte Plaquekontrolle

PM – Mukosarand, aJE - apikale Verlängerung des langen Saumepithels, aICT - apikale Verlängerung des entzündlichen Zellinfiltrats, CBI – am weitesten koronal liegender Knochenabschnitt mit Implantatkontakt

Obwohl aICT bei TiZrmodSLA und bei TiZrmodMA in einer Position koronal von aJE lokalisiert war, ist es im Gegensatz dazu bei den Gruppen TiZrM und TiM in den Bereich des subepithelialen Bindegewebes eingedrungen. Die Mittelwerte von aICT-CBI variierten zwischen 1.03 mm und 1.90 mm, wobei der geringste Abstand für TiZrM Implantate vermerkt wurde.

In der Gruppe mit Plaquekontrolle zeigten alle Implantate vergleichbare Mittelwerte bei PM-CBI, PM-aJE und aJE-CBI. Die Mittelwerte bei PM-aICT waren, verglichen mit der jeweiligen Gruppe ohne Plaquekontrolle, allgemein tiefer und variierten zwischen 0.88 und 2.08 mm. Der tiefste Wert wurde wiederum bei TiZrmodSLA-Implantaten erfasst. Trotzdem erreichten diese Unterschiede zwischen den Gruppen keine statistische Relevanz (Abb. 2c,d). Angrenzend an alle Implantatoberflächenmodifikationen war aICT allgemein in einer koronalen Position von aJE lokalisiert. Mittelwerte von aICT-CBI variierten dabei zwischen 1.68 und 2.58 mm. Den geringsten Abstand war bei TiZrM-Implantaten feststellbar. Vergleich man die Gruppen untereinander, konnte jedoch keine statistische Relevanz festgestellt werden (Tab. 4b)

3.4 Immunhistochemische Analyse

Bei der immunhistochemischen Analyse wurde spezifisch die CD68 positive Fraktion ermittelt. Die Mittelwerte der Antigenreaktivität innerhalb des entzündlichen Infiltrats sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6

Immunhistochemische Analyse von CD68 positiven Zellen (in %, Mittelwert \pm SD) innerhalb des Entzündungszellinfiltrats in verschiedenen Gruppen vestibulär und oral (n=6 Hunde)

Modifikation	Keine Plaquekontrolle	Plaquekontrolle (3 x pro Woche)
TiZrmodSLA	0.46 \pm 0.37	0.11 \pm 0.10
TiZrmodMA	0.61 \pm 0.42	0.17 \pm 0.17
TiZrM	0.68 \pm 0.57	0.30 \pm 0.33
TiM	0.25 \pm 0.18	0.20 \pm 0.09

Innerhalb der Gruppenvergleiche (einseitig – ANOVA): $p > 0.05$

In der Gruppe ohne regelmäßige Plaquekontrolle wurde der höchste Prozentsatz bei TiZrM (0.68% \pm 0.57%) und der niedrigste bei TiM (0.25% \pm 0.18) erfasst. Für die TiZrmodMA- und TiZrmodSLA-Oberfläche wurden 0.61% \pm 0.42% und 0.46% \pm 0.37% eruiert.

In der Gruppe mit Plaquekontrolle differierten diese Werte zwischen 0.11 und 0.30. Der niedrigsten Wert wurde dabei bei TiZrmodSLA-Implantaten (0.11% \pm 0.10%), den höchsten im Gegensatz hierzu bei TiZrM-Modifikationen (0.30% \pm 0.33%) notiert. Im Allgemeinen war die Verteilung der CD68-Zellen innerhalb des entzündlichen Infiltrats (ICT) in allen Gruppen vergleichbar. Während die Antigenreaktivität im koronalen Anteil eher dürftig erschien, nahm die Dichte in apikale Richtung deutlich zu (Abb. 3a-d).

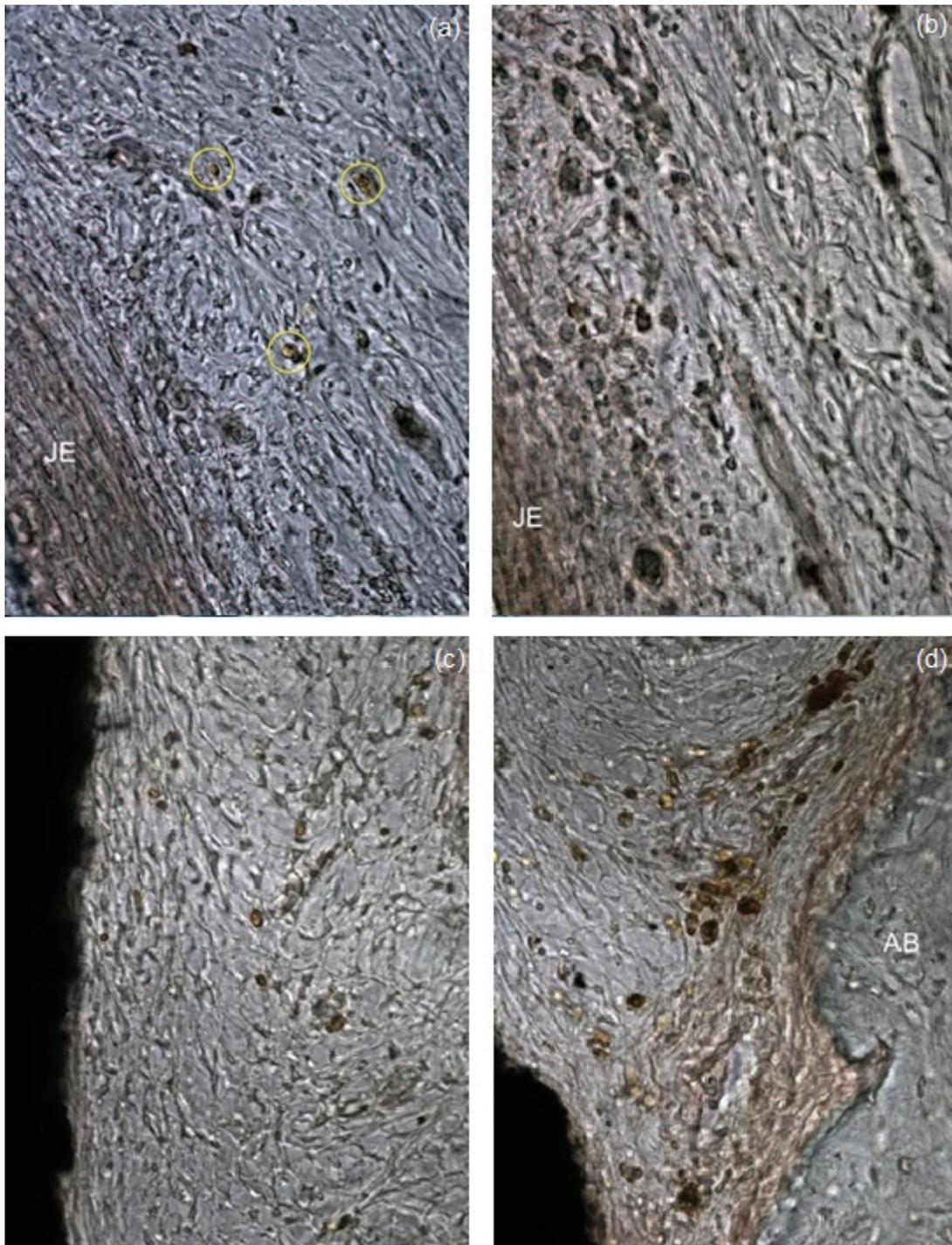


Abbildung 3

Darstellende immunhistochemische Abbildungen von CD68 Antigenreaktivität innerhalb des entzündlichen Zellinfiltrats in unterschiedlichen Gruppen nach 16 Wochen (Originalvergrößerung x 200).

Die Dichte der CD68 positiven Zellen (gelbe Kreise) war in allen untersuchten Gruppen vergleichbar, nahm aber jeweils in apikale Richtung zu.

- (a) TiZrmodMA Gruppe – gestörte Plaquekontrolle. Mittig-koronale Ansicht der angrenzenden Mukosa (monoklonaler Antikörper zu CD68).
 - (b) TiZrM Gruppe – gestörte Plaquekontrolle. Mittig-koronale Ansicht der angrenzenden Mukosa (unspezifischer Antikörper, Negativkontrolle).
 - (c) TiZrmodSLA Gruppe – ungestörte Plaquekontrolle. Koronalste Ansicht des subepithelialen Bindegewebes (monoklonaler Antikörper zu CD68).
 - (d) TiM Gruppe – ungestörte Plaquekontrolle, am weitesten apikaler Teil des subepithelialen Bindegewebes, deutet auf eine enge Korrelation zwischen CD68 positiven Zellen und einem Verlust des unterstützenden Alveolarknochens (monoklonaler Antikörper zu CD68) hin.
- AB – Alveolarknochen, JE – langes Saumepithel

4. Diskussion

4.1 Diskussion von Material und Methode

Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung einer experimentell induzierten, periimplantären Mukositis an unterschiedlichen Implantatoberflächen. Anhand von histologischen und immunologischen Analysen wurde der mögliche Einfluss von oberflächenverstärkten, modifizierten hydrophilen Implantaten auf die Progression dieser experimentellen, periimplantären Mukositis beurteilt. Wie bereits bei vorausgegangenen Studien gezeigt wurde, handelt es sich bei der periimplantären Mukositis um die Wirtsantwort des umliegenden Weichgewebes auf eine bakterielle Infektion, die nicht auf den angrenzenden Knochen übergeht (Heitz-Mayfield 2008). Sie stellt damit eine reversible Läsion dar (Zitzmann *et Berglundh* 2008).

Untersucht wurden im Rahmen der vorliegenden Studie vier unterschiedliche Implantatoberflächen an einem standardisierten Hundemodell (Foxhounds), welches sich bei der Erforschung zahnmedizinischer Fragestellungen seit Jahren bewährt hat (Faggion *et al.* 2009, Renvert *et al.* 2009).

Vorliegende Literatur zu experimentellen Studien an Tieren visiert bereits eine genauere Untersuchung der Pathogenese und Therapie periimplantärer Erkrankungen an. Bedeutend bei diesen präklinischen Untersuchungen ist nach wie vor die Qualität der Berichterstattung. Deshalb gelten die seit 2010 für Forschung an Tieren festgelegten *ARRIVE* (= *Animal Research: Reporting In Vivo Experiments*) Richtlinien nach Kilkenny *et al.*

Dabei handelt es sich um eine Kontrollliste bestehend aus 20 Punkten, welche den geringsten Umfang der zu berichtenden Informationen für alle wissenschaftlichen Studien anhand von Tiermodellen definiert (Kilkenny *et al.* 2010a). Diese Forschungen beinhalten nicht nur Hundemodelle, sondern auch nichtmenschliche Primaten- und Minischweinmodelle (Schwarz *et al.* 2015).

Die meisten Hunderassen zeigen eine natürliche Anfälligkeit für Parodontitis, da sie als natürliche Plaquebildner gelten (Weinberg *et al.* 1999). Deshalb wird die Pathogenese und die Therapie periimplantärer Erkrankungen häufig anhand des Hundemodells erforscht (Faggion *et al.* 2009, Renvert *et al.* 2009). Durch

den gefügigen Charakter, die geeignete Größe und erleichterte Pflege, sind Beagle Hunde die am häufigsten eingesetzte Hunderasse in zahnmedizinischen Studien. Die Makro- und Mikrostruktur des Hundeknochens ist dem menschlichen Knochen moderat ähnlich. Die Knochenzusammensetzung von Hunden und auch Schweinen ist der des Menschen gleichartig (Schwarz *et al.* 2015). Diese spezielle anatomische Charakteristik des Kieferknochens ermöglicht normalerweise eine Insertion gewöhnlicher Implantate. Zusätzlich stellt die einfache postoperative Handhabung der Tiere bei der Mundhygiene, und somit die problemlose Infektionskontrolle, einen potentiellen Vorteil dar. Die Reaktion des Weichgewebes auf eine ungehinderte Plaqueakkumulation an osseointegrierten Titanimplantaten wurde daher hauptsächlich anhand von Hundemodellen evaluiert (Berglundh *et al.* 1992, Ericsson *et al.* 1992, Ericsson *et al.* 1995, Abrahamson *et al.* 1998, Lang *et al.* 1994, Zitzmann *et al.* 2002). In diesen Studien unterblieben allgemein adäquate Mundhygienemaßnahmen. Eine ungehinderte Plaqueformation in einem Zeitraum von 21 Tagen bis hin zu 9 Monaten war die Folge. Studien dieser Art sind jedoch aus ethischen Gründen limitiert.

Das Protokoll der vorliegenden Studie wurde durch das Landesamt für Natur und Verbraucherschutz (Recklinghausen, Deutschland) genehmigt.

Innerhalb der ersten chirurgischen Phase wurden Zähne bilateral (P1-M2, Phase 1) sowohl im Ober-, als auch im Unterkiefer extrahiert. Danach inserierte man nach einer 8-wöchigen Heilungsperiode vier einteilige Implantate (Phase 2), welche dann vier Wochen transmukosal einheilten. Bei der Testgruppe handelte es sich um eine Metalllegierung bestehend aus 85% Titan und 15% Zirkonium (TiZr) mit drei unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheiten (modSLA, modMA und M). Bei der Kontrollgruppe kam ein reines Titanimplantat mit einer SLActive® Oberfläche und maschinierem transmukosalen Anteil (TiM) zum Einsatz.

Anschließend wurde im Verlauf der dritten Phase in Form eines *split-mouth* Designs eine experimentelle, periimplantäre Mukositis auf einer zufällig ausgewählten Kieferhälfte induziert (*NPC*), während auf der kontralateralen Kieferseite eine regelmäßige mechanische Plaqueentfernung (*PC*, 3x pro

Woche) stattfand. Nach einem zeitlichen Verlauf von 16 Wochen wurden die Tiere eingeschläfert, Proben entnommen, diese präpariert und histologisch aufbereitet und schließlich immunhistochemisch und histologisch analysiert.

Klinisch zeigten sich nach diesen 16 Wochen in der Gruppe ohne Plaquekontrolle als Entzündungsparameter eine leichte Rötung und Hyperplasie der Gingiva. Jedoch kam es weder zu Wundinfektionen, noch Schwellungen oder Abszessen.

Die histologische Analyse ergab, dass die Bildung und Schwere eines chronischen Entzündungszellinfiltrates in der Mukosa angrenzend an alle untersuchten Implantatoberflächen direkt mit dem Grad der Plaqueformation korreliert. In der Gruppe ohne Plaquekontrolle war die Ausdehnung dieses Infiltrates ausgeprägter als in der Gruppe mit regelmäßiger Plaquekontrolle (siehe Tabelle 2 a und b). Dass eine ungehinderte Plaqueakkumulation in einer Entzündung des umliegenden Weichgewebes an osseointegrierten Titanimplantaten mit begleitender Taschenbildung resultiert, wurde bereits umfassend durch vorherige Studien bewiesen (Berglundh *et al.* 1992, Ericsson *et al.* 1995, Abrahamson *et al.* 1998, Zitzmann *et al.* 2002). Dabei spielten vor allem die klinischen Parameter wie eine Blutung bei schonendem Sondieren, Ödembildung und Rötung des Gewebes eine bedeutende Rolle. Das entzündliche Infiltrat ist die Wirtsantwort auf eine bakterielle Invasion (Abrahamson *et al.* 1998). Wichtig bei diesen Studien ist die Schlussfolgerung, dass sich eine periimplantäre Läsion nur bei einer ungehinderten Plaquebildung ausbildet. Demgegenüber zeigte das Weichgewebe bei regelmäßigen Mundhygienemaßnahmen in entsprechenden Studien sowohl klinisch, als auch histologisch, keine Entzündungszeichen (Ericsson *et al.* 1995).

Diese Erkenntnis belegt die Validität dieses experimentellen Modells (Berglundh et Stavropoulos 2012).

Nach der experimentellen Phase von vier Monaten ergab die vorliegende histologische Analyse sowohl in der Gruppe mit, als auch in jener ohne Plaquekontrolle bei TiZrmodMA und TiZrmodSLA Implantatoberflächen eine tendenzielle Verringerung des Wertes von PM-aICT, dem Abstand des Mukosarandes bis zur apikalen Ausdehnung des Entzündungszellinfiltrates. Auch wenn die statistische Analyse keine signifikanten Unterschiede unter diesen Rahmenbedingungen zeigen konnte, besteht eine klare Tendenz, dass

TiZrM-Oberflächen im Vergleich dazu unabhängig von der Plaquekontrolle (*NPC/PC*) höchste PM-aICT und geringste aICT-CBI Werte in der Maxilla aufweisen. Da diese ausgeprägte Tendenz auch im Vergleich mit TiZrM- und TiM-Oberflächen besteht, kann angenommen werden, dass die Progression einer entzündlichen Läsion von anderen Faktoren außer der Oberflächenbeschaffenheit beeinflusst wird. In der Tat zeigten bereits vorherige experimentelle Studien, dass ungehinderte Plaquekontrolle bei allen untersuchten Oberflächen, unabhängig von Implantatsystemen oder Abutments, zu in Dimension und Zusammensetzung ähnlichen Läsionen führen (Zitzmann *et al.* 2002, Wennerberg *et al.* 2003, Pongnarisorn *et al.* 2007, Abrahamson *et al.* 2008).

In der vorliegenden Studie wurden die histologischen Erkenntnisse durch die immunhistochemische Untersuchung bestätigt. Gemessen wurde die Antigenreaktivität von CD68 positiven Zellen innerhalb des Infiltrates. CD68 ist ein Marker für Zellen der Makrophagenlinie (Monozyten, Histiozyten, Riesenzellen und Osteoklasten). Deren Anwesenheit wurde hauptsächlich eher mit Periimplantitis, als mit periimplantären Mukositis-Läsionen assoziiert (Berglundh *et al.* 2011, Lang *et al.* 2011). Bei TiZrM- und TiM-Implantaten war das Infiltrat dichter, es kam zur Ulzeration des Mukosarandes und zum Verlust angrenzender Kollagenstrukturen, welche auf eine Taschenbildung hinweist (siehe Abbildung 2 b, d). Dabei zeigte TiM den geringsten Wert CD68-positiver Fraktionen (in %) innerhalb des entzündlichen Infiltrates (siehe Abbildung 3 d). Die Antigenreaktivität war im koronalen Anteil eher spärlich, die Dichte nahm jedoch nach apikal aufgrund der Taschenbildung und der Ausdehnung des Infiltrats im subepithelialen Bindegewebe zu. Diese Erkenntnis war an allen untersuchten Oberflächenmodifikationen vergleichbar.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Studie war die immunologische Analyse von IL-1 β , IL-8, Matrixmetalloproteinase 8 (MMP-8) und Myeloperoxidase (MPO). Weder zeigten IL-1 β , MMP-8 und MPO signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen modifizierten Implantatoberflächen, noch deuteten sie auf Unterschiede innerhalb der *NPC*- und *PC*-Gruppen hin.

IL-1 β gehört zur Gruppe der Zytokine und stellt somit einen Entzündungsmediator dar. Es wird hauptsächlich von Makrophagen, Fibroblasten und Gingivaepithelzellen exprimiert (Kinane *et al.* 1992). Erhöhte

IL-1–Werte wurden in diesen Untersuchungen mit einer Plaqueakkumulation assoziiert und waren bereits vor dem Auftreten klinisch erkennbarer Veränderungen nachweisbar. Die IL-1 β -Werte sind zwar bei einer periimplantären Mukositis erhöht, erreichten in einer klinischen Studie von Ata-Ali *et al.* 2003 im Bezug auf gesunde Implantatgruppen bei Patienten keine statistisch signifikanten Unterschiede. Periimplantäres Gewebe entwickelt, im Vergleich zur Gingiva um einen natürlichen Zahn, eine stärkere Entzündungsreaktion auf experimentelle Plaqueakkumulation. Die Höhe der Biomarker war jedoch bei beiden Läsionen ähnlich (Salvi *et al.* 2012). Untersuchungen diverser Studien haben eher gezeigt, dass ein erhöhter IL-1 β -Spiegel im Speichel und im periimplantären Sulkusfluid in Kombination mit Pathogenen des roten Komplexes ein typisches Merkmal bei Patienten mit Periimplantitis zu sein scheint (Murata *et al.* 2002, Javed *et al.* 2011, Fonseca *et al.* 2014, Acharya *et al.* 2015).

Die Matrixmetalloproteinase 8 ist ebenfalls ein körpereigener Biomarker, welcher während parodontalen Entzündungen früh von Zellen des Immunsystems produziert wird. Dieses Enzym ist mit dem extrazellulären Abbau von Kollagen assoziiert. MMP-8 Werte sind noch vor klinischen Anzeichen im Sulkusfluid nachweisbar. Diese Abbauprozesse sind jedoch in diesem Stadium in der Regel reversibel und dienen der Überwachung periimplantären Erkrankungen (Basegmez *et al.* 2012).

Myeloperoxidase, ein lysosomales Protein in neutrophilen Granulozyten, Monozyten und diversen Gewebemakrophagen spielt ebenfalls bei der Terminierung und Regulation von Entzündungsprozessen eine bedeutende Rolle. MPO gilt als Gewebeerstörer und ist im periimplantären Sulkusfluid bei Entzündungsläsionen signifikant höher als im gesunden Gewebe um Implantate (Liskmann *et al.* 2004). Außerdem korrelieren MPO-Werte mit klinischen Parametern.

In der vorliegenden Studie erreichten diese Biomarker jedoch keine statistische Signifikanz.

Die fehlende Übereinstimmung dieser klinischen Studien mit den Daten der vorliegenden Arbeit kann vor allem durch mögliche Unterschiede bei Immunreaktionen von Mensch und Tier, beziehungsweise Hund, begründet werden.

Auffallend bei der immunologischen Untersuchung waren die erhöhten IL-8 Werte bei den meisten Implantaten der Gruppe ohne Plaquekontrolle, die direkt mit der vorhandenen Plaquemenge korrelierten. Von erhöhten IL-8 Werten waren insbesondere TiZrmodMA, TiZrmodSLA and TiM Implantate betroffen, trotzdem erreichten diese Unterschiede keine statistische Relevanz. Diese Aussage bestätigt vorausgegangene klinische Daten, die von einer Überexpression dieser Chemokine bei Periimplantitis berichten (Bordin *et al.* 2009, Venza *et al.* 2010).

Parodontale Erkrankungen sind in der heutigen Gesellschaft eine der häufigsten akuten und auch chronischen bakteriellen Entzündungen des Zahnfleisches. Die Entzündung resultiert aus einer inadäquaten Mundhygiene mit gesteigerter Plaqueakkumulation. Bereits vorliegende Studien haben ergeben, dass klinisch und histologisch keine grundlegenden Unterschiede zwischen einer Entzündung um einen Zahn und um ein Implantat bestehen (Lang *et al.* 2011, Berglundh *et al.* 2011). Da es einen deutlichen Anstieg der Lebenserwartung gibt und der Bedarf nach Lebensqualität auch im höheren Alter bestehen bleibt (Nickenig *et al.* 2016), entscheiden sich viele teilbezahnte oder zahnlose Patienten für eine Versorgung durch Implantate. Vorliegende Studien beweisen, dass Patienten, die bereits einmal an einer Parodontitis erkrankt waren, ein erhöhtes Risiko haben, auch an einer Periimplantitis zu erkranken (Sigusch *et al.* 2006). Darum ist davon auszugehen, dass die Prävalenz von Entzündungen des periimplantären Gewebes mit weitreichenden Folgen wie Knochen- oder sogar Implantatverlust steigen wird. Zu diesen periimplantären Erkrankungen zählen einerseits die periimplantäre Mukositis, die sich nur auf das umliegende Gewebe eines Implantates bezieht, ohne dabei auf den Knochen überzugehen, und andererseits die Periimplantitis, die gravierende Auswirkungen, nicht nur auf das Gewebe, sondern auch für den Knochen und somit die Stabilität des Implantates hat. Präventiv muss Patienten eine adäquate Mundhygiene vermittelt werden, um eine ansteigende Plaqueakkumulation zu verhindern und dadurch das Vordringen von Bakterien nach apikal zu inhibieren.

Im Rahmen einer weiteren Studie (Schwarz *et al.*, 2015) wurde im gleichen Projekt an den selben Implantaten der enossale Anteil der Implantate während der experimentell induzierten, periimplantären Mukositis untersucht.

Genauerer Augenmerk lag dabei auf den Einfluss der Entzündungsprozesse auf die Osseointegration hydrophiler, oberflächenbehandelter Titan- (Ti) und Titan-Zirkonium-Implantate (TiZr).

Der Untersuchungsvorgang ist folglich dem der vorliegenden Studie gleich: Nach der Zahnentfernung folgte die Implantation und eine Einheilphase von vier Wochen.

Auf einer zufällig ausgewählten Kieferseite wurden dann jegliche Hygienemaßnahmen unterlassen (*no plaque control – NPC*), wohingegen auf der kontralateralen Seite eine dreimal wöchentliche Plaquekontrolle (*plaque control - PC*) statt fand.

Nach 16 Wochen wurden auch im Rahmen dieser Untersuchung Biopsien entnommen und folglich histologisch und immunhistochemisch analysiert. Besonderes Augenmerk galt einerseits in der histologischen Betrachtung den BIC-Werten (*bone to implant contact – Knochen-Implantat-Kontakt*) und andererseits in der immunhistochemischen Analyse den CD68 positiven Zellen. Es konnten sowohl innerhalb der Implantatgruppen, als auch innerhalb der Hygienegruppen (*PC-NPC*) keine Unterschiede mit statistischer Signifikanz festgestellt werden. Die Osseointegration der untersuchten Implantate wurde demnach nicht durch die absichtlich herbeigeführte Plaqueakkumulation beeinflusst.

4.2 Limitationen der Studie

Limitationen dieser Studie sind zum einen die geringe Fallzahl (sechs Foxhound Hunde) und zum anderen der Stichprobenumfang. Bei der vorliegenden experimentellen Studie handelte es sich um vier männliche und zwei weibliche Hunde. Ob und welchen Einfluss das Geschlecht auf die Ergebnisse haben kann, wurde hierbei nicht beurteilt. Wie bereits oben diskutiert, ist außerdem die Übertragbarkeit immunologischer Prozesse von Hund auf Mensch nicht definitiv gegeben.

Eine methodische Einschränkung stellt in gewisser Weise die Übertragung von

Plaquedepots der NPC- auf die PC-Gruppe dar. Da es sich bei der vorliegenden Studie um einen Versuch im *split-mouth* Design handelt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich bestimmte Plaqueformationen durchaus bewegen können und somit das Untersuchungsergebnis verfälschen.

4.3 Weitere Forschung

Implantatmaterialien und deren Oberflächenbeschaffenheit stehen im Zentrum intensiver Forschungsarbeiten. Sie werden untersucht und weiterentwickelt. Wie bereits durch Studien belegt wurde, stellen Makro- und Mikrostrukturen eine deutliche Vergrößerung der Oberfläche dar und bieten somit eine ausgedehnte Kontaktfläche zwischen Implantat und Knochen.

Ein Ziel der Forschungsarbeiten ist es, die Biofilmmakkumulation zu verzögern und deutlich einzuschränken, indem eine Barriere zwischen Implantat und Weich- beziehungsweise Hartgewebe durch eine beschleunigte Einheilung des Implantats erzeugt werden soll. Eine hydrophile Oberfläche scheint einen bedeutenden Effekt auf die Biofilmformation zu haben (Bollen *et al.* 1997, Zitzmann *et al.* 2002). Trotzdem scheint der Einfluss nicht so gravierend zu sein, wie zu Beginn angenommen (Rimondini *et al.* 1997).

Die initiale Biofilmformation scheint viel komplexer zu sein, als bisher angenommen und durch eine Kombination von Oberflächenenergie, Rauigkeit und Hydrophilie beeinflusst zu werden.

In Anbetracht auf den erforderlichen Zeitraum für einen möglichen Übergang von einer periimplantären Mukositis zu einer Periimplantitis wurde die Studie auf 16 Wochen begrenzt. In der Regel geht man bei Hunden von 8-16 Wochen bis sich eine periimplantäre Mukositis zu einer Periimplantitis entwickelt, beim Menschen jedoch nur von 21 Tagen.

Es bedarf also weiterer Forschung, welche Eigenschaften oder Morphologie ein Implantat erfüllen sollte, um beim Menschen frühzeitig in der Lage zu sein zu interagieren.

4.4 Fazit

Alle untersuchten Implantatoberflächen führten sowohl bei einer 16-wöchigen ungestörte Plaqueakkumulation als auch bei einer regelmäßigen drei mal wöchentlichen mechanischer Plaquekontrolle zu vergleichbaren immunologischen, histologischen und immunhistochemischen Ergebnissen. Das Fortschreiten einer experimentellen periimplantären Mukositis unterschied sich bei den untersuchten Implantatoberflächen nicht.

5. Literatur

Abrahamsson I., Berglundh T. & Lindhe J. (1998):

Soft tissue response to plaque formation at different implant systems. A comparative study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* 9, 73–79.

Altuna P., Lucas-Taulé E., Gargallo-Albiol J., Figueras-Alvarez O., Hernández-Alfaro F. & Nart J. (2016):

Clinical evidence on titanium-zirconium dental implants: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 45(7), 842-850.

Basegmez C., Yalcin S., Yalcin F., Ersanli S. & Mijiritsky E. (2012):

Evaluation of periimplant crevicular fluid prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-8 levels from health to peri-implant disease status: a prospective study. *Implant Dentistry* 21, 306–310.

Berglundh T., Lindhe J., Marinello C., Ericsson I. & Liljenberg, B. (1992):

Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* 3, 1–8.

Berglundh T. & Stavropoulos A. (2012):

Preclinical in vivo research in implant dentistry. Consensus of the eighth European workshop on periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* 39(Suppl. 12), 1–5.

Berglundh T., Zitzmann N. U. & Donati M. (2011):

Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions? *Journal of Clinical Periodontology* 38(Suppl. 11), 188–202.

Bordin S., Flemmig T. F. & Verardi S. (2009):

Role of fibroblast populations in peri-implantitis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 24, 197–204.

Bowen W. H. & Koo H. (2011):

Biology of streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilm. *Caries Research* 45, 69-86.

Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R. & Lappin-Scott H. M. (1995): Microbial biofilms. *Annual Review Microbiology* 49, 711-745.

Darveau R. P. (2010): Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Reviews Microbiology* 8, 481-490.

De Wild M. (2005): Superhydrophilic SLActive® implants. Straumann document 151.52

Ericsson I., Persson L. G., Berglundh T., Marinello C. P., Lindhe J. & Klinge B. (1995): Different types of inflammatory reactions in peri-implant soft tissues. *Journal of Clinical Periodontology* 22, 255–261.

Flemming H.C. & Wingender J. (2010):

The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8, 623-633.

Fürst M., Salvi G.E., Lang N.P. & Persson G.R. (2007):

Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clinical Oral Implants Research* 18, 501-508.

Hannig M. & Joiner A. (2006):

The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monographs in Oral Science* 19, 29-64.

Hannig C. & Hannig M. (2009):

The oral cavity – a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clinical Oral Investigations* 13, 123-139.

Heitz-Mayfield L. J. (2008):

Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *Journal of Clinical Periodontology* 35, 292–304.

Hugoson A., Sjodin B. & Norderyd O. (2008):

Trends over 30 years, 1973-2003, in the prevalence and severity of periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* 35, 405-414. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01225.x

Javed F., Al-Hezaimi K., Salameh Z., Almas K. & Romanos G. E. (2011):

Proinflammatory cytokines in the crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Cytokine* 53, 8–12.

John G., Becker J. & Schwarz F. (2013):

Rotating titanium brush for plaque removal from rough titanium surfaces – an in vitro study. *Clinical Oral Implants Research* 25, 838-842.

John G., Becker J. & Schwarz F. (2015a):

Modified implant surface with slower and less initial biofilm formation. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 17, 461-468.

John G., Becker J. & Schwarz F. (2015b):

Taurolidine as an effective and biocompatible additive for plaque-removing techniques on implant surfaces. *Clinical Oral Investigations* 19, 1069-1077.

Jordan A. R., Micheelis W. (2016):

Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie, Materialienreihe Band 35

Kinane D. F., Winstanley F. P., Adonogianaki E. & Moughal N. A. (1992):

Bioassay of interleukin-1 (IL-1) in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *Archives of Oral Biology* 37, 153–156.

Kolenbrander P. E., Palmer R. J., Jr., Rickard A. H., Jakubovics N. S., Chalmers N. I. & Diaz P. I. (2006):

Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology* 2000 42, 47-79.

Koyanagi T., Sakamoto M., Takeuchi Y., Ohkuma M. & Izumi Y. (2010):

Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16s rRNA gene clone library. *Journal of Oral Microbiology* 2, 1-7.

Koyanagi T., Sakamoto M., Takeuchi Y., Maruyama N., Ohkuma M. & Izumi Y. (2013): Comprehensive microbiological findings in peri-implantitis and periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 40(3), 218-226. doi: 10.1111/jcpe.12047. Epub 2013 Jan 7.

Lang N. P., Bosshardt D. D. & Lulic M. (2011):

Do mucositis lesions around implants differ from gingivitis lesions around teeth? *Journal of Clinical Periodontology* 38(Suppl.11), 182–187.

Leonhardt A., Renvert S. & Dahlen G. (1999):

Microbial findings at failing implants. *Clinical Oral Implants Research* 10, 339-345.

Lindhe J. & Meyle J.; Group D of European Workshop on Periodontology (2008): Periimplant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* 35, 282–285.

Liskmann S., Zilmer M., Vihalemm T., Salum O. & Fischer K. (2004):

Correlation of peri-implant health and myeloperoxidase levels: a cross-sectional clinical study. *Clinical Oral Implants Research* 15, 546–552.

Maniura K. (2013):

Laboratory for Materials – Biology Interactions Empa, St. Gallen, Switzerland
Protein and blood adsorption on Ti and TiZr implants as a model for osseointegration. EAO 22nd Annual Scientific Meeting, October 17 – 19, Dublin

Marsh P. & Martin M. (2009): Oral microbiology. 5th ed, Elsevier, Edinburgh, 222p.

Marsh P. D. & Devine D. A. (2011):

How is the development of dental biofilms influenced by the host? *Journal of Clinical Periodontology* 38(Suppl 11), 28-35.

Mesmer C., Forster A., Antal M. & Nagy, K. (2012):

Clinical, microbiological and immunological findings in peri-implantitis patients with bar-retained lower removable partial dentures, compared to a healthy control group (12-month-follow-up). *Fogorvosi Szemle* 105,59–64.

Quirynen M., De Soete M. & van Steenberghe D. (2002):

Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clinical Oral Implants Research* 13, 1-19.

Rasperini G., Maglione M., Cocconcelli P. & Simion M. (1998):

In vivo early plaque formation on pure titanium and ceramic abutments: a comparative microbiological and SEM analysis. *Clinical Oral Implants Research* 9, 357-364.

Rausch-fan X., Qu Z., Wieland M., Matejka M. & Schedle A. (2008):

Differentiation and cytokine synthesis of human alveolar osteoblasts compared to osteoblast-like cells (MG63) in response to titanium surfaces. *Dental Materials* Jan 24(1), 102-110. Epub Apr 27.

Renvert S., Polyzois I. & Claffey N. (2011):

How do implant surface characteristics influence peri-implant disease? *Journal of Clinical Periodontology* 38(Suppl.11), 214–222.

Renvert S. & Quirynen M. (2015): Risk indicators for peri-implantitis. A narrative review. *Clinical Oral Implants Research* 26(Suppl. 11), 15-44. doi:10.1111/clr.12636

Rimondini L., Fare 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.

Rupp F., Scheideler L., Eichler M. & Geis-Gerstorfer J. (2011):
Wetting behavior of dental implants. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 26, 1256–1266.

Rupp F., Scheideler L., Olshanska N., De Wild M., Wieland M. & Geis-Gerstorfer J. (2006): Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 76(2), 323-334 .

Rupf S., Hannig C. & Hannig M. (2014): Kariesprophylaxe – Aktueller Stand und zukünftige Herausforderungen. *DZZ* 69 (10), 594-606.

Salvi G. E., Aglietta M., Eick S., Sculean A., Lang N. P. & Ramseier C. A. (2012): Reversibility of experimental peri-implant mucositis compared with experimental gingivitis in humans. *Clinical Oral Implants Research* 23,182–190.

Salvi G.E., Fürst M.M., Lang N.P. & Persson G.R. (2008): One-year bacterial colonization patterns of *Staphylococcus aureus* and other bacteria at implants and adjacent teeth. *Clinical Oral Implants Research* 19, 242-248.

Schwarz F., Ferrari D., Herten M., Mihatovic I., Wieland M., Sager M. & Becker J. (2007a): Effects of surface hydrophilicity and microtopography on early stages of soft and hard tissue integration at non-submerged titanium implants: an immunohistochemical study in dogs. *Journal of Periodontology* 78, 2171–2184.

Schwarz F., Herten M., Sager M., Wieland M., Dard M. & Becker J. (2007b): Histological and immunohistochemical analysis of initial and early subepithelial connective tissue attachment at chemically modified and conventional SLA titanium implants. A pilot study in dogs. *Clinical Oral Investigations* 11, 245–255.

Schwarz F., Mihatovic I., Becker J., Bormann K. H., Keeve P. L. & Friedmann A. (2013): Histological evaluation of different abutments in the posterior maxilla and mandible. An experimental study in humans. *Journal of Clinical Periodontology* 40, 807–815.

Schwarz F., Mihatovic I., Ferrari D., Wieland M. & Becker J. (2010): Influence of frequent clinical probing during the healing phase on healthy peri-implant soft tissue formed at different titanium implant surfaces: a histomorphometrical study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* 37, 551–562.

Schwarz F., Mihatovic I., Golubovic V., Bradu S., Sager M. & Becker J. (2015): Impact of plaque accumulation on the osseointegration of titanium-zirconium alloy and titanium implants. A histological and immunohistochemical analysis. *Clinical Oral Implants Research* 26(11), 1281-7. doi: 10.1111/clr.12452. Epub 2014 Jul 17.

Schwarz F., Sager M., Ferrari D., Herten M., Wieland M. & Becker J. (2008): Bone regeneration in dehiscence-type defects at non-submerged and submerged chemically modified (SLActive®) and conventional SLA® titanium implants: an immunohistochemical study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* 35(1), 64–75.

Schwarz F., Sahm N., Mihatovic I., Golubovic V. & Becker J. (2011): Surgical therapy of advanced ligature-induced peri-implantitis defects: cone-beam computed tomographic and histological analysis. *Journal of Clinical Periodontology* 38, 939–949.

Schwarz F., Sculean A., Wieland M., Horn N., Nuesry E., Bube C. & Becker J. (2007): Effects of hydrophilicity and microtopography of titanium implant surfaces on initial supragingival plaque biofilm formation. A pilot study. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie* 11, 333-338.

Schwarz F., Wieland M., Schwartz Z., Zhao G., Rupp F., Geis-Gerstorfer J., Schedle A., Broggini N., Bornstein M. M., Buser D., Ferguson S. J., Becker J., Boyan B. D. & Cochran D. L. (2009):

Potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 88, 544–557.

Shibli J.A., Vitussi T.R., Garcia R.V., Zenóbio E.G., Ota-Tsuzuki C. & Cassoni A. (2007): Implant surface analysis and microbiologic evaluation of failed implants retrieved from smokers. *Journal of Oral Implantology* 33, 232-238.

Siegrist B.E., Brex M.C., Gusberti F.A., Joss A. & Lang N.P. (1991):

In vivo early human dental plaque formation on different supporting substances. A scanning electron microscopic and bacteriological study. *Clinical Oral Implants Research* 2, 38-46.

Sigusch B. W., Höft H. D., Rabold C. & Pfister W. (2006):

Profile parodontalpathogener Bakterien bei Implantatpatienten. *ZWR* 115/12, 547–551.

Skudutyte-Rysstad R., Eriksen H. M. & Hansen B. F. (2007):

Trends in periodontal health among 35-year-olds in Oslo, 1973-2003. *Journal of Clinical Periodontology* 34, 867-872. doi10.1111/j.1600-051X.2007.01129.x

Trombelli L., Farina R., Manfrini R. & Tatakis D.N. (2004a):

Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis: effect of incisor crown form. *Journal of Dental Research* 83(9), 728-731.

Trombelli L., Farina R., Minenna L., Carrieri A., Scapoli C. & Tatakis D. N. (2008): Experimental gingivitis: reproducibility of plaque accumulation and gingival inflammation parameters in selected populations during a repeat trial. *Journal of Clinical Periodontology* 35(11), 955-960. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01315.x. Epub 2008 Sep 17.

Venza I., Visalli M., Cucinotta M., De Grazia G., Teti D. & Venza M. (2010):
Proinflammatory gene expression at chronic periodontitis and peri-implantitis sites in patients with or without type 2 diabetes. *Journal of Periodontology* 81, 99–108.

Xiao J., Klein M. I. & Falsetta M. L. (2012):
The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *Plos Pathogens* 8(4):e1002623. doi: 10.1371/journal.ppat.1002623. Epub 2012 Apr 5.

6. Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Postoperativer Zustand nach Implantatinsertion

Abbildung 2: Charakteristische, histologische Aufnahmen vom Anfang und Verlauf einer periimplantären Erkrankung in unterschiedlichen Gruppen nach 16 Wochen (Toluidinblau-Färbung, Originalvergrößerung x 40).

Abbildung 3: Darstellende immunhistochemische Abbildungen von CD68 Antigenreaktivität innerhalb des entzündlichen Zellinfiltrats in unterschiedlichen Gruppen nach 16 Wochen (Originalvergrößerung x 200).

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Implantatmaterialien mit zugehörigem Sa-Wert

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Orientierungspunkte mit gemessenen Strecken

Tabelle 3: Immunologische Analyse von IL-1 β (pg/Seite), IL-8 (ng/Seite), MMP-8 (ng/Seite) und MPO (ng/Seite) in unterschiedlichen Gruppen von vestibulär und oral (n= 6 Hunde); Mittelwert \pm SD.

Tabelle 4: Histomorphometrische Analyse von PM-aJE, aJE-CBI, PM-aICT und aICT-CBI (in mm, Mittelwert \pm SD) in unterschiedlichen Gruppen von vestibulär und oral (n= 6 Hunde).

Tabelle 5: Kreuztabelle: Diagnose nach histologischer Untersuchung der jeweiligen Gruppen

Tabelle 6: Immunhistochemische Analyse von CD68 positiven Zellen (in %, Mittelwert \pm SD) innerhalb des Entzündungsinfiltrats in verschiedenen Gruppen von vestibulär und oral (n= 6 Hunde).

7. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

3. April 2017, Theresa Iglhaut

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei besonderen Menschen bedanken, die mich in den letzten Jahren auf unterschiedlichste Weise unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Frank Schwarz. Vielen Dank für die Betreuung, die konstante Unterstützung, Hilfestellung und wertvollen Feedbacks.

Bedanken möchte ich mich natürlich auch sehr herzlich bei Univ.-Prof. Dr. Jürgen Becker für das Überlassen des Themas und der praktischen Arbeit in seiner Abteilung.

Außerdem möchte ich ganz besonders Dr. Vladimir Golubović für sein Engagement und seine Hilfestellung vom ersten Tag an danken.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern Rita und Gerhard. Ihr seid die tollste Unterstützung, die man sich als Tochter wünschen kann und ohne eure Rückendeckung wäre ich nicht da, wo ich heute bin.

Zuletzt gilt ein riesengroßer Dank meiner geliebten großen Schwester Karina. Ich danke dir für deine unermüdliche Unterstützung egal wann und wo.