

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Martin Gosau

Vergleichende Untersuchungen zur Osseointegration nach Photofunktionalisation und Oberflächenplasmaaktivierung dentaler Zirkoniumoxidimplantate im Landschwein

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Dr. med. Lisa Maren Libecki
geb. Krautwald
aus Bad Nauheim

Hamburg 2022

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 15.02.2023**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Florian Barvencik

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. Ralf Smeets

Inhaltsverzeichnis

1. Originalarbeit	4 - 18
2. Zusammenfassende Darstellung der Publikation	19 - 30
3. Literaturverzeichnis	31 - 33
4. Zusammenfassung	34
5. Summary	35
6. Erklärung des Eigenanteils an der Publikation	36
7. Danksagung	37
8. Lebenslauf	38
9. Eidesstattliche Versicherung	39

Article

Osseointegration of Zirconia Implants after UV-Light or Cold Atmospheric Plasma Surface Treatment In Vivo

Lisa Krautwald ^{1,2,†}, Ralf Smeets ^{1,2,†}, Carolin Stolzer ², Rico Rutkowski ², Linna Guo ^{1,3}, Aline Reitmeier ⁴, Martin Gosau ¹ and Anders Henningsen ^{1,5,*}

- ¹ Division “Regenerative Orofacial Medicine”, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany; l.krautwald@uke.de (L.K.); r.smeets@uke.de (R.S.); guolinna001@gmail.com (L.G.); m.gosau@uke.de (M.G.)
- ² Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany; c.stolzer@uke.de (C.S.); r.rutkowski@uke.de (R.R.)
- ³ Department of Stomatology, The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China
- ⁴ Department of Laboratory Animal Science, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany; a.reitmeier@uke.de
- ⁵ Private Practice ELBE MKG, Suellendorfer Kirchenweg 1A, 22587 Hamburg, Germany
- * Correspondence: a.henningsen@uke.de
- † These authors contributed equally to this work.

Abstract: The influence of UV light and non-thermal plasma on the osseointegration of yttria-stabilized zirconia implants (Y-TZP) comparing the two methods is unclear. The aim of this study was to show the influence of these methods on the osseointegration of dental zirconia implants in an animal model. A total of 54 implants were either untreated, treated with UV light (UV), or non-thermal oxygen plasma for 12 min and inserted into the parietal bones of six domestic pigs. The animals were sacrificed after a healing interval of two, four, and nine weeks. The degree of osseointegration was determined using histomorphometric determination of bone-to-implant contact values (BIC) and the bone-to-implant contact values within the retentive parts of the implants (BAFO). BIC values decreased in all groups after four weeks of healing and re-increased after nine weeks in all groups. BAFO increased significantly over time in all groups. However, there were no statistically significant differences in BIC and BAFO values between the control group and the test groups and over time. Clinical studies may follow to confirm the influence of cold plasma and UV light on the healing and survival of zirconia implants.

Keywords: dental implants zirconia; osseointegration; cold atmospheric plasma; UV light



Citation: Krautwald, L.; Smeets, R.; Stolzer, C.; Rutkowski, R.; Guo, L.; Reitmeier, A.; Gosau, M.; Henningsen, A. Osseointegration of Zirconia Implants after UV-Light or Cold Atmospheric Plasma Surface Treatment In Vivo. *Materials* **2022**, *15*, 496. <https://doi.org/10.3390/ma15020496>

Academic Editor:
Domenico Dalessandri

Received: 10 October 2021
Accepted: 15 December 2021
Published: 10 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Dental implants have evolved a profound method to replace missing teeth. Osseointegration, which describes the direct structural and functional contact between the human bone and the implant surface, is one key factor for long-term success and survival of dental implants [1]. Additionally to functionality and stability, esthetics have become increasingly important in recent years following the introduction of zirconia as ceramic implant material [2]. Zirconia is highly biocompatible and possess good stability properties. However, some studies revealed long-term outcomes may be inferior to those of comparable studies that investigated titanium implants [3–5].

During implant healing, the surface is primarily covered by woven bone, which is later replaced by realigned lamellar bone (remodeling). At the end of this remodeling phase, usually 60–70% of the implant surface is covered by bone that can be measured histomorphometrically using the bone-to-implant contact [6]. BIC is the most common measuring method in order to assess osseointegration in vivo [7]. The BIC typically ranges between 65% and 73% and does usually not reach the ideal 100% using modern implant

systems [8]. Another term to assess osseointegration *in vivo* is bone area fraction occupancy (BAFO), which are the areas occupied by bone between the implants' threads subtracted from the total area between the threads ("healing chambers") reported in percentage values according to Leonard et al. [9].

Generally, the physical, topographical, and chemical surface properties of implants determine their ability to osseointegrate. An ideal physico-chemical composition or surface topography of dental implants is currently unknown and chemical surface changes as well as adjustments to the topography in the nanometer range are the subject of recent research [2]. After manufacturing, implants are gamma-sterilized, but usually, the package is permeable to air. Comparable to titanium implants, biological aging may be a reason for a reduced osseointegrative capacity of zirconia implants. Carbon compounds that deposit on the surface during storage can cause hydrophobization and decreased protein-binding capacity [10]. Additionally, the increasing age of the population and the use of bone metabolism-interacting drugs like bisphosphonates, glucocorticoids, and cytostatics may lead to compromised osseointegration of dental implants by reducing its biological activity [11,12]. Studies showed that surface treatment using ultraviolet (UV) light or cold atmospheric plasma (CAP) may be capable of reducing hydrophobic layers of hydrocarbons and carbonaceous species and may increase hydrophilization, cell adhesion, and proliferation on implant surfaces that are made of titanium or zirconia [13–19]. Studies revealed that a surface treatment of zirconia using short-wave UV light may have a positive effect on osseointegration of dental implants [18]. Irradiation with short-wave light breaks molecular connections and an increased surface polarity leading to an increased reactivity of the treated surfaces [20]. Cold atmospheric plasma (CAP) is already used for disinfection and sterilization of medical products. Similar to the effects of UV-light, energy is administered to the surface, electrons are released and reactive particles are created [21]. The increased reactivity of the surface leads to a surface hydrophilization and may increase cell attachment and the viability of osteoblasts without changing the physical surface properties [22]. However, a comparison of the effects of UV-light and CAP on the osseointegration of zirconia implants *in vivo* has not been performed yet.

The aim of this study was to determine the influence of UV-light and cold plasma on osseointegration of yttria-stabilized zirconia implants *in vivo*. The hypothesis was that the use of UV-light or CAP on these implants prior to implant placement can increase the histomorphometrical osseointegration of the implants measured by BIC and BAFO in a landrace pig model.

2. Materials and Methods

2.1. Implants

One-piece whiteSKY zirconia implants (Bredent GmbH & Co. KG, Senden, Germany), 4 mm in diameter and 8 mm in length, were used in this study (Figure 1). The implant design is considered to be particularly stable because there is a screw connection to fix an abutment on the implant. The manufacturer specifies a flexural strength of 1250 MPa +/– 120 MPa, a modulus of elasticity of 200 GPa and a fracture toughness of 6–8 MPa/m for these implants. In total, 54 implants were used in this study, of which 18 implants used non-treated as a control group. The surface structure was investigated using a scanning electron microscope (Zeiss Crossbeam 340, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany).



Figure 1. whiteSKY zirconia implant (Bredent GmbH & Co. KG) Adapted from: <https://www.bredent.co.uk/products/sky-implants> (accessed on 15 October 2021).

2.2. Surface Treatments

In total, 36 implants were treated with UV-light or cold atmospheric plasma. Immediately before insertion, the implants of one experimental group (18 implants) were placed in a UV-light oven for 12 min that generates UV-light with an intensity of 0.15 mW/cm^2 ($\lambda = 253.7 \text{ nm}$). The second group of 18 implants were placed in a plasma reactor (Yocto III, Diener Electronic GmbH, Ebhausen, Germany) for 12 min using cold atmospheric argon plasma (generator frequency 100 kHz, input power 24 W, system pressure 1 mbar, gas flow rate 1.25 sccm, gas purity > 99.5%) immediately before insertion (Figure 2). The protocols are established and were used in several previous studies [23–25].

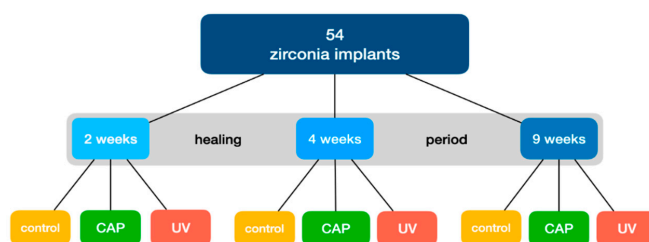


Figure 2. Study flowchart.

2.3. Animals

The animal study was approved by the Authority of Health and Consumer Protection of Hamburg (approval number 040/2018) and it was conducted following the ARRIVE guidelines according to the German legislation on protection of animals and the NIH guidelines for the care and use of laboratory animals. Sample size (six animals, nine implants per animal, and three different time points) was calculated with a power of 0.89 using a biological relevant difference of 15% and an effect size of 1.22 (Cohen's f). The implant placements in the frontal calvarial bone of six juvenile female German landrace pigs took place from June 2019 to August 2019 at the animal facility of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf. A frontal calvarial bone model was used because it enables to place up to 9 implants using only one surgical approach in a short time in order to reduce the stress on the animals. The animals (between 55.5 and 58.5 kg at start of the investigation) were kept together in adjacent lying sheds and were fed with pellet food and water. After two weeks of acclimatization at the animal facility, the operations were performed.

2.4. Surgical Procedures

Anesthesia was maintained by 10 mg/kg Ketamine (HVW Bremer Pharma, Warburg, Germany) and 4 mg/kg Azaperon (Jansen, Bad Homburg, Germany). After endotracheal intubation (standard tube with a diameter of 6–7 mm from Portex, Kent, UK), anesthesia was continued by inhalation with Isoflurane (Forene, Abbott GmbH, Wiesbaden, Germany) in a weight-adapted manner. The animals received a perioperative antibiotic prophylaxis with Enrofloxacin (10% Baytril, Bayer, Leverkusen, Germany).

After placing the animals in a prone position and local disinfection (Betaisadona, Braun, Melsungen, Germany), the frontal calvarial bone was exposed using a 10 cm long vertical incision after local infiltration anesthesia with UDS forte (Hoechst GmbH, Frankfurt, Germany). Nine implants were randomly placed into the ossa calvaria. Each animal received 3 untreated, 3 UV-light treated, and 3 CAP-treated implants. The pilot drilling was carried out under water cooling and it was prepared step-by-step in accordance to the manufacturer's protocol. The implants were inserted primary stable with an insertion torque of 45 N/cm. Finally, wounds were closed in multilayers using Vicryl 2-0 (Ethicon Co., Norderstedt, Germany) and the animals received 4 mg/kg Rimadyl (Zoetis, Berlin, Germany) intravenously for analgesia. The duration of each operation was between 40 and 60 min. Two animals were euthanized after two weeks (group 1), another two animals after four weeks (group 2), and the remaining two animals after nine weeks (group 3). The whole calvarial bone was removed and placed into aqueous solution of 4% formaldehyde.

2.5. Histomorphometrical Preparation and Analysis

For histomorphometrical analysis, each of the nine implants containing the surrounding bone tissue was sawed out using a diamond band saw (EXAKT 310 CP with diamond separating band 0.3 mm D64, Exakt Apparatebau, Norderstedt, Germany), resulting in nine implant-bone-blocks. The specimens were processed to conventional X-ray (Faxitron X-ray, Faxitron Xray Corp., Wheeling, IL, USA) following preservation in aqueous solution of formaldehyde (3.5%). Afterwards, the specimens were dehydrated using an ascending ethanol solution (Geyer GmbH, Hamburg, Germany) and embedded in resin. Parallel sample blocks (thickness 300 μm) were cut off using a diamond band saw (EXAKT cut-off grinding system Makro 310 CP with EXAKT diamond cutting tape 0.1 mm D64 310, EXAKT Apparatebau, Norderstedt, Germany) and thinned and polished using a micro-grinding system to finally 80–100 μm thickness (grain size 1200/2500/4000 SiliconCarbide Paper, Allied High Tech Products Inc., Rancho Dominguez, CA, USA). The histological slices were stained using toluidine blue (Kohler Chemie GmbH, Bensheim, Germany). Microscope images were created using an Axio Scope A1 (Carl Zeiss AG Oberkochen, Germany) and measurement were performed using OsteoMeasure XP software (release 3.2.1.1., Osteometrics, Atlanta, GA, USA). First, the entire implant surface surrounded by bone was measured. To determine the BIC (bone-to-implant contact), the parts of the implants surface covered with mineralized bone tissue was placed in relation to the total surface giving the percentage of the surface that is successfully osseointegrated (Figure 3). To determine the BAFO (Bone area fraction occupancy), the total area between the threads was measured following indication of all areas occupied by bone in these "healing chambers". The percentage of area occupied by bone in mm^2 in relation to the total area in mm^2 gave the BAFO (Figure 4) [9]. Measurements were performed by two independent researchers.

Implants showing BIC values below 20 were considered to be failures. These zirconia implants are not considered to be osseointegrated and were removed from the evaluation.

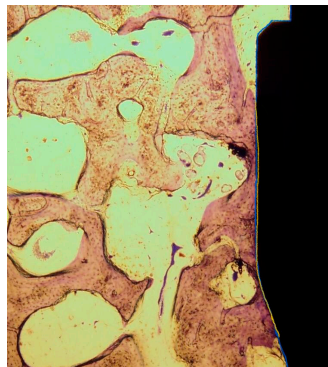


Figure 3. Histomorphometric evaluation of the bone-to-implant-contact (BIC) (blue = entire implant surface, yellow/blue = bone-covered implant surface).

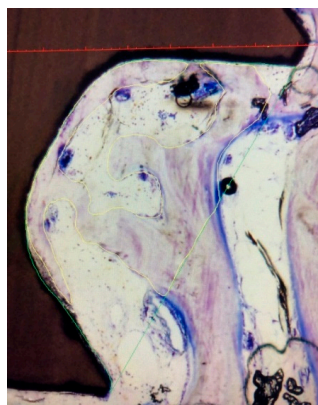


Figure 4. Determination of the BAFO: percentage of bone (area surrounded by yellow marking) in the healing chamber (area surrounded by green marking).

2.6. Statistical Analysis

Inter-observer reliability was assessed with an intraclass correlation coefficient for consistency and absolute agreement of the data in a two-way mixed model. A generalized linear mixed model (GLMM) was used for statistical analysis using SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The treatment method and the healing time were modelled as fixed effects in the mixed model. The individual characteristics of the pigs were adopted as random effects using a compound symmetry covariance structure. The final group comparison was based on least-square-means estimators, which were constructed using the respective parameter estimators. p -values < 0.05 were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Scanning Electron Microscopy

Scanning electron microscopy revealed a micro-rough surface in the region of the threads and a polished surface in the upper part of the implants starting at the implant neck for optimized soft tissue adhesion (Figure 5).

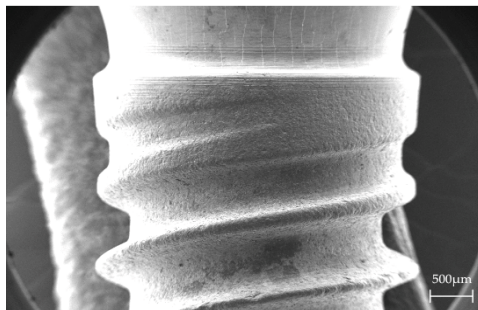


Figure 5. SEM-Image of a whiteSKY zirconia implant, 45-fold magnification.

According to the manufacturer, the micro-rough surface in the region of the threads is achieved using sand-blasting (Figure 6).

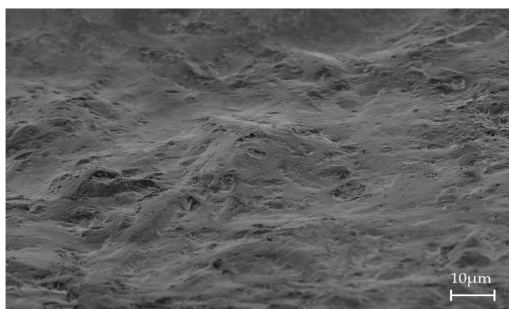


Figure 6. SEM-Image of a whiteSKY zirconia implant, 2000-fold magnification.

3.2. Animal Evaluation

All operations were performed without complications. The postoperative course was uneventful without wound healing disorders and dehiscences. All animals gained weight and they behaved normally. After two weeks the average weight in all animals was 67.5 kg, after four weeks the average weight was 82 kg, and after 9 weeks it was 99.5 kg.

3.3. Macroscopic and Radiological Evaluation

After removal, all calvariae were macroscopically intact with no signs of infection or osteolysis (Figure 7).

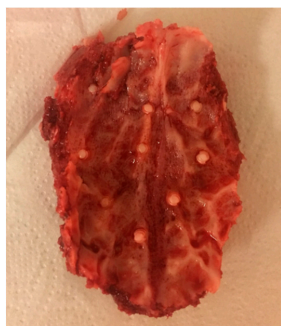


Figure 7. Extracted frontal calvarial bone of a landrace pig after a healing time of four weeks.

Bone was not present around implant number 45 in animal number 5 (UV-light group, nine weeks healing time), which was surrounded by connective tissue. The remaining implants were clinically successfully osseointegrated. Seventy-four per cent ($n = 39$) of the implants were accidentally partially inserted into the sinus due to the limited vertical amount of bone in the pigs. However, all implants were apically covered by mucosa without any signs of healing disorders. After a healing time of nine weeks, four implants were coronally overgrown by bone (two untreated implants and two UV-light treated implants).

3.4. Histomorphometrical Evaluation

The results of the reliability tests indicated a high inter-observer reliability for the histomorphometrical measurements regarding consistency ($p = 0.89$, 95%-CI: 0.85; 0.93) and absolute agreement ($p = 0.92$, 95%-CI: 0.87; 0.95) of the data. Exemplary radiographical and microscope images are shown in Figures 8 and 9.

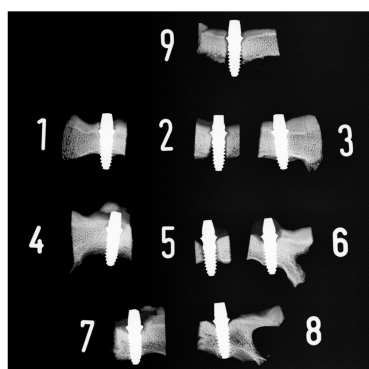


Figure 8. Radiographs of all dental implants that were placed in animal 3 in the frontal calvarial bone after four weeks of healing. Implants 2, 5, and 9 are radiographically not osseointegrated, presenting a peri-implant brightening. Implants 1 and 6–8 are radiographically fully osseointegrated and partially overgrown by bone.

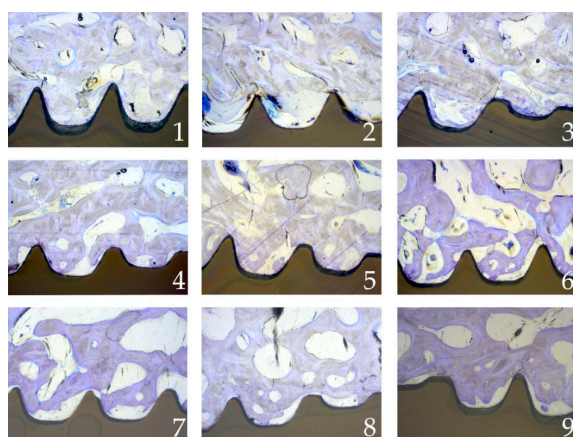


Figure 9. Microscope images after healing and histomorphometrical preparation. Upper row after 2 weeks of healing (1. Control, 2. CAP, 3. UV-light), middle row after 4 weeks of healing (4. Control, 5. CAP, 6. UV-light), lower row after 9 weeks of healing (7. Control, 8. CAP, 9. UV-light).

BIC values ranged between 21.9 and 80.1% (Figure 10). Mean values decreased after four weeks of healing in all groups, but rose again after nine weeks of healing in all groups.

However, the highest BIC values were achieved in the UV-light group (60% after two weeks of healing, Table 1).

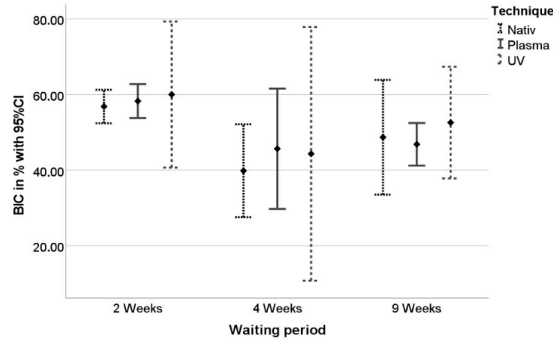


Figure 10. BIC values in percent ± standard deviation after 2, 4, and 9 weeks of healing.

Table 1. BIC values after 2, 4, and 9 weeks of healing.

Healing Period	Surface Treatment	Number (n)	BIC Mean (in %)	Min/Max (in %)
2 weeks	Control	5	56.82	51.63/61.72
	CAP	4	49.09	21.85/60.58
	UV	4	60.01	39.03/80.11
4 weeks	Control	4	36.51	26.52/47.97
	CAP	5	45.66	30.06/69.91
	UV	4	35.10	23.25/49.62
9 weeks	Control	6	44.66	24.5/70.74
	CAP	5	43.30	29.28/51.22
	UV	5	43.20	29.01/61.95

Generally, mean BAFO values ranged between 37.2% after two weeks of healing and 59.7% after nine weeks of healing. In contrast to BIC results, mean values increased continuously until nine weeks of healing except in the CAP group (Figure 11). However, the highest BAFO values were achieved in the UV-light group (60.9% after two weeks of healing, Table 2).

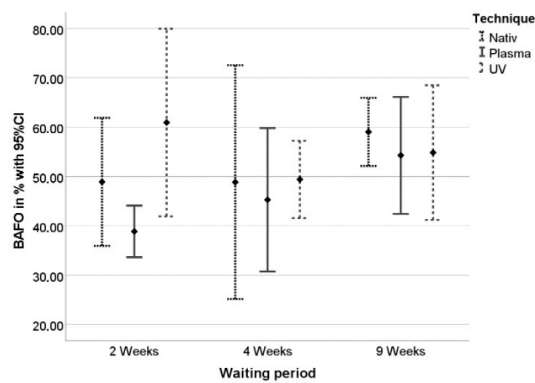


Figure 11. BAFO values in percent ± standard deviation after 2, 4, and 9 weeks of healing.

Table 2. BAFO values after 2, 4, and 9 weeks of healing.

Healing Period	Surface Treatment	Number (n)	BAFO Mean (in %)	Min/Max (in %)
2 weeks	Control	5	48.91	35.43/70.89
	CAP	4	37.16	32.02/42.04
	UV	3	60.95	48.63/70.77
4 weeks	Control	4	47.79	32.91/59.45
	CAP	5	45.28	22.66/59.99
	UV	4	46.65	43.0/50.66
9 weeks	Control	6	59.7	50.2/68.12
	CAP	5	54.65	40.44/64.43
	UV	5	58.47	49.48/68.75

Joining the results of BIC and BAFO, values in all groups were highest after nine weeks of healing, indicating the osseointegration over time. However, the differences regarding BIC and BAFO values between the groups nor in the different groups over time in the groups were not statistically significant ($p < 0.05$) (Tables 3 and 4).

Table 3. Statistical results of the generalized linear mixed model (GLMM) concerning differences in BIC values between the different treatment groups.

Test	2 Weeks	4 Weeks	9 Weeks
UV/Control	0.6890	0.6798	0.6537
CAP/Control	0.8678	0.5031	0.8149
UV/CAP	0.8470	0.8916	0.5268

Table 4. Statistical results of the generalized linear mixed model (GLMM) concerning differences in BIC values between the different time points.

Test	2 Weeks	4 Weeks	9 Weeks
2 weeks/4 weeks	0.595	0.1357	0.1546
4 weeks/9 weeks	0.3118	0.4472	0.8829
2 weeks/9 weeks	0.2838	0.4149	0.2143

Table 5 summarizes the results of the implant that were characterized as failures. Generally, number of failed implants decreased after nine weeks of healing (Table 5). However, a systematic reason for failure could not be determined.

Table 5. Characterization of non-osseointegrated implants during the different healing times.

Implant Number	Animal	Healing Period (weeks)	Surface Treatment	BIC	BAFO
5	1	2	CAP	1.26	4.19
9	1	2	Control	4.05	0
11	2	2	CAP	18.86	38.25
14	2	2	UV	1.04	10.36
18	2	2	UV	0	0.81
20	3	4	CAP	0	0
23	3	4	Control	0	0
27	3	4	UV	0	0.63
28	4	4	UV	3.05	12.5
29	4	4	Control	7.93	17.02
45	5	9	UV	0	0
54	6	9	CAP	0	0

4. Discussion

Surface functionalization by UV-light and CAP treatment are able to create hydrophilic implant surfaces and may improve osteoblastic adhesion [10]. Biological aging caused by an accumulation of carbon remnants on the implants' surfaces since manufacturing may be reversed using either UV-light or CAP and several studies have already confirmed these effects on the implants' surfaces [14,20,23–30]. Modifying zirconia surfaces is more difficult and challenging than metallic surfaces [5]. Additionally, due to its characteristics, zirconia is more hydrophobic than titanium [24]. Therefore, an activation of the surface could be beneficial to establish a rapid and reliable osseointegration. In this study, treatment of zirconia implants using CAP and UV-light initially higher BIC values after two and four weeks of healing. However, differences between the groups were not significant. BAFO values increased over time in the all groups without statistically significant differences between the groups over time. However, after nine weeks of healing, BAFO values of untreated implants were 3.3% higher compared to the UV-light group and were 5.7% higher than in the CAP group. Compared with previous studies investigating the influence of surface treatment on the osseointegration of zirconia implants, the present in vivo study did not show any significant improvements of the histomorphometric healing of zirconia implants.

In this study, the landrace pig was chosen, which is an established model to examine osseointegration. The ratio between trabecular and cortical bone is comparable to human bone [25,31,32]. However, this animal model may be a limitation. The juvenile animals that were used grew very fast, which was reflected in the weight gaining, which means that a higher bone turnover and growth must be assumed compared to humans. A high turnover may also be the reason that there were no statistically significant differences on BIC and BAFO between treated and non-treated implants in this study as well as the reason for the missing increase of BIC over time by reducing the bond between bone and the implants' surface. The calvarial bone model that was used may also be a limitation due to the reduced vertical amount of bone in the juvenile animals that led to a partial intrasinusoidal placement of implants. However, all of them were apically covered by mucosa without any signs of healing disorders. Although initial osseointegration in the calvarial bone should not be different compared to the jawbones, long-term osseointegration may be varying considering the load of masticatory forces. Treatment using UV-light and cold atmospheric plasma was performed for 12 min in this study. It remains unclear whether longer exposure to zirconia surfaces may achieve higher effects. Studies showed that a

longer treatment interval may lead to increased hydrophilicity and improved osseointegration [26,33]. High standard deviation values were determined, especially after two weeks of osseointegration of implants. The low number of animals and implants may be possible reasons. However, another reason may be that the process of osseointegration may be different compared to the initial osseointegration processes of titanium implants. Some studies even described decreased BIC values when comparing osseointegration of titanium and zirconia implants [34,35]. The use of a sealed system generating CAP may lead to a limitation when comparing the results of this study to other studies, since most often open atmospheric plasma devices are used in comparable studies. An explanation for the high standard deviation may be the small number of only six animals. As a result, a greater spread of the results may be expected. To solve this problem, an attempt was made by increasing the number of implants per animal to nine implants each. Another important point to consider is the animals' high growth rate.

One study compared the influence of UV-light and CAP treatment on the surface structure, cell adhesion, and cytocompatibility of zirconia *in vitro* [25]. Both surface treatments significantly reduced the amount of organic material on zirconia. There was an increase in hydrophilicity and improved conditions for osteoblasts. Further, functionalization using CAP led to higher cell proliferation and cell attachment compared to UV-light. In this *in vivo* study, plasma treatment did not significantly improve BIC values after a four-week healing period. Even after nine weeks of healing, however, there was no advantage for the CAP treatment on zirconia with regard to the contact values between bone and implant. It is possible that the surface of the zirconia implants that were used (white SKY, Bredent GmbH & Co. KG) may be improved compared to other zirconia implants and that the effects of CAP or UV-light may be reduced. Another explanation could be that the time of implant placement since manufacturing was too short to get the implants' surfaces saturated with carbon compounds. The animal model could also be partially responsible for the absent effects of UV-light or CAP because juvenile landrace pigs were used that showed distinct growth effects and gained 68% body weight during only nine weeks of keeping.

However, several *in vivo*-studies showed positive effects after using UV-light on the osseointegration of zirconia implants. Brezavscek et al. treated smooth and rough zirconia disks and cylindrical implants with UV light for 15 min and inserted them into rat femurs. After two and four weeks, the proportion of bone-to-implant contacts had increased by three to seven times (smooth surfaces) and 1.4–1.7 times (rough surfaces) compared to untreated surfaces. The formation of the bone-implant contacts accelerated and the bond was significantly stronger [36]. Compared to the present study, the irradiation time was 3 min longer at 15 min. The emission of UV light as a spectral mixture at $\lambda = 360$ nm and $\lambda = 250$ nm was comparable to the present study.

Tuna et al. examined the effect of UV-light on smooth and roughened surfaces made of zirconia on the reaction of alveolar human bone and its osteoblasts. A 15 W bactericidal UV lamp was used and the zirconia discs were irradiated for 48 h with a mixed spectrum between $\lambda = 360$ nm and $\lambda = 250$ nm. After 24 h, there was a significantly higher number of osteoblasts on the surfaces treated with UV-light and after three weeks, there was significantly more mineralized bone on the UV-treated zirconia surfaces than on the untreated surfaces. The authors concluded that the treatment with UV-light transforms the zirconia surfaces from hydrophobic to hydrophilic which may result in faster healing and increased BIC values [15].

Improved cell reaction on zirconia surfaces after various plasma treatments has also already been reported. Zheng et al. showed an increased cell density after non-thermal plasma treatment using helium as carrier gas [16]. For this purpose, zirconia disks were treated with CAP for 30, 60, or 90 s and the biocompatibility of human gingiva fibroblasts was examined. A 60 s treatment increased the density of fibroblasts on the disks. After 30 and 60 s of treatment, the expression of attachment-related genes was significantly higher in the test groups compared to the controls. After the plasma treatment, the surface wettability increased due to the presence of hydroxide and the biological behavior of the

human gingival fibroblasts improved. After a cultivation time of 90 s, the expression of integrins decreased again. The authors believe that atmospheric helium pressure plasma has an early and brief effect on the zirconia disks. Improved cell behavior and a possible improved connection between zirconium oxide and bone tissue was described. In this study, no significant improvement in the BIC and BAFO values was noticed.

Watanabe et al. showed that acid etching, non-thermal plasma and UV-light treatments turned zirconia surfaces hydrophilic and improved the adhesion of osteoblast-like cells. The authors used tetragonal zirconia discs that were sandblasted and etched with hydrofluoric acid. Roughened zirconium oxide surfaces were created. Some of the samples were stored in distilled water for one day, a second part was treated with oxygen plasma for 10 min and a third part was irradiated with UV light for 2 h (using a wavelength between 185 and 365 nm) [27]. The results showed that cell attachment could be improved. However, compared to the present study, the zirconium oxide disks were treated using a significantly longer period of 2 h. This may also be one reason that no significant differences were shown in the histomorphometric analysis.

In another study, a 10 s treatment using non-thermal plasma increased the microtensile bond strength of zirconia in vitro [37]. Zirconia disks (Y-TZP) were loaded with 1 mm/min with 100 N until failure the cross-sectional areas of these samples were measured and the MTBS values (microtensile bond strength) in MPa were calculated showing a clear increase in the test groups. Shon et al. placed PIM (powder-injection molded) zirconia implants in the tibiae of 25 rabbits and were able to show that treatment with helium plasma resulted in a significant increase in BIC values [38]. The rabbits received four types of implants. There was a group with PIM zirconia implants, roughened PIM zirconia implants, plasma-treated PIM zirconia implants, and plasma-treated roughened PIM zirconia implants. The static contact angle of the implant types was evaluated by measurement with a contact angle analyzer using the sessile drop technique. The plasma-treated implants had a contact angle of less than 1° , which suggests superhydrophilicity. A removal torque test was performed, which was influenced by the surface roughness, but not by the plasma treatment. On the other hand, the plasma-treated implants showed a significantly higher BIC than the untreated implants. The result was that the plasma treatment seems to significantly increase the hydrophilicity without changing the surface parameters of the implants. In the present study, implants with only one surface were used. However, although removal torque was not tested, there were also no statistically significant differences comparing BIC and BAFO values of control and test groups.

Hashim et al. conducted a systematic review in 2019 containing 14 articles and reported an overall survival rate of 92% for one- and two-part zirconia implants after one year [39]. Roehling et al. described the one- and two-year survival rates as 98.3% and 97.2%, respectively, after analyzing a total of 18 studies [40]. In the present study, the BIC value of a total of 12 implants was below 20, which means that they were not osseointegrated and therefore had been declared as failures giving a rate of osseointegration of 78%, which is lower compared to the studies mentioned above. However, it could be seen that the rate of implants presenting BIC values below 20% decreased over time. It may be possible that dental implants made of zirconia may need a longer healing time.

Implant loss is most likely caused by impaired osseointegration in the early phase or by a change in the contact between the implant and bone tissue mainly caused by inflammatory reactions on the bone-to-implant interface [41–43]. The aging of society is associated with a decrease in bone activity being a risk for successful osseointegration of dental implants [11]. Another reason for impaired osseointegration might be the use of bone-interacting drugs such as glucocorticoids or bisphosphonates [12].

Therefore, it is important to find methods for faster and safer osseointegration of implants. These should be easy to integrate into everyday clinical practice and should be able to be used with lasting effects without major risks for the patient.

In pre-clinical studies, UV-light and CAP were able to improve adhesion of osteogenic cells on zirconia implant surfaces and may increase the speed of osseointegration. Both

methods can be performed well in a short and clinically practicable period of time. This study showed that surface functionalization using cold atmospheric plasma and UV-light may be able to increase osseointegration in the crucial first period following implant placement. A positive effect on osseointegration in the critical early phase of bone healing would be important, especially in elder patients or patients taking bone metabolism interacting drugs. However, controlled clinical studies are needed to investigate the determined effects, especially in these patients.

5. Conclusions

The aim of this study was to determine the influence of UV-light and cold atmospheric plasma (CAP) on osseointegration of yttria-stabilized zirconia implants in a pig model. Generally, bone-to-implant contacts in groups treated with UV-light and CAP were higher after two and four weeks of healing, but without statistically significant differences. Bone area fraction occupancy (BAFO) increased over time in all groups without statistically significant differences. Twelve implants showed BIC values below 20% and were rated as failures. However, the rate of implants presenting such low BIC values decreased over time, assuming longer healing times for zirconia implants compared to titanium implants. However, zirconia implants may achieve clinical and histomorphometrical osseointegration comparable to titanium implants with improved biocompatibility and esthetics, but modifying the surface with the aim of even increased cell attachment appears to be challenging. Controlled clinical studies are needed to confirm the influence of cold atmospheric plasma or UV-light on the success and survival of dental implants.

Author Contributions: Conceptualization, A.H. and R.S.; Methodology, M.G.; Validation, R.R., A.R. and C.S.; Formal analysis, L.G.; Investigation, L.K., A.H. and A.R.; Resources, M.G.; Data curation, L.G. and R.R.; Writing—original draft preparation, L.K.; Writing—review and editing, L.K., A.H., L.G. and R.R.; Visualization, C.S.; Supervision, R.S. and M.G.; Project administration, A.H. and R.S.; Funding acquisition, C.S., R.S. and A.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research project was supported by a grant of the German Association for Implantology, grant number 2018-12-13.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors wish to thank bredent GmbH for the implants manufactured for this research as well as Diener Electronic AG for supplying the cold atmospheric plasma device. Furthermore, the authors want to thank Michael Hahn from the Department of Osteology and Biomechanics of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf and Eric Bibiza from the Department of Medical Biometry and Epidemiology of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf for their support. This research project was supported by a grant of the German Association of Oral Implantology.

Conflicts of Interest: This research project was supported by a grant of the German Association for Implantology. The plasma device and the zirconia implants were provided free of charge by the manufacturers. No benefit of any kind was received either directly or indirectly by the authors. The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

References

1. Brånemark, P.I.; Hansson, B.O.; Adell, R.; Breine, U.; Lindström, J.; Hallén, O.; Ohman, A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Suppl.* **1977**, *16*, 1–132.
2. Smeets, R.; Stadlinger, B.; Schwarz, F.; Beck-Broichsitter, B.; Jung, O.; Precht, C.; Kloss, F.; Gröbe, A.; Heiland, M.; Ebker, T. Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 6285620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Depprich, R.; Naujoks, C.; Ommerborn, M.; Schwarz, F.; Kubler, N.R.; Handschuh, J. Current findings regarding zirconia implants. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2014**, *16*, 124–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ahmad, I. Yttrium-partially stabilized zirconium dioxide posts: An approach to restoring coronally compromised nonmetal teeth. *Int. J. Periodont. Restor. Dent.* **1998**, *18*, 454–465.
5. Hisbergues, M.; Vendeville, S.; Vendeville, P. Zirconia: Established facts and perspectives for a biomaterial in dental implantology. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2009**, *88*, 519–529. [[CrossRef](#)]

6. Schenk, R.K.; Buser, D. Osseointegration: A reality. *Periodontology 2000* **1998**, *17*, 22–35. [[CrossRef](#)]
7. Von Wilmowsky, C.; Moest, T.; Nkenke, E.; Stelzle, F.; Schlegel, K.A. Implants in bone: Part II. Research on implant osseointegration: Material testing, mechanical testing, imaging and histoanalytical methods. *Oral Maxillofac. Surg.* **2014**, *18*, 355–372. [[CrossRef](#)]
8. Alharbi, H.M.; Babay, N.; Alzoman, H.; Basudan, S.; Anil, S.; Jansen, J.A. Bone morphology changes around two types of bone-level implants installed in fresh extraction sockets—A histomorphometric study in Beagle dogs. *Clin. Oral Implant. Res.* **2015**, *26*, 1106–1112. [[CrossRef](#)]
9. Leonard, G.; Coelho, P.; Polyzois, I.; Stassen, L.; Claffey, N. A study of the bone healing kinetics of plateau versus screw root design titanium dental implants. *Clin. Oral Implant. Res.* **2009**, *20*, 232–239. [[CrossRef](#)]
10. Att, W.; Ogawa, T. Biological aging of implant surfaces and their restoration with ultraviolet light treatment: A novel understanding of osseointegration. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* **2012**, *27*, 753–761.
11. Stanford, C.M.; Schneider, G.B. Functional behaviour of bone around dental implants. *Gerodontology* **2004**, *21*, 71–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ata-Ali, J.; Ata-Ali, F.; Peñarrocha-Oltra, D.; Galindo-Moreno, P. What is the impact of bisphosphonate therapy upon dental implant survival? A systematic review and meta-analysis. *Clin. Oral Implant. Res.* **2016**, *27*, 38–46. [[CrossRef](#)]
13. Noro, A.; Kaneko, M.; Murata, I.; Yoshinari, M. Influence of surface topography and surface physicochemistry on wettability of zirconia (tetragonal zirconia polycrystal). *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2013**, *101*, 355–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Al Qahtani, M.S.; Wu, Y.; Spintzyk, S.; Krieg, P.; Killing, A.; Schweizer, E.; Stephana, I.; Scheideler, L.; Geis-Gerstorfer, J.; Rupp, F. UV-A and UV-C light induced hydrophilization of dental implants. *Dent Mater.* **2015**, *31*, 157–167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Tuna, T.; Wein, M.; Altmann, B.; Steinberg, T.; Fischer, J.; Att, W. Effect of ultraviolet photofunctionalisation on the cell attractiveness of zirconia implant materials. *Eur. Cell. Mater.* **2015**, *29*, 82–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Zheng, M.; Yang, Y.; Liu, X.Q.; Liu, M.Y.; Zhang, X.F.; Wang, X.; Li, H.-P.; Tan, J.-G. Enhanced Biological Behavior of In Vitro Human Gingival Fibroblasts on Cold Plasma-Treated Zirconia. *PLoS ONE* **2015**, *10*, 0140278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Altmann, B.; Kohl, R.J.; Steinberg, T.; Tomakidi, P.; Bachle-Haas, M.; Wennerberg, A.; Att, W. Distinct cell functions of osteoblasts on UV-functionalized titanium- and zirconia-based implant materials are modulated by surface topography. *Tissue Eng. Part C Methods* **2013**, *19*, 850–863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Att, W.; Takeuchi, M.; Suzuki, T.; Kubo, K.; Anno, M.; Ogawa, T. Enhanced osteoblast function on ultraviolet light-treated zirconia. *Biomaterials* **2009**, *30*, 1273–1280. [[CrossRef](#)]
19. Tuna, T.; Wein, M.; Swain, M.; Fischer, J.; Att, W. Influence of ultraviolet photofunctionalization on the surface characteristics of zirconia-based dental implant materials. *Dent. Mater. Off. Publ. Acad. Dent. Mater.* **2015**, *31*, 14–24. [[CrossRef](#)]
20. Ogawa, T. Ultraviolet photofunctionalization of titanium implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* **2014**, *29*, 95–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Diener Electronic. *Plasmatechnik*; Diener Electronic GmbH & Co. KG: Ebhausen, Germany, 2008; pp. 7–15.
22. Canullo, L.; Cassinelli, C.; Götz, W.; Tarnow, D. Plasma of argon accelerates murine fibroblast adhesion in early stages of titanium disk colonization. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* **2013**, *28*, 957–962. [[CrossRef](#)]
23. Henningsen, A.; Smeets, R.; Hartjen, P.; Heinrich, O.; Heuberger, R.; Heiland, M.; Precht, C.; Cacaci, C. Photofunctionalization and non-thermal plasma activation of titanium surfaces. *Clin. Oral Investig.* **2018**, *22*, 1045–1054. [[CrossRef](#)]
24. Henningsen, A.; Smeets, R.; Heuberger, R.; Jung, O.T.; Hanken, H.; Heiland, M.; Cacaci, C.; Precht, C. Changes in surface characteristics of titanium and zirconia after surface treatment with ultraviolet light or non-thermal plasma. *Eur. J. Oral Sci.* **2018**, *126*, 126–134. [[CrossRef](#)]
25. Smeets, R.; Henningsen, A.; Heuberger, R.; Hanisch, O.; Schwarz, F.; Precht, C. Influence of UV Irradiation and Cold Atmospheric Pressure Plasma on Zirconia Surfaces: An In Vitro Study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* **2019**, *34*, 329–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Canullo, L.; Genova, T.; Tallarico, M.; Gautier, G.; Mussano, F.; Botticelli, D. Plasma of argon affects the earliest biological response of different implant surfaces: An in vitro comparative study. *J. Dent. Res.* **2016**, *95*, 566–573. [[CrossRef](#)]
27. Watanabe, H.; Saito, K.; Kokubun, K.; Sasaki, H.; Yoshinari, M. Change in surface properties of zirconia and initial attachment of osteoblast like cells with hydrophilic treatment. *Dent. Mater. J.* **2012**, *31*, 806–814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Gittens, R.A.; Scheideler, L.; Rupp, F.; Hyzy, S.L.; Geis-Gerstorfer, J.; Schwartz, Z.; Boyan, B.D. A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 2907–2918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Lang, N.P.; Salvi, G.E.; Huynh-Ba, G.; Ivanovski, S.; Donos, N.; Bosshardt, D.D. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clin. Oral Implant. Res.* **2011**, *22*, 349–356. [[CrossRef](#)]
30. Flanagan, D. Photofunctionalization of Dental Implants. *J. Oral Implantol.* **2016**, *42*, 445–450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Aerssens, J.; Boonen, S.; Lowet, G.; Dequeker, J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: Potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* **1998**, *139*, 663–670. [[CrossRef](#)]
32. Kantarci, A.; Hasturk, H.; Van Dyke, T.E. Animal models for periodontal regeneration and peri-implant responses. *Periodontology 2000* **2015**, *68*, 66–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Aita, H.; Hohri, N.; Takeuchi, M.; Suzuki, T.; Yamada, M.; Anpo, M.; Ogawa, T. The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials* **2009**, *30*, 1015–1025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Bosshardt, D.D.; Chappuis, V.; Buser, D. Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: Current knowledge and open questions. *Periodontology 2000* **2017**, *73*, 22–40. [[CrossRef](#)]

35. Chappuis, V.; Cavusoglu, Y.; Gruber, R.; Kuchler, U.; Buser, D.; Bosshardt, D.D. Osseointegration of zirconia in the presence of multinucleated giant cells. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2016**, *18*, 686–698. [[CrossRef](#)]
36. Brezavšček, M.; Fawzy, A.; Bächle, M.; Tuna, T.; Fischer, J.; Att, W. The Effect of UV Treatment on the Osteoconductive Capacity of Zirconia-Based Materials. *Materials* **2016**, *9*, 958. [[CrossRef](#)]
37. Valverde, G.B.; Coelho, P.G.; Janal, M.N.; Lorenzoni, F.C.; Carvalho, R.M.; Thompson, V.P.; Weltemann, K.D.; Silva, N.R. Surface characterisation and bonding of Y-TZP following non-thermal plasma treatment. *J. Dent.* **2013**, *41*, 51–59. [[CrossRef](#)]
38. Shon, W.J.; Chung, S.H.; Kim, H.K.; Han, G.J.; Cho, B.H.; Park, Y.S. Peri-implant bone formation of non-thermal atmospheric pressure plasma-treated zirconia implants with different surface roughness in rabbit tibiae. *Clin. Oral Implant. Res.* **2014**, *25*, 573–579. [[CrossRef](#)]
39. Hashim, D.; Cionca, N.; Courvoisier, D.S.; Mombelli, A. A systematic review of the clinical survival of zirconia implants. *Clin. Oral Investig.* **2016**, *20*, 1403–1417. [[CrossRef](#)]
40. Roehling, S.; Schlegel, K.A.; Woelfler, H.; Gahlert, M. Performance and outcome of zirconia dental implants in clinical studies: A meta-analysis. *Clin. Oral Implant. Res.* **2018**, *16*, 135–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Henningsen, A.; Smeets, R.; Köppen, K.; Sehner, S.; Kornmann, F.; Gröbe, A.; Heiland, M.; Gerlach, T. Immediate loading of subcrestally placed dental implants in anterior and premolar sites. *J. Craniomaxillofac. Surg.* **2017**, *45*, 1898–1905. [[CrossRef](#)]
42. Henningsen, A.; Smeets, R.; Wahidi, A.; Kluwe, L.; Kornmann, F.; Heiland, M.; Gerlach, T. The feasibility of immediately loading dental implants in edentulous jaws. *J. Periodontal Implant. Sci.* **2016**, *46*, 234–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Smeets, R.; Henningsen, A.; Jung, O.; Heiland, M.; Hammächer, C.; Stein, J.M. Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis—A review. *Head Face Med.* **2014**, *10*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. Zusammenfassende Darstellung der Publikation

Die Verweise auf Abbildungen (engl.: Figures) beziehen sich auf die anhängige Originalpublikation.

1. Einleitung

Zu Beginn der Implantation im dentalen Bereich war das primäre Ziel eine ausreichende Osseointegration, welche den direkten strukturellen sowie funktionellen Verbund zwischen dem menschlichen Knochen und der künstlichen Implantatoberfläche beschreibt. Sie ist ein Schlüsselfaktor für den langfristigen Erfolg und das Überleben von Zahnimplantaten (Brånemark et al. 1977). Die physikalischen, topographischen und chemischen Oberflächeneigenschaften von Implantaten bestimmen ihre Fähigkeit zur Osseointegration. Eine optimale Oberflächenstruktur der Implantate ist bislang unbekannt, so dass chemische Oberflächenveränderungen und Anpassungen der Topographie im Nanometerbereich Gegenstand der aktuellen Forschung sind (Smeets et al. 2016).

Aktuell gilt Titan mit einer mikrorauen Oberfläche als Goldstandard für dentale Implantate. Begründet wird dies vor allem durch seine gute Gewebeverträglichkeit, Korrosionsfestigkeit und bewährte Knochenintegration (Buser et al. 2012). In der Klinik sowie der Wissenschaft kommt immer wieder der Wunsch nach zahnfarbenen, ästhetisch natürlich erscheinenden Materialien zum Ersatz der Zahnwurzeln auf. Bereits 1968 wurden daher Implantate aus keramische Materialien wie Aluminiumoxid von Sandhaus entwickelt (Sandhaus et al. 1968). Das weißliche Zirkoniumdioxid als Oxid des biegsamen, silbrig glänzenden Metalls wird aus Zirkonsand hergestellt. Die Zunahme des Volumens bei reinem Zirkoniumdioxid bei den Umwandlungsschritten, während des Herstellungsprozesses, zieht unerwünschte Risse durch Spannungsbildungen nach sich, so dass Stabilisierungsoxide hinzugefügt werden müssen. Bei den dentalen Keramiken wird hierzu Yttriumoxid (Y_2O_3) verwandt. Man spricht von den mechanisch belastbaren und rissfesten Y-ZTP-Keramiken (yttrium stabilized tetragonal zirconia polycrystals).

Bei Zirkoniumdioxid lagern sich nach der Herstellung Kohlenstoffverbindungen an der Oberfläche ab, wodurch es zu einer Hydrophobisierung des Implantats kommt. Dies sind ähnliche Vorgänge wie sie bereits für Titanoberflächen beschrieben wurden, erklärbar durch die sehr ähnlichen Kristallstrukturen von Zr- und Ti-Oxiden. Durch Kontakt mit Sauerstoff kommt es zur Anlagerung einer Oxidschicht auf der Oberfläche von Titan. Durch diese sogenannte biologische Alterung wurden abnehmende Knochen-

Implantatkontakte beobachtet (Att, Ogawa 2012). Folglich ist die Osseointegration messbar durch den Knochen-Implantat-Kontakt (BIC) auf 65 - 73% erniedrigt (Alharbi et al. 2015).

Studien haben gezeigt, dass eine Oberflächenbehandlung mit ultraviolettem (UV) Licht oder kaltem atmosphärischem Plasma (CAP) in der Lage ist, hydrophobe Schichten von Kohlenwasserstoffen und kohlenstoffhaltigen Spezies zu reduzieren und die Hydrophilisierung, Zelladhäsion und Proliferation auf Implantatoberflächen aus Titan oder Zirkonoxid zu erhöhen (Noro et al. 2013, Al Qahtani et al. 2015, Tuna et al. 2015a, Zheng et al. 2015, Altmann et al. 2013, Att et al. 2009a, Tuna et al. 2015b).

Die Modifikation der Oberfläche von Zirkoniumdioxid durch kurzwelliges UV-Licht soll einen positiven Effekt auf die Osseointegration und somit Einheilung der Implantate haben. Durch die Bestrahlung mit kurzwelligem Licht wird die Oberfläche von Implantaten durch das Aufbrechen von molekularen Verbindungen reaktiv, die Polarität wird erhöht und folglich die Bestreben, Verbindungen einzugehen, vergrößert (Ogawa 2014). Die Oberfläche wird hydrophilisiert und es kommt zu einer verbesserten Protein- und Zellanhaftung. Es konnte dargestellt werden, dass es bei der UV-Bestrahlung zu keiner Änderung der Kristallstruktur von Zirkoniumoxid kommt und daher die Materialfestigkeit unverändert bleibt (Roy et al. 2016).

Durch die Energiezufuhr bei einer Behandlung mit Plasma werden Elektronen aus den Atomen herausgelöst und es entstehen geladene Teilchen (negativ geladene Elektronen und positiv geladene Ionen) (Diener Electronic GmbH & Co KG 2008). Durch die erhöhte Reaktivität des Gases wird das Zellattachment und die Viabilität von marinen Osteoblasten erhöht und so die Oberflächeneigenschaft durch diese Plasmaaktivierung verändert.

2. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von UV-Licht und Kaltplasma auf die Osseointegration von Zirkoniumdioxidimplantaten im Tiermodell (in vivo). Dieser wird anhand des Knochen-Implantatkontaktes (BIC, Bone Implant Contact) und des prozentualen Anteils an Knochenfläche an der Fläche einer Einheilkammer beziehungsweise rezeptiven Fläche des Implantats (BAFO, Bone Area Fraction Occupancy) gemessen und in Abhängigkeit der Einheilintervalle von 2, 4 und 9 Wochen nach Insertion der Zirkoniumdioxidimplantate in die Kalotte von Hausschweinen betrachtet.

Des Weiteren liegt das Interesse darin eventuelle Unterschiede zwischen den Funktionalisierungsverfahren der Implantatoberflächen in Hinsicht auf die Auswirkung auf die Knochenapposition herauszuarbeiten.

3. Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Zirkoniumdioxidimplantate (n=54) werden unbehandelt (Kontrolle, K) oder mit UV-Licht (UV) oder Kaltplasma (CAP) bestrahlt in die Schädelkalotte von 6 Landschweinen implantiert. Nach 2 Wochen Akklimatisierung bei Unterbringung der sechs Landschweine in die Tierversuchshaltung des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf erfolgte die Einbringung von neun Implantaten in die Kalotte jedes Tieres.

3.2 Implantate

In die Landschweine wurden einteilige whiteSKY Zirkoniumdioxidimplantate der Firma Bredent (bredent GmbH & Co. KG, Senden, Deutschland) mit der Länge 8 mm und dem Durchmesser von 4 mm inseriert (Figure 1). Es handelt sich hierbei um ein einteiliges, konisches, yttrium-stabilisiertes Zirkoniumdioxid-Schraubenimplantat.

3.3 Oberflächenfunktionalisierung

3.3.1 UV-Fotofunktionalisierung

Direkt vor der Insertion der Implantate (n=18) wurden diese, außerhalb ihrer sterilen Verpackung, in einen UV-Lichtofen (TheraBeam® Super Osseo, Ushio Inc., Tokio, Japan) für 12 Minuten mit einer Intensität zwischen 0.05 mW/cm² ($\lambda=360$ nm) und 2 mW/cm² ($\lambda=250$ nm) vorbehandelt.

3.3.2 Plasmaaktivierung

Nach Entnahme der Implantate (n=18) aus der sterilen Schutzhülle wurden diese unmittelbar vor der Insertion für 12 Minuten in einem Plasmaofen (Yocto III, Diener Electronic GmbH, Jettingen, Deutschland) mittels Kaltplasma mit Argongas unter 24 W und -0,5 mbar vorbehandelt. Während dieser Zeit erfolgte wie nach der UV-Licht-Bestrahlung die Implantatbettauflbereitung und anschließend die Insertion der Implantate (Figure 2).

Die Protokolle sind etabliert und wurden in mehreren früheren Studien verwendet (Henningsen et al. 2018a, Henningsen et al. 2018b, Smeets et al 2019).

3.4 Tierversuch

Die Durchführung der Versuche mit der Implantation von Zirkoniumdioxidimplantate in die Schädelkalotte von sechs Hausschweinen erfolgte von Juni 2019 bis August 2019 in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Eppendorf gemäß den tierärztlichen Richtlinien. Dieser Tierversuch wurde bei der Freien und Hansestadt Hamburg - Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz - beantragt und genehmigt (Genehmigungsnummer 040/2018).

Die Stichprobengröße (sechs Tiere, neun Implantate pro Tier und drei verschiedene Zeitpunkte) wurde mit einer Potenz von 0,89 unter Verwendung einer biologisch relevanten Differenz von 15 % und einer Effektgröße von 1,22 (Cohen's f) berechnet. Es wurde ein frontales Schädeldachmodell verwendet, da es ermöglicht, bis zu 9 Implantate mit nur einem chirurgischen Zugang in kurzer Zeit zu platzieren, um die Belastung der Tiere zu reduzieren.

Für die Implantatinsertion wurde eine Allgemeinanästhesie mit 10 mg/kg Ketamin (HVW Bremer Pharma, Warburg, Deutschland) und 4 mg/kg Azaperon (Jansen, Bad Homburg, Deutschland) durch die Tierärzte der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Eppendorf durchgeführt und überwacht. Nach Lagerung der Tiere in Bauchlage und lokaler Desinfektion (Betasadona, Braun, Melsungen, Deutschland) wurde nach örtlicher Infiltrationsanästhesie mit UDS forte (Hoechst GmbH, Frankfurt, Deutschland) über einen 10 cm langen vertikalen Schnitt der vordere Schädelknochen freigelegt. Die Implantate wurden primärstabil mit einem Eindrehmoment von 45 N/cm inseriert. Schließlich wurden die Wunden mehrschichtig mit Vicryl 2-0 (Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen und die Tiere erhielten zur Analgesie 4 mg/kg Rimadyl (Zoetis, Berlin, Deutschland) intravenös. Die Euthanasie wurde durch die intravenöse Gabe von 0,12 ml/kg Körpergewicht T-61 (Embutramid/ Mebezonium/ Tetracian) (MSD, Kenilworth, USA) nach Sedierung mit 10 mg/kg Ketamin, 10mg/kg Stresnil und 2 mg/kg Midazolam vollzogen. Anschließend wurde durch die bereits vorhandene Schnittführung der entsprechende Teil der Kalotte entnommen.

3.5 Aufarbeitung zur histomorphometrischen Untersuchung und Auswertung

Das Institut für Osteologie und Biomechanik des Universitätsklinikum Eppendorf stellte die Präparate mittels Trenn-Dünnschliff-Technik nach Donath her und färbte die Schliffe anschließend für die histologische Untersuchung.

Zunächst wurden die neun Implantate einer Schweinekalotte mit jeweils umliegendem Knochengewebe ausgesägt, so dass neun Blöcke (circa 15 x 15 x 8mm) resultierten (Diamantbandsäge EXAKT 310 CP mit Diamanttrennband 0,3 mm D64, Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland). Diese Präparate wurden daraufhin dem konventionellen Röntgen (Faxitron X-ray, Faxitron Xray Corp., Wheeling Illinois, USA) zugeführt. Es erfolgte die Entwässerung und folgend die Kunststoffinfiltration mit dem lichthärtenden Einkomponentenkunststoff Technovit 7200 VLC (Heraeus-Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, Deutschland). Der nächste Schritt beinhaltet die zweiphasige Lichtpolymerisation (zwischen 400 und 500 nm Wellenlänge) der Präparate im EXAKT Polymerisationsgerät 520 (Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland). Im Anschluss wurden die Proben nach Ausbettung aus den Schalen zunächst mit dem Handschleifgerät (Phoenix alpha Grinder/ Polishers, Buehler, Düsseldorf, Deutschland) vorgetrimmt und daraufhin mit dem Mikroschleifsystem (EXAKT400 CS Tellerschleifgerät, Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) und mit Nassschleifpapier (Körnung P500 von Hermes Abrasives Ltd., Virginia Beach, Virginia, USA) planparallel geschliffen. Nach Abtrennung von 300µm dicken planparallelen Probenblöcke wurden diese mit dem Mikroschleifsystem auf 80-100µm Dicke verdünnt und poliert (Körnung 1200/ 2500/ 4000 SiliconCarbide Papier, Allied High Tech Products Inc., Rancho Dominguez, California, USA). Die Toluidinblau-Färbung (durch 30-minütige Inkubation der Dünnschliffe in der Toluidinblaufärbelösung bei 60 Grad Celsius) führt zu blauvioletten, metachromatischen Farbeffekten, wobei verkalkte Knorpelmatrix dunkelblau eingefärbt wird und mineralisierte Hartgewebematrix blassblau erscheint. Das Weichgewebe färbt sich in Blautönen, während Mastzellgranula rötlich-lila erscheint. Zur histologischen Auswertung der Dünnschliffpräparate wurde ein Lichtmikroskop (Axio Scope A1, Carl Zeiss AG Oberkochen, Deutschland) mit einer Mikroskopkamera (Olympus DP 72, Tokio, Japan) verwendet. Für die Betrachtung und Analyse wurde eine 5-fache Vergrößerung eingesetzt und zur Auswertung eine Vermessungssoftware (OsteoMeasure XP 3.2.1.1., Osteometrics, Atlanta, USA) benutzt.

Zur Festlegung des BIC wurde zunächst die gesamte mit ausreichend Knochen umgebene Implantatoberfläche umfahren. Im zweiten Schritt wurde der Abschnitt des Implantats mit

direkter Anlagerung mineralisierten Knochens ohne Unterbrechung durch dazwischenliegendes Bindegewebe in Relation zur Gesamtoberfläche gesetzt. Schließlich erhält man so die prozentualen Anteile der Implantatoberfläche, die knöchern eingeheilt und somit erfolgreich osseointegriert sind (Figure 3).

Zur Bestimmung der BAFO wurde zunächst die gesamte Fläche zwischen den retentiven Teilen eines Implantats ermittelt. Daraufhin wurden alle knöchernen Anteile in dieser sogenannten Einheilkammer markiert und so die Knochenfläche durch die Vermessungssoftware errechnet. Durch Angabe der prozentuale Knochenfläche (mm²) in Relation zur Gesamtfläche, ausgedrückt als Prozentsatz der Gesamtfläche (mm²), erhält man die BAFO (Figure 4) (Leonard et al. 2009).

Implantate mit BIC-Werten unter 20 wurden als Versagen gewertet und aus der Bewertung herausgenommen.

3.6 Statistische Analyse

Die Inter-Observer-Reliabilität wurde mit einem Intraklassen-Korrelationskoeffizienten für Konsistenz und absolute Übereinstimmung der Daten in einem gemischten Zwei-Wege-Modell bewertet. Ein verallgemeinertes lineares gemischtes Modell (GLMM) wurde für die statistische Analyse unter Verwendung von SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) verwendet. Die Oberflächenbehandlung und die Einheilzeit wurden als feste Effekte im gemischten Modell modelliert. Die individuellen Merkmale der Schweine wurden als Zufallseffekte unter Verwendung einer zusammengesetzten Symmetrie-Kovarianz-Struktur übernommen. Der abschließende Gruppenvergleich basierte auf Least-Square-Means-Schätzern, die mit den jeweiligen Parameterschätzern konstruiert wurden. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Makroskopische und radiologische Auswertung

Post mortem zeigten sich makroskopisch alle Kalotten mit intakten Oberflächen, ohne sichtbare Anzeichen einer Infektion und ohne erkennbare Osteolysen (Figure 7). Der Kalottenknochen war an einem Implantat (Tier 5, Implantatnummer 9 (UV-bestrahltes Implantat, 9 Wochen Einheilzeit)) nicht vorhanden. Alle restlichen vorhandenen Implantate waren makroskopisch suffizient im Knochen inseriert. 74 % (n = 39) der Implantate wurden aufgrund der begrenzten vertikalen Knochenmenge bei den Schweinen versehentlich

teilweise in die Nebenhöhle eingesetzt. Alle Implantate waren jedoch apikal von Schleimhaut bedeckt, ohne Anzeichen von Heilungsstörungen. Nach einer Einheilzeit von neun Wochen waren vier Implantate koronal mit Knochen überwachsen (zwei unbehandelte Implantate und zwei mit UV-Licht behandelte Implantate).

4.2 Mikroskopische (histologische) Auswertung

Die BIC-Werte lagen zwischen 21,85 % und 80,11 % (Figure 10). Die Mittelwerte nahmen in allen Gruppen nach 4 Wochen Einheilung ab, stiegen aber nach 9 Wochen Einheilung bei der Kontrollgruppe und der UV-Lichtgruppe wieder an. Die BIC-Werte der mit CAP behandelten Implantate fielen im zeitlichen Verlauf dezent ab. Die höchsten BIC-Werte wurden in der UV-Licht bestrahlten Gruppe (60,01% nach 2 Wochen Einheilung) erreicht (Table 1).

Im Allgemeinen lagen die mittleren BAFO-Werte zwischen 37,16 % nach zwei Wochen Einheilung und 59,7 % nach neun Wochen Einheilung (Figure 11). Im Gegensatz zu den BIC-Werten sanken die Mittelwerte nach 4 Wochen Einheilung im Vergleich zu 2 Wochen in der Kontrollgruppe und der Plasma-Gruppe nicht ab, sondern stiegen kontinuierlich bis nach 9 Wochen Einheilung an. Die höchsten BAFO-Werte wurden jedoch in der UV-Licht-Gruppe erreicht (60,95 % nach zweiwöchiger Einheilung) (Table 2).

Zusammenfassend waren die Werte von BIC und BAFO in allen Gruppen nach 9 Wochen Einheilung am höchsten, was auf die Osseointegration im Laufe der Zeit hindeutet. Allerdings waren die Unterschiede bezüglich BIC- und BAFO-Werten zwischen den Gruppen oder in den verschiedenen Gruppen über die Zeit in den Gruppen statistisch nicht signifikant ($P < 0,05$) (Table 3, Table 4).

Tabelle 5 zeigt die Rate der misserfolgten Implantate pro Gruppe und Zeitraum. Nach 9 Wochen Einheilung wurden es in allen drei Gruppen deutlich weniger.

5. Diskussion

Durch die Oberflächenfunktionalisierung von Zirkonoxid mit UV-Licht oder Kaltplasma wird eine Hydrophilie erzeugt und so eine verbesserte Osteoplastenadhäsion erreicht (Att, Ogawa 2012). In einigen Studien wurde dieser Effekt durch UV-Licht und Kaltplasma auf die Implantatoberfläche bereits beschrieben (Al Qahtani et al. 2015, Ogawa 2014, Henningsen et al. 2018a, Henningsen et al. 2018b, Smeets et al. 2019, Canullo et al. 2016, Watanabe et al. 2012, Gittens et al. 2014, Lang et al. 2011, Flanagan et al. 2016). In

dieser Studie scheint initial (zwei Wochen Einheilung) die Behandlung von Y-TZP-Zirkoniumdioxidimplantaten mit Kaltplasma und UV-Licht eine Verringerung der Osseointegration aufzuweisen, während die Plasma-Bestrahlung histomorphometrisch die Osseointegration (höhere BIC-Werte) nach vierwöchiger Einheilungsphase erhöht. Schließlich waren die Werte in der UV-Gruppe mit denen der unbehandelten Gruppe vergleichbar. Die BAFO-Werte stiegen in allen Gruppen im Zeitverlauf ohne statistisch signifikante Unterschiede an. Nach 9 Wochen Einheilung waren die BAFO-Werte unbehandelter Implantate jedoch 3,3 % höher als in der UV-Licht-Gruppe und 5,7 % höher als in der CAP-Gruppe.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden die Kalotten eines Landrassenschweins gewählt. Es ist ein etabliertes Modell zur Betrachtung der Osseointegration. Das Verhältnis zwischen trabekulärem und kortikalem Knochen lässt den Vergleich zum menschlichen Unterkieferknochen gut zu (Smeets et al. 2019, Aerssens et al. 1998). Die verwendeten Jungtiere wachsen sehr schnell, wodurch von einem hohen Knochenwachstum ausgegangen werden muss. Folglich ist anzunehmen, dass die Knochenapposition weitaus größer als die Knochenheilung beim erwachsenen Menschen sein wird. Dies kann auch der Grund dafür sein, dass es in dieser Studie keine statistisch signifikanten Unterschiede bei BIC und BAFO zwischen behandelten und unbehandelten Implantaten gab. Die Behandlung mit UV-Licht und Kaltplasma war bei dieser Studie lediglich 12 Minuten. Es bleibt unklar, ob eine längere Bestrahlung von Zirkonoxid eine bessere Wirkung erzeugt. In Studien konnte eine höhere Hydrophobie und bessere Osseointegration nach längerer Zeit gezeigt werden (Canullo et al. 2013, Aita et al. 2009). Insbesondere nach 2 Wochen Osseointegration der Implantate wurden hohe Standardabweichungswerte ermittelt. Ein Grund kann sein, dass sich der Prozess der Osseointegration von den anfänglichen Osseointegrationsprozessen von Titanimplantaten unterscheidet. Einige Studien beschrieben sogar verringerte BIC-Werte beim Vergleich der Osseointegration von Titan- und Zirkonoxidimplantaten (Bosshardt et al. 2017, Chappuis et al. 2016).

Eine bereits durchgeführte Studie untersuchte den Einfluss von Photofunktionalisierung und nichtthermischem Plasma auf die Oberflächenstruktur, Zelladhäsion und Zytokompatibilität von Zirkonoxid in vitro (Smeets et al. 2019). Beide Oberflächenbehandlungen reduzierten die Menge an organischem Material auf Zirkoniumoxid erheblich. Es ergab sich eine Zunahme der Hydrophilie und damit verbesserte Bedingungen für Osteoblasten. Darüber hinaus führte die Funktionalisierung mit Kaltplasma im Vergleich zu UV-Licht zu einer höheren Zellproliferation und

Zellanhaftung. In der vorliegenden in vivo-Studie verbesserte die Plasmabehandlung die BIC-Werte nach einer vierwöchigen Heilungsphase nicht signifikant. Auch nach 9 Wochen Einheilzeit ergab sich für die CAP-Behandlung auf Zirkonoxid kein Vorteil hinsichtlich der Kontaktwerte zwischen Knochen und Implantat (BIC). Es ist möglich, dass die Oberfläche der verwendeten Zirkonoxid-Implantate (white SKY, Bredent GmbH & Co. KG) im Vergleich zu anderen Zirkonoxid-Implantaten so verbessert ist, dass die Auswirkungen von CAP oder UV-Licht reduziert werden. Eine andere Erklärung könnte sein, dass die Zeit der Implantatinsertion seit der Herstellung zu kurz war, um die Oberflächen der Implantate mit Kohlenstoffverbindungen zu sättigen.

Mehrere in vivo-Studien zeigten jedoch positive Effekte nach der Verwendung von UV-Licht auf die Osseointegration von Zirkonoxidimplantaten. Brezavscek et al. behandelte glatte und raue Zirkonoxidscheiben und zylindrische Implantate über 15 Minuten lang mit UV-Licht und inserierte sie in Rattenfemuren. Nach 2 und nach 4 Wochen hatte sich der Anteil an Knochen-Implantat-Kontakten um das 3- bis 7-fache (glatte Flächen) und 1,4- bis 1,7-fache (raue Flächen) erhöht im Vergleich zu unbehandelten Scheiben und Implantaten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich die Bildung der Knochen-Implantat-Kontakte beschleunigte und der Verbund deutlich stärker war (Brezavšček et al. 2016). Im Vergleich zu der vorliegenden Studie war die Bestrahlungszeit mit 15 Minuten etwas länger. Die Emission von UV-Licht als spektrale Mischung bei $\lambda = 360$ nm und $\lambda = 250$ nm war mit der unserer Untersuchung vergleichbar.

Auch Tuna et al. untersuchten die Wirkung von UV-Licht auf glatte und aufgeraute Oberflächen aus Zirkonoxid auf die Reaktion des menschlichen Alveolarknochens und deren Osteoblasten. Es wurde eine 15-W-Bakterizidlampe benutzt und die Zirkonoxidscheiben für 48 h mit einem gemischten Spektrum zwischen $\lambda = 360$ nm und $\lambda = 250$ nm bestrahlt. Bereits nach 24 h zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl von Osteoblasten auf den UV-Licht behandelten Oberflächen. Nach 3 Wochen zeigte sich signifikant mehr mineralisierter Knochen an den UV-behandelten Zirkonoxidflächen als an den unbehandelten Flächen. Es konnte darauf geschlossen werden, dass die UV-Licht-Vorbehandlung die Zirkonoxidoberflächen von hydrophob zu hydrophil transformiert. Dadurch kam es zu einer schnelleren Heilung und einem höheren BIC-Wert (Tuna et al. 2015a).

Auch über eine verbesserte Zellreaktion auf Zirkonoxidoberflächen nach verschiedenen Plasmabehandlungen wurde bereits berichtet. Zheng et al. zeigten eine erhöhte Zelldichte nach nichtthermischer Plasmabehandlung mit Helium als Trägergas (Zheng et al. 2015). Hierzu wurden Zirkonoxidscheiben für 30, 60 oder 90 s mit Helium-Atmosphärendruck

behandelt und die Biokompatibilität mit menschlichen Gingivafibroblasten untersucht. Nach 60 s Behandlung nahm die Fibroblastendichte auf den Scheiben zu. Nach 30 s und 60 s war die Expression von anhaftungsbezogenen Genen signifikant höher. Nach einer Kultivierungszeit von 90 s nahm die Expression der Integrine wieder ab. Es wird angenommen, dass Helium-Atmosphärendruck einen frühen und kurzen Effekt auf die Zirkonoxidscheiben hat. Es wurde ein verbessertes Zellverhalten und eine mögliche verbesserte Verbindung zwischen Zirkonoxid und Knochengewebe beschrieben. In unseren Untersuchungen stellte sich keine signifikante Verbesserung bei den BIC- und BAFO-Werten dar.

Watanabe et al. zeigten, dass Säureätzungen, nicht-thermische Plasma- und UV-Lichtbehandlungen Zirkonoxidoberflächen hydrophil macht und die Adhäsion osteoblastenähnlicher Zellen verbessert. Die Autoren verwendeten tetragonale Zirkoniumdioxidscheiben, die sandgestrahlt und mit Flusssäure geätzt wurden. Es entstanden aufgeraute Zirkonoxid-Oberflächen. Ein Teil der Proben wurde einen Tag in destilliertem Wasser gelagert, ein zweiter Teil wurde 10 Minuten mit Sauerstoffplasma behandelt und ein dritter Teil wurde 2 Stunden mit UV-Licht (mit einer Wellenlänge zwischen 185 und 365 nm) bestrahlt (Watanabe et al. 2012). Die Ergebnisse zeigten, dass die Zellhaftung verbessert werden konnte. Jedoch wurden im Vergleich zu unseren Untersuchungen die Zirkonoxidscheiben mit 2 Stunden deutlich länger behandelt. Dies ist möglicherweise ein Grund dafür, dass sich in unserer Studie keine signifikanten Unterschiede in der histomorphometrischen Analyse zeigten.

In einer anderen Studie erhöhte eine 10 Sekunden lange Behandlung mit Kaltplasma die mikrotensile Bindungsstärke von Zirkonoxid in vitro (Valverde et al. 2013). Zur Messung dieser mikrotensilen Bindungsstärke (MTBS-Test) wurden die Zirkonoxidscheiben mit 1 mm/min unter 100 N bis zum Versagen belastet, die Querschnittsflächen dieser Proben danach vermessen und so die MTBS-Werte in MPa berechnet. In dieser Studie wurde die Haftfestigkeit von Y-TZP, die an gehärtete Verbundscheiben gebunden wurden, nach folgenden Oberflächenkonditionierungen untersucht: Sandstrahlung, Clearfil-Keramikprimer, Sandstrahlung und Clearfil-Keramikprimer. Die MTBS-Werte zeigten einen deutlichen Anstieg.

Shon et al. inserierte PIM (Powder Injection Molded) Zirkonoxidimplantate in die Tibiae von 25 Kaninchen und konnten zeigen, dass die Behandlung mit Heliumplasma zu einer signifikanten Steigerung der BIC-Werte führte (Shon et al. 2014). Es gab eine Gruppe mit PIM-Zirkonoxid-Implantaten, mit aufgerauten PIM-Zirkonoxid-Implantaten, mit plasmabehandelten PIM-Zirkonoxid-Implantaten und mit plasmabehandelten aufgerauten

PIM-Zirkonoxid-Implantaten. Es wurde der statische Kontaktwinkel der Implantattypen bewertet, durch Messung mit einem Kontaktwinkelanalysator in der Sessile-Drop-Technik. Die plasmabehandelten Implantate hatten einen Kontaktwinkel von weniger als 1° . Das deutet auf eine Superhydrophilie hin. Ein Entfernungsdrehmomenttest wurde durchgeführt. Dieser wurde durch die Oberflächenrauigkeit beeinflusst, aber nicht durch die Plasmabehandlung. Andererseits zeigten die plasmabehandelten Implantate einen signifikant höhere BIC als die unbehandelten Implantate. Ergebnis war, dass die Plasmabehandlung die Hydrophilie deutlich zu erhöhen scheint. Die Oberfläche der Implantate blieb jedoch unverändert. Verglichen dazu war der BIC-Wert der plasmabehandelten Implantate unserer Studie nach 4 Wochen genauso hoch wie der der unbehandelten Implantate. Nach einem Einheilungsintervall von 4 Wochen zeigte sich bei uns keine verbesserte Osseointegration. Auch die Messungen der Anteile retentiven Knochens (BAFO bzw. BV/TV) zeigten bei uns im Gegensatz zu den Ergebnissen von Shon et al. keine signifikanten Unterschiede.

Hashim et al. führte 2019 ein systematisches Review mit 14 Artikeln durch und berichtet zusammenfassend von einer Gesamtüberlebensrate von 92% bei ein- und zweiteiligen Zirkonoxidimplantaten nach einem Jahr (Hashim et al. 2016). Roehling et al. beschrieben die 1- und 2-Jahres-Überlebensraten sogar mit 98,3% beziehungsweise 97,2% nach einem Screening von insgesamt 18 Studien (Roehling et al. 2018). In der vorliegenden Studie lag der BIC-Wert von insgesamt 12 Implantaten unter 20. Die Gesamtüberlebensrate war mit 78% (jedoch nach 9 Wochen) deutlich niedriger. Es konnte gesehen werden, dass die Versagensrate im zeitlichen Verlauf abnahm und nach 9 Wochen nur noch 2 statt 5 Implantate nicht osseointegriert waren. Folglich ist anzunehmen, dass Zirkonoxid eine längere Einheilzeit benötigt.

6. Fazit

Der Implantatverlust wird höchstwahrscheinlich durch eine gestörte Osseointegration in der Frühphase oder durch eine Veränderung des Kontakts zwischen Implantat und Knochengewebe verursacht, die hauptsächlich durch entzündliche Reaktionen an der Knochen-Implantat-Grenzfläche verursacht wird (Henningsen et al. 2017, Henningsen et al. 2016, Smeets et al. 2014). Daher ist es wichtig, Methoden für eine schnellere und sicherere Osseointegration von Implantaten zu finden. UV-Licht und Kaltplasma sind Methoden, um die Adhäsion von osteogenen Zellen auf Zirkonoxid-Implantatoberflächen

zu verbessern und die Osseointegrationsgeschwindigkeit zu erhöhen. Beide Methoden sind gut am Patienten in der Praxis in einer kurzen und klinisch praktikablen Zeit durchzuführen.

Diese Studie zeigte, dass die Oberflächenfunktionalisierung mit Kaltplasma die Osseointegration nach einer vierwöchigen Heilungsphase steigern kann. Ein positiver Effekt auf die Osseointegration in der kritischen Frühphase der Knochenheilung könnte möglich sein. Es sind jedoch kontrollierte klinische Studien erforderlich, um die festgestellten Wirkungen insbesondere bei diesen Patienten zu untersuchen.

3. Literaturverzeichnis

Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J (1998) Interspecies differences in bone composition, density, and quality: Potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology*. 139:663–670.

Aita H, Hohri N, Takeuchi M, Suzuki T, Yamada M, Anpo M, Ogawa T (2009) The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials*. 30:1015–1025.

Al Qahtani MS, Wu Y, Spintzyk S, Krieg P, Killing A, Schweizer E, Stephana I, Scheidelera L, Geis-Gerstorfer J, Ruppä F (2015) UV-A and UV-C light induced hydrophilization of dental implants. *Dent Mater*. 31:157–167.

Alharbi HM, Babay N, Alzoman H, Basudan S, Anil S, Jansen JA (2015) Bone morphology changes around two types of bone-level implants installed in fresh extraction sockets—A histomorphometric study in Beagle dogs. *Clin. Oral Implant. Res*. 26:1106–1112.

Altmann B, Kohl RJ, Steinberg T, Tomakidi P, Bachle-Haas M, Wennerberg A, Att W (2013) Distinct cell functions of osteoblasts on UV-functionalized titanium- and zirconia-based implant materials are modulated by surface topography. *Tissue Eng. Part C Methods*. 19:850–863.

Att W, Hori N, Iwasa F, Yamada M, Ueno T, Ogawa T (2009) The effect of UV-photofunctionalization on the time-related bioactivity of titanium and chromium-cobalt alloys. *Biomaterials*. 30(26):4268-76.

Att W, Ogawa T (2012) Biological aging of implant surfaces and their restoration with ultraviolet light treatment: A novel understanding of osseointegration. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant*. 27:753–761.

Att W, Takeuchi M, Suzuki T, Kubo K, Anno M, Ogawa T (2009) Enhanced osteoblast function on ultraviolet light-treated zirconia. *Biomaterials*. 30:1273–1280.

Bosshardt DD, Chappuis V, Buser D (2017) Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: Current knowledge and open questions. *Periodontology* 2000. 73:22–40.

Buser D, Janner SF, Wittneben JG, Brägger U, Ramseier CA, Salvi GE (2012) 10-year survival and success rates of 511 titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a retrospective study in 303 partially edentulous patients. *Clin Implant Dent Relat Res*. 14(6):839-51.

Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, Ohman A (1977) Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Suppl*. 16:1–132.

Brezavšček M, Fawzy A, Bächle M, Tuna T, Fischer J, Att W (2016) The Effect of UV Treatment on the Osteoconductive Capacity of Zirconia-Based Materials. *Materials*. 9:958.

- Canullo L, Genova T, Tallarico M, Gautier G, Mussano F, Botticelli D (2016) Plasma of argon affects the earliest biological response of different implant surfaces: An in vitro comparative study. *J. Dent. Res.* 95:566–573.
- Chappuis V, Cavusoglu Y, Gruber R, Kuchler U, Buser D, Bosshardt DD (2016) Osseointegration of zirconia in the presence of multinucleated giant cells. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* 18:686–698.
- Diener Electronic GmbH & Co KG (2008). *Plasmatechnik*, Aufl.2: 7-15.
- Flanagan D (2016) Photofunctionalization of Dental Implants. *J. Oral Implantol.* 42:445–450.
- Gittens RA, Scheideler L, Rupp F, Hyzy SL, Geis-Gerstorfer J, Schwartz Z, Boyan BD (2014) A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. *Acta Biomater.* 10:2907–2918.
- Hashim D, Cionca N, Courvoisier DS, Mombelli A (2016) A systematic review of the clinical survival of zirconia implants. *Clin. Oral Investig.* 20:1403–1417.
- Henningsen A, Smeets R, Hartjen P, Heinrich O, Heuberger R, Heiland M, Precht C, Cacaci C (2018) Photofunctionalization and non-thermal plasma activation of titanium surfaces. *Clin. Oral Investig.* 22:1045–1054.
- Henningsen A, Smeets R, Heuberger R, Jung OT, Hanken H, Heiland M, Cacaci C, Precht C (2018) Changes in surface characteristics of titanium and zirconia after surface treatment with ultraviolet light or non-thermal plasma. *Eur. J. Oral Sci.* 126(2):126–134.
- Henningsen A, Smeets R, Köppen K, Sehner S, Kornmann F, Gröbe A, Heiland M, Gerlach T (2017) Immediate loading of subcrestally placed dental implants in anterior and premolar sites. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 45:1898–1905.
- Henningsen A, Smeets R, Wahidi A, Kluwe L, Kornmann F, Heiland M, Gerlach T (2016) The feasibility of immediately loading dental implants in edentulous jaws. *J. Periodontal Implant. Sci.* 46:234–243.
- Lang NP, Salvi GE, Huynh-Ba G, Ivanovski S, Donos N, Bosshardt DD (2011) Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clin. Oral Implant. Res.* 22:349–356.
- Leonard G, Coelho P, Polyzois I, Stassen L, Claffey N (2009) A study of the bone healing kinetics of plateau versus screw root design titanium dental implants. *Clin. Oral Implant. Res.* 20:232–239.
- Noro A, Kaneko M, Murata I, Yoshinari M (2013) Influence of surface topography and surface physicochemistry on wettability of zirconia (tetragonal zirconia polycrystal). *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 101:355–363.
- Ogawa T (2014) Ultraviolet photofunctionalization of titanium implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* 29:95–102.

Roehling S, Schlegel KA, Woelfler H, Gahlert M (2018) Performance and outcome of zirconia dental implants in clinical studies: A meta-analysis. *Clin. Oral Implant. Res.* 16:135–153.

Roy M, Pompella A, Kubacki J, Szade J, Roy RA, Hedzelek W (2016) Photofunctionalization of Titanium: An Alternative Explanation of Its Chemical-Physical Mechanism. *PLoS One.* 11(6):e0157481.

Sandhaus S (1968) Technic and instrumentation of the implant C.B.S. (Cristalline Bone Screw) *Inf. Odonto-Stomatol.* 4:19–24.

Shon WJ, Chung SH, Kim HK, Han GJ, Cho BH, Park YS (2014) Peri-implant bone formation of non-thermal atmospheric pressure plasma-treated zirconia implants with different surface roughness in rabbit tibiae. *Clin. Oral Implant. Res.* 25:573–579.

Smeets R, Henningsen A, Heuberger R, Hanisch O, Schwarz F, Precht C (2019) Influence of UV Irradiation and Cold Atmospheric Pressure Plasma on Zirconia Surfaces: An In Vitro Study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* 34:329–336.

Smeets R, Henningsen A, Jung O, Heiland M, Hammächer C, Stein JM (2014) Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis—A review. *Head Face Med.* 10:1–13.

Smeets R, Stadlinger B, Schwarz F, Beck-Broichsitter B, Jung O, Precht C, Kloss F, Gröbe A, Heiland M, Ebker T (2016) Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration. *BioMed Res. Int.* 6285620.

Tuna T, Wein M, Altmann B, Steinberg T, Fischer J, Att W (2015) Effect of ultraviolet photofunctionalisation on the cell attractiveness of zirconia implant materials. *Eur. Cell. Mater.* 29:82–94.

Tuna T, Wein M, Swain M, Fischer J, Att W (2015) Influence of ultraviolet photofunctionalization on the surface characteristics of zirconia-based dental implant materials. *Dent. Mater. Off. Publ. Acad. Dent. Mater.* 31:14–24.

Valverde GB, Coelho PG, Janal MN, Lorenzoni FC, Carvalho RM, Thompson VP, Weltemann KD, Silva NR (2013) Surface characterisation and bonding of Y-TZP following non-thermal plasma treatment. *J. Dent.* 41:51–59.

Watanabe H, Saito K, Kokubun K, Sasaki H, Yoshinari M (2012) Change in surface properties of zirconia and initial attachment of osteoblast like cells with hydrophilic treatment. *Dent. Mater. J.* 31:806–814.

Zheng M, Yang Y, Liu XQ, Liu MY, Zhang XF, Wang X, Li H-P, Tan J-G (2015) Enhanced Biological Behavior of In Vitro Human Gingival Fibroblasts on Cold Plasma-Treated Zirconia. *PLoS ONE.* 10:0140278.

4. Zusammenfassung

Die Osseointegration ist der entscheidende Parameter für die Einheilung und das langfristige Überleben eines Zahnimplantats. Der Einfluss von UV-Licht und kaltem Plasma auf die Osseointegration von Yttriumoxid-stabilisierten Zirkonoxidimplantaten (Y-TZP) im Vergleich der beiden Methoden ist unklar. Ziel dieser Studie ist es daher, diesen Einfluss im Tiermodell zu zeigen.

Insgesamt 54 Y-TZP Zirkondioxid-Implantate (whiteSKY, Bredent, Senden) werden nach dem Zufallsprinzip in drei Gruppen eingeteilt und entweder fabrikneu und unbehandelt (nativ), mit UV-Licht (UV) für 12 Minuten oder mit kaltem Sauerstoffplasma (Plasma) behandelt) bestrahlt. Die Implantate wurden dann unter Vollnarkose in die Kalotten von insgesamt 6 Hausschweinen inseriert. Die Tiere werden nach einem Einheilungsintervall von 2, 4 und 9 Wochen euthanasiert (9 Implantate pro Tier, 2 Tiere pro Heilungsintervall). Der Grad der Osseointegration wird mittels der histomorphometrischen Bestimmung der Knochen-Implantat-Kontaktwerte (BIC) und der Knochen-Implantat-Kontaktwerte innerhalb der retentiven Anteile der Implantate (BAFO) bestimmt. Beide Verfahren werden auf signifikante Unterschiede hinsichtlich der Verbesserung der Osseointegration untersucht.

Die höchsten BIC-Werte wurden in der Kontrollgruppe nach 2 Wochen Einheilung erreicht (48,03 %). Nach 4 Wochen fiel der BIC-Wert in allen Gruppen. Allerdings kam es nach 9 Wochen Einheilung bei der Kontroll- und der UV-Lichtgruppe wieder zu einem Anstieg der BIC-Werte. Der BAFO stieg über die Zeit in der Kontrollgruppe (48,91 % auf 59,7 %) sowie in der Plasma-Gruppe (37,16 % auf 54,65 %). Die Unterschiede zwischen den Gruppen und im Laufe der Zeit waren statistisch nicht signifikant ($P < 0,05$). Zusammenfassend waren die Werte von BIC und BAFO (mit Ausnahme von BIC in der Kontrollgruppe) nach 9 Wochen Einheilung am höchsten, was auf eine Osseointegration im Laufe der Zeit hinweist.

Anfänglich (zwei Wochen Einheilzeit) scheint die Behandlung von Y-TZP-Zirkonoxidimplantaten mit kaltem Plasma und UV-Licht eine Verringerung der Osseointegration zu zeigen, während die histomorphometrischen Werte zur Beurteilung der Osseointegration nach einem Zeitraum von 9 Wochen erhöht waren. Es gab jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede in den BIC- und BAFO-Werten zwischen der Kontrollgruppe und den Testgruppen und über die Zeit. Weitere Studien müssten folgen, um den Einfluss von kaltem Plasma und UV-Licht auf das Überleben von Zirkonoxid-Implantaten zu bestätigen.

5. Summary

Osseointegration is the decisive parameter in the healing and long-term survival of a dental implant. The influence of UV light and cold plasma on the osseointegration of yttria-stabilized zirconia implants (Y-TZP) in a comparison of the two methods is unclear. The aim of this study is therefore to show this influence in an animal model.

A total of 54 Y-TZP zirconium dioxide implants (whiteSKY, Bredent, Senden) are randomly divided into three groups and either brand new and untreated (native), treated with UV light (UV) for 12 minutes or with cold oxygen plasma (plasma) irradiated. The implants were then inserted into the calottes of a total of 6 domestic pigs under general anesthesia. The animals are sacrificed after a healing interval of 2, 4 and 9 weeks (9 implants per animal, 2 animals per healing interval). The degree of osseointegration is determined by means of the histomorphometric determination of bone-implant contact values (BIC) and the bone-implant contact values within the retentive parts of the implants (BAFO). Both procedures are then examined for significant differences in terms of improving osseointegration.

The highest BIC values were reached in the native group after 2 weeks of healing (48.03%). After 4 weeks, the BIC value fell in all groups. However, after 9 weeks of healing, the BIC values in the native group and UV light groups increased again. The BAFO increased over time in the native group (48.91% to 59.7%) as well as in the plasma group (37.16% to 54.65%). Differences between groups and over time were not statistically significant ($P < 0.05$). In summary, the values of BIC and BAFO (with the exception of BIC in the native group) were highest after 9 weeks of healing, which indicates osseointegration over time.

Initially (two weeks of healing), treatment of Y-TZP zirconia implants with cold plasma and UV light appears to show a reduction in osseointegration, while the histomorphometric values for assessing osseointegration were increased after a period of 9 weeks. However, there were no statistically significant differences in BIC and BAFO values between the control group and the test groups and over time. Further studies would have to follow to confirm the influence of cold plasma and UV light on the survival of zirconia implants.

6. Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

Mein Anteil an der Publikationsdissertation ergibt sich gemäß der Autorenreihenfolge der Publikation. Dabei habe ich bei der Durchführung der in vivo-Experimente maßgeblich mitgewirkt. Nach Euthanasie der Tiere und histologischer Aufbereitung der Proben habe ich die histologischen Analysen selbständig durchgeführt und unter Hilfestellung statistisch ausgewertet.

Neben der vorliegenden zusammenfassenden Dissertation habe die Publikation unter Anleitung meines Betreuers selbstständig verfasst und eingereicht.

Am 15.12.2021 wurde das Manuskript zur Veröffentlichung angenommen und am 27.12.2021 änderte sich mein Name nach Eheschließung zu Dr. Lisa Libeck.

7. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Ralf Smeets für die Bereitstellung dieses Themas und der Ermöglichung dieser Dissertation sowie der fortwährenden Unterstützung und konstanten Förderung.

Weiterhin möchte ich meinem Betreuer PD Dr. med. Dr. med. dent. Anders Henningsen für die gute Betreuung, zahlreichen Hilfen und Ratschlägen danken.

Eric Bibiza-Freiwald bin ich für die große Hilfe bei der statistischen Auswertung und Erstellung der Diagramme zu Dank verpflichtet.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für Osteologie und Biomechanik Dr. ing. Michael Hahn und Elke Leicht zum einen für die tadellose und zügige Durchführung der Probenbearbeitung für die histologische Untersuchung sowie zum anderen für die außergewöhnlich freundliche Aufnahme und engagierte Unterstützung bei meinen Auswertungen.

8. Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

9. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: