

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. dent. J. Becker

Ex vivo Untersuchung zur Verwendung von Pulverwasserstrahlgeräten auf
biologisch kontaminierten Titanoberflächen von Zahnimplantaten.

Dissertation

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

vorgelegt von

Jan-Kristian Popovski

2018

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

gez.:

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

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Frank Schwarz

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Jörg Handschel

Meiner Familie.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Schwarz, F., Ferrari, D., Popovski, K., Hartig, B., Becker, J., (2009),
Influence of different air-abrasive powders on cell viability at biological
contaminated titanium dental implant surfaces.
J Biomed Mater Res B Appl Biomater (88) S. 83–91

Zusammenfassung:

Bisherige Studien haben gezeigt, dass durch subgingivalen Biofilm auf Titanoberflächen dentaler Implantate, die Regeneration des periimplantären Gewebes limitiert war. Die Verwendung von Kunststoffküretten zur Reinigung der Titanoberflächen war zu Beginn der Studie das Mittel der Wahl. An natürlichen Zähnen werden abrasive Prophylaxepulver zur Dekontamination der Wurzeloberfläche bereits verwendet. Zum jetzigen Wissensstand gibt es in der Literatur keinen Konsens in der Periimplantitistherapie zur Anwendung dieser Substanzen auf Titanoberflächen.

Die aktuelle Studie untersucht zum einen die Effizienz der Behandlung mit verschiedenen, abrasiven Prophylaxepulvern auf kontaminierten Titanoberflächen. Zum anderen soll untersucht werden, inwieweit die Verwendung der Reinigungspulver einen Einfluss auf die Zellneubildung hat.

In Vitro bewertet wurde neben der Partikelart und -größe auch die Distanz und die Angulation, mit der die verschiedenen, abrasiven Prophylaxepulver auf die Titanoberfläche treffen, bewertet.

Hierfür wurden zufällig ausgewählte Probanden gebeten, intraorale Acrylplatten mit sandgestrahlten und säuregeätzten Titanscheiben, welche die Titanoberfläche dentaler Implantate simulierten, für 48 Stunden zu tragen, um Biofilm zu sammeln. Vier verschiedene Prophylaxepulver, drei auf Glycinbasis und eins auf Natriumbikarbonatbasis, mit einer Partikelgröße von 20-75µm wurden einmalig und wiederholt in einem Abstand von 1 und 2 mm verwendet, um den Biofilm auf den Titanplättchen *in vitro* zu entfernen. Die Angulation betrug 30 oder 90 Grad.

Die wiederholt gereinigten Titanplättchen wurden für sieben Tage mit SaOs-2 Zellen inkubiert. Als Bewertungsparameter dienten der residuale Biofilm, das Maß der Oberflächenveränderung des Titans unter dem Elektronenmikroskop und die Entwicklungsfähigkeit von SaOs-2 Zellen an Hand ihrer mitochondrialen Aktivität.

Entsprechend der Bedingungen der aktuellen Studie kann festgehalten werden, dass die Entwicklungsfähigkeit von SaOs-2-Zellen als Korrelat zu humanen Osteoblasten hauptsächlich durch den Partikeltyp abrasiver Pulver bestimmt wird. Die unterschiedlichen Partikelgrößen der Glycinpulver untereinander schienen keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse zu haben. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass die Partikelgröße im Vergleich der Glycin basierten Prophylaxepulver in diesem eng begrenzten Bereich keine signifikante Rolle spielt. Distanz- und Angulationsänderungen des Handstückes führten gleichermaßen zur Reinigung der Titanoberfläche. Besonders auffällig war die Darstellung der Titanoberfläche nach Anwendung von Natriumbikarbonatpulver unter dem Elektronenmikroskop im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hier zeigten sich deutliche Abflachungen des Oberflächenreliefs. Dies hatte keinen Einfluss auf die Entwicklungsfähigkeit der SaOs-2 Zellen.

Entsprechend der aktuellen Studienlage scheint die Dekontamination der Titanoberfläche als Grundvoraussetzung unabdingbar in der Periimplantitisbehandlung. Abrasive Prophylaxepulver auf Glycinbasis sind entsprechend der hier durchgeführten Studie das Mittel der Wahl und sind den bis dato verwendeten Kunststoffküretten in ihrer Effizienz deutlich überlegen. Für zukünftige Studien sollten weitere *in vitro* und *in vivo* Studien in Betracht gezogen werden.

Abstract:

Previous studies have shown that subgingival biofilm on titanium surfaces of dental implants has limited the regeneration of peri-implant tissue. The use of plastic curettes to clean titanium surfaces was the medium of choice at the beginning of the study. On natural teeth, abrasive powders have already been used to decontaminate root surfaces. To the current level of knowledge, there is no consensus in literature on peri-implant therapy for the application of these substances on dental implant titanium surfaces.

On the one hand the current study investigates the efficiency of treatment with various, abrasive powders on contaminated titanium surfaces. On the other hand it is investigated to what extent the use of the cleaning powder has an influence on cell regeneration.

Evaluated *in vitro*, in addition to the particle type and size, the distance and angulation with which the various abrasive powders hit the titanium surface, are also evaluated.

For this purpose, randomly selected probands were asked to wear intraoral acrylic plates with sandblasted and acid etched titanium discs simulating the titanium surface of dental implants for 48 hours to collect biofilm. Four different abrasive powders, three glycine-based and one sodium bicarbonate-based, having a particle size of 20-75µm were used once and repeatedly at a distance of 1 and 2mm to remove the biofilm on the titanium platelets *in vitro*. The angulation was 30 or 90 degrees.

The repeatedly purified titanium platelets were incubated with SaOs-2 cells for seven days. The evaluation parameters were the residual biofilm, the degree of titanium surface modification under an electron microscope and the viability of SaOs-2 cells based on their mitochondrial activity.

According to the conditions of the current study, it can be stated that the viability of SaOs2 cells as a correlate to human osteoblasts is determined mainly by the particle type of abrasive powders. The different particle sizes of the glycine powder with each other did not seem to have a significant influence on the results. This allows the conclusion that particle size does not play a significant role in the comparison of glycine-based abrasive powders in this narrow range. Spacer and angulation changes of the handpiece also led to the cleaning of the titanium surface. Particularly striking was the appearance of the titanium surface after application of sodium bicarbonate powder under the electron microscope compared to the control group. Here, significant flattenings of the surface relief were evident. This did not affect the viability of SaOs-2 cells.

According to the current study situation, the decontamination of the titanium surface as a basic requirement seems indispensable in periimplantitis treatment. Based on the study carried out here, abrasive powders based on glycine are the medium of choice and are clearly superior in their efficiency to the plastic curettes used to date. For future investigations, further *in vitro* and *in vivo* studies should be considered.

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BOP	<i>Bleeding on probing</i> ; Blutung auf Sondierung
C	Kohlenstoff
Ca²⁺	Calciumion
Cl	Chlor
CO₂-Laser	Kohlenstoffdioxidlaser
CP	Clinpro ® prophyl powder
CU²⁺	Kupferion
DGI	Deutsche Gesellschaft für Implantologie
DGZMK	Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
DLVO	Derjagin-Landau-Verwey-Overbeek-Theorie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dV	Partikelgröße
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Air-flow ® Classic
EPS	extrapolymere Substanz
ER,CR:YSSG	Erbium, Chromium doped Yttrium Scandium Gallium Garnet
ER:YAG	Erbium-Yttrium-Aluminium-Garnet Laser
Fe²⁺	Eisenion

HCL	Salzsäure
H₂SO₄	Schwefelsäure
iB	initialer Biofilm
IgA	Immunglobulin A
M	Air-flow ® soft
MCM	McCoy's 5A medium
Mg²⁺	Magnesiumion
n	Probenanzahl
N	Stickstoff
O₂	Sauerstoff
P	Air-flow® perio
PBS	Phosphatgepufferte Lösung
PD	<i>pocket depth</i> , Taschentiefe
PPI	Pyrophosphat
RA	Oberflächenrauigkeit
RB	residualer Biofilm
RB1x	residualer Biofilm nach der ersten Behandlung
RB2x	residualer Biofilm nach der zweiten Behandlung
SaOs2 Zellen	Sarcoma osteogenic-2 Zellen
SEM / REM	<i>scanning electron microscopic</i> , Rasterelektronenmikroskop
SLA	<i>Sandblasted, acid etched</i> = sandgestrahlt und Säure geätzt
Ti	Titan

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Was ist ein Biofilm?.....	1
1.2 Einfluss der Oberfläche auf die Biofilmbildung.....	9
1.3 Einfluss der Oberfläche auf die (Re-)Osseointegration.....	10
1.4 Die Bedeutung des Biofilmes für Erkrankungen der Mundhöhle.....	11
1.5 Mikroflora.....	13
1.6 Ziele der bisherigen Therapieansätze.....	14
1.7 Überblick über die bisherigen Reinigungsverfahren.....	15
1.8 Reinigungsverfahren.....	15
1.9 Bisherige Erkenntnisse zur Verwendung abrasiver Pulver auf Titanoberflächen.....	17
1.10 Bereits verwendete Prophylaxepulver.....	18
1.11 Die Entwicklung bis zum aktuellen Studiendesign.....	19
1.12 Ziele der Arbeit.....	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Auswahl der Probanden.....	21
2.2 Splints und Titanplättchen.....	22
2.3 Versuchsdurchführung.....	23
2.4 Charakteristika der verwendeten Pulver.....	26
2.5 Vermessung des verbliebenen Biofilmes (RB).....	27
2.6 Präzision der Auswertung.....	27
2.7 Zellkulturen.....	28
2.8 Hintergrund zu SaOs2-Zellen.....	29
2.9 Versuch zur Entwicklungsfähigkeit von Zellen.....	29
2.10 Hintergrund zu Luciferin.....	30
2.11 Elektronenmikroskopische Auswertung.....	31

2.12 Statistische Analyse.....	31
2.13 Zusammenfassung der Anteile des Doktoranden.....	32
3 Ergebnisse.....	33
3.1 Verbleibende Plaque Biofilm Areale.....	33
3.2 Entwicklungsfähigkeit der Zellen.....	35
3.3 Charakteristika der verwendeten Pulver.....	37
3.4 Oberflächenmorphologie.....	38
3.5 Ergebnisse des Reinigungsverfahrens.....	40
4 Diskussion.....	43
4.1 Der Einfluss von Angulation und Entfernung auf die Reinigungseffizienz.....	43
4.2 Die Entfernung des Biofilmes durch Pulverwasserstrahlgeräte im Vergleich zu anderen Behandlungsmethoden.....	43
4.3 Der Einfluss der getesteten Substanzen auf die Entwicklungsfähigkeit der SaOS2-Zellen.....	44
4.4 Welche Faktoren haben Einfluss auf die Aktivität der SaOS2-Zellen genommen?.....	45
4.5 Der Einfluss der Partikelgröße und –zusammensetzung auf die Knochenneubildung.....	46
4.6 Klinische Indikationen nach heutiger Studienlage.....	47
4.7 Vorteile der getesteten Prophylaxepulver im Vergleich zu Behandlungsalternativen.....	49
4.8 Zukunftsperspektiven in der Entwicklung von Prophylaxepulver.....	49
4.9 Schlussfolgerung und klinische Relevanz der Ergebnisse.....	51
5 Literaturverzeichnis.....	52
6 Anhang.....	63

1 Einleitung

Die Pathogenese periimplantärer Infektionen und die Besiedlung von Titanimplantaten mit mikrobieller Plaque scheinen in einem kausalen Zusammenhang zu stehen (Alcoforado et al., 1991, Mombelli et al., 1988). Eine Multicenterstudie mit 159 Patienten und 558 dentalen Implantaten zeigte, dass im zweiten und dritten Jahr nach Implantation ca. 2% der Implantate verloren gingen und die Verlustrate proportional zur ansteigenden Plaqueakkumulation an den Implantatoberflächen war (van Steenberghe et al., 1993). In der aktuellen Studie sollen daher Reinigungsverfahren für Titanimplantate verglichen werden. Ziel der Reinigungsverfahren ist es, die Plaque bzw. den Biofilm zu entfernen und so pathologischen Veränderungen des Hart- und Weichgewebes vorzubeugen.

1.1 Was ist ein Biofilm?

Definitionsgemäß ist der Biofilm laut Fraunhofer Institut eine Symbiose von Bakterien, Pilzen und / oder Algen, welche sich auf Oberflächen am Übergang von fest zu flüssig oder von flüssig zu gasförmig organisieren. Im Verbund weisen diese Mikroorganismen verbesserte Eigenschaften und veränderte Stoffwechselaktivitäten gegenüber freien Zellen auf.

Bereits als van Leewenhoek 1673 (Williamson et al., 1973) das Mikroskop entwickelte, befasst sich die Wissenschaft mit Bakterien, Viren, Pilzen etc. Untersuchungen bezüglich der oralen Mikroflora gehen bis in das siebzehnte Jahrhundert zurück. Als Biofilm anerkannt gilt diese Art der Bakterienorganisation seit 1940 durch Heukelekian und Heller.

Kein Biofilm gleicht dem anderen. Jeder Biofilm ist in Zusammensetzung und Aufbau unterschiedlich. Die Diskrepanzen entstehen in Abhängigkeit von den Gewohnheiten der entsprechenden Testperson (Wood et al., 2000). So spielt die Ernährung, die Zusammensetzung des Speichels und auch die Wahl der Zahnpflegeprodukte eine entscheidende Rolle (van der Mei et al., 2002). Gemeinsamkeiten finden sich bezogen auf die Dicke des Biofilmes, die Mikroflora und die Organisation der einzelnen Bestandteile (Wood et al., 2000).

Ein charakteristischer Adaptationsmechanismus ist das so genannte „Quorum Sensing“. Die Bakterien haben über diverse Signalmoleküle die Möglichkeit miteinander zu kommunizieren und so den Stoffwechsel den gegebenen Umständen und Notwendigkeiten anzupassen (Withers et al., 1998, Cvitkovitch et al., 2001). Diese Regulationsmechanismen spielen sich nicht nur auf der Zellmembran ab, sondern inkludieren auch die Desoxyribonukleinsäure (DNA) Replikation (Withers et al., 1998). Quorum sensing gram-negativer Bakterien erfolgt über ein Signalmolekül und ein Regulatorprotein, wobei das Signal in vielen Fällen über Acyl-Homoserin-Lacton vermittelt wird (Parsek et al., 2000). Quorum sensing gram-positiver Bakterien erfolgt über ein Signalmolekül und ein Regulatorprotein mit einer membrangebundenen Komponente und einer intrazellulären Komponente (Pestova et al., 1996).

Der Biofilm besteht aus in Mikrokolonien angeordneten Bakterienformationen, welche in eine Matrix aus Wasser und anionischen extrapolymeren Substanz (EPS) integriert sind. Wasser bildet hier den Hauptbestandteil (Costeron et al., 1987). Die extrapolymeren Substanz (EPS) wird von den Bakterien gebildet (Flemming et al., 2010). Die extrapolymeren Substanz bindet Moleküle wie Kalzium Ionen, Eisen Ionen, Kupfer Ionen und Zellüberreste (Flemming et al., 2001). Sie dienen als Brückenbildner innerhalb der Matrix. Die Bakterien liegen kumuliert innerhalb des Biofilmes vor. Durch die Struktur der Bakterienformationen bilden sich Wasserkanäle, welche sowohl Nährstoffe wie auch Sauerstoff transportieren und somit für den Stoffwechsel essentiell sind (de Beer et al., 1994). Der Transport über Wasserkanäle innerhalb des Biofilmes ist in dynamischer Form über konvektive Diffusion wesentlich effektiver als in statischer Form über Diffusion (Rijnaarts et al., 1993). Daher weisen Biofilme mit dynamischem System eine höhere Lebensdauer und Resistenz gegenüber Einflüssen ihrer Umwelt auf.

Aggregierende, große Zellen in der wasserführenden Schicht können das hydrodynamische System stören und so den Wassertransport hemmen (Rijanaarts et al., 1993).

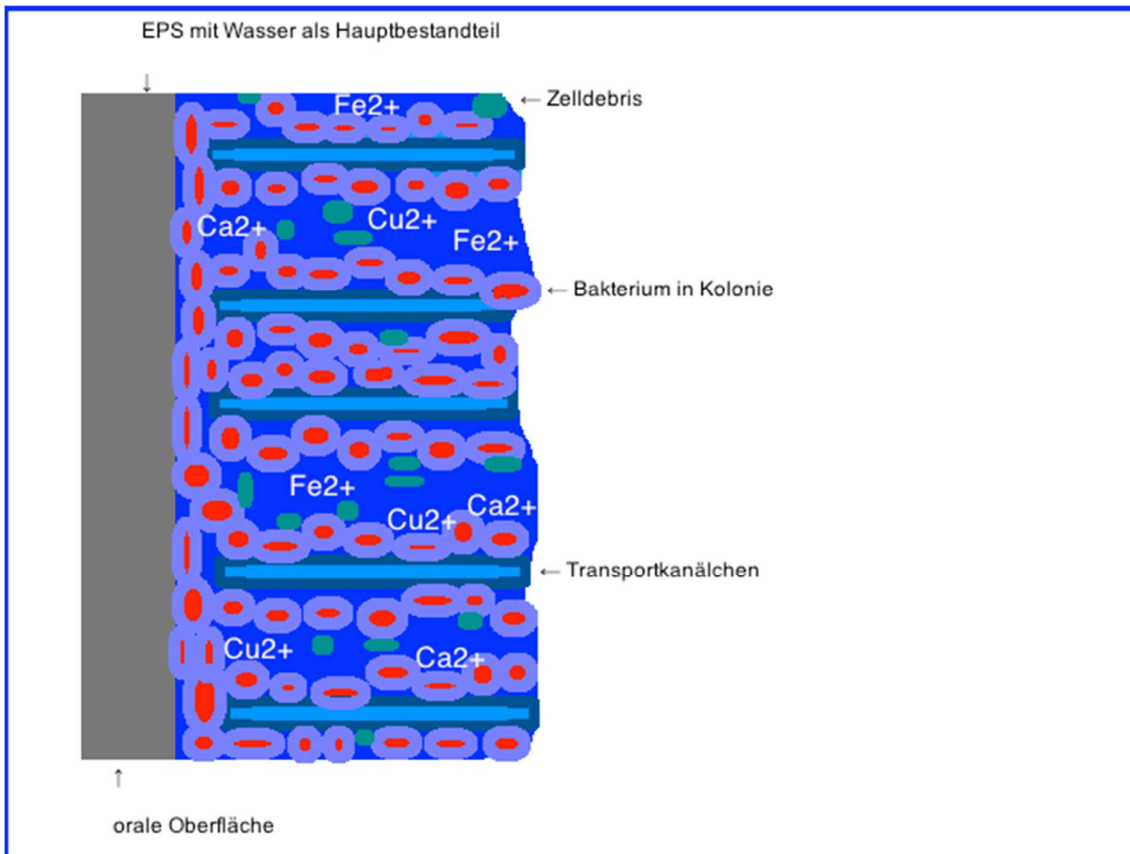


Abb. 1: Schematischer Aufbau des oralen Biofilmes (modifiziert nach Costeron et al., 1987; Flemming et al., 2001; Flemming et al., 2010; de Beer et al., 1994)

Experimentelle Studien zur Entwicklung des oralen Biofilmes zeigen folgende Bestandteile. Proteine des Biofilmes wie die α -Amylase und Immunglobulin A (IgA) entstammen dem Speichel der großen Speicheldrüsen (Glandula parotidea und Glandula sublingualis) (Edgerton et al., 1996). Das frühe Pellikel des Biofilmes (siehe Abb.1) wird vor allem aus den Speichelbestandteilen α -Amylase, Mucin und Prolin reichen Proteinen geformt.



Abb. 2: Entstehung des Biofilms (modif. nach Costeron et al., 1999; Flemming et al., 2001)

Das Flussdiagramm (Abb. 2) zeigt die Entstehung des Biofilmes auf oralen Flächen. Bereits wenige Minuten nach Reinigung der Zahnoberfläche bildet sich darauf das sogenannte Pellikel, auch Konditionierungsfilm oder Schmelzoberhäutchen genannt (Mash et al., 1995). Die Pionierkeime nutzen zur Anhaftung auf der Oberfläche extrazelluläre Komponenten wie Flagellen, Pili und spezielle Fasern. Auch membrangebundene Proteine helfen bei der Primärbesiedlung der Oberfläche (Bullitt et al., 1995, Thomas et al., 2004). Über Fimbrien können einige Bakterien sich über die Oberfläche rollen und so anhaften. Dieses Prinzip wird auch „stick and roll“ Adhäsion genannt (Thomas et al., 2004).

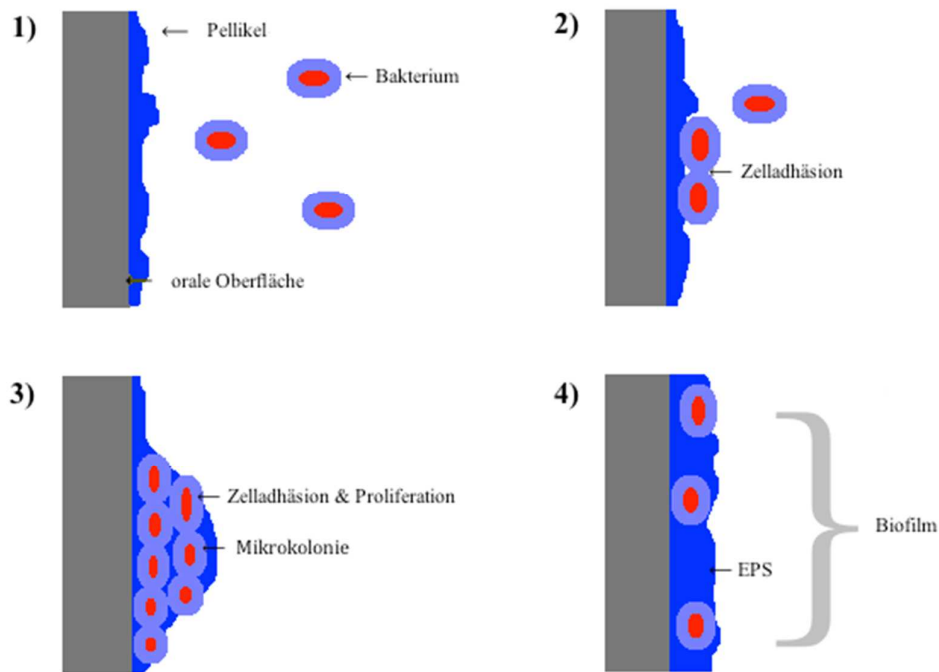


Abb. 3: Schematische Darstellung der initialen Biofilmbildung (modifiziert nach Rickard et al., 2003)

Diese „stick and role“ Adhäsion findet in der oberen Darstellung (Abb. 3) auf dem zweiten Bild statt. Bei der Kolonisierung durch Bakterien wird zwischen den Frühbesiedlern und den Spätbesiedlern unterschieden (Kolenbrander et al., 1993). In der Auflistung (Abb. 4) ist beispielhaft die Anlagerung verschiedener Bakterienstämme unterteilt. Bakterien mit einer Vorreiterrolle sind dick geschrieben. Eine spezielle Auswahl an Frühkolonisierern binden dabei mit ihren adhären Oberflächenmolekülen an Rezeptoren des Pellikels. Diese sind mit einem prozentualen Anteil von ca. 65% vor allem Streptokokkenstämme (Petersen et al., 2004). Andere Bakterienstämme gehen Koaggregationen untereinander ein, ohne direkt an das Pellikel zu binden. *Fusobacterium nucleatum* kommt herausragende Aufgabe zuteil. Es dient als Vermittler zwischen Früh- und Spätbesiedlern (Abb.4) (Kolenbrander et al., 1993).

Frühbesiedler



- Streptokokkus oralis**
- Streptokokkus mitis
- Streptokokkus gordonii
- Capnocytophaga ochracea
- Streptokokkus Sanguis**
- Actinomyces naealundii
- Prevotella loescheii
- Actinomyces israelii
- Veillonella atypica
- Capnocytophaga gingivalis
- Propionibakterium acnes

Spätbesiedler



- Fusobakterium nucleatum**
- Actinomyces actinomycetemcomitans
- Treponema Subspezies
- Eubacterium Subspezies
- Capnocytophaga sputigena
- Porphyromonas gingivalis
- Streptokokkus flueggei

Abb. 4: Früh- und Spätbesiedler (modifiziert nach dem Modell der Kolonisation von Kolenbrander et al., 1993, 2002)

Zur Anlagerung der Bakterien an orale Oberflächen gibt es verschiedene Theorien. Zu Grunde liegen den Theorien elektrostatische, hydrodynamische und ionische Bindungen.

Die Derjagin-Landau-Verwey-Overbeek-Theorie (DLVO) stellt ein dynamisches, kolloidales System dar, welche einer irreversiblen Bindung der Teilchen im Biofilm

bedingen würde. Die Bindungen im Biofilm sind nach der DLVO elektrostatische und Van der Waals Bindungen (Vigeant et al., 2002; Marshall et al., 1971). Nach Anlagerung der Bakterien über die elektrodynamische Anziehung helfen extrazelluläre Zellorganellen (Bullitt et al., 1995, Thomas et al., 2004) den Mikroorganismen, innerhalb des Pellicels zu verbleiben. Weitere freie Bindungsgruppen stabilisieren die Position des Bakteriums und schützen so vor einer Verdrängung des Bakteriums (Hong et al., 2008).

Andere Forschungsgruppen unterteilen den Biofilm in drei Kompartimente: die äußere Masse, die oberflächennahe Masse und die oberflächengebundene Masse. Die Position der Bakterien innerhalb der drei Kompartimente ist abhängig von hydrodynamischen und physiko-chemischen Effekten zwischen Bakterien, der extrazellulären Substanz und der Oberfläche (Vigeant et al., 2002). Entsprechend dieser Modelle spielt auch die Oberflächenbeschaffenheit und –energie eine entscheidende Rolle für die Biofilmbildung. Die Ladung und Energie der Oberfläche sowie die Größe und Rauigkeit haben Einfluss auf die entstehenden elektrostatischen und hydrodynamischen Bindungen und somit auf die Adhäsion und Ko-aggregation der Mikroorganismen sowie der extrazellulären Moleküle.

In Folge der Koloniebildung wird der initiale Biofilm über die vermehrte extrapolymeren Substanz, die Einlagerung externer Moleküle aus dem Speichel und den Produkten des Bakterienstoffwechsels zu einem weitestgehend abgeschlossenen geschützten Lebensraum. Dieser Prozess wird als Maturation bezeichnet. Der ausgereifte Biofilm zeigt eine Plateauphase, in welcher kein logharhythmische Wachstum mehr stattfindet. Biofilme sind somit selbstlimitierend entsprechend ihrer Zusammensetzung. Es wird vermutet, dass auch hier das Quorum sensing eine übergeordnete Rolle spielt.

Flemming (2001) unterteilt die oben genannten Stadien der Biofilmbildung in 3 übergeordnete Phasen ein.



Abb. 5: **Stadien der Biofilmbildung (modifiziert nach Flemming et al., 2001)**

1.2 Einfluss der Oberfläche auf die Biofilmbildung

Besonders bei beeinflussbaren Therapien wie die Versorgung mit Zahnersatz auf eigenen Zähnen oder Implantaten interessiert die Oberflächenbeschaffenheit der Materialien.

Aus vorangegangenen Studien geht hervor, dass die Hydrophilie der Oberfläche keine sichtbare Rolle in Bezug auf die Biofilmneubildung spielt, jedoch die Mikromorphologie der Titanoberfläche (Schwarz et al., 2007b). In einer Studie von Al-Ahmad et al., 2010 wurden verschiedene Implantat Materialien bezogen auf ihren Einfluss auf die Biofilmbildung getestet. Die Schichtdicke des Biofilmes nach wenigen Tagen war abhängig vom Material der Implantate. Die Zusammensetzung des Biofilmes wurde hierdurch nicht agitiert. Keines der Materialien konnte der Biofilmbildung vorbeugen. Zusätzlich scheint auch die freie Energie der Teilchen des Oberflächenmaterials Einfluss auf die Biofilmbildung zu nehmen (Quirynen et al., 1995).

Entscheidend für die aktuelle Studie ist es nun herauszufinden, ob die zu testenden Reinigungsverfahren in vitro mit einer Oberflächenveränderung einhergehen und ob die Reinigungsverfahren Einfluss auf die Zellneubildung haben.

1.3 Einfluss der Oberfläche auf die (Re-) Osseointegration

Über den Einfluss der Titanoberfläche dentaler Implantate auf die Osseointegration nach Implantatinsertion gibt es eine Vielzahl an Studien (Becker et al., 2006; Schliephake et al., 2006, Schwarz et al., 2007b; Berglundh et al., 2007, Al-Nawas et al., 2007). Über die Re-osseointegration ist die Literatur begrenzter. In einer Studie am Hund (Persson et al., 2001) konnte gezeigt werden, dass die Reosseointegration durch Dekontamination der Oberfläche limitiert ist. Die gereinigten Oberflächen wiesen innerhalb der Grenzen der Studie die Tendenz zur Reosseointegration auf. Die grundlegende Morphologie der Oberfläche scheint eine signifikante Rolle bezogen auf die Reosseointegration zu spielen (Persson et al., 2001b). In einer Übersichtsarbeit von 25 Tierstudien (Renvert et al., 2009) konnte konkludierend festgestellt werden, dass die Summe an Reosseointegration innerhalb der Studien deutliche Unterschiede in Abhängigkeit der Implantat Oberfläche aufwies. Die Reinigung alleine schien auch hier nicht der ausschließliche Faktor für die Wiederherstellung zu sein.

1.4 Die Bedeutung des Biofilmes für Erkrankungen der Mundhöhle

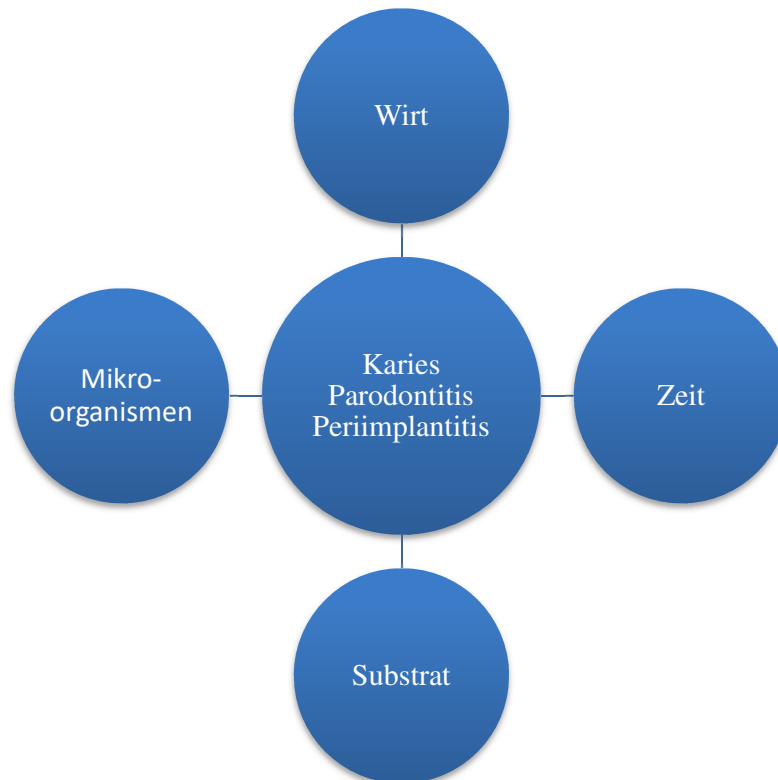


Abb. 6: Einflussfaktoren auf die Entstehung bakterieller Entzündungen (modifiziert in Anlehnung an die Ätiologie der Karies und Parodontitis (König et al., 1987))

Wie in der oberen Abbildung (Abb. 6) dargestellt ist die Entstehung von Erkrankungen in der Mundhöhle (Karies, Parodontitis, Periimplantitis) multikausalen Ursprungs. Essentiell für die Ätiologie dieser Erkrankungen sind Mikroorganismen, die über einen gewissen Zeitraum unter Zuführung von Nahrung auf einen Organismus und entsprechend sein Immunsystem einwirken (König et al., 1987).

Entsprechend der für orale Erkrankungen festgelegten Parameter nach König et al., (1987) spielt der Biofilm eine entscheidende Rolle und vereint diese Parameter. Umso relevanter scheint die Dekontamination oraler Oberflächen als Prävention und Therapie. Seit nachgewiesen wurde, dass die Periimplantitis mit Mikroorganismen assoziiert ist (Leonhardt et al., 1999, Mombelli et al., 1987), wird

vermutet, dass die Entfernung des auf der Implantatoberfläche abgelagerten Biofilmes als Voraussetzung für eine erfolgreiche Periimplantitistherapie unabdingbar ist.

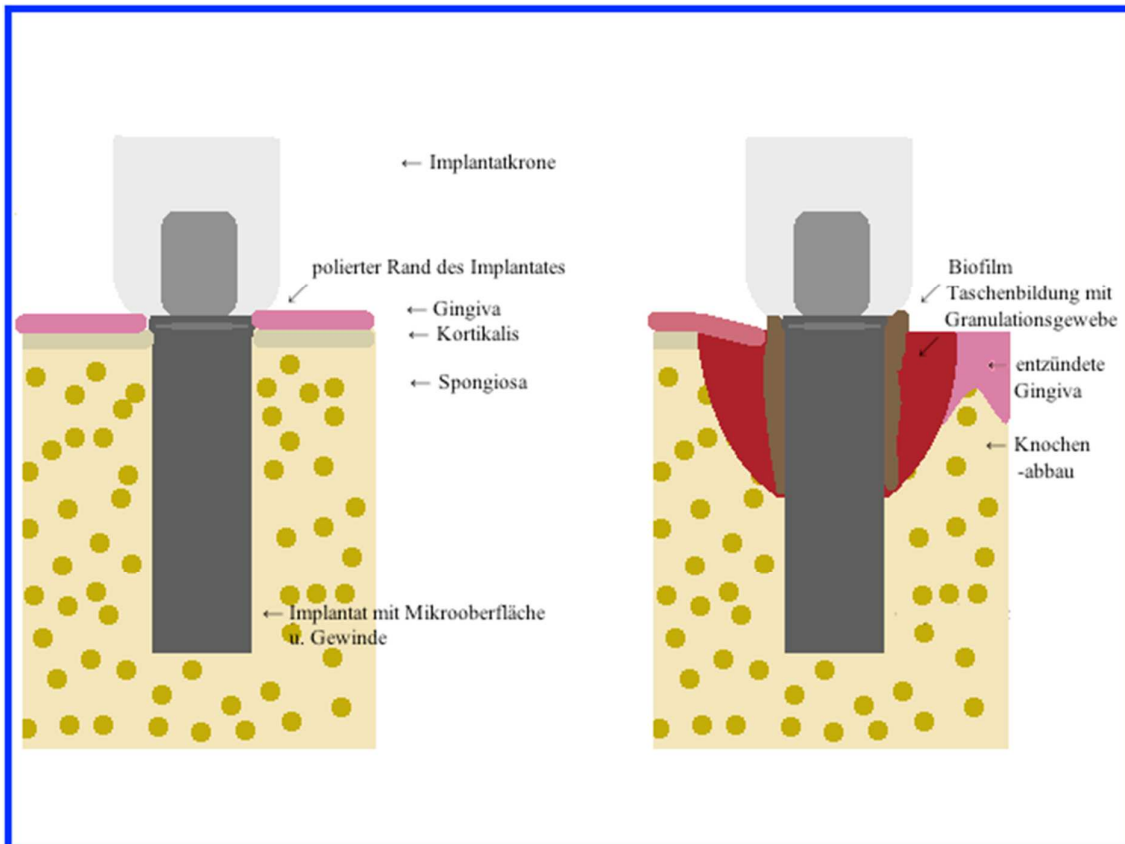


Abb. 7: Die Bedeutung der Biofilmbildung für die Entstehung der Periimplantitis (eigene Zeichnung)

Die Abbildung (Abb. 7) zeigt links ein vollständig osseointegriertes Implantat. Rechts ist ein Implantat mit angelagertem Biofilm dargestellt. Durch die Entzündungsreaktion auf die Bestandteile des Biofilmes kommt es zu Knochenabbau und somit zur Taschenbildung am Implantat (Leonhardt et al., 1999, Mombelli et al., 1987). Bei letzterer spricht man von einer Periimplantitis.

1.5 Mikroflora

Mit zunehmender Anzahl an gesetzten Zahnimplantaten steigt auch die Zahl an periimplantären Entzündungen. Die Zahl an betroffenen Implantaten ist schwer zu bemessen, sie liegt in etwa bei 10% der Implantate und 20% der Patienten (Mombelli et al., 2012). Genauso wie die primäre Implantatplanung, die Implantatinserion und die Versorgung der Implantate mit Zahnersatz, ist auch die Behandlung und Nachsorge der Implantate zum Bestandteil des Praxisalltages geworden. Folglich untersuchten viele aktuelle Studien die Zusammensetzungen der Bakterienkolonien.

Die Mikroflora in periimplantären Defekten ist überwiegend anaerob (van Winkelhoff et al., 2000), wobei gram-negative Bakterien die übergeordnete Rolle spielen (Mombelli et al., 2000). Die Keime *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, und *Treponema denticola* sind sowohl im infizierten, wie auch im gesunden periimplantären Gewebe nachweisbar (Casado et al., 2011). Während die oben genannten Bakterien keine direkte Korrelation mit einem pathologischen Geschehen haben, ist der Nachweis der Bakterien *Tannerella forsythia*, *Campylobacter* und *Peptostreptococcus micros* charakteristisch für periimplantäre Infektionen. Bei schmerzhaften Läsionen dominieren die Spezies *P. micros*, *Fusobakterium* und *Eubakterium* (Tabanella et al., 2009). Die plaqueinduzierte Periimplantitis wird demzufolge hauptsächlich durch den orangenen Komplex geprägt. Studien zeigen, dass auch die Spezies der Staphylokokken mit der Periimplantitis assoziiert ist (Persson et al., 2013, da Silva et al., 2013). Zusätzlich wurden in einer aktuellen Studie untypische Keime wie *Filifaktor alocis*, *Dialister invisus* und *Mitsuokella dentalis* nachgewiesen (Da Silva et al., 2013). Generell lässt sich sagen, dass die Bakteriendichte vom gesunden periimplantären Gewebe beziehungsweise vom gesunden parodontalen Gewebe hin zu Periimplantitis und Parodontitis ansteigt. Einen Unterschied in der Bakterienzahl von Mukositis zu Periimplantitis und Parodontitis gibt es nicht (Cortelli et al., 2013). Die Konzentration von *P. gingivalis* und *Agg. actinomycetemcomitans* ist sowohl bei parodontal geschädigten Zähnen wie auch bei periimplantären Läsionen nahezu identisch. Die übrigen Spezies scheinen sich bei der Parodontitis stärker zu manifestieren als bei der Periimplantitis (Cortelli et al., 2013).

1.6 Ziele der bisherigen Therapieansätze

Ziel aller Therapieansätze der periimplantären Behandlung sollte eine Restitutio ad integrum in Form einer Reosseointegration sein. Die Osseointegration ist laut Branemark et al., (1969) der unter einem Lichtmikroskop sichtbare, direkte funktionelle und strukturelle Verbund des angrenzenden Knochens mit der Oberfläche des inserierten Implantates. Da die Re-osseointegration bislang ein utopisches Ziel darstellt, formulieren Forscher folgende Teilziele. Als Therapieerfolg wird ein entzündungsfreies, langzeitstabiles Hart- und Weichgewebe um ein klinisch gereinigtes Implantat angesehen. Die Wiederanlagerung von Hart- und Weichgewebe wird ebenfalls als Therapieerfolg angesehen.

Folgende Parameter sollen erreicht werden:

- Entfernung des Biofilmes
- Entfernung harter und weicher Beläge, Entfernung subgingivaler Konkremente
- Reinigung ohne Veränderung der Titanoberfläche
- Reinigung ohne Gewebeschädigung, ohne Fremdkörperreaktion
- Erhalt der Regenerationsfähigkeit der Zellen des ortständigen Gewebes (Knochen, Gingiva)

In der S3-Leitlinie (AWMF 2016) der Deutschen Gesellschaft für Implantologie (DGI) und der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK) wird die Dekontamination der Titanoberfläche als hoch signifikanter Faktor für den Erfolg einer Periimplantitisbehandlung angesehen. Dies steht im Einklang mit den hier definierten Therapiezielen. Beschrieben werden in der S3-Leitlinie neben dem mechanischen Debridement weitere Behandlungstechniken zur Entfernung der bakteriellen Plaque sowie adjuvante Therapien zur Verringerung der bakteriellen Besiedlung.

1.7 Überblick über die bisherigen Reinigungsverfahren

Grundprinzip einer jeden Therapie ist eine profunde Reinigung der Implantatoberfläche (Lindhe und Meyle 2008).

Überblick über bisherige Reinigungsverfahren

manuelle Reinigung (Kürretten)

Ultraschall

CO2 Laser, Er:Yag Laser, Nd:YAG, Er:YAG, Er,Cr:YSGG

abrasive Pulver (Bsp. Airflow®)

Abb. 8: **Überblick über die bisherigen Reinigungsverfahren**

1.8 Reinigungsverfahren

Gemäß einer ursachenbezogenen Therapie bestehen mehrere Lösungsansätze, um den entzündlichen Prozess im umliegenden Hart- und Weichgewebe zu behandeln. Die Reinigungsverfahren oraler Oberflächen sind mannigfaltig (Abb. 8). Jede Einzelne ist in der Literatur gut umschrieben.

Erste Veröffentlichungen zur manuellen Reinigung an periimplantären Defekten gehen auf die frühen neunziger Jahre zurück (Mombelli et al., 1992). Hier wurde erstmals nach Beschreibung der Periimplantitis als anerkannte, orale Erkrankung der positive Effekt der Dekontamination einhergehend mit verminderter Blutung (*Bleeding on Probing*; BOP) und einer Reduktion der Taschentiefe (*Pocket depth*; PD) publiziert.

Sowohl mechanische und Ultraschall unterstützte Reinigung, die adjuvante Verwendung chemischer Stoffe wie desinfizierende Spülungen, lokale oder systemische Antibiotika oder Lasertherapie sind nach klinischen Ergebnissen

effektiv, um eine Progression von Erkrankungen wie Periimplantitis oder Parodontitis zu verhindern (Büchter et al., 2004, Karring et al., 2005, Schwarz et al., 2005b). Die Ergebnisse zu Knochenregeneration und Reosseointegration variieren beträchtlich, teilweise wird eine Re-osseointegration sogar in Frage gestellt (Schou et al., 2004). Verschiedene Faktoren könnten die fehlende Reintegration erklären. Allem voran ist per Plastikkürette und Schall-/Ultraschallscaler keine absolute Dekontamination der rauen Titanoberfläche möglich (Schwarz et al., 2005; Schwarz et al., 2006a). Kunststoffküretten zeigen im Vergleich zu Stahlküretten keine Oberflächenveränderungen an der Implantat Oberfläche (Fox et al., 1990). Die mechanische Bearbeitung der Titanoberfläche mit Instrumenten, die eine höhere Härte haben als Titan, könnte Abnutzungserscheinungen und Ermüdung derselben zur Folge haben und somit in die Bildung eines Attachments negativen Einfluss ausüben (Schwarz et al., 2003). In der genannten Studie wurde exemplarisch das Vector® Ultraschallsystem mit Arbeitsspitzen aus Carbonfaser verwendet. Hier zeigten sich deutliche Veränderungen auf der Titanoberfläche, sodass ein klinischer Einsatz an Titanimplantaten nicht indiziert ist (Schwarz et al., 2003). In Bezug auf die Effektivität zeigen sich keine Unterschiede zwischen der klassischen manuellen Reinigung mit manuellen Küretten und dem Vector® System (Karring et al., 2005).

In einer vorangegangenen Studie wurde der Unterschied zwischen einer Reinigung mit einem Natriumchlorid getränkten Wattepellet und einem Polierbürstchen am Hund getestet (Persson et al., 1999). Beide Verfahren zeigten ähnliche Ergebnisse im Bezug auf die Reintegration. Es wurde nur eine minimale Verbesserung der Gewebeanhaftung erreicht.

Aktuell zeigen verschiedene Verfahren zur Säuberung der Titanoberflächen ähnlich gute Ergebnisse. Sowohl die Dekontamination mit einem Kohlenstoffdioxidlaser (CO₂ Laser)(Deppe et al., 2001, Mouhyi et al., 2000) als auch mit einem Erbium-Yttrium-Aluminium-Granatlaser (ER:YAG) (Schwarz et al., 2005b, Schwarz et al., 2006b) zeigen gute Ergebnisse bezogen auf die Reintegration und Entzündungsfreiheit. Die Laserapplikation scheint unbedenklich in Bezug auf die Oberflächenstruktur des Titans zu sein (Schwarz et al., 2003).

Publikationen zur Anwendung photodynamischer Therapie an Tumorzellen gehen

auf die sechziger Jahre zurück (Hunter et al., 1967). Das Behandlungsprinzip lässt sich auch für die Therapie dentaler und implantärer Entzündungen anwenden. In einer Studie von Woods et al., von 1999 wird die Anwendung der photodynamischen Therapie *in vivo* beschrieben. Der hier verwendete Photosensibilisator Zink(II)phthalocyanine lagert sich in den Biofilm ein. Durch die Laserapplikation wird der Zelltod der Bakterien hervorgerufen und so der Biofilm gestört. Eine Studie zur Verwendung der photodynamischen Therapie unter der Anwendung eines Helium-Neonlasers konnte eine signifikante Reduktion der Bakterienstämme *Propionibacterium acnes*, *Actinomyces odontolyticus*, *Porphyromonas gingivalis* und *Prevotella intermedia* zeigen. Insgesamt konnte die Formung von Bakterienkolonien um ca. 50% inhibiert werden (König et al., 2000). Die erste Publikation zur Verwendung des bis heute unter anderem üblichen Farbstoffes Toluidin blau ist von Dörtbudak et al., 2001. Der Photosensibilisator wurde für 60s auf die Titanimplantate aufgetragen und anschließend für 60s mit einem Diodenlaser bei 690nm behandelt. Die Studiengruppe konnte eine signifikante Reduktion der Bakterien *Actinomyces actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* nachweisen, jedoch konnte auch hier keine absolute Dekontamination erzielt werden.

Im Vergleich weisen sowohl die Behandlungen mit dem Er:Yag Laser als auch die photodynamische Therapie gute Ergebnisse auf. Jedoch kann bei keiner der oben genannten Therapien eine vollständige Bakterienelimination nachgewiesen werden.

1.9 Bisherige Erkenntnisse zur Verwendung abrasiver Pulver auf Titanoberflächen

Frühere Studien haben gezeigt, dass sich auch die Applikation abrasiver Pulver mit einem Pulverwasserstrahlgerät für die Behandlung periimplantärer Entzündungen eignen könnte (Augthun et al., 1998, Chairay et al., 1997, Kreisler et al., 2005, Mengel et al 1998). Erste Publikationen, die dieses Verfahren als potentiell effektiv erachten, gehen ebenfalls auf die frühen neunziger Jahre zurück (Singh et al., 1993, Dennison et al., 1994). Diese Systeme, welche mit abrasiven Pulvern arbeiteten, schienen die Plaque vorhersagbar zu entfernen, jedoch zu

mikroskopisch sichtbaren Oberflächenveränderungen zu führen (Kreisler et al., 2005, Mengel et al., 1998).

Leider existieren bis dato keine einheitlichen signifikanten Daten und Empfehlungen zur Verwendung der abrasiven Pulver auf Titanoberflächen. Die verschiedenen Ergebnisse dieser Studien könnten auf die unterschiedlichen Parameter wie Partikelart und Größe, sowie auch die Entfernung und Angulation des Handstückes zurückzuführen sein. Experimentelle *in vitro* und *in vivo* Studien sind für eine reproduzierbare Therapie zwingend erforderlich.

Es besteht bei falscher Anwendung der Pulverwasserstrahlgeräte die Gefahr der Emphysembildung nach Anwendung (Van de Velde et al., 1991). Eine profunde Schulung der Anwender ist daher zwingend erforderlich.

Im Einklang bisheriger Studien lässt sich die Aussage treffen, dass bisherige Verfahren der Pulverwasserstrahlgeräte gute Ergebnisse bezogen auf die Dekontamination zeigen, jedoch einheitlich Oberflächenveränderungen des Titans nachweisbar sind.

1.10 Bereits verwendete Prophylaxe Pulver

Der Erfinder der Pulverwasserstrahlgeräte im ursprünglichen Sinne war R.B. Black (1945). Damals noch in anderer Funktion dienten die Geräte der Kavitätenpräparation. Erst Jahre später (Willmann et al., 1980) wurde diese Technik für die Prophylaxe und Parodontitistherapie weiterentwickelt. Zusätzlich zu Druckluft und Pulver wurde nun Wasser appliziert. Das abrasive Pulver damals z.B. aus Aluminiumoxiden wurde durch Natriumbikarbonat und später auch durch Pulver auf Glycinbasis ersetzt.

Zu Beginn der aktuellen Studie waren bereits zwei der zu testenden Produkte gut in der Literatur umschrieben und haben sich in der Praxis bewährt. Dies war zum einen das Clinpro® Prophy Powder von 3MESPE (Petersilka et al., 2003b) und zum anderen das Airflow® Classic von EMS (Schwarz et al., 2006a). Sowohl Pulver auf Glycinbasis wie auch auf Natriumbikarbonatbasis sind bezüglich ihrer Gewebeverträglichkeit für das umliegende Gewebe und Effizienz an natürlichen Zähnen bereits umfassend getestet worden (Petersilka et al 2003; Petersilka et al 2003b).

	Natriumbikarbonat	Glycin
Chemische Formel	NaHCO ₃	C ₂ H ₅ NO ₂
Molare Masse	84,01 g/mol	75,07g/mol
PH-Wert	7,8	6,2
pKs Wert	10,33	pKCOOH 2,34 pKNH ₂ 9,6
Dichte	2,22 g/ml	1,6 g/ml
Löslichkeit	96 g/l	250 g/l
Geschmack	Leicht salzig	süßlich
Aussehen	Farbloses, kristallines Pulver	Farbloses, kristallines Pulver

Abb. 9: Chemische Eigenschaften der Grundsubstanz der Prophylaxepulver (umschrieben durch den Hersteller)

1.11 Die Entwicklung bis zum aktuellen Studiendesign

Die aktuelle Studie ist Teil eines Studienprojektes welches bereits April 2003 zur Genehmigung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit der Studiennummer 2157 vorlag (Anhang) und bereits 2005 veröffentlicht wurde. Das Thema dieses Projektes lautete: „Untersuchung zur Entfernung bakterieller Biofilme von verschiedenen, beschichteten Titanimplantaten mit Hilfe eines Er:Yag Lasers“. Hier wurden die Reinigungseffekte von einem ER:Yag, einem Ultraschallgerät, einer Plastikkürette und einer Spüllösung getestet (Schwarz et al., 2005b). Obwohl der Er:Yag Laser die besten Ergebnisse in der Reinigungsfähigkeit zeigte, konnte keines der Verfahren eine signifikante Biokompatibilität und Anlagerung neuer Zellen im Sinne einer Restitutio ad integrum erreichen.

In einer darauffolgenden Studie (Schwarz et al., 2006a) wurden die Reinigungseffekte von einem Ultraschallgerät, einem Pulverwasserstrahlgerät, einer Plastikkürette und einer Spüllösung getestet. Zugrunde lagen Daten früherer Studien, welche einen positiven Effekt abrasiver Reinigungspulver implizieren (Augthun et al., 1998, Chairay et al., 1997, Kreisler et al., 2005, Mengel et al 1998).

Der Biofilm wurde über einen Zeitraum von 72h gesammelt. Nach der Dekontamination mit dem jeweiligen Verfahren wurde die Biokompatibilität an Hand von SaOs2 Zellen (Sarcoma osteogenic-2 Zellen) untersucht. Die Oberflächen, die mit dem Pulverwasserstrahlgerät gereinigt wurden, zeigten erste Anlagerungen neuer Zellen auf der Oberfläche. Resultierend aus dieser Studie war die Erkenntnis, dass speziell die Dekontamination als alleiniger Faktor nicht entscheidend für die Reosseointegration scheint, jedoch die besten Ergebnisse bezogen auf die SaOs2 Zellen mit der Reinigung durch ein Pulverwasserstrahlgerät erzielten.

Signifikant gute Ergebnisse des Studienprojektes (Schwarz et al 2005b; Schwarz et al., 2006a) warfen die Frage auf, welchen Unterschied verschiedene Pulverstrahlmaterialien auf die Reossifikation periimplantärer Defekte zeigen. Weitere Studien schienen essentiell. Basierend auf einer Studie an orthodontisch versorgten Zähnen schien auch die Angulation und Dauer der Applikation eine entscheidende Rolle für den Erfolg der Therapie einzunehmen (Gerbo et al., 1993). Applikationsdauer und Angulation des auftreffenden Strahles sind weitere wichtige Parameter für zukünftige Studien gewesen.

1.12 Ziele

Studien haben gezeigt, dass die Bildung eines oralen Biofilmes an konditionierten Titanoberflächen in die Zelladhäsion und Proliferation der umliegenden Gewebe einzugreifen scheint. Die Entfernung des Biofilmes nach konventionellen Methoden wurde bereits in vielen Studien getestet, jedoch ist die Regeneration des umliegenden Gewebes bislang ohne signifikanten Erfolg geblieben. Bislang gibt es kein adäquates Reinigungsverfahren für Titanoberflächen *in situ*.

In der vorliegenden Studie war es das Ziel,

- 1.) die Effektivität abrasiver Prophylaxepulver an kontaminierten Titanoberflächen zu bewerten und
- 2.) die Regenerationsfähigkeit der Zellen aus umliegenden Geweben nach Reinigung mit abrasiven Prophylaxepulvern zu beurteilen.

2 Material und Methoden

2.1 Auswahl der Probanden

Sechs gesunde Freiwillige (2 Frauen, 4 Männer; 29,5 +/-1,2 Jahre) wurden nach definierten Kriterien für die Studie ausgewählt. Jeder Teilnehmer bekam eine detaillierte Beschreibung des Versuches und wurde gebeten, eine Einverständniserklärung zu unterzeichnen.

Für die Auswahl der Probanden galten folgende Kriterien:

- keine systemische Antibiose während der letzten 6 Monate
- gute Mundhygiene (Plaqueindex < 1)
- kein Anzeichen einer Parodontitis oder einer Entzündung des Weichgewebes
- Nichtraucher

2.2 Splints und Titanplättchen

Vor Versuchsbeginn bekamen alle Probanden eine professionelle Zahnreinigung. Der für die Studie erforderliche Biofilm wurde von den Probanden auf einer Acrylplatte mit 4 oberflächenkonditionierten Titanplättchen (Institut Straumann AG, Basel, Schweiz) gesammelt. Die Acrylplatte wurde im Oberkiefer mit kleinen Halteklammern am Zahnbogen fixiert. Die Probanden wurden angehalten, diese für 48h zu tragen, ohne dabei ihre reguläre Ernährung umzustellen. Der Splint sollte die gesamte Zeit *in situ* verbleiben, ausschließlich zur Zahnpflege durfte er herausgelegt werden. Die Zahnpflege durfte nur mit Wasser und Zahnbürste durchgeführt werden. Weder Zahnpasta noch Mundspülungen waren erlaubt.

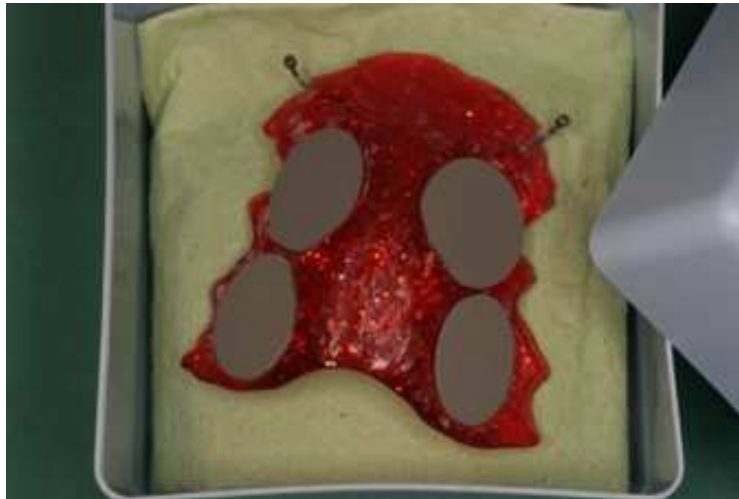


Abb. 10: Acrylplatte mit Titanplättchen (eigenes Foto)

Titanplättchen: \varnothing 15mm, 1,5mm Dicke
sandgestrahlt mit grober Körnung 0,25-0,5mm
Säuregeätzt mit HCl/H₂SO₄ (SLA)
Oberflächenrauigkeit (RA) 3,22 +/-0,88 μ m



Abb. 11: Titanplättchen (eigenes Foto)

Die Probeplättchen wurden am harten Gaumen mit 1mm Abstand auf der Acrylplatte befestigt. Der Abstand diente zum einen der Schaffung einer feuchten

und nahrhaltigen Umgebung für die Plaqueakkumulation ohne störende Einwirkung der Zunge.

Die Plättchen wurden direkt nach Entnahme mit Erythrosinfarbstoff gefärbt. Nur Proben mit einem initial homogenen Biofilm (IB) konnten in die Studie mit einbezogen werden (n=160). Zur Überprüfung wurden die Plättchen mit einem Lichtmikroskop untersucht (Olympus BX50, Olympus, Hamburg, Deutschland). n = 32 Probenplättchen mussten aus der Auswertung herausgenommen werden, da der Biofilm inhomogen auf dem Plättchen aufgelagert war. Direkt nach der Färbung wurden die Titanplättchen entsprechend der Zuordnung mit einem abrasiven Pulver behandelt. Die zufällige Zuordnung der Proben erfolgte mittels einer Computer generierten Liste (RandList1, DatInf GmbH, Tübingen, Deutschland).

2.3 Versuchsdurchführung

Die Gesamtmenge aller auswertbaren homogenen Proben lag bei n = 160.



Abb. 12: **Pulverstrahlgerät (eigenes Foto)**

Zur Reinigung der Titanplättchen wurde ein Pulverwasserstrahlgerät (Airflow S1® EMS, Nyon, Schweiz) mit einem Standardhandstück (Airflow ® EL-308/A EMS, Nyon, Schweiz) verwendet.



Abb. 13: Das Pulversortiment (eigenes Foto)

Die Proben wurden entweder mit Pulvern auf Glycin oder auf Sodumbicarbonatbasis aus zwei verschiedenen Entfernungen (1 & 2mm), Angulationen (30° & 90°) und entsprechend der Herstellerangabe mit 4,5 bar und 60ml Wasser pro Minute behandelt.

Pulver auf Glycinbasis:

- Air-Flow1 Soft, Air-Flow1 Perio, EMS, Nyon, Schweiz
- Clinpro1 Prophy Powder, 3M ESPE AG, Seefeld, Deutschland

Pulver auf Sodumbicarbonatbasis

- Airflow® Classic EMS

Ein standardisierter Versuchsaufbau stellte die Reproduzierbarkeit des Versuches sicher.



Abb. 14: Versuchsaufbau 1 (eigenes Foto)

Insgesamt $n=8$ Titanplättchen waren in jeder Gruppe und $n=16$ Gruppen wurden in der Auswertung berücksichtigt. Jedes Titanplättchen wurde zweimal behandelt. Die Reinigung erfolgte vom Zentrum in Richtung Peripherie in kreisförmigen Bewegungen (Abb.16). Als Dauer wurde eine Zeitangabe von 20s gesetzt (1x20s; 2x40s). Im Anschluss wurden alle Titanplättchen mit Kochsalzlösung abgespült, um Rückstände des Pulvers zu entfernen. Als Kontrollgruppe dienten nicht kontaminierte, unbehandelte Titan-plättchen ($n=8$).



Abb. 15: Versuchsaufbau 2 (eigenes Foto)

In der Abbildung 16 ist die Reinigung der Titanplättchen vom Zentrum in Richtung Peripherie in kreisförmigen Bahnen dargestellt. Die Applikation des Prophylaxe Pulvers erfolgte über ein Zeitintervall von 20s (1x20s; 2x40s).

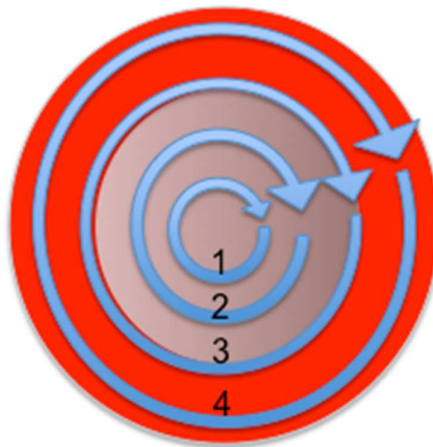


Abb. 16: **Reinigungsschema von zentral nach peripher (eigene Zeichnung)**

Die Behandlung wurde ausschließlich durch den Doktoranden durchgeführt. Ein Teil der Proben wurde zur Bewertung des verbliebenen Biofilms und der Überlebensfähigkeit der Zellen verwendet, während der andere Teil der Proben mittels Elektronenmikroskop ausgewertet wurde.

Ein Teil der Proben (n=128) wurde zur Ausmessung des verbliebenen Biofilmes (RB) und der Entwicklungsfähigkeit von Zellen verwendet. Der andere Teil der Proben (n=32) wurde unter dem Elektronenmikroskop ohne Zusetzung von SaOs2 Zellen ausgewertet.

2.4 Charakteristika der verwendeten Pulver

Alle Partikel der verwendeten Materialien waren rhomboid und zylindrisch geformt. Die Partikelgröße wurde mit einem Malvern Mastersizer S abgeschätzt (Malvern Instruments, Malvern, Großbritannien). Es wurden drei Pulver auf Glycinbasis getestet und ein Pulver auf Natriumbicarbonatbasis. Untersucht wurde das Pulver

Clinpro® Prophy Powder, Air-Flow® Perio, Air-Flow® Soft und Air-Flow® Classic. Die Pulver unterscheiden sich nicht nur durch die variierende Basissubstanz, sondern zusätzlich durch den Anteil an differierenden Partikelgrößen am Gesamtvolumen. Dv10 stellt die Partikelgröße dar, die unter 10% des Gesamtvolumens liegt. Dv50 stellt die Partikelgröße dar, die unter 50% des Gesamtvolumens liegt. Dies entspricht einer mittleren Partikelgröße. Dv90 stellt die Partikelgröße dar, die unter 90% des Gesamtvolumens liegt.

2.5 Vermessung des verbliebenen Biofilmes (RB)

Die Bildauswertung erfolgte mit Hilfe einer auf einem Lichtmikroskop (Olympus BX50, Olympus, Hamburg, Deutschland) angebrachten Kamera (ColorView III, Olympus, Hamburg, Deutschland). Als Softwareprogramm wurde SIS AnalySIS Auto Software 3.2 (Soft imaging System GmbH, Münster, Deutschland) verwendet. Zur Auswertung wurde der verbliebene Biofilm mit den Werten des initialen Biofilms verglichen, wobei der initiale Biofilm als 100% definiert wurde. Nach jeder Behandlung wurde für jedes Titanplättchen der verbliebene, angefärbte Biofilm in 20 zufällig gewählten Bereichen auf dem Titanplättchen prozentual zur Gesamtfläche ausgewertet. Die Auswertungen wurden vom Doktoranden ohne Kenntnis über die Verteilung der Plättchen durchgeführt.

2.6 Präzision der Auswertung

Fünf Titanplättchen wurden zur Kalibrierung verwendet. Die Auswertung erfolgte in einem Abstand von 48h zweimal. Die Kalibrierung war erfolgreich, wenn beide Auswertungen um bis zu 90% übereinstimmten.

2.7 Zellkulturen

Nach der Vermessung des Biofilmes (RB) (n=128) wurden die Proben autoklaviert (F. Schwarz et al., 2005, F. Schwarz et al., 2006a, F. Schwarz et al., 2006b) und in Inkubationskammern gelegt (Lap Tek Chamber Slide, Nalge Nunc, Naperville, IL, USA). Die Autoklavierung war notwendig, um die Kontamination der Inkubationskammern auszuschließen. SaOs2 Zellen (ATCC, No. HTB 85, Manassas, VA), die ähnlich wie humane Osteoblasten auf die Titanoberfläche reagieren und schätzungsweise zweidrittel mehr Kalzifizierung zeigen (Ahmad et al., 1999). Die Zellen waren in einem McCoy's 5A Medium (MCM, Gibco No. 21017-025, Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gelöst. Das Nährmedium beinhaltet folgende Bestandteile.

Tabelle 1: **Zusammensetzung des Nährmediums**

1% Penicillin/ Streptomycin (Gibco1 Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
10% fetales Rinderserum (Gibco1 Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
DMEM 1g/l Glucose (Gibco1 Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
DMSO Sigma (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
PBS (Gibco 1 Invitrogen Karlsruhe, Deutschland)
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)1% Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Die suspendierten Zellen wurden bei 37°C in den Inkubationskammern bei feuchten Bedingungen (95% Luft, 5% CO₂) kultiviert. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt.

2.8 Hintergrund zu SaOs2-Zellen

Ursprünglich konnten die SaOs2-Zellen aus einem primären Osteosarkom eines 11-jährigen Mädchens aus dem Kaukasus isoliert werden (Fogh et al., 1977). Seit Rodan et al., 1987 herausgefunden haben, dass SaOs2-Zellen ähnlich den humanen Osteoblasten sind, werden diese Zellen für zahlreiche Studien verwendet (Murray et al., 1987, Farley et al., 1991). Wegen der Produktion von extrazellulärer Matrix und der Expressierung von Rezeptoren wie sie auch bei Osteoblasten exprimiert werden, gelten die SaOs2-Zellen als attraktive Zellkultur. Sie folgen keinen Passagierungsvorgängen.

Die Verwendung von SaOs2-Zellen zu Forschungszwecken ist heutzutage ein standardisiertes Verfahren. Die dafür erforderlichen Zellkulturen sind im Rahmen naturwissenschaftlicher Forschungsprojekte käuflich zu erwerben.

2.9 Versuch zur Entwicklungsfähigkeit von Zellen

An Tag 7 wurde die mitochondriale Aktivität von SaOs2 Zellen mittels „CellTiter-Glo luminescent cell viability Test“ (Promega, Madison, WI, USA) gemessen. Dieser Test quantifiziert die Anwesenheit von Adenosintriphosphat (ATP). Die Präsenz von ATP ist ein Signal für die metabolische Aktivität von Zellen, welches durch die luciferasekatalysierte Reaktion von Luziferin und ATP entsteht (Crouch et al., 1993). Im Speziellen ist es so, dass die Monooxygenierung von Luziferin durch das Enzym Luciferase unter der Anwesenheit von Mg^{2+} , ATP und molekularem Oxygen katalysiert wird. 100 μ L CellTiter-Glo® Lösung und 100 μ L MCM wurde in die leeren Kammern gegeben und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Wie vom Hersteller empfohlen, wurde das lumineszierende Signal 1s pro Kammer aufgenommen (Top Count, Canberra-Packard GmbH, Dreieich, Deutschland).

2.10 Hintergrund zu Luciferin

Das Luciferin-Luciferase-System wurde erstmals in biolumineszierenden Organismen gefunden (Neufeld et al., 1975). Seit einigen Jahren wird dieses System als Marker Reaktion für die Anwesenheit von ATP und somit als Nachweis verschiedener Bakterienstämme angewendet (Kricka et al., 1988, Rinsho Byori et al., 2004). Diese Nachweismethode findet in vielen Fachbereichen Anwendung, so z.B. in der Medizin und Zahnmedizin, wie auch in der Biologie und Lebensmittelindustrie. In einer Probe werden die Bakterienwände zerstört und das freigewordene ATP über den Luciferin-Luciferase-Test nachgewiesen. In einer Reaktion abhängig von ATP und Mg^{2+} wird das Luziferin durch die Luciferase oxidiert. Das hierbei entstehende Oxiluciferin emittiert ein Photon, welches in der Messkammer erfasst wird.

Die Reaktion im Überblick:

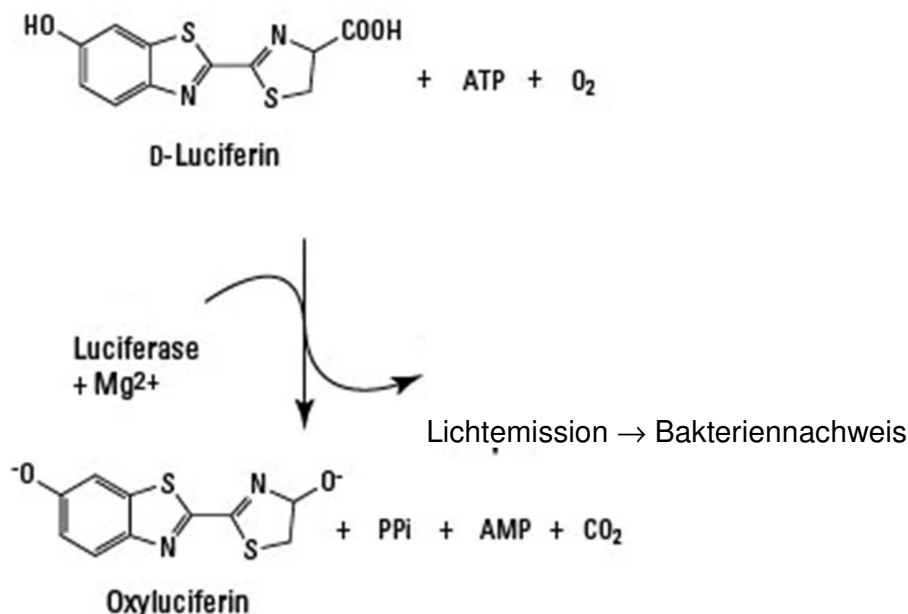


Abb. 17: Luciferin-Luciferase-System (Kricka et al., 1988, Rinsho Byori et al., 2004)

2.11 Elektronenmikroskopische Auswertung

Die Proben (n=32) wurden anhand von aufsteigenden Acetonreihen dehydriert (von 40%-100%, in 10% Schritten). Nach Trocknung der Proben in Hexamethyldisilazan wurden die Proben mit Gold besprüht (sputter coater 108auto, Cressington, Scientific instruments, Watford, England) und von einem Elektronenmikroskop (SEM) ausgewertet (S-3000N, Hitachi, Pleasanton, CA, USA). Die Oberflächenmorphologie von behandeltem und unbehandeltem Titan wurde ausgewertet.

2.12 Statistische Analyse

Ein Softwareprogramm (SPSS 15.0, SPSS, Chicago, IL, USA) wurde für die statistische Auswertung verwendet. Das Titanplättchen wurde dabei als statistische Einheit definiert. Mittelwert und Standardabweichung wurden für jede Gruppe berechnet. Durch die Analyse von Streuung und Signifikanz (Post hoc Test) an Hand der Bonferroni Methode wurden Vergleiche innerhalb und zwischen den Gruppen dargestellt. Die Ergebnisse gelten als signifikant mit $p < 0,05$.

2.13 Zusammenfassung der Anteile des Doktoranden Jan-Kristian Popovski

a) selbsterbrachte Leistungen

- Literaturrecherche, Zusammentragen bisheriger Erkenntnisse
- Versuchsaufbau, Erarbeitung einer geeigneten Hilfsapparatur
- Erstellung der Acrylplatten mit Titanplättchen zur Sammlung von Biofilm
- Erstellung der Splints zum Abstrahlen der Titanplättchen
- Probandenakquise und Betreuung
- Fotodokumentation

b) selbsterbrachte Leistungen nach Anleitung

- Anfärben der Titanplättchen zur Darstellung des Biofilmes
- Untersuchung des Biofilmes unter Auflichtmikroskop
- Abstrahlen der Titanplättchen mit einem Pulverwasserstrahlgerät
- Lichtmikroskopische Analyse nach mechanischem Debridement
- Datenerhebung der Studie

c) Assistenz bei Leistungen

- Assistenz bei der Kultivierung von SaOs2-Zellen auf der Titanoberfläche

3 Ergebnisse

3.1 Verbleibende Plaque Biofilm Areale

Nach 48h waren alle Titan-plättchen mit einem gefärbten, homogenen Biofilm bedeckt. Der initiale Biofilm war in allen Gruppen 100% +/- 0% ($p > 0,05$) (Abb.18).



Abb. 18: unbehandelte Kontrollgruppe (40x)

Direkt nach der ersten Behandlung mit einem abrasiven Pulver zeigten alle Gruppen einen signifikant geringeren Prozentsatz an Biofilm ($p < 0,001$). Die Werte des verbliebenen Biofilmes nach der ersten Behandlung (RB1x) sind in Tabelle 3-6 dargestellt.

Vornehmlich zeigten alle untersuchten Pulver sowohl aus 1mm als auch aus 2mm Entfernung und sowohl mit 30° wie auch mit 90° vergleichbare RB1x Werte ($p > 0,05$). Die lichtmikroskopische Analyse zeigte nur wenige verbleibende Areale des Biofilmes (Abb.19)



Abb. 19: **Air-Flow® Classic Pulver nach einmaliger
Behandlung (40x)**

Diese Areale waren nach der zweiten Behandlung RB2x nicht nachweisbar (RB2x 0,00% +/- 0,00%) (Abb. 20) Die Unterschiede zwischen den Gruppen war nicht signifikant ($p > 0,05$) (Tabelle 2-5).



Abb. 20: **Air-Flow® Perio Pulver nach 2
Behandlungen (40x)**

3.2 Entwicklungsfähigkeit der Zellen

Während der experimentellen Phase gab es keine Anzeichen für eine bakterielle oder fungale Kontamination der Inkubationskammern. Für den Nachweis der Entwicklungsfähigkeit von Zellen wurden hier die SaOs2-Zellen verwendet. Die mitochondriale Aktivität der SaOs2-Zellen wurde durch den lumineszierenden Ausstoß (Zählimpulse pro s) in den verschiedenen Gruppen gemessen. Das Prinzip der Biolumineszenz beruht hier auf dem Nachweis von ATP durch die Luciferin-Luciferase-Reaktion. (Abb. 17)

In der statistischen Analyse wurden die höchsten Werte in der unbehandelten, nicht kontaminierten Gruppe gemessen ($p > 0,001$). Das Natriumbicarbonatpulver zeigte signifikant höhere Werte als das Aminoglycin ($p < 0,001$). Obwohl der Lichtausstoß mit der Partikelgröße der Aminoglycinpartikel anstieg, zeigten diese Unterschiede keine statistische Signifikanz ($p > 0,05$). Die statistische Analyse zeigte keine Unterschiede innerhalb der Gruppen ($p > 0,05$) (Abb. 21).

Das Natriumbikarbonat mit einer molekularen Masse von 84,01g/mol und einer Dichte von 2,22 g/ml weist eine Löslichkeit von 96 g/l auf. Dieses Pulver (hier Air-Flow ® Classic) ist bereits durch die physikalisch und chemisch gegebenen Grundparameter aggressiver im Vergleich zu Glycinhaltigen Pulvern (hier Clinpro ® Prophy Powder, Air-Flow ® Perio, Air-Flow ® Soft). Die molekulare Masse von Glycin liegt bei nur 75,07g/mol und einer Dichte von 1,6g/ml. Die Löslichkeit ist im Vergleich zu Natriumbikarbonat mit 250g/l deutlich überlegen. In Bezug auf die Ergebnisse (Abb. 21) scheinen beide Pulvermaterialien die Entwicklungsfähigkeit der Zellen zu begünstigen. Die verschiedenen Materialien mit ihrer elektronenmikroskopischen Darstellung sind im Folgenden aufgelistet.

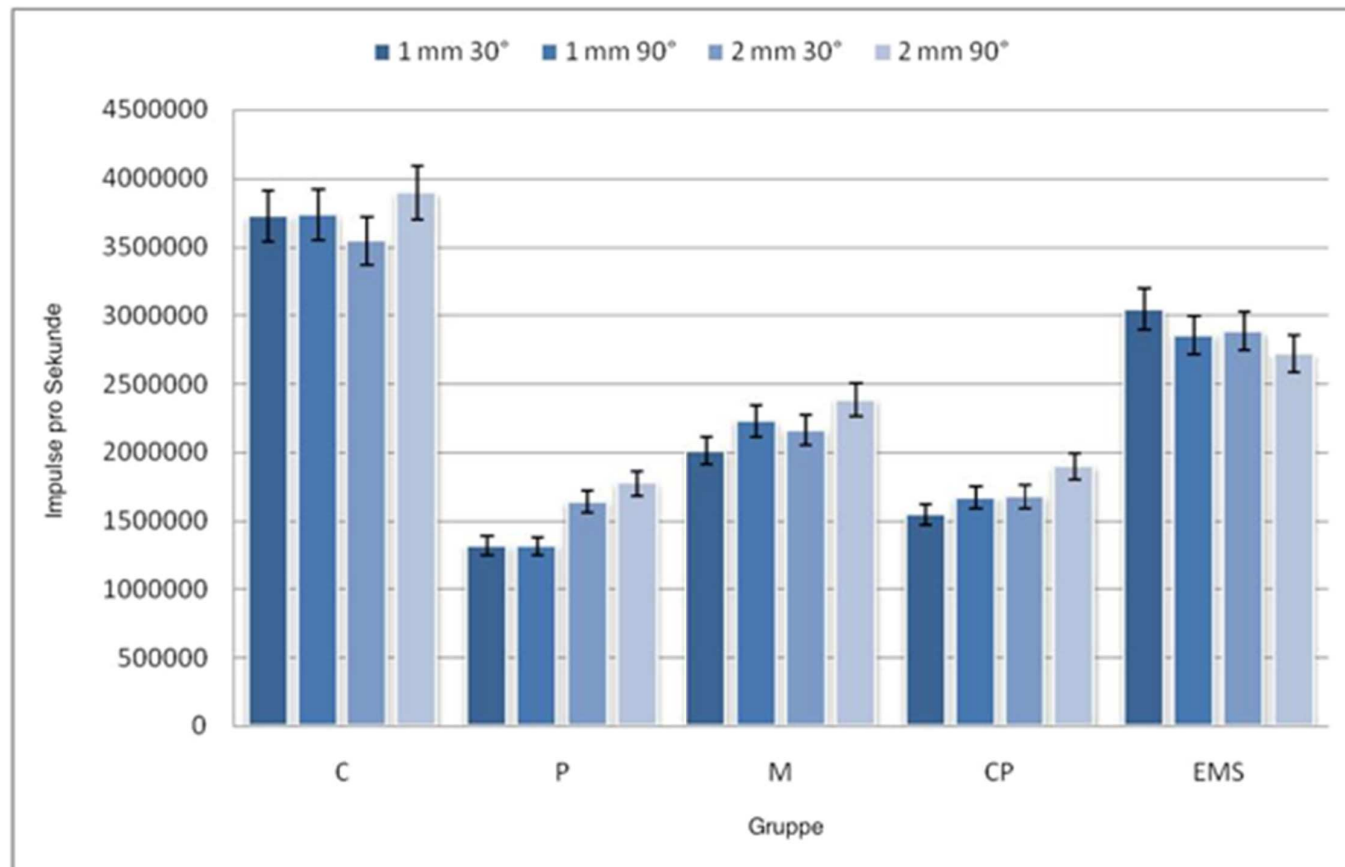


Abb. 21: Entwicklungsfähigkeit von Zellen auf biologisch kontaminierten Titanimplantaten

3.3 Charakteristika der verwendeten Pulver

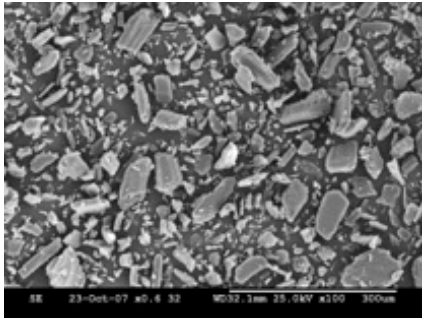


Abb. 22: Clinpro® Prophy Powder 1000x

Abkürzung: CP
Pulverart: Glycinbasis
 d_{v10} (μm): 5
 d_{v50} (μm): 20
 d_{v90} (μm): 63

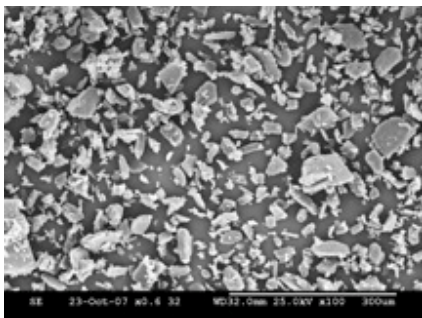


Abb. 23: Air-Flow® Perio 1000x

Abkürzung: P
Pulverart: Glycinbasis
 d_{v10} (μm): 5
 d_{v50} (μm): 20
 d_{v90} (μm): 63

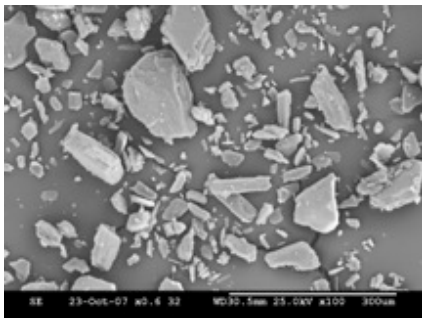


Abb. 24: Air-Flow® Soft 1000x

Abkürzung: M
Pulverart: Glycinbasis
 d_{v10} (μm): 10
 d_{v50} (μm): 50
 d_{v90} (μm): 125

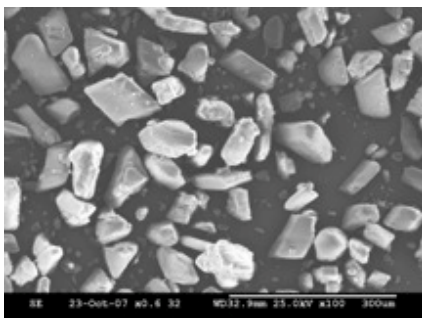


Abb. 25: Air-Flow® Classic 1000x

Abkürzung: EMS
Pulverart: Natriumbikarbonat
 d_{v10} (μm): 20
 d_{v50} (μm): 75
 d_{v90} (μm): 150

3.4 Oberflächenmorphologie

Die Oberfläche wurde entsprechend mit der nicht kontaminierten und unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Die elektronenmikroskopische Analyse konnte keine sichtbaren Veränderungen der säuregeätzten, sandgestrahlten Oberfläche (SLA) nach einmaliger Behandlung nachweisen. Sowohl die untersuchten Test- wie auch Kontrollgruppen zeigten ein in seiner Mikrostruktur unverändertes Relief mit Furchen und Gruben umrandet von scharfkantigen Erhebungen (Abb. 26+27).

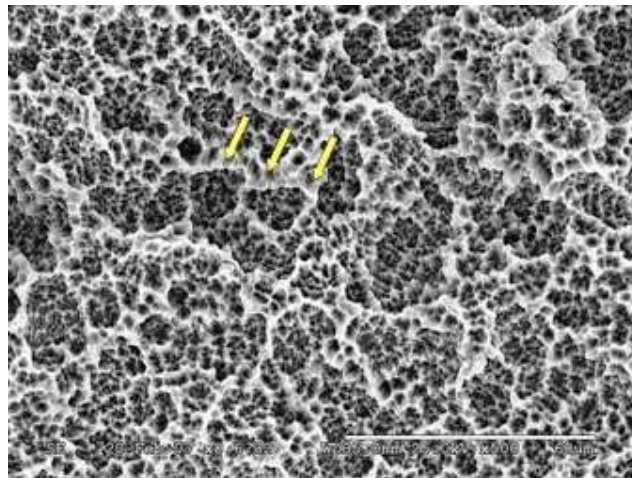


Abb. 26: **REM Analyse der Oberflächenbeschaffenheit, nicht kontaminierte und unbehandelte Kontrollgruppe 1000x**

Die Pfeile markieren die scharfkantigen Erhebungen der Kontrollgruppe (Abb.26). Sie umranden Vertiefungen in der Oberfläche.

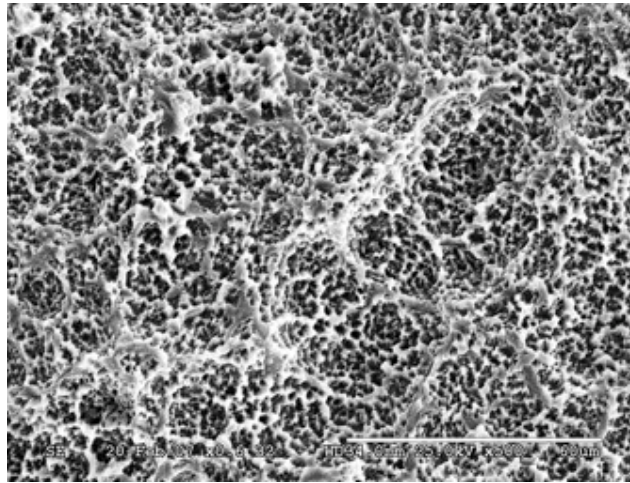


Abb. 27: **REM Analyse der Oberflächenbeschaffenheit (Air-Flow® Perio Pulver – Winkel: 30°, Abstand: 2 mm) 1000x**

Eine vergleichbare Oberflächen-morphologie wurde auch nach einmaliger Behandlung in allen Gruppen nachgewiesen. Hier (Abb. 27) dargestellt die Testgruppe nach einmaliger Behandlung mit Air-Flow® Perio Pulver bei einem Winkel von 30° und einem Abstand von 2mm.

Nach zweimaliger Behandlung zeigten die mit Natriumbikarbonat behandelten Plättchen unabhängig von Abstand und Angulation eine deutliche Veränderung der Oberfläche. Während die unregelmäßig angeordneten Furchen und Gruben generell unverändert geblieben sind, scheinen die scharfkantigen Erhebungen deutlich abgeflacht zu sein (Abb. 28).

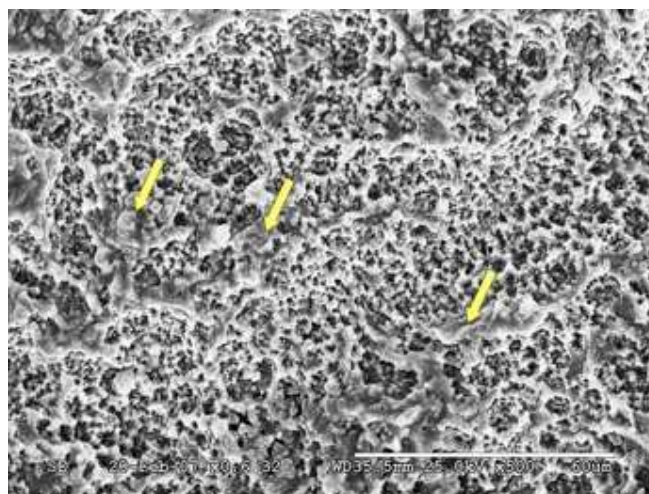


Abb. 28: **REM Analyse der Oberflächenbeschaffenheit nach zweimaliger Behandlung mit Air-Flow® Classic Pulver (Winkel 90°, Abstand 2mm) 1000x**

Nach wiederholter Anwendung des Air-Flow ® Classic Pulvers in den jeweiligen Winkeln und Abständen resultierte in einer sichtbaren Oberflächenveränderung. Insbesondere wurden die scharfkantigen Erhebungen deutlich geglättet. Dies wird hier (Abb. 28) mit den gelben Pfeilen markiert.

Im Gegensatz dazu zeigten die Titanplättchen nach zweimaliger Behandlung mit Aminoglycinpulver keine Veränderung der Oberfläche. Die elektronenmikroskopische Analyse (Originalvergrößerung 1000x) konnte keine Pulverrückstände auf den behandelten Oberflächen nachweisen.

3.5 Ergebnisse des Reinigungsverfahrens

Die Tabellen 2-5 zeigen Mittelwert und Standardabweichung des residualen Biofilmes nach einmaliger und wiederholter Behandlung der Oberfläche aus verschiedenen Abständen (n=8 Plättchen/Gruppe) und Angulationen (30° & 90°).

Nach einmaliger Behandlung der Titanplättchen in einem Winkel von 30° ist der Unterschied zwischen den Abständen gravierender. Die Anwendung in 1mm Entfernung zeigt eine deutlich bessere Beseitigung des Biofilmes als in einem Abstand von 2mm. Zudem sind die Ergebnisse für die Pulver auf Glycinbasis Air-Flow ® Perio und Air-Flow ® Soft sowie das Pulver auf Sodumbicarbonatbasis Air-Flow ® Classic deutlich besser als die Ergebnisse des Clinpro ® Prophy Powder.

Tabelle 2: **Ergebnisse bei der Angulation von 30° bei einmaliger Behandlung**

Abstand	Winkel	Pulver	Residualer Biofilm (1x)
1 mm	30°	CP	0,5 +/- 0,5
		EMS	0,1 +/- 0,1
		M	0,1 +/- 0,0
		P	0,1 +/- 0,0
2 mm	30°	CP	1,2 +/- 0,1
		EMS	0,4 +/- 0,0
		M	0,3 +/- 0,0
		P	1,1 +/- 0,0

Vergleich zwischen und innerhalb der Gruppen: $p > 0,05$; ANOVA

Bei einer Behandlung in wiederholter Sequenz bei 30° zeigen alle Gruppen eine vollständige Eliminierung des Biofilmes unabhängig davon, ob der Abstand 1 oder 2mm betragen hat.

Tabelle 3: **Ergebnisse bei der Angulation von 30° bei zweimaliger Behandlung**

Abstand	Winkel	Pulver	Residualer Biofilm (2x)
1 mm	30°	CP	0,0 +/- 0,0
		EMS	0,0 +/- 0,0
		M	0,0 +/- 0,0
		P	0,0 +/- 0,0
2 mm	30°	CP	0,0 +/- 0,0
		EMS	0,0 +/- 0,0
		M	0,0 +/- 0,0
		P	0,0 +/- 0,0

Vergleich zwischen und innerhalb der Gruppen: $p > 0,05$; ANOVA

Tabelle 4: **Ergebnisse bei der Angulation von 90° bei einmaliger Behandlung**

Abstand	Winkel	Pulver	Residualer Biofilm (1x)
1 mm	90°	CP	0,1 +/- 0,1
		EMS	0,0 +/- 0,0
		M	0,0 +/- 0,0
		P	0,0 +/- 0,0
2 mm	90°	CP	0,9 +/- 1,2
		EMS	0,1 +/- 0,1
		M	5,7 +/- 5,7
		P	0,0 +/- 0,0

Vergleich zwischen und innerhalb der Gruppen: $p > 0,05$; ANOVA

Bei einer Behandlung in wiederholter Sequenz bei 90° zeigen alle Gruppen ähnlich der Behandlung bei 30° eine vollständige Eliminierung des Biofilmes unabhängig davon, ob der Abstand 1 oder 2mm betragen hat.

Tabelle 5: **Ergebnisse bei der Angulation von 90° bei zweimaliger Behandlung**

Abstand	Winkel	Pulver	Residualer Biofilm (2x)
1 mm	90°	CP	0,0 +/- 0,0
		EMS	0,0 +/- 0,0
		M	0,0 +/- 0,0
		P	0,0 +/- 0,0
2 mm	90°	CP	0,0 +/- 0,0
		EMS	0,0 +/- 0,0
		M	0,0 +/- 0,0
		P	0,0 +/- 0,0

Vergleich zwischen und innerhalb der Gruppen: $p > 0,05$; ANOVA

4 Diskussion

4.1 Der Einfluss von Angulation und Entfernung auf die Reinigungseffizienz

Die aktuelle Studie wurde durchgeführt, um den Effekt von verschiedenen abrasiven Prophylaxepulvern an biologisch kontaminierten Titanoberflächen von Zahnimplantaten auf die Entwicklungsfähigkeit von Zellen umliegender Gewebe an Hand von SaOs-2 Zellen zu bewerten. Generell zeigte sich, dass alle untersuchten Pulver den Biofilm an konditionierten Titanoberflächen gleichermaßen entfernen. Nach einmaliger Behandlung lagen die Werte zwischen 0,0% +/- 0,0% und 5,7% +/- 5,7%. Nach zweimaliger Behandlung war der Biofilm vollständig entfernt 0,0% +/- 0,0%. Des Weiteren wurde festgestellt, dass der Behandlungserfolg unabhängig von Distanz und Angulation des Handstückes zur Titanoberfläche war.

Sowohl der Abstand des Handstückes, wie auch die Angulation wurden entsprechend klinischer Behandlungsvorschläge zur Verwendung von abrasiven Pulvern an exponierten Titanoberflächen ausgewählt (Augthun et al., 1998, Chairay et al., 1997, Kreisler et al., 2005, Mengel et al., 1998, Van de Velde et al., 1991). Eine anatomische Grenze für die Behandlung stellt die umliegende Gingiva dar, welche ein erhöhtes Verletzungsrisiko mit Blasenbildung aufweisen kann (Van de Velde et al., 1991). Das Verletzungsrisiko ist zum einen abhängig von Distanz und Angulation des Handstückes, als auch von der Konfiguration periimplantärer Knochendefekte, welche meist mit einem zirkumferenten Knochenverlust einhergehen (Schwarz et al., 2007). Bei ordnungsgemäßem Gebrauch erachten Experten das Verfahren als sicher (Tastepe et al., 2013, Petersilka et al., 2003b).

4.2 Die Entfernung des Biofilmes durch Pulverwasserstrahlgeräte im Vergleich zu anderen Behandlungsmethoden

Nach unseren Erkenntnissen sind dies die ersten Ergebnisse über die Entfernung von Biofilm an konditionierten Titanoberflächen durch abrasive Pulver. Andere Studien verwendeten das gleiche Splintsystem (F. Schwarz et al., 2005, F. Schwarz et al., 2006a, Schwarz et al., 2006b) In diesen Studien wurden die Titanplättchen mit einem Er:Yag Laser, einem ER,CR:YSSG Laser, einem modifizierten Ultraschallgerät oder mit Plastikküretten und Chlorhexidin Diglukonat

behandelt. Alle Studien wiesen anschließend einen höheren verbliebenen Biofilm auf als in dieser Studie.

ER:Yag Laser 5,8% +/- 5,1%

ER,CR:YSSG Laser bei 9,8% +/- 6,2% to 53,8% +/- 2,2%

Ultraschallgerät 28,3% +/- 2,0% to 36,8% +/- 4,5%

Plastikküretten 58,5% +/- 4,9% bis 61,1% +/- 11,4%

Alle Daten kumuliert ausgewertet zeigen, dass alle untersuchten abrasiven Pulver der aktuellen Studie ein höheres Potential aufweisen, den oral angelagerten Biofilm auf konditionierten Titanoberflächen zu entfernen, als alle vorab getesteten Behandlungsalternativen. Aus klinischer Sicht ist es wichtig zu bedenken, dass supragingival gesammelter Biofilm nach 24-48h nicht mineralisiert ist, während subgingival angesammelter Biofilm mineralisierte Plaque durchsetzt von Kalziumphosphatkristallen ist (Schroeder HE 1965). Es ist chemisch und physikalisch davon auszugehen, dass die Entfernung des subgingivalen Biofilmes eine höhere Herausforderung stellt als die supragingivale Entfernung des künstlich gesammelten Biofilms. Beobachtungen zeigen, dass eine SLA Titanoberfläche eine erhöhte Plaque Akkumulation aufweist. Dies geht Konform mit anderen Studien, welche ebenfalls zeigen, dass angeraute Oberflächen innerhalb von 24h einen homogen ausgereiften Biofilm anlagern (Schwarz et al., 2005, Schwarz et al., 2006a, Schwarz et al., 2006b, Rimondini et al., 1997, Siegrist et al., 1991).

4.3 Der Einfluss der getesteten Substanzen auf die Entwicklungsfähigkeit der SaOS2-Zellen

In allen Gruppen war die Aktivität der SaOS2 Zellen niedriger, als in der Kontrollgruppe. Speziell die mit Aminoglycin behandelte Gruppe zeigte signifikant niedrigere Zellaktivität im Vergleich zum Natriumbikarbonat. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch die im oberen erwähnten Studien zu Erbium-Yttrium-Aluminium-Granatlasers (ER:Yag), Erbium, Chromium doped Yttrium Scandium Gallium Garnet (ER,CR:YSSG), Ultraschallgeräten und Plastikküretten mit Chlorhexidine Diglukonat (F. Schwarz et al., 2005, Schwarz et al., 2006a, Schwarz et al., 2006b).

Die mitochondriale Aktivität in dieser Studie wurde mit dem „CellTiter-Glo luminescent cell viability Test“ (Promega, Madison, WI, USA) ausgewertet. Dieser Test zeigt eine besonders hohe Spezifität und Sensitivität gegenüber anderen Testverfahren (Machara et al., 1987, Retty et al., 1995). Das während der Zellteilung generierte lumineszierende Signal ist proportional zur Anwesenheit von ATP. ATP ist wiederum proportional zur Anwesenheit von überlebensfähigen Zellen in der entsprechenden Zellkultur (Crouch et al., 1993).

4.4 Welche Faktoren haben Einfluss auf die Aktivität der SaOS2-Zellen genommen?

Verschiedene Faktoren spielen für den Mangel an entwicklungsfähigen Zellen nach Applikation von abrasiven Pulvern eine entscheidende Rolle. Vor allem anderen ist es wichtig herauszustellen, inwieweit Aminoglycinpulver und Natrium Bicarbonat Pulver in die Zellentwicklung an Titanoberflächen eingreifen können. Wenngleich der Nachweis von Pulverrückständen mittels elektronenmikroskopischer Analyse in dieser Studie nicht ausreichend war, ist es fragwürdig, ob diese Nachweismethode für diese Studie angemessen ist, um kleinste Partikel der Pulver auf einer konditionierten Titanoberfläche zu detektieren. Zum anderen ist es immer noch unbekannt, inwieweit ein exponiertes Titanimplantat nach Abtragung des Biofilms mittels Pulverstrahlgerät noch eine suffiziente Oberfläche für die Knochenneubildung ist. Zur jetzigen Studienlage gibt es noch keine signifikanten Daten zur Regeneration des Knochen-Implantatkontaktes. Eine vorangegangene experimentelle Studie stellte heraus, dass der Biofilm den Gehalt an Carbon an der Titandioxidschicht reduziert. Die elementare Zusammensetzung von unbenutzten kommerziell erhältlichen Titanfolien Betrag:

9% Titan (Ti)

48% Kohlenstoff (C)

40% Sauerstoff (O)

10% Stickstoff (N)

Chlor (Cl)

Im Vergleich dazu zeigten bereits intraoral kontaminierte Folien eine Zusammensetzung aus:

70% C

20% O

10% N

< 1% Titan (Mouhyi et al., 2000).

Studien zeigen, dass adsorbiertes Hydrogenkarbonat und Karbonat die freie Energie auf SLA Oberflächen signifikant beeinflussen (Zhao 2005). Es besteht daher die Annahme, dass die Entwicklungsfähigkeit der Zellen in der aktuellen Studie durch die chemische Zusammensetzung der Titanoxidschicht beeinflusst wurde. Alle diese Daten implizieren, dass die reine Dekontamination der Titanoberfläche nicht zum entscheidenden Erfolg in der Periimplantitistherapie führt (Schwarz et al., 2006a). Studien zum Verhalten von Knochenzellen an bereits behandelten Implantaten sowie zur chemischen Veränderung von Titanimplantaten nach Exposition und Dekontamination scheinen zwingend erforderlich.

4.5 Der Einfluss der Partikelgröße und –zusammensetzung auf die Knochenneubildung

Die Bikarbonat Pulver zeigten einen deutlich höheren Lichtausstoß als die Aminoglycinpulver. Es bestehen Unterschiede in der Zusammensetzung (Bikarbonat oder Glycin) und auch Partikelgröße ($dv_{50} = 75, 50$ oder $20\mu\text{m}$) der Materialien. Die unterschiedlichen Größen der Glycinpulver mit dem Faktor 2,5 schienen keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse zu haben. Diese Schlussfolgerung erlaubt auch den Ausschluss, dass die Partikelgröße im Vergleich der beiden Grundpräparate eine wichtige Rolle spielt, da sich dieser im Rahmen von 1,5 zwischen Bikarbonat und Aminoglycin bewegt. Aus diesem Grund wurde die Pulverzusammensetzung als möglicher Einflussfaktor genauer untersucht. Beide Materialien unterschieden sich in Härtegrad und Dichte (z.B. Dichte Bikarbonat = $2,16 \text{ g/cm}^3$; Dichte Glycin $1,61 \text{ g/cm}^3$). Obwohl der Härtegrad von Glycin nicht aufgeführt ist, scheint es aber im Vergleich zu Bikarbonat weniger

abrasiv zu sein (Petersilka et al., 2003). Der entsprechend höhere Lichtausstoß bei Bikarbonat kann also durch größere Partikel und einen höheren Härtegrad ausgelöst werden. Dies führt entsprechend der höheren Abrasionswerte nach zweimaliger Behandlung bereits zu Veränderungen der Oberfläche. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Kreislet et al., (2005) festgestellt, der mikroskopische Veränderungen der SLA Oberfläche nach Behandlung mit demselben Bikarbonatpulver nachweisen konnte. Nach Inkubation der Proben mit humanen Fibroblasten war die Zellproliferation an kontaminierten, unbehandelten Oberflächen (*Porphyromonas gingivalis*) niedriger als an sterilen, behandelten Oberflächen der Kontrollgruppe. Das Zellwachstum an mit abrasiven Pulvern behandelten Oberflächen war nicht signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

4.6 Klinische Indikationen nach heutiger Studienlage

Jedes der getesteten Prophylaxepulver ist auch heute noch im klinischen Einsatz. Je nach klinischer Indikation wird das passende Produkt verwendet. So gilt das Pulver auf Natriumbikarbonat weiterhin als Goldstandard in der Prophylaxe-Behandlung der eigenen Zähne. Prophylaxepulver auf Glycinbasis, in dieser Studie das Airflow® Soft, zeigen unter anderem in der aktuellen Studie einen deutlich höheren Patientenkomfort in der Behandlung supragingivaler Verunreinigungen. Die beiden genannten Prophylaxepulver sind bezüglich ihrer Gewebeverträglichkeit für das umliegende Gewebe und Effizienz an natürlichen Zähnen bereits umfassend getestet worden (Petersilka et al 2003; Petersilka et al 2003b), jedoch nicht in Bezug auf die subgingivale Implantat Reinigung. Gemäß der aktuellen Studie scheint die klinische Indikation klar beschrieben. Mit Rücksicht auf die aktuellen Ergebnisse, scheinen Prophylaxepulver auf Glycinbasis und Natriumbikarbonatbasis in die Entwicklungsfähigkeit von Zellen der Hart- und Weichgewebe einzugreifen. Alle vorliegenden Ergebnisse zu diesen Produkten implizieren, dass die reine Dekontamination der Titanoberfläche unabhängig von der Therapiemethode nicht ausschließlich zum entscheidenden Durchbruch in der Periimplantitistherapie führt. In der Reinigungskraft unterscheiden sich beide Pulver nicht.

Ist eine subgingivale Dekontamination mittels Pulverwasserstrahlgerätes gewünscht, so ist das Airflow® Perio auf Glycinbasis indiziert. Die besonders feine Körnung von 25µm schont das umliegende parodontale und periimplantäre Gewebe.

Eine sowohl supra- wie auch subgingivale Reinigung lässt sich mit dem Airflow® Plus erzielen, einem Pulver auf Erythritolbasis (ein Zuckerersatzstoff). Durch die minimale Partikelgröße lässt sich das Pulver für beide Indikationen nutzen (Hägi et al., 2013; Müller et al., 2014). Weitere klinische Studien sind notwendig. Aktuelle Daten zur Reinigung dentaler Implantatoberflächen bei nachgewiesener Periimplantitis mit Prophylaxepulvern auf Erythritolbasis liegen nicht vor. Korrelierend zur aktuellen Studie wären auch hier die gleichen Kriterien anzuwenden. Studien zur Entwicklungsfähigkeit von Knochenzellen sowie die Reinigungskraft korrelierend zum Auftreffwinkel fehlen bislang. Des Weiteren liegen noch keine Ergebnisse bezogen auf die Oberflächenmorphologie nach Reinigung mit Erythritol an Titanoberflächen vor.

Die aktuelle Studie zeigt eine verbesserte Reinigungswirkung nach zweimaliger Behandlung, so dass im klinischen Gebrauch ein Konzept mit mehrmaligen Reinigungen wie beispielsweise auch im Bereich der Parodontitis Behandlung optimal scheint. Zwischen den Abständen 1 und 2mm zeigten sich leichte Unterschiede in der Dekontaminationsrate. Diese Ergebnisse implizieren die Techniksensitivität und fordern somit die Anwendung durch einen erfahrenen Zahnarzt bzw. eine erfahrene Prophylaxekraft oder Dentalhygienikerin.

In Einklang mit aktueller Literatur lässt sich annehmen, dass Prophylaxepulver auf Glycinbasis das Potential haben könnten, Titanoberflächen *in situ* adäquat zu dekontaminieren, obgleich die Ergebnisse dieser und weiterer Studien keine signifikante Überlegenheit gegenüber anderen Methoden aufweisen konnten (Schwarz et al., 2015). Adjuvante Therapien (AWMF 2016) wie beispielsweise eine begleitende Gabe von Antibiotika oder antibakteriellen Spüllösungen könnten den antiinflammatorischen Effekt der Reinigung zusätzlich begünstigen (John et al., 2015), diesen jedoch nicht ersetzen.

4.7 Vorteile der getesteten Prophylaxepulver im Vergleich zu Behandlungsalternativen

Die Verwendung von Prophylaxepulver generell im Vergleich zu anderen Methoden wie die Reinigung mittels Handinstrumenten oder Ultraschallgeräten zeigt eine deutlich höhere Patientenzufriedenheit. Die Behandlung wird von den Patienten als schonend und schmerzarm empfunden (Müller et al., 2014). Zudem ist der finanzielle Invest in der Praxis geringer als bei Alternativtherapien mittels Laser oder photodynamischer Therapie. Entsprechend vielfacher Literaturstellen scheinen Nebenwirkungen in der Verwendung von Pulverstrahlgeräten bei geschultem Fachpersonal vernachlässigbar zu sein (Schwarz et al., 2015).

4.8 Zukunftsperspektiven in der Entwicklung von Prophylaxepulvern

Neben den in der aktuellen Studie getesteten Prophylaxepulvern ist nun ein Produkt mit der Grundsubstanz Erythritol auf dem Markt erhältlich. Der neuartige Stoff wird nicht nur in der Prophylaxe verwendet. Es ist bereits als Zuckeraustauschstoff in vielen Produkten enthalten. Für den menschlichen Körper ist Erythritol nahezu nicht zu verwerten. Es besitzt einen glykämischen Faktor von nahezu 0 (Livesey 2003). Ähnlich verhält es sich in der Mundhöhle. Erythritol kann von den Bakterien nicht als Energielieferant genutzt werden. Es ist antikariogen (Honkala et al., 2014).

Der Produktbeschreibung der Firma EMS nach, liegt die spezielle Wirkung des Stoffes Erythritol an seiner Morphologie (Abb. 25). Mit einer Körnung von 14 Mikron ist es deutlich feiner als andere Prophylaxepulver. In unterschiedlichen aktuellen Studien wird Prophylaxepulvern auf Erythritolbasis eine mindestens vergleichbare Wirksamkeit zugesprochen wie den Prophylaxepulvern auf Glycinbasis (Drago et al., 2014). Zusätzlich wird eine Zusammensetzung des Prophylaxepulvers aus Erythritol und Chlorhexidin propagiert. Diese Kombination schien in der genannten Studie von Drago et al., eine signifikant bessere Wirksamkeit zu erzielen, als das Pulver auf Glycinbasis.

	Natriumbikarbonat	Glycin	Erythritol
Chemische Formel	NaHCO ₃	C ₂ H ₅ NO ₂	C ₄ H ₁₀ O ₄
Molare Masse	84,01 g/mol	75,07g/mol	122,12 g/mol
pH-Wert	7,8	6,2	7,0
Dichte	2,22 g/ml	1,6 g/ml	1,45 g/ml
Löslichkeit	96 g/l	250 g/l	100 g/l
Geschmack	Leicht salzig	süßlich	süßlich
Aussehen	Farbloses, kristallines Pulver	Farbloses, kristallines Pulver	Farbloses, kristallines Pulver

Abb. 25: Vergleich der Substanzen Natriumbikarbonat, Glycin und Erythritol

Weitere abrasive Prophylaxepulver befinden sich in der Testphase. Mit zunehmender Akzeptanz in der Bevölkerung steigt das Interesse von Industrie und Wissenschaft nach wirksamen, optimierten Alternativen. Neben den bereits genannten Substanzen werden nun auch Zusätze mit Hydroxylapatit, Calciumphosphat oder Titandioxid *in vitro* getestet (Tastepe CS. et al., 2013). Jedoch scheint es hier bislang kein medizinisch suffizientes Produkt zu geben, da Veränderungen der Titanoberfläche nachweisbar waren. Die Reinigungswirkung scheint, gegenüber den bisherigen Produkten verbessert zu sein. Als Resultat der zitierten Studie scheint Calciumphosphat als abrasives Prophylaxepulver, vielversprechende Ergebnisse zu zeigen. Jedoch sind weitere Studien zwingend erforderlich. Anzuregen wäre zusätzlich, ob eine gezielte Veränderung der Titanoberfläche eine Reintegration geplant steuern kann.

4.9 Schlussfolgerung und klinische Relevanz der Ergebnisse

Alle zusammengetragenen Daten und die aktuelle Studie implizieren, dass eine Ablation der SLA Oberfläche mit einem gewissen positiven Einfluss auf die Zellproliferation an Titanoberflächen einhergeht. Es sind jedoch weitere Studien erforderlich, um die Ergebnisse zu verifizieren. Entsprechend der Bedingungen der aktuellen Studie kann festgehalten werden, dass die Entwicklungsfähigkeit von SaOs2-Zellen als Korrelat zu humanen Osteoblasten hauptsächlich durch den Partikeltyp abrasiver Pulver bestimmt wird. Die unterschiedlichen Partikelgrößen der Glycinpulver schienen keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse zu haben. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass die Partikelgröße im Vergleich der beiden Prophylaxepulver in diesem eng begrenzten Bereich keine signifikante Rolle spielt.

Entsprechend des oben formulierten Zieles der Studie wurde nachgewiesen, dass die Anwendung abrasiver Pulver eine negative Wirkung auf die Entwicklungsfähigkeit von Zellen der umliegenden Gewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe hat. Speziell die mit Aminoglycin behandelte Gruppe zeigte eine signifikant niedrigere Zellaktivität im Vergleich zum Natriumbikarbonat. Alle vorliegenden Daten implizieren, dass die reine Dekontamination der Titanoberfläche unabhängig von der Therapiemethode nicht zum entscheidenden Erfolg in der Periimplantitistherapie führt.

Grundsätzlich zeigte sich, dass alle untersuchten Pulver den Biofilm an konditionierten Titanoberflächen gleichermaßen entfernen, unabhängig von Distanz und Angulation des Handstückes. Weitere Studien *in vitro* wie *in vivo*, sowie die Betrachtung weiterer Behandlungsmethoden scheinen erforderlich, um eine signifikante Verbesserung der periimplantären Therapie zu erreichen. Die hier dargestellte Therapie steht im Einklang mit der aktuellen S3-Leitlinie zur Behandlung oraler, periimplantärer Entzündungen (AWMF 2016).

5 Literaturverzeichnis

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

Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahmad M, Faust J, Bächle M, Follo M, Wolkewitz M, Hannig C, Hellwig E, Carvalho C, Kohal R. Biofilm formation and composition on different implant materials in vivo. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010 Oct;95(1):101-9

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

Al-Nawas B, Hangen U, Duschner H, Krummenauer F, Wagner W. Turned, machined versus double-etched dental implants in vivo. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2007 Jun;9(2):71-8

Augthun M, Tischnert J, Huber A. In vitro studies on the effect of cleaning methods on different implant surfaces. *J Periodontal* 1998; 69:857-864

Auschill TM, Arweiler NB, Netuschil L, Brex M, Reich E, Sculean A, Artweiler NB. Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol* 2001;46:471-476

AWMF: S3-Leitlinie: Die Behandlung periimplantärer Infektionen an Zahnimplantaten. 05/2016

Becker J, Kirsch A, Schwarz F, Chatzinikolaidou M, Rothamel D, Lekovic V, Laub M, Jennissen HP. Bone apposition to titanium implants biocoated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). A pilot study in dogs. *Clin Oral Investig.* 2006 Sep;10(3):217-24. Epub 2006 May 9

Berglundh T, Abrahamsson I, Albouy JP, Lindhe J. Bone healing at implants with a fluoride-modified surface: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2007 Apr;18(2):147-52

Black, R.B. Technic for nonmechanical preparation of cavities and prophylaxis. *J Am Dent Assoc* 1945; 32, 955-965

- Branemark PI, Adell R., Breine U, Hanson B. O., Lindstrom J., Ohlson A:
Intraosseous anchorage of dental protheses. I. Experimental studies, Scand J
Plast Reconstr Surg, 1969 3: 81- 100
- Büchter A, Meyer U, Kruse-Losler B, Joos U, Kleinheinz J. Sustained release of
doxycycline for the treatment of peri-implantitis: Randomised controlled trial. Br
Oral Maxillofac Surg 2004;42:439-444
- Bullitt E, Makowski L. Structural polymorphism of bacterial adhesion pili. Nature.
1995 Jan 12;373(6510):164-7
- Casado PL, Otazu IB, Balduino A, de Mello W, Barboza EP, Duarte ME.
Identification of periodontal pathogens in healthy periimplant sites. Implant Dent.
2011 Jun;20(3):226-35
- Chairay JP, Boulekbache H, Jean A, Soyer A, Bouchard P. Scanning electron
microscopic evaluation of the effects of an air-abrasive system on dental
implants: A comparative in vitro study between machined and plasma-sprayed
titanium surfaces. J Periodontol 1997;68:1215-1222
- Clark WB, Bammann LL, Gibbons RJ. Comparative estimates of bacterial
affinities and adsorption sites on hydroxyapatite surfaces. Infect Immun. 1978
Mar;19(3):846-53
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie
TJ; Review Bacterial biofilms in nature and disease. Annu Rev Microbiol. 1987;
41():435-64
- Crouch SP, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J. The use of ATP bioluminescence
as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. J Immunol Methods 1993;
160:81-88
- Cvitkovitch DG. Genetic competence and transformation in oral streptococci. Crit
Rev Oral Biol Med. 2001;12(3):217-43
- de Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z. Effects of biofilm structures on
oxygen distribution and mass transport. Biotechnol Bioeng. 1994
May;43(11):1131-8

Dennison DK, Huerzeler MB, Quinones C, Caffesse RG. Contaminated implant surfaces: an in vitro comparison of implant surface coating and treatment modalities for decontamination. *J Periodontol.* 1994 Oct;65(10):942-8.

Deppe H, Horch HH, Henke J, Donath K. Periimplant care of ailing implants with the carbon dioxide laser. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001 Sep-Oct;16(5):659-67

Dörtbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2001 Apr;12(2):104-8

Drago L, Del Fabbro M., Bortolin M., Vassena C., De Vecchi E., Taschieri S. Biofilm removal and antimicrobial activity of two different air-polishing powders. An in vitro study. *J Periodontol.* 2014 Jul 25:1-11

Edgerton M, Lo SE, Scannapieco FA: Experimental salivary pellicles formed on titanium surfaces mediate adhesion of strep- tococci. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:443–449

Farley JR, Hall SL, Herring S, Tarbaux NM, Matsuyama T, Wergedal JE. Skeletal alkaline phosphatase specific activity is an index of the osteoblastic phenotype in subpopulations of the human osteosarcoma cell line SaOS-2. *Metabolism.* 1991 Jul;40(7):664-71

Flemming HC, Wingender J.: Biofilme – die bevorzugte Lebensform der Bakterien: Flocken, Filme und Schlämme. In: *Biologie in unserer Zeit.* 31(3) (2001), S. 169–180

Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Sep;8(9):623-33

Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 1977 Jul;59(1):221-6

Fox SC, Moriarty JD, Kusy RP. The effects of scaling a titanium implant surface with metal and plastic instruments: an in vitro study. *J Periodontol.* 1990 Aug;61(8):485-90

Gerbo LR, Barnes CM, Leinfelder KF. Applications of the air-powder polisher in clinical orthodontics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1993 Jan;103(1):71-3

Hägi TT, Hofmänner P, Salvi GE, Ramseier CA, Sculean A. Clinical outcomes following subgingival application of a novel erythritol powder by means of air polishing in supportive periodontal therapy: a randomized, controlled clinical study. *Quintessence Int.* 2013 Nov-Dec;44(10):753-61

Hahn R, Netuschil L, Löst C. Initiale Plaquebesiedlung auf keramischen Restaurationsmaterialien. *Dtsch zahnärztl Z* 1992;47;330-334

Heukelekian H, Heller A. Relation between Food Concentration and Surface for Bacterial Growth. *J Bacteriol.* 1940 Oct;40(4):547-58

Hong Y, Brown DG. Electrostatic behavior of the charge-regulated bacterial cell surface. *Langmuir.* 2008 May 6;24(9):5003-9

Honkala S1, Runnel R, Saag M, Olak J, Nömmela R, Russak S, Mäkinen PL, Vahlberg T, Falony G, Mäkinen K, Honkala E. Effect of erythritol and xylitol on dental caries prevention in children. *Caries Res.* 2014;48(5):482-90

Hunter JC, Burk D, Woods MW. Influence of diphosphopyridine nucleotide (DPN) on photodynamic effects of low concentrations of methylene blue in ascites tumor cells. *J Natl Cancer Inst.* 1967 Oct;39(4):587-93

John G., Sahm N., Becker J., Schwarz F.: Nonsurgical treatment of peri-implantitis using an air-abrasive device or mechanical debridement and local application of chlorhexidine. Twelve-month follow-up of a prospective, randomized, controlled clinical study. *Clin Oral Investig.* 2015 Nov;19(8):1807-14.

Karring ES, Stavropoulos A, Ellegaard B, Karring T. Treatment of peri-implantitis by Vector system. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:288-293

Kolenbrander PE, Andersen RN, Holdeman LV. Coaggregation of oral Bacteroides species with other bacteria: central role in coaggregation bridges and competitions. Infect Immun. 1985 Jun;48(3):741-6

Kolenbrander PE, London J (1993): Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. J Bacteriol 175: 3247-3252

Kolenbrander P., Andersen R., David S. Blehert, Paul G. Eglund, Jamie S. Foster, and Robert J. Palmer, Jr. Communication among Oral Bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 2002 September; 66(3): 486–505.

König et al. 1987; Etiology of caries with emphasis on the role of sugars. Dtsch Zahnarztl Z. 1987 Oct;42(10 Suppl 1):S20-9

König K, Teschke M, Sigusch B, Glockmann E, Eick S, Pfister W. Red light kills bacteria via photodynamic action. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2000 Nov;46(7):1297-303

Kreisler M, Kohnen W, Christoffers AB, Gotz H, Jansen B, Duschner H, d'Hoedt B. In vitro evaluation of the biocompatibility of contaminated implant surfaces treated with an Er:YAG laser and an air powder system. Clin Oral Implants Res 2005;16:36-43

Kricka LJ. Clinical and biochemical applications of luciferases and luciferins. Anal Biochem. 1988 Nov 15;175(1):14-21

Rinsho Byori; Determination of biological substances using bioluminescent reaction based on luciferin-luciferase. 2004 Jul;52(7):595-603

Lang N, Berglundh T, Working Group 4 of Seventh European Workshop on Periodontology: Periimplant diseases: where are we now? – Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. J Clin Periodontol 2011 vol. 38 Suppl 11, pp. 178–81

Leonhardt A, Renvert S, Dahlen G. Microbial findings at failing implants. Cli Oral Implants Re 1999;10:339-345

- Lindhe J, Meyle J. Periimplant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2008; 35 (Suppl. 8): 282–285
- Livesey G. Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties. *Nutr Res Rev.* 2003 Dec;16(2):163-91
- Löe H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol* 1967;38(Suppl.):610-616
- Machara Y, Anai H, Tamada R, Sugimachi K. The ATP assay is more sensitive than the succinate dehydrogenase inhibition test for predicting cell viability. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987;23:273-276
- Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol.* 1995 Sep;15(3):169-75
- Marshall K C, Stout R & Mitchell R. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *J. Gen. Microbiol.* 68:337-48,1971
- Mengel R, Buns CE, Mengel C, Flores-de-Jacoby L. An in vitro study of the treatment of implant surfaces with different instruments. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:91-96
- Mombelli A, Lang NP. Antimicrobial treatment of peri-implant infections. *Clin Oral Implants Res.* 1992 Dec;3(4):162-8
- Mombelli A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. *Periodontology* 2000 2002;28:177-189
- Mombelli A, BuserD, Lang NP. Colonization of osseointegrated dental implants in edentulous patients. Early results. *Oral Microbial Immunol* 1988;3:113-120
- Mombelli A, van Oosten MA, Schuch E Jr, Land NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbial Immunol* 1987;2:145-151
- Mombelli A, Müller N, Cionca N; The epidemiology of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* 2012 Oct; 23(Suppl)6:67-76

Mouhyi J, Senerby L, Wennerberg A, Louette P, Dourov N, van reck J. Re-establishment of the atomic composition and the oxide structure of contaminated titanium surfaces by means of carbon dioxide laser and hydrogen peroxide: An in vitro study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2000;2:190-202

Müller N., Moene R., Cancela JA, Mombelli A. Subgingival air-polishing with erythritol during periodontal maintenance: Randomized clinical trial of twelve months. *J Clin Periodontol.* 2014 Sep;41(9):883-9

Murray E, Provvedini D, Curran D, Catherwood B, Sussman H, Manolagas S. Characterization of a human osteoblastic osteosarcoma cell line (SAOS-2) with high bone alkaline phosphatase activity. *J Bone Miner Res.* 1987 Jun;2(3):231-8

McQuillan DJ, Richardson MD, Bateman JF. Matrix deposition by a calcifying human osteogenic sarcoma cell line (SAOS-2). *Bone.* 1995 Apr;16(4):415-26

Neufeld HA, Towner RD, Pace J. A rapid method for determining ATP by the firefly luciferin-luciferase system. *Experientia.* 1975 Mar 15;31(3):391-2

Parsek, M. R., and E. P. Greenberg. 2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8789–8793

Persson LG, Araújo MG, Berglundh T, Gröndahl K, Lindhe J. Resolution of periimplantitis following treatment. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 1999; 10:195–203

Persson LG, Ericsson I, Berglundh T, Lindhe J. Osseointegration following treatment of peri-implantitis and replacement of implant components. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 2001 Mar;28(3):258-63

Persson LG, Berglundh T, Lindhe J, Sennerby L. Re-osseointegration after treatment of peri-implantitis at different implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 2001b Dec;12(6):595-603

Pestova EV, Håvarstein LS, Morrison DA. Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide

- pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiol.* 1996 Aug;21(4):853-62
- Petersen FC, Pecharki D, Scheie AA. Biofilm mode of growth of *Streptococcus intermedius* favored by a competence-stimulating signaling peptide. *J Bacteriol.* 2004 Sep;186(18):6327-31
- Petersilka GJ, Bell M, Haberlein I, Mehl A, Hickel R, Flemmig TF. In vitro evaluation of novel low abrasive air polishing powders. *J Clin Periodontol* 2003;30:9-13
- Petersilka G., Tunkel J., Barakos K., Heinecke A., Häberlein I., Flemmig T.F.: Subgingival plaque removal at interdental sites using a low abrasive air-polishing powder, *J Periodontol.* 2003b Mar;74(3):307-11
- Pretty RD, Sutherland LA, Hunter EM, Cree IA. Comparison of MTT and ATP-base assays for the measurement of viable cell number. *J Biolumin Chemilumin* 1995;10:29-34
- Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol.* 1995 Jan;22(1):1-14
- Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.* 2003 Feb;11(2):94-100
- Rijanaarts, H.H.M., Norde, W., Bouwer, E.J., Lyklema, J. and Zehnder, A.J.B. Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1993; 3255–3265
- Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, Shull S, Mann K, Rodan GA. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res.* 1987 Sep 15;47(18):4961-6
- Romondini L, Fare S, Brambilla E, Felloni A, Consonni C, Brossa F, Carrassi A. The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium. *J Periodontol* 1997;68:556-562

- Schliephake H, Scharnweber D, Roessler S, Dard M, Sewing A, Aref A. Biomimetic calcium phosphate composite coating of dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006 Sep-Oct;21(5):738-46
- Schou S, Berglundh T, Lang NP. Surgical treatment of peri-implantitis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19(Suppl):140-149
- Schroeder HE. Crystal morphology and gross structures of mineralizing plaque and of calculus. *Helv Odontol Acta* 1965;35:73-86
- Schwarz F, Rothamel D, Sculean A, Georg T, Scherbaum W, Becker J. Effects of Er:YAG laser and the Vector Ultrasonic system on the biocompatibility of titanium implants in cultures of human osteoblast-like cells. *Clin Oral Implants res* 2003;14:784-792
- Schwarz F, Sculean A, Romanos G, herten M, Horn N, Scherbaum W, Becker J. Influence of different treatment approaches on the removal of early plaque biofilms and the viability of SaOs-2 osteoblasts grown on teh titanium implants *Clin Oral Investig* 2005a;9:111-117
- Schwarz F, Sculean A, Rothamel D, Schwenzler K, Georg T, Becker J. Clinical evaluation of an Er:YAG laser for nonsurgical treatment of peri-implantitis: A pilot study. *Clin Oral Implant Res* 2005b;16:44-52
- Schwarz F, Papanicolau P, Rothamel D, Beck B, herten M, Becker J. Influence of plaque biofilm removal on reestablishment of the biocompability of contaminated titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A* 2006a;77:437-444
- Schwarz F, Nuesry E, Bieling K, Herten M, Becker J. Influence of an erbium, chromed-doped yttrium, scandium, gallium and garnet (Er,Cr.YSSG) laser on the reestablishment of the biocompability of contaminated titanium implant surfaces. *J Perodontol*2006b;77:1820-1827
- Schwarz F, Herten M, Sager M, Bieling K, Sculean A, Becker J. Comparison of naturally occuring and ligature-induced periimplantitis bone defects in humans and dogs. *Clin Oral Implant Res* 2007;18:161-170

- Schwarz F, Sculean A, Wieland M, Horn N, Nuesry E, Bube C, Becker J. Effects of hydrophilicity and microtopography of titanium implant surfaces on initial supragingival plaque biofilm formation. A pilot study. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2007b Dec;11(6):333-8
- Schwarz F., Becker K., Renvert S.: Efficacy of air polishing for the non-surgical treatment of peri-implant diseases: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2015 Sep 12.
- Siegrist BE, Brex MC, Gusberti FA, Joss A, Lang NP. In vivo early human dental plaque formation on different supporting substances. A scanning electron microscopic and bacteriological study. *Clin Oral Implants Res* 1991;2:38-46
- Singh G, O'Neal RB, Brennan WA, Strong SL, Horner JA, Van Dyke TE. Surgical treatment of induced peri-implantitis in the micro pig: clinical and histological analysis. *J Periodontol.* 1993 Oct;64(10):984-9
- Tabanella G, Nowzari H, Slots J. Clinical and microbiological determinants of ailing dental implants. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2009 Mar;11(1):24-36
- Tastepe CS., Liu Y., Visscher CM, Wismeijer D. Cleaning and modification of intraorally contaminated titanium discs with calcium phosphate powder abrasive treatment. *Clin Oral Implants res.* 2013 Nov;24(11):1238-46
- Thomas WE, Nilsson LM, Forero M, Sokurenko EV, Vogel V. Shear-dependent 'stick-and-roll' adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2004 Sep;53(5):1545-57
- van der Mei HC, White DJ, Kamminga-Rasker HJ, Knight J, Baig AA, Smit J, Busscher HJ. Influence of dentifrices and dietary components in saliva on wettability of pellicle-coated enamel in vitro and in vivo. *Eur J Oral Sci.* 2002 Dec;110(6):434-8
- Van de Velde E, Thielens P, Schauttet H, Vanclooster R. Subcutaneous emphysema of the oral floor during cleaning of a bridge fixed on a IMZ implant. Case report. *Rev Belge Med Dent* 1991;46:64-71

- Van Steenberghe D, Klinge B, Linden U, Quiryen M, Herrmann I, Garpland C. Periodontal indices around natural and titanium abutments: A longitudinal multicenter study. *J Periodontol* 1993;64;538-541
- Van Winkelhoff AJ, Wolf JW. Actinobacillus actinomycetemcomitans-associated peri-implantitis in an edentulous patient. A case report. *J Clin Periodontol*. 2000 Jul;27(7):531-5
- Vigeant MA, Ford RM, Wagner M, Tamm LK. Reversible and irreversible adhesion of motile Escherichia coli cells analyzed by total internal reflection aqueous fluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Jun;68(6):2794-801
- Williamson F. Microbes. 1. Antony Leewenhoek: inventor of the microscope. *Nurs Times*. 1973 Nov 15;69(46):1512-3
- Willmann DE, Norling BK, Johnson WN. A new prophylaxis instrument: effect on enamel alterations. *J Am Dent Assoc*. 1980 Dec;101(6):923-5
- Wood S, Nattress B, Kirkham J, Shore R, Brookes S, Griffiths J, Robinson C. An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. *J Photochem Photobiol B*. 1999 May;50(1):1-7
- Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, et al. Architecture Of Intact Natural Human Plaque Biofilms Studied By Confocal Laser Scanning Microscopy. *J Dent Res*. 2000;79:21-27
- Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, Boyan BD. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A* 2005; 74:49-58

6 Anhang

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Schematischer Aufbau des oralen Biofilmes (modifiziert nach Costeron et al., 1987; Flemming et al., 2001; Flemming et al., 2010; de Beer et al., 1994).....	3
Abb. 2: Entstehung des Biofilms (modif. nach Costeron et al., 1999; Flemming et al., 2001).....	4
Abb. 3: Schematische Darstellung der initialen Biofilmbildung (modifiziert nach Rickard et al., 2003).....	5
Abb. 4: Früh- und Spätbesiedler (modifiziert nach dem Modell der Kolonisation von Kolenbrander et al., 1993, 2002).....	7
Abb. 5: Stadien der Biofilmbildung (modifiziert nach Flemming et al., 2001).....	9
Abb. 6: Einflussfaktoren auf die Entstehung bakterieller Entzündungen (mod. In Anlehnung an die Ätiologie der Karies und Parodontitis (König et al., 1987).....	11
Abb. 7: Die Bedeutung der Biofilmbildung für die Entstehung der Periimplantitis (eigene Zeichnung).....	12
Abb. 8: Überblick über die bisherigen Reinigungsverfahren.....	15
Abb. 9: Chemische Eigenschaften der Grundsubstanz der Prophylaxepulver (umschrieben durch den Hersteller).....	19
Abb. 10: Acrylplatte mit Titanplättchen (eigenes Foto).....	22
Abb. 11: Titanplättchen (eigenes Foto).....	22
Abb. 12: Pulverstrahlgerät (eigenes Foto).....	23
Abb. 13: Das Pulversortiment (eigenes Foto).....	24
Abb. 14: Versuchsaufbau 1 (eigenes Foto).....	25
Abb. 15: Versuchsaufbau 2 (eigenes Foto).....	25
Abb. 16: Reinigungsschema von zentral nach peripher (eigene Zeichnung).....	26
Abb. 17: Luciferin-Luciferase-System (Kricka et al., 1988, Rinsho Byori et al., 2004).....	30

Abb. 18: unbehandelte Kontrollgruppe (40x).....	33
Abb. 19: Air-Flow ® Classic Pulver nach einmaliger Behandlung (40x).....	34
Abb. 20: Air-Flow ® Perio Pulver nach 2 Behandlungen (40x).....	34
Abb. 21: Entwicklungsfähigkeit von Zellen auf biologisch kontaminierten Titanimplantaten.....	36
Abb. 22: Clinpro ® Prophy Powder 1000x.....	37
Abb. 23: Air-Flow ® Perio 1000x.....	37
Abb. 24: Air-Flow ® Soft 1000x.....	37
Abb. 25: Air-Flow ® Classic 1000x.....	37
Abb. 26: REM Analyse der Oberflächenbeschaffenheit, nicht kontaminierte und unbehandelte Kontrollgruppe 1000x.....	38
Abb. 27: REM Analyse der Oberflächenbeschaffenheit (Air-Flow® Perio Pulver – Winkel: 30°, Abstand: 2 mm) 1000x.....	39
Abb. 28: REM Analyse der Oberflächenbeschaffenheit nach zweimaliger Behandlung mit Air-Flow® Classic Pulver (Winkel 90°, Abstand 2mm) 1000x.....	39

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Zusammensetzung des Nährmediums.....	28
Tabelle 2: Ergebnisse bei der Angulation von 30° bei 1x Behandlung.....	41
Tabelle 3: Ergebnisse bei der Angulation von 30° bei 2x Behandlung.....	41
Tabelle 4: Ergebnisse bei der Angulation von 90° bei 1x Behandlung.....	42
Tabelle 5: Ergebnisse bei der Angulation von 90° bei 2x Behandlung.....	42



ETHIKKOMMISSION der Medizinischen Fakultät

ETHIKKOMMISSION der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf

Herrn
Dr. med. Frank Schwarz
Poliklinik für zahnärztliche Chirurgie

HIER

Prof. Dr. H.-G. Lenard

Telefon: (0211)81-19590
Sekretariat: (0211)81-19591
Telex: (0211)81-19592
Ethikkommission@med.uni-duesseldorf.de

22. Apr. 2003

Studiennummer: 2157
Therapie periimplantärer Infektionen mit einem Er:YAG Laser

Sehr geehrter Herr Kollege Schwarz,

zu der o.g. Studie, die unsere Kommission am 03.04.2003 bereits positiv beurteilt hat, haben Sie einen ausführlicheren DFG-Antrag nachgereicht, der den Titel trägt

„Untersuchungen zur Entfernung bakterieller Biofilme von verschiedenen beschichteten Titanimplantaten mit Hilfe eines Er:YAG Lasers“.

Zusätzlich zu dem bereits vorliegenden Protokoll sind in dem Antrag Untersuchungen von Biofilmen vorgesehen, die auf Implantatscheiben im Mund freiwilliger wissenschaftlicher Mitarbeiter gezüchtet werden.

Die Kommission nimmt diese Erweiterung des Studienprotokolls zur Kenntnis. Die bei der Beurteilung des Erstprotokolls beteiligten Kommissionsmitglieder wurden telefonisch informiert. Eine nochmalige formale Begutachtung des Antrages erscheint nicht erforderlich.

Mit freundlichen kollegialen Empfehlungen
Ihr

Prof. Dr. med. Hans-Gerd Lenard
i.A. der Kommission

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich auf vielfältige Weise bei meiner Arbeit unterstützt haben:

Ich danke der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die Ermöglichung einer fachnahen Dissertation entsprechend meines Spezialisierungsschwerpunktes.

Hier möchte ich besonders die Abteilung für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Jürgen Becker erwähnen.

Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Frank Schwarz für die intensive und stets konstruktive Betreuung meiner Dissertation.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung während der oft zeitintensiven Erstellung der Dissertation.