

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
Poliklinik für Parodontologie, Präventive Zahnmedizin und Zahnerhaltung

Direktor: Prof. Dr. Dr. Thomas Beikler

Einfluss von Kaltplasma, Airpolishing und HybenX auf Titanoberflächen auf das Wachstum von Fibroblasten

Dissertation

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

vorgelegt von:

Ivonne Lange
aus Hamburg

Hamburg 2021

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 07.03.2022**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Alexandre Assaf

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Petra Schmage

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Fragestellung	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Versuchsdesign.....	15
3.2	Gingivafibroblasten	18
3.3	Probekörper	21
3.4	Oberflächen-Konditionierungen.....	24
3.4.1	Kaltplasma	24
3.4.2	Airpolishing.....	25
3.4.3	HybenX	26
3.5	Versuchsdurchführung und -auswertung.....	26
4	Ergebnisse	31
4.1	Oberflächentestung	31
4.1.1	Rauigkeitstestung.....	31
4.1.2	Oberflächenbenetzbarkeit	33
4.2	Morphologische und quantitative Auswertung	34
4.2.1	Quantitative Auswertung	34
4.2.2	Fibroblastenmorphologie der Kontrollgruppen	39
4.2.3	Kaltplasma-Konditionierung vor Fibroblastenapplikation.....	45
4.2.4	Airpolishing-Konditionierung vor Fibroblastenapplikation	51
4.2.5	Airpolishing- und Kaltplasma-Konditionierung vor Fibroblastenapplikation.....	55
4.2.6	HybenX-Konditionierung vor Fibroblastenapplikation.....	59

4.2.7 HybenX-Konditionierung nach Fibroblastenapplikation.....	63
4.2.8 Kaltplasma-Konditionierung nach Fibroblastenapplikation.....	65
4.3 Statistische Auswertung.....	71
5 Diskussion	78
5.1 Methodenkritik.....	78
5.2 Ergebniskritik.....	80
6 Schlussfolgerung	86
7 Zusammenfassung.....	87
8 Summary	89
9 Literaturverzeichnis	91
10 Danksagung.....	98
11 Lebenslauf	99
12 Eidesstattliche Versicherung	100

1 Einleitung

Die Implantologie stellt heute ein zuverlässiges und vorhersagbares Verfahren zum Ersatz verloren gegangener Zähne dar. Die Entwicklung ist jedoch nicht abgeschlossen. Hierbei spielen insbesondere die Implantatoberflächen eine wichtige Rolle für die Einheilung von Knochen und Weichgewebe und zur Vermeidung inflammatorischer Prozesse am Implantat.

Circa 5 - 7 % aller primär erfolgreich osseointegrierten Implantate gehen innerhalb der ersten 10 Jahre verloren. Periimplantitis, die bis zum Implantatverlust fortschreiten kann, gilt als Hauptursache hierfür (Derks und Tomasi 2015, Chrcanovic et al. 2014, Smeets et al. 2014). Die aktuelle Forschung beschäftigt sich mit Techniken und Methoden, diese Quote zu verbessern. Hierzu wird versucht, die Heilung zu begünstigen, sowohl primär auf der Implantatoberfläche als auch sekundär, nachdem eine bakterielle Kontamination aufgrund einer Mukositis oder Periimplantitis stattgefunden hat.

Implantate bestehen vorrangig aus Titan, welches an der Oberfläche eine Oxidschicht bildet (Piattelli et al. 2003), und besitzen eine Makro- sowie Mikrostrukturierung. Die Makrostrukturen gewährleisten die primäre Stabilität bei der Implantation, während die Mikrostrukturen für die stabile knöcherne Anlagerung sorgen. Da das epitheliale Attachment sowie die bindegewebige Anheftung eher auf weniger rauen Oberflächen gelingen, befinden sich üblicherweise ein glatter Implantatbund und ein glattes Abutment an der Durchtrittsstelle (Schmage 2008, Schwarz et al. 2003). Die Oberflächenrauigkeit variiert also im Verlauf der Implantate, sodass die Bereiche für die knöcherne Anlagerung eine höhere

Rauigkeit besitzen als solche für die Anlagerung der periimplantären Mukosa.

Die Durchtrittsstelle der Implantate in die Mundhöhle, der periimplantäre Sulcus, stellt die Schwachstelle des Systems dar. Dort können Bakterien hindurchtreten und in der Folge eine Entzündung unterhalten, die wiederum die Osseointegration gefährdet (Sculean et al. 2014).

Die Weichgewebezellen – Keratinozyten und Fibroblasten – bevorzugen die Adhäsion auf relativ glatten Oberflächen. Allerdings sind sie, wenn auch langsamer, zu einer qualitativ festeren Anlagerung auf minimal strukturierten Oberflächen in der Lage, wobei sie sich funktionell differenzieren (Schmage 2008).

Die Fibroblastenadhäsion am Implantat ist zu großen Teilen durch ihre Fokalkontakte bedingt. Diese dienen nicht nur der Adhäsion der Zelle, sondern funktionieren auch als Mechanosensoren, welche Informationen über die topographischen Gegebenheiten der Oberfläche ins Zellinnere leiten (Geiger und Bershadsky 2001). Je nach Struktur der Oberfläche bilden sich die Zellen unterschiedlich aus. Sie orientieren sich zum Beispiel entlang längs gerichteter Strukturen in der Oberflächentopografie, wobei ihr Wachstum der Richtung von Vertiefungen folgt (Curtis und Wilkinson 1999, den Braber et al. 1998). Dies wird auch als „topographic guidance“ bezeichnet (Weiss 1934). Jedoch richtet sich nicht nur der Zellkörper aus, auch die Mikrofilamente ordnen sich entlang dieser Achse an (Brunette 1986, Meyle et al. 1993). Das Zytoskelett der Fibroblasten überspannt dabei die Mikrostruktur. Während die Mikrostrukturen zur Osseointegration eine durchschnittliche Rauigkeit von circa 2-3 μm besitzen, sind es nur circa 0,5 μm für die Fibroblasten. Die Adhäsion und morphologische Anpassung der Keratinozyten verhält sich ähnlich (Schmage 2008).

Neben der Rauigkeit haben die Art der Strukturierung der Implantatoberfläche (zum Beispiel durch Abstrahlen mit Korundpartikeln oder Säureätzung erzeugt) sowie die physikalischen Eigenschaften (wie die Benetzbarkeit und die chemische Reinheit der Oberfläche) Einfluss auf das Heilungsverhalten der Gewebe. Eine erhöhte Benetzbarkeit verbessert die Zelladhäsion, eine schlechte Reinigung nach der Oberflächenstrukturierung verschlechtert sie (Rompen et al. 2006, Rupp et al. 2015).

Wenn Rezessionen des periimplantären Knochens auftreten oder sich die periimplantäre Tasche vertieft, sind die mikro- und makrostrukturierten Oberflächen zum Mundmilieu exponiert. Die Rauigkeit dieser Strukturen begünstigt dann auch das Biofilm-Attachment (Teughels et al. 2006, Sanderink et al. 2008, Heitz-Mayfield et al. 2008). Automatisch werden die Oberflächenstrukturen durch die Mundhygiene oder bei professioneller Taschenreinigung verändert. Bei freiliegenden Implantatbestandteilen erscheint eine Glättung sinnvoll, weil bakterieller Biofilm von glatten, das heißt polierten oder strukturpolierten Oberflächen, leichter zu entfernen ist als von mikrorauen Oberflächen. Dadurch wird die Reinigung der Oberflächen mittels der häuslichen Mundhygiene erleichtert (Schmage 2010).

Ein Biofilm ist eine sessile mikrobielle Gemeinschaft, die in einer selbst produzierten, extrazellulären Matrix eingebettet und aneinander oder an eine Oberfläche angeheftet ist (Donlan und Costerton 2002, Wimpenny et al. 2000). Während das bakterielle Spektrum supragingivaler Biofilme zumeist von grampositiven aeroben oder fakultativ anaeroben Bakterienspezies dominiert wird, herrschen in dem subgingivalen Biofilm der periimplantären Tasche gramnegative anaerobe

Bakterienspezies vor (Nishihara und Koseki 2004, Aparna et al. 2008, Papaioannou et al. 1996).

Bei der Mukositis ist der periimplantäre Sulcus bakteriell kontaminiert und der Implantatoberfläche ein Biofilm aufgelagert. Bei der Periimplantitis kommt eine Vertiefung der periimplantären Tasche hinzu. Wünschenswert wäre, dass es im Zuge der Therapie nach Dekontamination der Oberflächen zu einer Wiederanhaftung und erneuten Heilung der Gewebe auf den Implantatoberflächen kommt (Zitzmann et al. 2006, Quirynen et al. 2002). Inwiefern das gelingen kann, ist, trotz vieler Anstrengungen in den letzten Jahren mit dem Ziel, die Therapie der Periimplantitis vorhersagbar zu gestalten, ungewiss. Die knöcherne Regeneration von periimplantären Defekten ist bislang nicht vorhersehbar. Bei allen mechanischen Prozeduren zur Reinigung des Biofilms im periimplantären Bereich wird die Titan-Oberflächenstruktur unweigerlich beeinträchtigt (Thielemann 2012). Die Oberflächenveränderung reicht vom Abtrag der Oxid-Schicht bis zur vollständigen Entfernung der Mikrostrukturen. Derartige Veränderungen können sich wiederum auf das Attachment der Hart- und Weichgewebe auswirken (Schwarz et al. 2005).

Für die mechanische Reinigung der Implantatoberflächen werden daher schonendere Verfahren als am Zahn eingesetzt. Beispielsweise haben sich Reinigungsverfahren mit rotierenden oder oszillierenden Prophylaxebürstchen, mit oszillierenden Spitzen aus PEEK-Kunststoff und das Airpolishing-System mit subgingivalem Pulver bewährt (Kahili 2012, Thielemann 2012). Beim Airpolishing wird ein Luft-Pulver-Wasserstrahl unter Druck auf die zu reinigende Oberfläche gestrahlt. In Abhängigkeit von der Arbeitsweise – speziell dem Anpressdruck und

der Dauer der Reinigung – können die Implantatoberflächen trotzdem beschädigt werden (Sollich 2015). Beim subgingivalen Airpolishing darf, anstelle von ausschließlich supragingival indiziertem Bikarbonat-Pulver, nur resorbierbares, feinkörniges Pulver aus Glycin oder Aminosäuren mit subgingivaler Indikation verwendet werden, um eine Emphysembildung zu vermeiden. Jedoch sind selbst mit diesen feinkörnigen Pulvern Veränderungen der Oberflächen – im Sinne eines Abtrages der Oxidschicht von den Titanoberflächen – nicht auszuschließen (Kröger et al. 2020, Haribyan 2019).

Trotzdem gelingt mit mechanischen Methoden die antibakterielle Reinigung niemals vollständig. Bei der mechanischen Implantatoberflächenreinigung verbleiben Bakterien in den Krypten der Mikrostrukturen und entgehen dem Abtrag. Umso mehr Bakterien verbleiben, je rauer die Oberfläche und je weiter submukosal sie lokalisiert ist. Am besten werden die mikrostrukturierten Bereiche durch das Abstrahlen mit dem Airpolishing-System erreicht (Haribyan 2019).

Klinisch limitiert der straffe zirkuläre Bindegewebering die Zugänglichkeit zu dem Fundus der periimplantären Tasche. Dadurch wird die Reinigung der Implantatoberflächen mit allen mechanischen Hilfsmitteln erschwert. Oft erlaubt erst eine Lappenchirurgie den Zugang in Taschen mit Instrumenten oder Airpolishing. Der Luft-Pulver-Wasserstrahl erreicht mit der konventionellen Düse die apikalwärts geneigten Flanken der makroskopischen Gewindestruktur des Implantates nicht. Die für tiefere Taschen vorgesehene „Nozzle“ kann nur nach chirurgischer Aufklappung des straffen periimplantären Weichgewebes in dem trichterförmigen ossären Defekt positioniert werden. Obwohl die Strahlrichtung mit der „Nozzle“ horizontal und nicht mehr wie mit der Düse schräg von marginal verläuft, steigert

sich die Effizienz der Reinigung dadurch nicht (Haribyan 2019). Daher ist davon auszugehen, dass nach der mechanischen Implantatoberflächenreinigung immer Biofilmreste in der periimplantären Tasche verbleiben (Louropoulou et al. 2014). Diese Reste beinhalten je nach Reinigungseffizienz Reste zerstörter Bakterien, einzelne Bakterien aus aufgebrochenem und entferntem Biofilm, bis hin zu nicht entferntem, intaktem Biofilm.

Die erneute Zelladhäsion auf bereits mit Biofilm kontaminierten und wieder gereinigten Oberflächen wird zum einen durch die unvollständige Dekontamination und zum anderen durch die Veränderungen der Oberflächenstrukturen beeinträchtigt. Studien zeigten jedoch bereits, dass eine Gewebeheilung auf derart beeinträchtigten Oberflächen möglich ist (Persson et al. 2001, Lindhe und Meyle 2008).

Für eine gute klinische Prognose wird eine Biofilm-Reduktion von über 94 % empfohlen (Trejo et al. 2006). Der Anteil verbliebenen Biofilms beträgt jedoch im Schnitt zwischen 40 % und 80 %, selbst bei In-vitro-Versuchen (Schmage 2010). Der Reinigungsgrad hängt von der Implantatoberflächenstruktur (glatt oder rau) und Lokalisation in der periimplantären Tasche (marginal oder tiefer subgingival) ab. Klinisch wird zur Periimplantitistherapie daher ein kombiniertes Vorgehen empfohlen: mechanisch mit adjuvanter, chemischer Dekontamination (z.B. Chlorhexidin, Betailsodona) beziehungsweise medikamentös (Antibiotika) (Sahrmann 2015).

Zur Dekontamination der Implantatoberflächen werden darüber hinaus in der Literatur noch weitere Mittel und Methoden beschrieben, die klinisch zum Einsatz kommen, wie zum Beispiel die Ätzung mit Phosphorsäure oder die Nutzung von

HybenX (Hersteller EPIEN Medical, Saint Paul, MN, USA). HybenX ist eine hygroskopische Lösung aus 37 % Hydroxybenzolsulfonsäure, 23 % Hydroxymethoxybenzoesäure, 28 % Schwefelsäure und 12 % Wasser (Lopez et al. 2016, Pini-Prato et al. 2016). Die stark negative Oberflächenladung der Sulfatgruppe bindet über Wasserstoffbrückenbindungen die Wassermoleküle mit positiver Oberflächenladung im Biofilm. Die Biofilmmatrix wird dehydriert und denaturiert.

HybenX ist seit einigen Jahren auf dem Markt verfügbar und wird für die Anwendung in der Wurzelkanaldesinfektion, für die oberflächliche Behandlung von Aphthen und Ulcera sowie für die Desinfektion parodontaler und periimplantärer Taschen empfohlen (EPIEN Medical 2017). Die klinische Anwendung am Patienten erfolgt derzeit ohne wissenschaftliche Bestätigung des Nutzens beziehungsweise der Unschädlichkeit. Es liegen bislang keine Erkenntnisse vor, wie die Weichgewebezellen auf die Dekontamination durch HybenX reagieren. Der Hersteller beschreibt eine weißliche Verfärbung der oberflächlichen Mukosa bei Kontakt mit HybenX, welche im Verlauf einiger Tage aufgrund natürlicher Rehydrierung wieder verschwinden soll (EPIEN Medical 2017).

Ebenso ist nicht erforscht, welche Wirkung – möglicherweise Toxizität – HybenX auf die Zellen selbst hat. Die HybenX-Bestandteile Schwefelsäure und Hydroxybenzolsulfonsäure wirken akut reizend und ätzend auf Haut und Schleimhaut (IFA 2021a, IFA 2021b). Auch beschreiben Fallberichte einen momentanen Schmerz bei der HybenX-Applikation, welcher jedoch innerhalb von zwei bis drei Tagen wieder vollständig zurückgehen soll (Pini-Prato 2016).

Des Weiteren spielt nach der Dekontamination der Implantatoberfläche eine möglichst rasche Anheftung der Zellen eine wichtige Rolle, damit die

Implantatoberflächen nicht erneut bakteriell besiedelt werden. Die Einheilung der Gewebe kann beispielsweise durch die Verbesserung der Benetzbarkeit der Implantatoberflächen mit Blut beschleunigt werden. Hierfür wird unter anderem die Anwendung von Kaltplasma empfohlen. Erste Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Zelladhäsion bei der Implantateinheilung durch die Kaltplasma-Applikation optimiert werden kann (Coelho et al. 2012, Karaman et al. 2018). Die Konditionierung mit Kaltplasma direkt vor ihrer Insertion kann auch die primäre Heilung von Implantatkomponenten wie dem Implantatkörper, Gingivaformern oder Abutments begünstigen.

Physikalisches Plasma zählt – neben den drei landläufig bekannten Materiezuständen flüssig, fest und gasförmig – zu den Aggregatzuständen. Plasmen sind Gase, welche teilweise oder vollständig ionisiert sind und aus einer großen Anzahl geladener Teilchen wie Ionen, Elektronen und freien Radikalen bestehen (Heinlin et al. 2010). Zwischen den Teilchen im Plasma wirken Kräfte, welche zu Partikelschwingungen und Ladungen führen. Je nach Temperatur der Ionen, Elektronen und des umgebenden Gases wird zwischen kaltem und heißem Plasma unterschieden (Heinlin et al. 2010). Die Temperatur von Ionen und Elektronen steht bei heißem Plasma im Gleichgewicht und erreicht zwischen 80 °C bis zu einigen Tausend Grad Celsius.

Elektronen heizen sich aufgrund ihrer geringeren Masse sehr viel schneller auf als Ionen, die ein deutlich höheres Gewicht haben. Durch ihr geringes Gewicht beeinflussen Elektronen die Gesamttemperatur des Plasmas kaum. Demzufolge besitzt Plasma, bei dem nur die Elektronen, nicht aber die Ionen aufgeheizt sind, niedrigere Temperaturen von weniger als 40-50 °C und wird entsprechend

Kaltplasma genannt (Fridman et al. 2008, Fridman 2012). Es wird auch als „nicht-thermisches Plasma“, „Nichtgleichgewichtsplasma“ oder „CAP – cold atmospheric plasma“ bezeichnet.

Kaltplasma wird durch Zufuhr von Energie zu neutralen Gasen generiert. Hierfür wird zwischen zwei Elektroden eine Hochspannung erzeugt, wodurch starke elektrische Felder entstehen. Dadurch wird das Prozessgas (zugeführtes Gas oder Umgebungsluft) dissoziiert und ionisiert, bevor es gerichtet auf die Zieloberfläche trifft (Shimizu et al. 2008). Kaltplasma aktiviert die Titanoberfläche, verbessert dabei deren Benetzbarkeit, reduziert potenziell vorhandene Kohlenstoffverbindungen auf der Titanoberfläche und fördert die Zunahme der Oxidschicht, ohne dabei die Oberflächenstruktur und -rauigkeit zu verändern (Henningsen et al. 2018a und 2018b).

Implantatbestandteile wie Abutments werden direkt vor ihrer klinischen Verwendung mit Kaltplasma konditioniert, da diese Konditionierung nicht lagerstabil ist. Aufgrund der günstigen Wirkung auf die zelluläre Reaktion entstand die Idee, das Kaltplasma auch für die sekundäre Heilung beziehungsweise zur Begünstigung der Regeneration im Rahmen der Periimplantitistherapie einzusetzen. Da die Implantate zu diesem Zeitpunkt aber bereits osseointegriert sind, müsste die Kaltplasma-Konditionierung nicht nur chair-side, sondern auch intraoral stattfinden. Bislang ist dies noch nicht gefahrlos möglich, da bei der Konditionierung auch eine Hitzeentwicklung an den Implantaten stattfindet. Deshalb ist derzeit kein Gerät für die intraorale klinische Anwendung freigegeben. Trotzdem stellen sich die theoretischen Fragen, ob auch die dekontaminierte, modifizierte

Implantatoberfläche von der Kaltplasmabehandlung profitieren könnte und wie adhärente Zellen auf die Kaltplasmakonditionierung reagieren würden.

Das Fibroblastenwachstum auf Implantatoberflächen, die mit den vorgenannten drei Methoden entweder aktiviert (Kaltplasma), mechanisch gereinigt (Airpolishing) oder chemisch dekontaminiert (HybenX) wurden, ist noch wenig untersucht. Eine Vergleichsstudie aller drei Methoden konnte nicht gefunden werden.

Die Literatursuche mit „Pub Med“ (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>, letzter Zugriff 31.08.2021) ergab für die Schlagworte:

„implant surface“, „fibroblast“, „titanium“

& „plasma“ = 88 Publikationen

& „air powder water spray“ = 6 Publikationen

& „HybenX “ = 17 Publikationen

& „decontaminating agents“ = 1 Publikation

Von den 88 Publikationen mit dem Schlagwort „plasma“ konnten, nach Ausschluss von Blutplasma und Osteosyntheseimplantaten betreffenden Studien, 6 Publikationen mit vergleichbarem Versuchsdesign vorselektiert werden.

Mit den Schlagworten „air powder water spray“ konnten 4 Publikationen mit ähnlichem Versuchsdesign verglichen werden.

Nach Ausschluss von Publikationen über Aphten und endodontische Therapie blieben mit dem Schlagwort „HybenX“ ausschließlich Fallberichte übrig. Eine Arbeit mit vergleichbarem Versuchsdesign konnte nicht gefunden werden.

Autor*innen / Jahr	Titel	Implantatmaterial	Konditionierungsmethode	Auswertungsparameter	Ergebnisse
Rabel et al. 2021	Human osteoblast and fibroblast response to oral implant biomaterials functionalized with non-thermal oxygen plasma	Titan Zirkonkeramik	Sauerstoffplasma	Zellzahl Morphologie metabolische Aktivität Proliferation über 24, 72 und 168 Stunden	geringfügige Morphologische Veränderungen ohne Einfluss auf Zellzahl und Proliferation
Canullo et al. 2020	Fibroblast Interaction with Different Abutment Surfaces: In Vitro Study	Titan	Argonplasma UV-Licht	Zellzahl Morphologie über 20 Minuten, 24 und 72 Stunden	geringfügig erhöhte Zellzahl 20 Minuten nach Plasmaapplikation, keine Unterschiede nach 24 und 72 Stunden
Matthes et al. 2019	Fibroblast Growth on Zirconia Ceramic and Titanium Disks After Application with Cold Atmospheric Pressure Plasma Devices or with Antiseptics	Titan Zirkonkeramik	Umgebungsluftplasma Chlorhexidindigluconat Octenidin Ethanol	Zelldichte über 1 und 24 Stunden	erhöhte Zellzahl durch Kaltplasma in der Frühphase der Adhäsion, geringere Zelldichte 24 Stunden nach Octenidin und Chlorhexidinbehandlung
Guo et al. 2019	Cytocompatibility of Titanium, Zirconia and Modified PEEK after Surface Treatment Using UV Light or Non-Thermal Plasma	Titan Zirkonkeramik Polyetheretherketon (PEEK)	Argonplasma Sauerstoffplasma UV-Licht	Zellzahl Zellviabilität Zytotoxizität über 2, 8 und 48 Stunden	erhöhte Zellzahl mit Sauerstoffplasma und UV-Licht, schwankende Viabilität und Zytotoxizität
Lee et al. 2015	Air atmospheric-pressure plasma-jet treatment enhances the attachment of human gingival fibroblasts for early peri-implant soft tissue seals on titanium dental implant abutments	Titan	Umgebungsluftplasma	Zellzahl Proliferation Morphologie	20 % erhöhte Zellzahl und Proliferationsrate und günstigere Morphologie in der Frühphase der Adhäsion
Canullo et al. 2013	Plasma of argon accelerates murine fibroblast adhesion in early stages of titanium disk colonization	Titan	Argonplasma	Zellzahl Morphologie über 2, 8 und 48 Stunden	erhöhte Zellzahl und günstigere Morphologie in der Frühphase der Adhäsion

Tab. 1: Literaturübersicht „implant surface“, „fibroblast“, „titanium“, „plasma“

Autor*innen / Jahr	Titel	Implantatmaterial	Konditionierungsmethode	Auswertungsparameter	Ergebnisse
Schmidt et al. 2018	Clinical and laboratory evaluation of the effects of different treatment modalities on titanium healing caps: a randomized, controlled clinical trial	Titan	Titan-Kürette Stahl-Ultraschallspitze Airpolishing (Erythritol) Silikon-Politur	Zellzahl über 120 Stunden	keine Unterschiede in der Zellzahl zwischen den Versuchsgruppen trotz großer Unterschiede im Maß der Oberflächenbeschädigung
Kreisler et al. 2005	In vitro evaluation of the biocompatibility of contaminated implant surfaces treated with an Er : YAG laser and an air powder system	Titan	Airpolishing Er:YAG-Laser	Proliferation über 72 Stunden	zuverlässige Dekontamination der Oberflächen ohne negativen Einfluss auf die Zellproliferation
Shibli et al. 2003	Effect of air-powder system on titanium surface on fibroblast adhesion and morphology	Titan	Airpolishing	Zellzahl Morphologie über 24 Stunden	deutlich erhöhte Zellzahl ohne morphologische Einbußen
Augthun et al. 1998	In vitro studies on the effect of cleaning methods on different implant surfaces	Titan	Kunststoffkürette Airpolishing	Zellzahl	deutlich höhere Zellzahl nach Airpolishing verglichen mit der Kunststoffküettenreinigung

Tab. 2: Literaturübersicht „implant surface“, „fibroblast“, „titanium“, „air powder water spray“

Autor*innen / Jahr	Titel	Implantatmaterial	Konditionierungsmethode	Auswertungsparameter	Ergebnisse
Lopez et al. 2021	The Treatment of Peri-Implant Diseases: A New Approach Using HYBENX® as a Decontaminant for Implant Surface and Oral Tissues	nicht angegeben	HybenX während offener Parodontistherapie	Sondierungstiefe Clinical attachment level (CAL) Bleeding on Probing (BOP)	42%ige Reduktion der Sondierungstiefe, 41%ige Reduktion des CAL, 94%ige Reduktion des BOP
Isola et al. 2018	The effects of a desiccant agent in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, controlled clinical trial	nicht angegeben	Scaling and Root-planing (SRP) SRP und HybenX	Sondierungstiefe BOP CAL Entzündungsmediatoren- und Bakterienanalyse	Reduktion aller Parameter in beiden Versuchsgruppen, größere Reduktion bei SRP kombiniert mit HybenX
Bracke et al. 2015	Pilot evaluation of a simple adjunctive method for improved removal of oral Biofilm during conventional scaling and root planing therapy	nicht angegeben	HybenX SRP und HybenX	Bakterienanalyse Entzündungsbiomarker (MMP8, IL-1 β , IL-6, TNF- α)	weder bakterielle DNA noch Entzündungsbiomarker nach kombinierter Therapie nachweisbar
Lombardo et al. 2015	A topical desiccant agent in association with ultrasonic debridement in the initial treatment of chronic periodontitis: a clinical and microbiological study	nicht angegeben	HybenX Ultraschall Ultraschall und HybenX	Sondierungstiefe BOP CAL visible plaque index Bakterienanalyse	ähnliche Reduktion aller Parameter bei Einzeltherapie, Verdopplung der Reduktion der Bakterienmenge bei kombinierter Therapie

Tab. 3: Literaturübersicht „implant surface“, „fibroblast“, „titanium“, „HybenX“

Autor*innen / Jahr	Titel	Implantatmaterial	Konditionierungsmethode	Auswertungsparameter	Ergebnisse
Maquera-Huacho et al. 2021	In vitro antibacterial and cytotoxic activities of carvacrol and terpinen-4-ol against biofilm formation on titanium implant surfaces	Titan	Carvacrol Terpinen-4-ol	Zellviabilität Zytotoxizität Dekontaminierungseffektivität	Carvacrol und Terpinen-4-ol mit guter Dekontaminierungseffektivität Terpinen-4-ol mit höherer Zellviabilität

Tab. 4: Literaturübersicht „implant surface“, „fibroblast“, „titanium“, „decontaminating agents“

2 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss von einer physikalischen, einer mechanischen und einer chemischen Konditionierungsmethode auf das Fibroblasten-Wachstum auf zwei unterschiedlichen Titanoberflächenstrukturen zu untersuchen. Zielgrößen waren die Zellzahl und die Morphologie von Gingiva-Fibroblasten.

Dazu wurden folgende Nullhypothesen aufgestellt:

- I. Die Konditionierung der Titanoberflächen mit allen drei Methoden hat keinen Einfluss auf das Fibroblasten-Wachstum.
- II. Die chemische und die physikalische Konditionierungsmethode haben keinen Einfluss auf die den Titanoberflächen adhärennten Fibroblasten.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsdesign

In dieser Arbeit wurden zwei Stämme humaner Gingivafibroblasten verwendet. Als Versuchskörper dienten Glasoberflächen sowie Titanoberflächen mit zwei verschiedenen Oberflächenstrukturen: strukturpoliert und korundgestrahlt. Die korundgestrahlten Versuchskörper wurden bezüglich ihrer dreidimensionalen Rauigkeitskenngößen der Oberfläche analysiert und im Rasterelektronenmikroskop wurde die Oberflächenstruktur visualisiert.

Eine physikalische (Kaltplasma), eine mechanische (Airpolishing) und eine chemische (HybenX) Konditionierungsmethode wurde auf den Oberflächen angewendet. Die Benetzbarkeit der Oberflächen nach ihrer Konditionierung wurde untersucht.

Die Versuchskörper aus Glas und Titan mit den zwei beschriebenen Oberflächenstrukturen wurden im ersten Teil der Untersuchung zunächst mit Kaltplasma, Airpolishing oder HybenX behandelt sowie nacheinander mit Airpolishing plus Kaltplasma konditioniert. Durch die Kombination von chemischer und mechanischer Konditionierungsmethode wurden vier Konditioniermodalitäten gebildet und drei Oberflächenstrukturen verwendet. Auf diese Weise wurden neun Testgruppen gebildet, auf denen die Gingivafibroblasten für 96 Stunden angezüchtet wurden. Als Kontrollgruppen dienten unbehandelte Glas- und Titanplättchen (Kontrolle). Die neun Test- und drei Kontrollgruppen sind in Tabelle 5 dargestellt.

Im zweiten Teil der Untersuchung wurden im Rahmen eines Vorversuches unbehandelte Glas- und Titanplättchen mit Fibroblasten für 24 Stunden kultiviert und dann einer Behandlung mit HybenX beziehungsweise Kaltplasma ausgesetzt. Danach wurden sie für 72 Stunden kultiviert. Die unbehandelten Glas- und Titanplättchen dienten wiederum als Kontrolle (4 Test-/ 3 Kontrollgruppen).

Die Versuche wurden mit jeweils mit drei Ansätzen pro Zell-Linie und pro Oberfläche je Gruppe durchgeführt. Dadurch ergab sich eine Anzahl von $n=12$ Probenkörpern pro Gruppe. Jede Probe wurde jeweils mit Farbstoffen zum Anfärben der Zellkerne beziehungsweise der Zytoskelette behandelt. Die Zellzählung erfolgte anhand der Zellkernfärbung.

Das Zellwachstum wurde nach 96 Stunden abgestoppt und bezüglich Zellzahl und Zellmorphologie ausgewertet. Die Zellanzahlen wurden anhand lichtmikroskopischer Aufnahmen der Zellkernfärbung ausgezählt und die Morphologie der Zellen lichtmikroskopisch analysiert. Die Zellanzahlen wurden quantitativ berechnet und auf statistisch signifikante Differenzen gegenüber den Vergleichsgruppen geprüft.

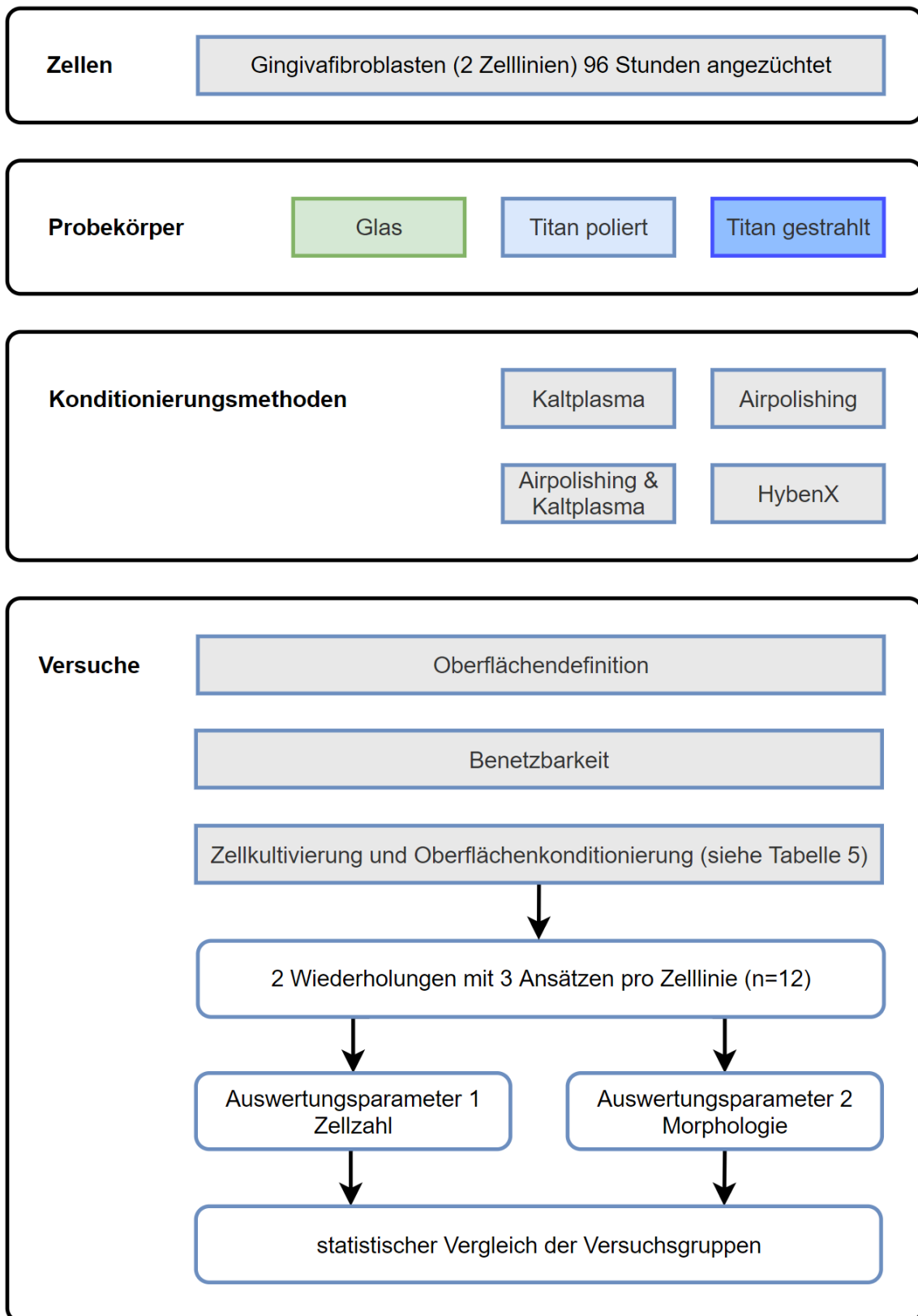


Abb.1: Versuchsdesign

Konditionierungs- methoden \ Probekörper		Glas	Titan poliert	Titan gestrahlt
Teil 1: Konditionierung vor Zellanzucht	Kaltplasma	12	12	12
	Airpolishing	-	12	12
	Airpolishing und Kalt- plasma	-	12	12
	HybenX	-	12	12
keine Behandlung	(Kontrolle)	12	12	12
Teil 2: Konditionierung nach Zellanzucht	HybenX	12	-	-
	Kaltplasma	12	12	12
2 Zelllinien mit je 3 Ansätzen und 2 Wiederholungen → n=12 Probekörper				

Tab. 5: Probekörper

3.2 Gingivafibroblasten

Es wurden zwei bereits bei vorhergegangenen Untersuchungen etablierte Gingivafibroblastenstämme (GF3 und GF10) verwendet (Schmage 2008). Zur Gewinnung der humanen Gingivafibroblasten wurden Gingivabiopsien zahnärztlicher Eingriffe von erwachsenen Patienten (35 Jahre oder älter, keine bekannten Allgemeinerkrankungen) genutzt (Bartold et al. 1998). Die Einwilligung aller Patienten wurde eingeholt und die Proben bereits anonymisiert von der Klinik an das Zelllabor übergeben. Hier wurden die Biopsieproben in Nährmedium mit Penicillin und Streptomycin-Zusätzen in steriler Arbeitsumgebung gelagert und verarbeitet. Die Entfernung der Epidermis erfolgte vor der Zerkleinerung des Bindegewebes,

welches in Nährmedium bei 37 °C unter Zusatz von 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert wurde. Die angewachsenen Zellen wurden trypsinisiert, passagiert und weiterverwendet.

Die Inkubation fand in T175 Zellkulturflaschen mit Zellkulturmedium (RPMI Medium 1640, gibco Chargennummer 1839811) statt, angereichert mit 20 % fetalem Kälberserum (FCS) und Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) bei 37 °C unter Zusatz von 5 % CO₂. Sämtliche Bearbeitungsschritte der Fibroblasten erfolgten in steriler Umgebung unter Absaugung.

Um eine optimale Zellgesundheit und Proliferationsrate zu erreichen, mussten die Zellen regelmäßig mit Nährstoffen versorgt und umgesetzt werden. Bei einer Konflueszenz der Zellen von circa 70 % des Flaschenbodens wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um eine ausreichende Ernährung der Zellen zu gewährleisten. Hierfür wurde das Medium bis auf einen verbleibenden Rest von 2 ml mit einer Aspirationspipette ohne Zellkontakt abgesaugt. Das verbleibende Medium enthielt außer Stoffwechselprodukten auch Wachstumsfaktoren und musste in der Flasche verbleiben, um die Zellproliferation zu fördern. Abschließend wurden 15 ml frisches, vorgewärmtes Medium mit FCS und Pen/Strep unter Wandkontakt einpipettiert und die Zellen weiter inkubiert.

Bei mehr als 80 % Konflueszenz wurde die Zellzahl reduziert, um einen Wachstumsstillstand zu verhindern. Hierfür mussten die Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst werden. Es wurden Trypsin (0.05 % Trypsin-EDTA, Gibco, Charge 25300-054), phosphatgepufferte Salzlösung (PBS - Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, gibco, Charge 1513257) und Nährmedium im Wasserbad vorgewärmt und vor Nutzung desinfiziert. Das vorhandene Nährmedium in der

Zellkulturflasche wurde vollständig mit einer Aspirationspipette abgesaugt. Als nächstes wurde die Flasche mit 10 ml PBS aufgefüllt und vorsichtig schwenkend gespült, um das gesamte Nährmedium zu entfernen, da das darin enthaltene FCS das Trypsin inhibiert. Das PBS wurde anschließend vollständig abgesaugt. Im nächsten Schritt wurden 7 ml vorgewärmtes Trypsin in die gespülte Zellkulturflasche eingefüllt, bis der Boden vollständig bedeckt war. Es folgte eine fünfminütige Inkubation in einem Brutschank. Anschließend wurden 7 ml Nährmedium mit FCS und Pen/Strep hinzugefügt. Diese stoppten den Vorgang der Trypsinierung. Eine oder mehrere neue Zellkulturflaschen wurden mit 15 ml Medium beschickt und 1,5 ml Zellsuspension wurden hinzugefügt. Nach einer Kontrolle der Zellen unter dem Mikroskop wurden die nun fertig beschickten Flaschen weiter im Brutschrank inkubiert



Abb. 2: Kultivierte Gingivafibroblasten in einer Zellkulturflasche

3.3 Probekörper

Für diese Untersuchung wurden 200 Plättchen aus Reintitan Grad 2 (DIN 17851) mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Dicke von 1 mm als Prototypen hergestellt. Je 100 dieser Plättchen erhielten auf einer Seite eine Oberflächenstrukturierung gemäß Strukturpolitur. Die weiteren 100 Plättchen wurden mit Korund gestrahlt und anschließend gereinigt. Die Oberflächen entsprechen dem „MicroPlant-System“ (Komet/ Gebr. Brasseler, Lemgo), einem System von Mini-Implantaten, das inzwischen nicht mehr vertrieben wird. Die korundgestrahlte Oberfläche wurde individuell charakterisiert anhand der dreidimensionalen Rauigkeitskenngrößen (S_A) und der Darstellung der Struktur im Rasterelektronen-Mikroskop. Als Vergleichsgruppe wurden laborübliche Glasplättchen von 10 mm Durchmesser verwendet. Unmittelbar vor der Applikation der Zellsuspension wurden die Prüfkörper in Heißluft sterilisiert.

Weiterhin wurden die Oberflächen unbehandelt sowie mit den verschiedenen Konditionierungen versehen bezüglich ihrer Benetzbarkeit untersucht.

Flüssigkeiten tendieren aufgrund ihrer Kohäsionskräfte zur kleinstmöglichen Oberfläche, der Tropfenform (Reiss 1992). Liegt der Flüssigkeitstropfen auf einer Festkörperoberfläche auf, beschreibt der Übergang vom festen zum flüssigen Stoff einen Winkel, den Kontaktwinkel.

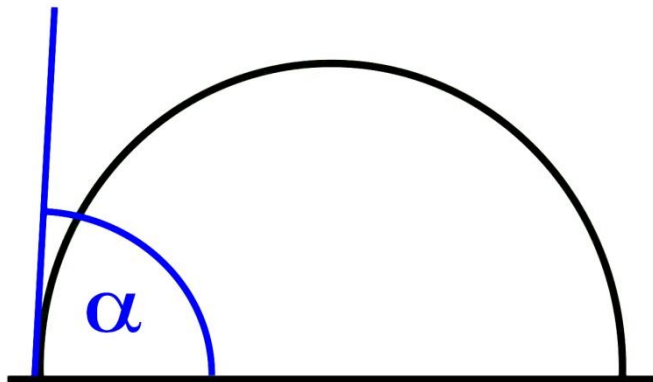


Abb. 3: Kontaktwinkel als Winkel α

Dieser verändert sich je nach Oberflächenenergie und Wechselwirkungen zwischen den Materialien: je geringer die Wechselwirkungen, desto größer der Kontaktwinkel (Sikarwar et al. 2012, Sepeur 2008). Je größer der Kontaktwinkel α , desto geringer ist also die Benetzbarkeit. Am Beispiel der Verwendung von Wasser wird die Oberfläche bei einem Kontaktwinkel von $< 90^\circ$ als hydrophil, zwischen 90° und 160° als hydrophob und bei $> 160^\circ$ als superhydrophob beschrieben (Liu und Kim 2014). Wenzel beobachtete, dass eine Feinstrukturierung eine Verstärkung vorhandener Oberflächeneigenschaften bewirkt (de Gennes et al. 2004).

Die Oberflächenbenetzbarkeit stellt eine Kenngröße für die Oberflächenenergie dar. Der Kontaktwinkel α eines Flüssigkeitstropfens auf einer Festkörper-Oberfläche wird gemessen (González-Carrasco et al., 2019; Abb. 3).

Dazu wurde ein Tropfen genau definierter Menge ($10,0 \mu\text{l}$) destillierten Wassers auf die Oberfläche pipettiert. Mit einem Abstand von 1 mm zu einem skalierten

Hintergrund wurde der Tropfen aus rechtwinkliger Betrachtungsrichtung fotografiert und der Kontaktwinkel nach Vergrößerung der Aufnahme vermessen. Je drei Probekörper jeder Oberfläche und jedes Materials wurden mit den fünf Konditionierungsmodalitäten versehen und die Kontaktwinkelbestimmung jeweils dreimal wiederholt.

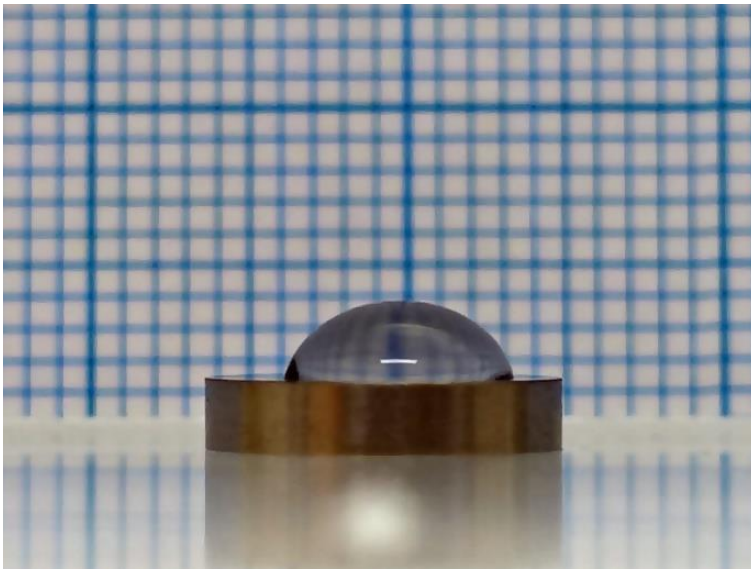


Abb. 4 a und b: Kontaktwinkelbestimmung

3.4 Oberflächen-Konditionierungen

Die drei Konditionierungsmethoden wurden entsprechend ihren jeweiligen Herstellerempfehlungen in Teil 1 auf den bereits sterilisierten Probekörpern direkt vor der Applikation der Zellsuspension und in Teil 2 auf den bereits angezüchteten Zellen angewendet.

3.4.1 Kaltplasma

Kaltplasma wurde mit dem piezobrush PZ2 (relyon plasma, Regensburg) unter Einsatz der Standard-Düse erzeugt (Abb. 5). Dieses hat eine maximale Leistungsaufnahme von 30 Watt und erzeugt mit der Umgebungsluft als Prozessgas Kaltplasma mit einer Temperatur $<50^{\circ}\text{C}$. Das Piezobrush PZ2 erzeugt indirektes Plasma, die Testkörper sind also nicht Teil des plasmaerzeugenden Systems (relyon plasma 2021). Die Oberflächen wurden für 30 Sekunden mit 1 cm Abstand bestrahlt und anschließend dreimal für 1 Minute mit PBS gespült. Dann wurde die Zellzüchtung durchgeführt.



Abb. 5: Kaltplasma-Gerät

3.4.2 Airpolishing

Airpolishing ist eine Methode der Oberflächen-Reinigung mittels eines Luft-Pulver-Wasserstrahl-Systems. Hier wurde das Airflow Piezon Master-Gerät (EMS, München, Geräte Nr. 1.005.555) mit dem Airflow Handstück (mit geradem Strahlaustritt) und Perio-Pulver auf Glycin-Basis mit ~25 µm Partikelgröße verwendet (Abb. 6). Die Oberflächen wurden für 10 Sekunden mit 1 cm Abstand unter kontinuierlicher Bewegung bestrahlt, bis die gesamte Oberfläche einmal abgestrahlt war, und unter Wasser abgespült. Entweder wurde die Oberfläche direkt weiterverwendet oder zusätzlich die Konditionierung mit Kaltplasma angeschlossen. Nach der dreimaligen Spülung für 1 Minute mit PBS wurde jeweils die Zellsuspension aufgetragen.



Abb. 6: Airpolishing-Gerät

3.4.3 HybenX

Die Flüssigkeit HybenX (Epien Medical, USA, Charge P20S1; Abb. 6) wurde auf die Oberflächen der Probekörper aufgetragen, sodass sie vollständig mit einer dünnen Schicht bedeckt waren. Die Oberflächen wurden nach 10 Sekunden sofort dreimal für 1 Minute mit PBS gespült. Anschließend wurde die Zellzüchtung durchgeführt.



Abb. 7: HybenX-Produkt

3.5 Versuchsdurchführung und -auswertung

Gemäß dem Versuchsdesign in Abbildung 1 wurden die Oberflächen der Probekörper spezifiziert und die Zellkulturen auf den teilweise konditionierten Probekörpern für die Teile 1 und 2 angesetzt. Nach 96 Stunden wurde das Wachstum der Zellkulturen abgestoppt. Von den jeweils 3 Parallelansätzen pro Versuchsgruppe, Zelllinie und Durchgang wurden alle zur quantitativen Bestimmung der Zellproliferation und zur qualitativen Analyse der Zellmorphologien herangezogen.

Zunächst wurden die gezüchteten Gingivafibroblasten wie in Abschnitt 3.2 zur Weiterverwendung trypsiniert. Zur Standardisierung der Anzahl der auf die Probekörper zu applizierenden Zellen wurde anschließend die Zellzahl pro Milliliter

der zu verwendenden Zellsuspension bestimmt. Hierfür fand eine Neubauer-Kammer Anwendung. Die trypsinierte Zellsuspension wurde in ein 30 ml Röhrchen überführt, bei 1.500 Upm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und mit 5 ml Medium resuspendiert. Somit steht ein definiertes Zellsuspensionsvolumen zur Verfügung. Auf die Neubauer-Kammer wurde anschließend ein Deckglas aufgebracht und 10 µl der Zellsuspension darunter pipettiert. Die Zellen in den vier Quadranten der Zellkammer wurden daraufhin ausgezählt. Die Konzentration der Zellen in der Suspension wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Zellzahl pro Milliliter} = \frac{\text{Zellanzahl aller 4 Quadranten}}{4} \times 10^4$$

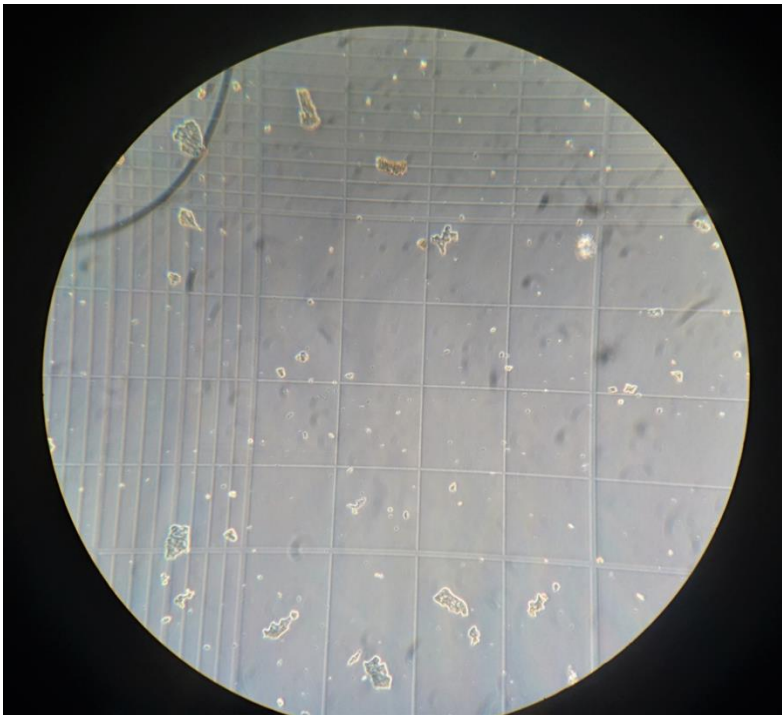


Abb. 8: ein Quadrant der Neubauer-Kammer (unten rechts)

Anschließend wurde das benötigte Volumen für 8.000 Zellen berechnet.

$$\text{benötigtes Volumen in Milliliter} = \frac{8.000 \text{ Zellen}}{\text{Zellzahl pro Milliliter}}$$

Zellkulturplatten (24 Well) (Sarstedt, Charge 6024211) wurden für Versuchsteil 1 mit konditionierten Probekörpern, für Versuchsteil 2 und die Kontrollgruppen mit unkonditionierten Probekörpern bestückt. Anschließend wurde das für 8.000 Zellen benötigte Volumen der Zellsuspension auf die Probekörper pipettiert. Als nächstes wurde gegebenenfalls Medium nachbeschickt, bis die Probekörper vollständig benetzt waren. Danach wurden die Wells 5 Minuten in den Brutschrank gestellt, um ein Absetzen der Zellen zu ermöglichen. Abschließend wurden die Wells mit 450 µl Medium aufgefüllt und im Brutschrank inkubiert.

24 Stunden nach Aussaat der Zellen wurde Versuchsteil 2 auf den Probekörpern durchgeführt. Hierfür wurden die vorgesehenen Probekörper aus den Wells genommen und restliches Medium vorsichtig seitlich abgesaugt. Die Probekörper wurden einmalig mit PBS gespült und erneut vorsichtig seitlich abgesaugt.

Es folgte die Konditionierung der bewachsenen Probekörper wie in Abschnitt 3.4 beschrieben.

Nach der Konditionierung wurden die Probekörper in ihre entsprechenden Wells zurückgelegt und die betreffenden Wells mit je 500 µl Medium aufgefüllt.

Nach Ablauf von 96 Stunden seit Beginn der Anzucht wurde das Wachstum der Zellen auf allen Probekörpern abgestoppt und die Zellen zur Auswertung angefärbt. Hierfür wurde das Medium aus allen Wells abgesaugt, um sie anschließend für 3 Minuten mit PBS zu waschen. Die Zellen wurden mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert (270 Mikroliter pro Well). Anschließend wurde das PFA abgesaugt und die Wells dreimal für jeweils fünf Minuten mit PBS gewaschen.

Nach dem erneuten Trockensaugen der Plättchen wurden 20 µl Primärantikörper (vorbereitet aus 10 µl Vimentin, 100 µl Rotiblock und 890 µl PBS) aufpipettiert, mit der Pipettenspitze verteilt und 30 Minuten dunkel abgedeckt einwirken gelassen.

Nach einem erneuten Absaugen der Plättchen und dreimal jeweils fünfminütigem Waschen mit PBS folgten das Benetzen mit 20 µl Sekundärantikörpern (vorbereitet aus 898 µl PBS, 100 µl Rotiblock, 1 µl goat anti rabbit F(ab')₂-Alexa Fluor 594 Ab, und 1 µl goat anti mouse F(ab')₂-Alexa Fluor 488 Ab) und erneut eine dunkel abgedeckte Einwirkphase von 30 Minuten.

Anschließend wurden die Plättchen dreimal jeweils fünf Minuten mit PBS und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen, trocken absaugt und mit Fluoromount und 1:1.000 Dapi auf Objektträgern eingedeckelt.

Die Plättchen wurden unter dem Mikroskop (Zeiss AxioObserver.Z1 microscope, Sony Okkulare 10-fache Vergrößerung, Tubus Faktor 1, Vergrößerung: 20-fach) sowohl in der Dapi- als auch der Vimentin-Färbung fotografiert.

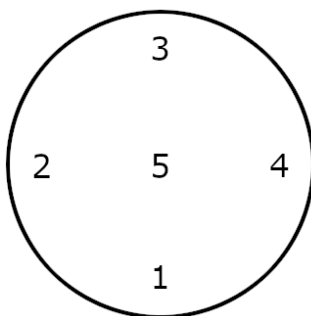


Abb. 9: Reihenfolge der Fotografien

Die morphologische Auswertung erfolgt im Vergleich zur Kontrollgruppe anhand der Aufnahmen der Vimentin- und Dapi-Färbungen. Die Zellen wurden bezüglich

der Oberflächenbedeckung, dem morphologischen Differenzierungsgrad, der Häufigkeit von Zell-zu-Zell-Kontakten und Zellausläufern, der Häufigkeit von Teilungsprozessen und dem Orientierungsgrad untersucht.

Für die quantitative Auswertung wurden die angefärbten Zellkerne der Fotos ($1.181 \times 885 \text{ Pixel} \cong 0,366 \text{ mm}^2$) ausgezählt.

Für die Datenerfassung und Plausibilitätskontrolle wurde Microsoft Excel, Version 14.0.7237.5000 und für die statistische Auswertung IBM SPSS-Statistics (Version 25) verwendet.

Die einzelnen Werte der Materialkontrollen eines Messareals eines Versuchstages wurden zu tages-, material- und messarealabhängigen Kontrollwerten gemittelt.

Die Werte der äußeren Loki einer Probe wurden gemittelt und die Werte für „Mitte“ und „Außen“ prozentual dem entsprechenden Kontrollwert gegenübergestellt.

Für die Vergleiche wurden T-Tests für verbundene Stichproben und nicht-parametrische Tests für unverbundene Stichproben verwendet.

Die Untersuchung der Ergebnisse auf statistisch signifikante Unterschiede erfolgte mithilfe des ANOVA-Verfahrens mit der Bonferroni-Dunn-Korrektur mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Oberflächentestung

4.1.1 Rauigkeitstestung

Zur Oberflächendefinition wurden die korundgestrahlten Titanprobekörper mit dem Rasterelektronenmikroskop Olympus DSX 500 imaging (Olympus, Tokyo, Japan) nach DIN EN ISO 1302 untersucht und ein 3D-Profil der Oberfläche erstellt.

Rauigkeitstestung		Messwert (μm)	Standard- abweichung (μm)
Gemittelte Rautiefe arithmetischer Mittelwert aller gemessenen Einzelrautiefen	Rz	4,397	0,700
Profilspitzenhöhe Höhe der größten Spitze von der Mittellinie des Oberflächenprofils aus gemessen	Rp	2,302	0,425
Profiltaltiefe Tiefe des tiefsten Tals von der Mittellinie des Oberflächenprofils aus gemessen	Rv	2,095	0,287
Maximale Rautiefe maximaler Abstand zwischen höchstem und tiefstem Punkt	Rt	6,214	1,206
Mittenrauwert mittleren Abstand eines Messpunktes zur Mittellinie des Oberflächenprofils	Ra	0,797	0,173
Quadratischer Mittenrauwert quadratischer Mittelwert aller Koordinatenwerte der Messstrecke	Rq	0,977	0,205

Tab. 6: Oberflächendefinition der korundgestrahlten Titanprobekörper

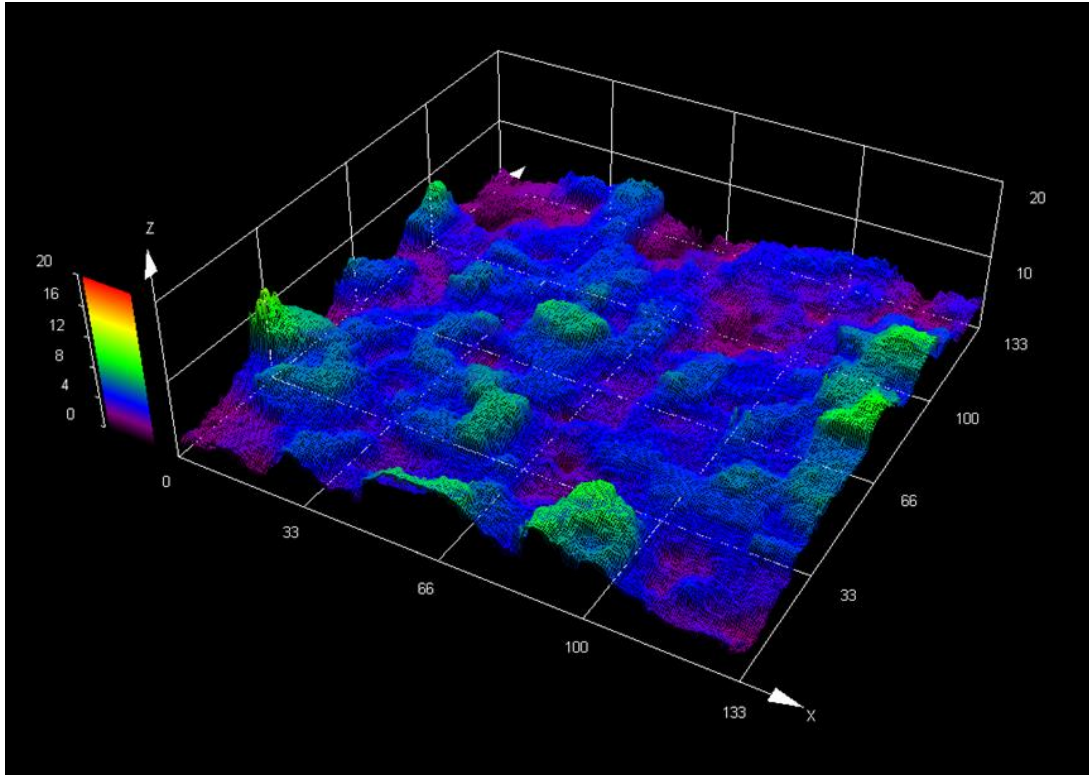


Abb. 10: 3D-Profil der Oberfläche der korundgestrahlten Titanoberfläche, 133 μm x 133 μm

4.1.2 Oberflächenbenetzbarkeit

Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde die Benetzbarkeit aller Oberflächen maßgeblich durch die Kaltplasmaapplikation verbessert. Im Mittelwert lag der Kontaktwinkel des Wassertropfens nur noch bei 37,9 % der Vergleichswerte der Kontrollgruppen. Das Airpolishing hatte hingegen keinen nennenswerten Einfluss auf die Benetzbarkeit. Die Kombination von Airpolishing- und Kaltplasmabehandlung der Oberflächen führte zu ähnlichen Benetzungswerten wie bei ausschließlich mit Kaltplasma bearbeiteten Oberflächen. Hier lag der mittlere Kontaktwinkel bei 37,3 % verglichen mit den mittleren Kontaktwinkeln der Kontrollgruppen. Der Einfluss von HybenX auf die Benetzbarkeit ergab kein homogenes Bild. Auf der Glasoberfläche wurde diese maßgeblich verschlechtert, auf poliertem Titan kaum verändert und auf gestrahltem Titan deutlich verbessert.

Probekörper Methoden	Glas	Titan poliert	Titan gestrahlt
keine Behandlung	29	89	88
Kaltplasma	11	31	36
Airpolishing	-	82	89
Airpolishing und Kaltplasma	-	33	33
HybenX	75	81	49

Tab. 7: Mittlere Oberflächenbenetzbarkeit, Kontaktwinkel in Grad

4.2 Morphologische und quantitative Auswertung

4.2.1 Quantitative Auswertung

			Zellzahl pro Messstelle		Zellzahl relativ zur Kontrolle		Zellzahl pro Probe-körper
			Mitte	Außen	Mitte %	Außen %	
Kontrolle		Glas	321,2	36,3			20.020
		poliertes Titan	233,1	30,9			15.314
		gestrahltes Titan	102,9	12,8			6.612
Versuchsteil 1	Kalt-plasma	Glas	283,6	59,6	0,883	1,641	22.404
		poliertes Titan	505,9	87,2	2,171	2,818	36.681
		gestrahltes Titan	41,2	6,2	0,401	0,488	2.842
	Air-polishing	poliertes Titan	436,5	37,0	1,873	1,194	25.078
		gestrahltes Titan	153,6	25,5	1,493	1,992	10.964
	Air-polishing und Plasma	poliertes Titan	247,7	28,2	1,063	0,912	15.476
		gestrahltes Titan	129,4	21,9	1,258	1,708	9.305
	HybenX	poliertes Titan	271,1	27,0	1,163	0,871	16.261
		gestrahltes Titan	142,2	20,9	1,383	1,634	9.693
Versuchsteil 2	HybenX	Glas	2,9	2,6	0,009	0,071	569
	Kalt-plasma	Glas	59,1	5,4	0,184	0,150	3.471
		poliertes Titan	23,8	11,2	0,102	0,363	2.949
		gestrahltes Titan	14,7	2,7	0,143	0,209	1.088

Tab. 8: Quantitative Auswertung des Fibroblastenwachstums

Die in Tabelle 4 aufgeführten Versuchsergebnisse wurden in den Abbildungen 11 bis 13 noch einmal graphisch dargestellt. Hierbei wurde zwischen den durchschnittlichen Gesamtzellzahlen pro Versuchskörper und den Zellzahlen der mittleren beziehungsweise äußeren Messareale unterschieden. Die X-Achse wurde jeweils auf Höhe der anfänglich applizierten Gesamtzellzahl gesetzt. Dies entspricht 8.000 Zellen pro Versuchskörper und 37,28 Zellen pro Messareal.

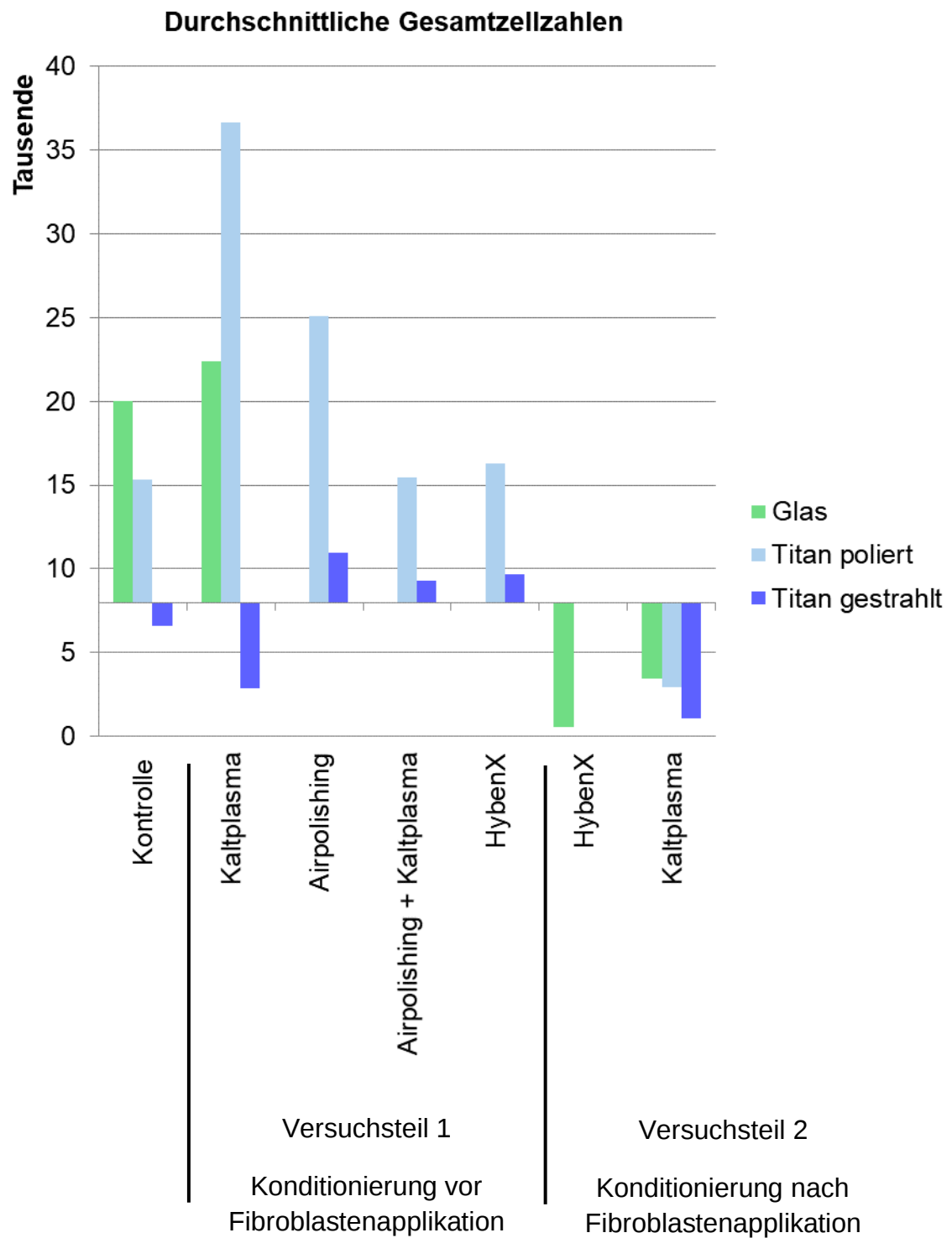


Abb. 11: Graphische Darstellung der Gesamtzellzahlen pro Versuchskörper

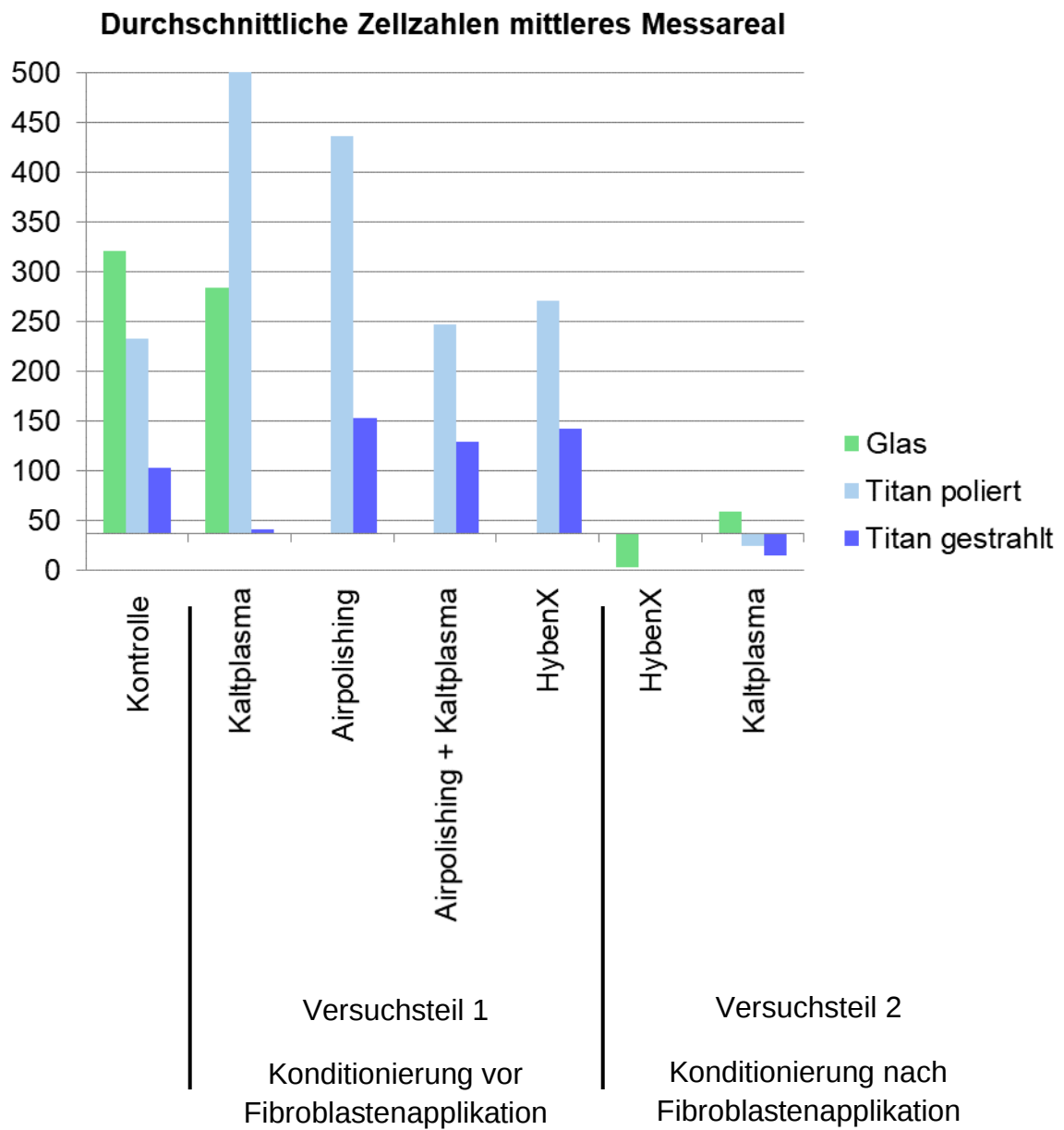


Abb. 12: Graphische Darstellung der Zellzahlen pro mittlerem Messareal

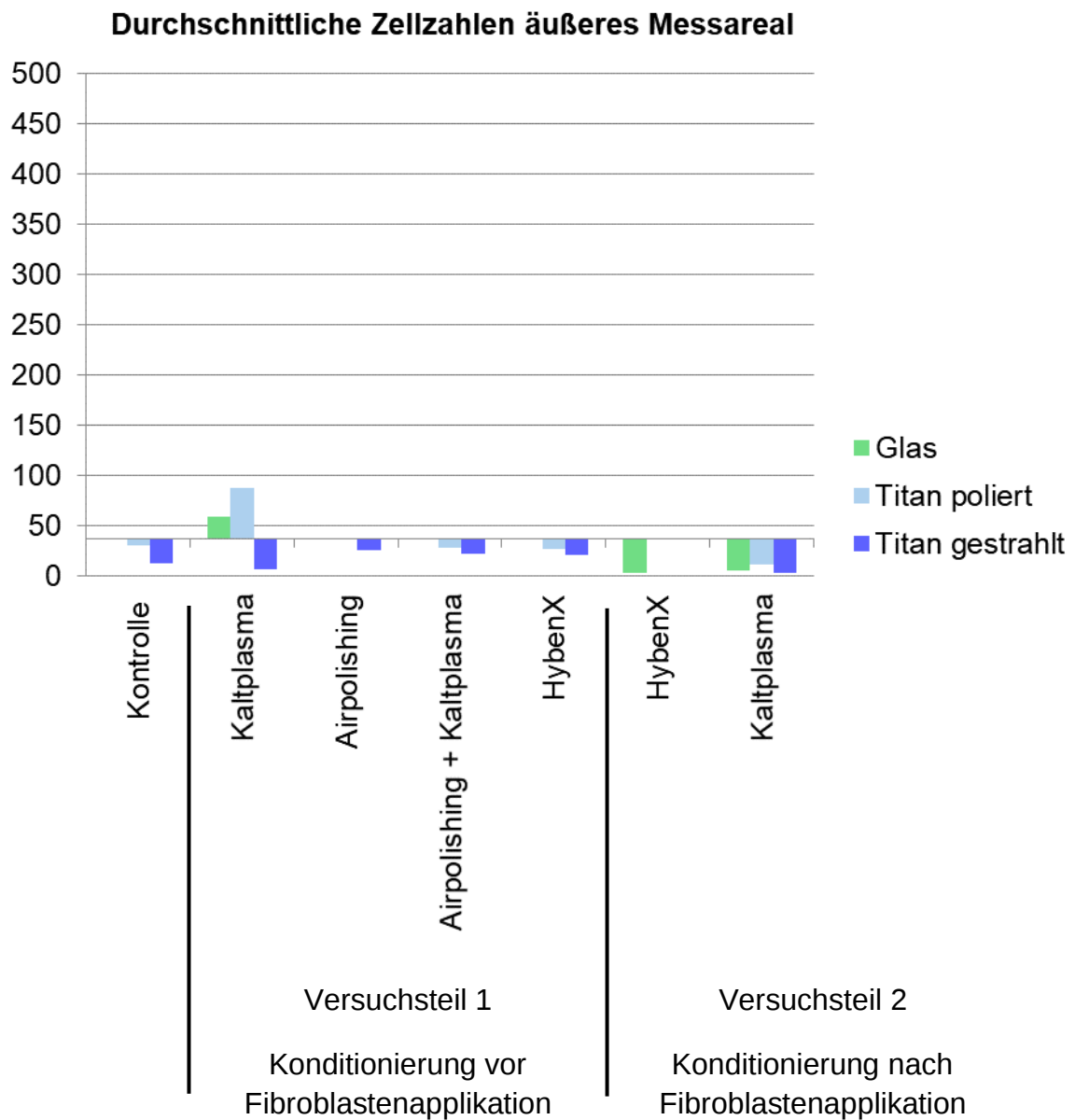


Abb. 13: Graphische Darstellung der Zellzahlen pro äußerem Messareal

4.2.2 Fibroblastenmorphologie der Kontrollgruppen

Morphologie auf Glas

Die Zellen zeigten zwar eine hohe Oberflächenbedeckung, dabei allerdings kaum morphologische Ausdifferenzierung und Zellkontakte beziehungsweise Zellausläufer. Genauso waren Teilungsprozesse und Orientierung nur geringfügig feststellbar.

Eigenschaft	Bewertung
mittlere Zellzahl pro 0,366 mm ² Messareal Mitte / Außen	321,2 / 36,3
Gesamtzellzahl pro Probekörper	20.020
Oberflächenbedeckung	flächig
morphologische Differenzierung	gering
Zellkontakte und -ausläufer	selten
Teilungsprozesse	selten
Orientierungsgrad	gering

Tab. 9: Fibroblastenmorphologie der Kontrollgruppe auf Glas

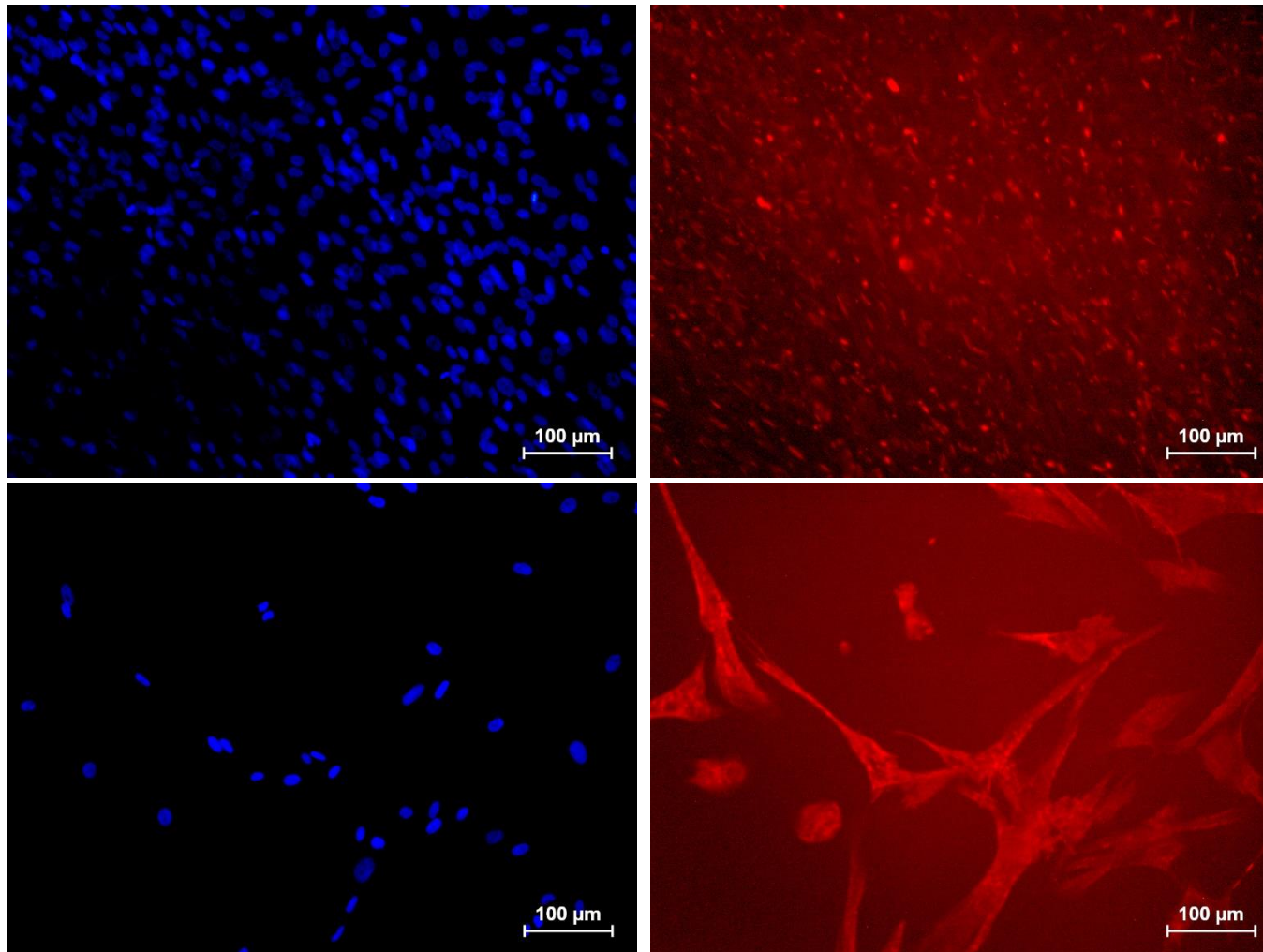


Abb. 14: Gingivafibroblasten auf Glas, Kontrollgruppe

(a) mittleres Messareal, Dapi-Färbung
(c) äußeres Messareal, Dapi-Färbung

(b) mittleres Messareal, Vimentin-Färbung
(d) äußeres Messareal, Vimentin-Färbung

Morphologie auf poliertem Titan

Zu beobachten war eine flächige Oberflächenbedeckung mit geringfügiger morphologischer Differenzierung. Es zeigten sich wenige Zellkontakte, nur teilweise mit Zellausläufern und kaum Teilungsprozesse mit mäßiger Orientierung.

Eigenschaft	Bewertung
mittlere Zellzahl pro 0,366 mm ² Messareal Mitte / Außen	233,1 / 31,0
Gesamtzellzahl pro Probekörper	15.314
Oberflächenbedeckung	flächig
morphologische Differenzierung	gering
Zellkontakte und -ausläufer	selten
Teilungsprozesse	selten
Orientierungsgrad	gering

Tab. 10: Fibroblastenmorphologie der Kontrollgruppe auf poliertem Titan

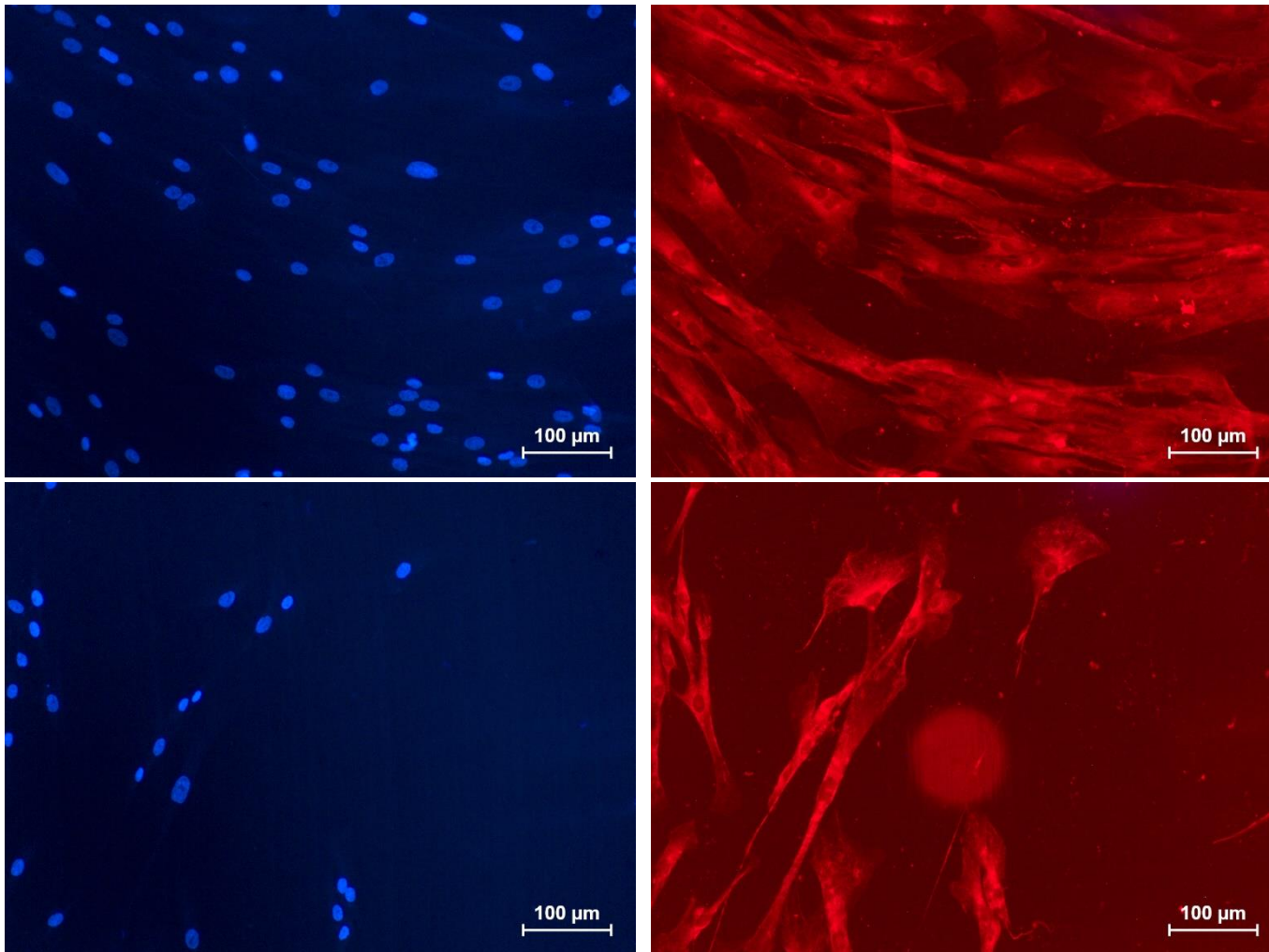


Abb. 15: Gingivafibroblasten auf poliertem Titan, Kontrollgruppe

(a) mittleres Messareal, Dapi-Färbung
(c) äußeres Messareal, Dapi-Färbung

(b) mittleres Messareal, Vimentin-Färbung
(d) äußeres Messareal, Vimentin-Färbung

Morphologie auf gestrahltem Titan

Die Zellen zeigten eine flächige Oberflächenbedeckung mit guter morphologischer Differenzierung und vielen Zellkontakten beziehungsweise Zellausläufern. Sie erschienen zwar etwas platter, jedoch mit hohem Orientierungsgrad und teilweise Teilungsprozessen.

Eigenschaft	Bewertung
mittlere Zellzahl pro 0,366 mm ² Messareal Mitte / Außen	102,9 / 12,8
Gesamtzellzahl pro Probekörper	6.612
Oberflächenbedeckung	flächig
morphologische Differenzierung	ausgeprägt
Zellkontakte und -ausläufer	häufig
Teilungsprozesse	teilweise
Orientierungsgrad	hoch

Tab. 11: Fibroblastenmorphologie der Kontrollgruppe auf gestrahltem Titan

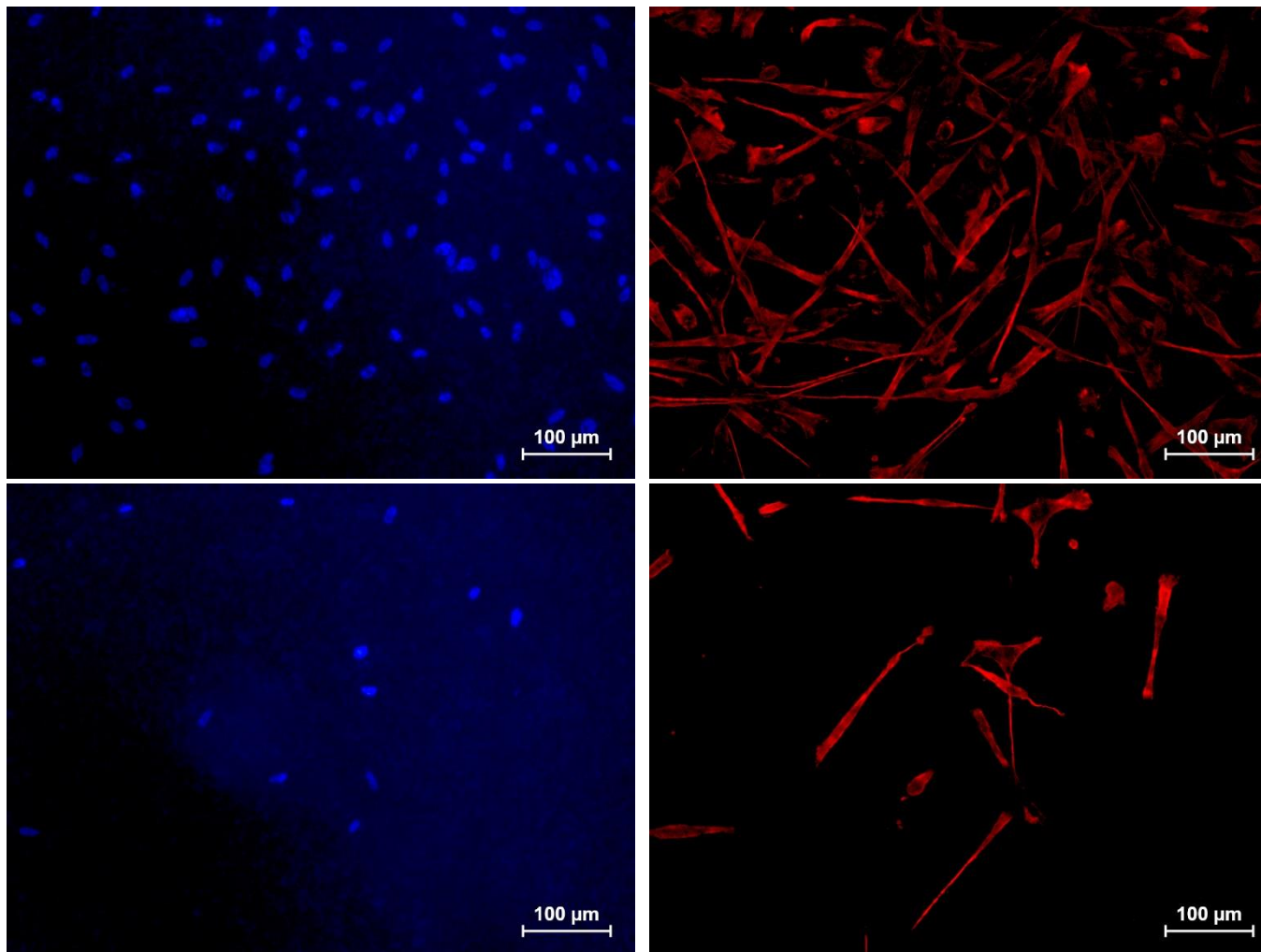


Abb. 16: Gingivafibroblasten auf gestrahltem Titan, Kontrollgruppe

(a) mittleres Messareal, Dapi-Färbung
(c) äußeres Messareal, Dapi-Färbung

(b) mittleres Messareal, Vimentin-Färbung
(d) äußeres Messareal, Vimentin-Färbung

4.2.3 Kaltplasma-Konditionierung vor Fibroblastenapplikation

Morphologie auf Glas

Die Zellen zeigten ein hohes Maß an Zellteilung, viele Zellkontakte und einen hohen Orientierungsgrad.

Eigenschaft		Bewertung
mittlere Zellzahl pro 0,366 mm ² Messareal	Mitte / Außen	283,6 / 59,6
relative Zellzahl vgl. mit der Kontrollgruppe	Mitte / Außen	88,3 % / 164,1 %
Gesamtzellzahl pro Probekörper		22.404
Oberflächenbedeckung		flächig
morphologische Differenzierung		ausgeprägt
Zellkontakte und -ausläufer		häufig
Teilungsprozesse		häufig
Orientierungsgrad		hoch

Tab. 12: Fibroblastenmorphologie auf Kaltplasma-konditioniertem Glas

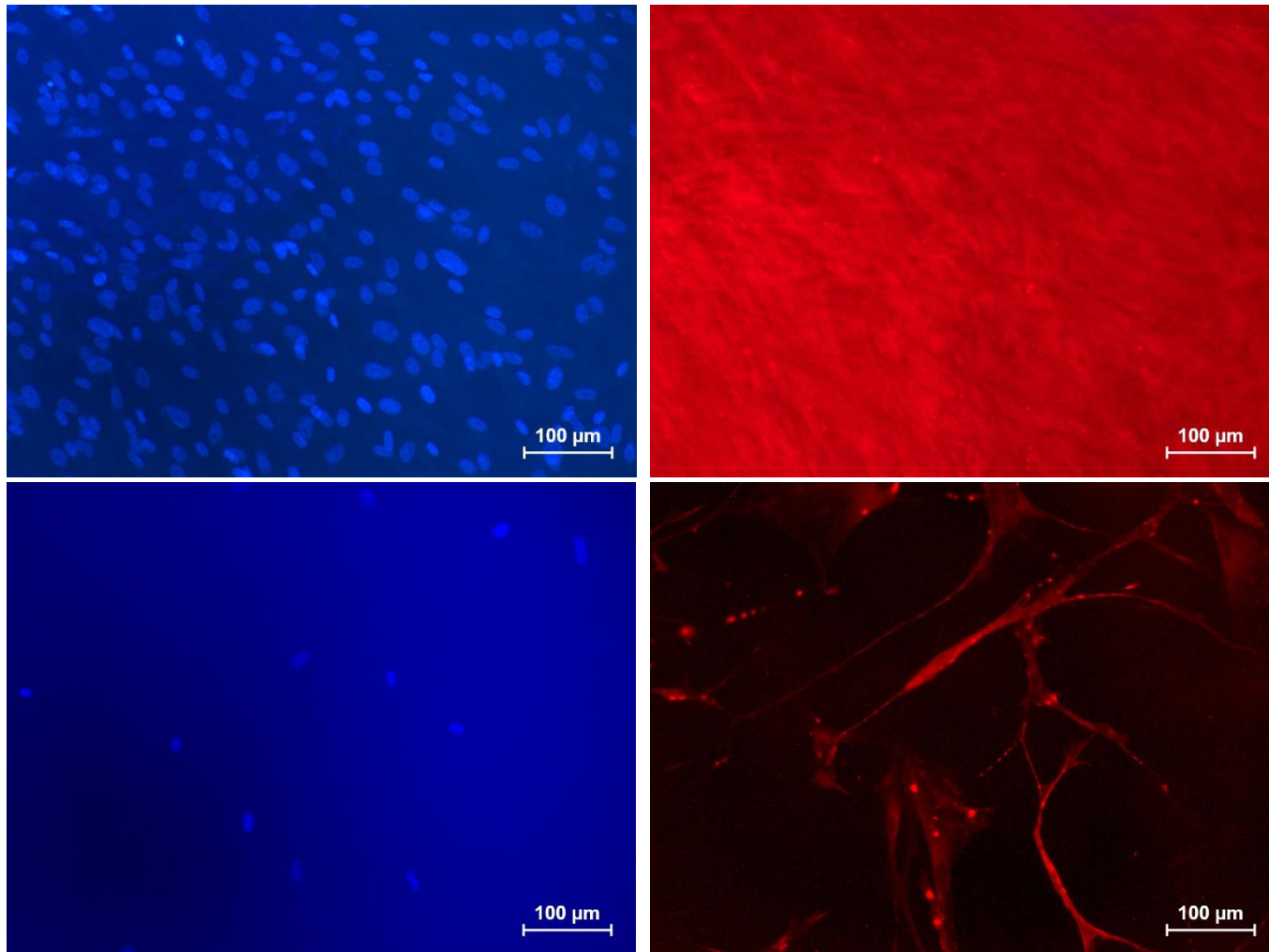


Abb. 17: Gingivafibroblasten auf Glas,
Kaltplasma-Konditionierung

(a) mittleres Mesenchym, Dapi-Färbung
(c) äußeres Mesenchym, Dapi-Färbung

(b) mittleres Mesenchym, Vimentin-Färbung
(d) äußeres Mesenchym, Vimentin-Färbung

Morphologie auf poliertem Titan

Die Zellen zeigten viel Zellteilung, dabei allerdings einen geringen Differenzierungsgrad. Morphologisch erschienen sie sehr schlank und eher kränkelnd. Zellkontakte waren nur geringfügig ausgeprägt. Auffällig ist die gegenüber der Kontrollgruppe stark erhöhte Zelldichte bei gleichzeitig eher negativem Zellbild.

Eigenschaft		Bewertung
mittlere Zellzahl pro 0,366 mm ² Messareal	Mitte / Außen	505,9 / 87,2
relative Zellzahl vgl. mit der Kontrollgruppe	Mitte / Außen	217,1 % / 281,8 %
Gesamtzellzahl pro Probekörper		36.681
Oberflächenbedeckung		flächig
morphologische Differenzierung		gering, kränkelnd
Zellkontakte und -ausläufer		selten
Teilungsprozesse		häufig
Orientierungsgrad		mäßig

Tab. 13: Fibroblastenmorphologie auf Kaltplasma-konditioniertem poliertem Titan

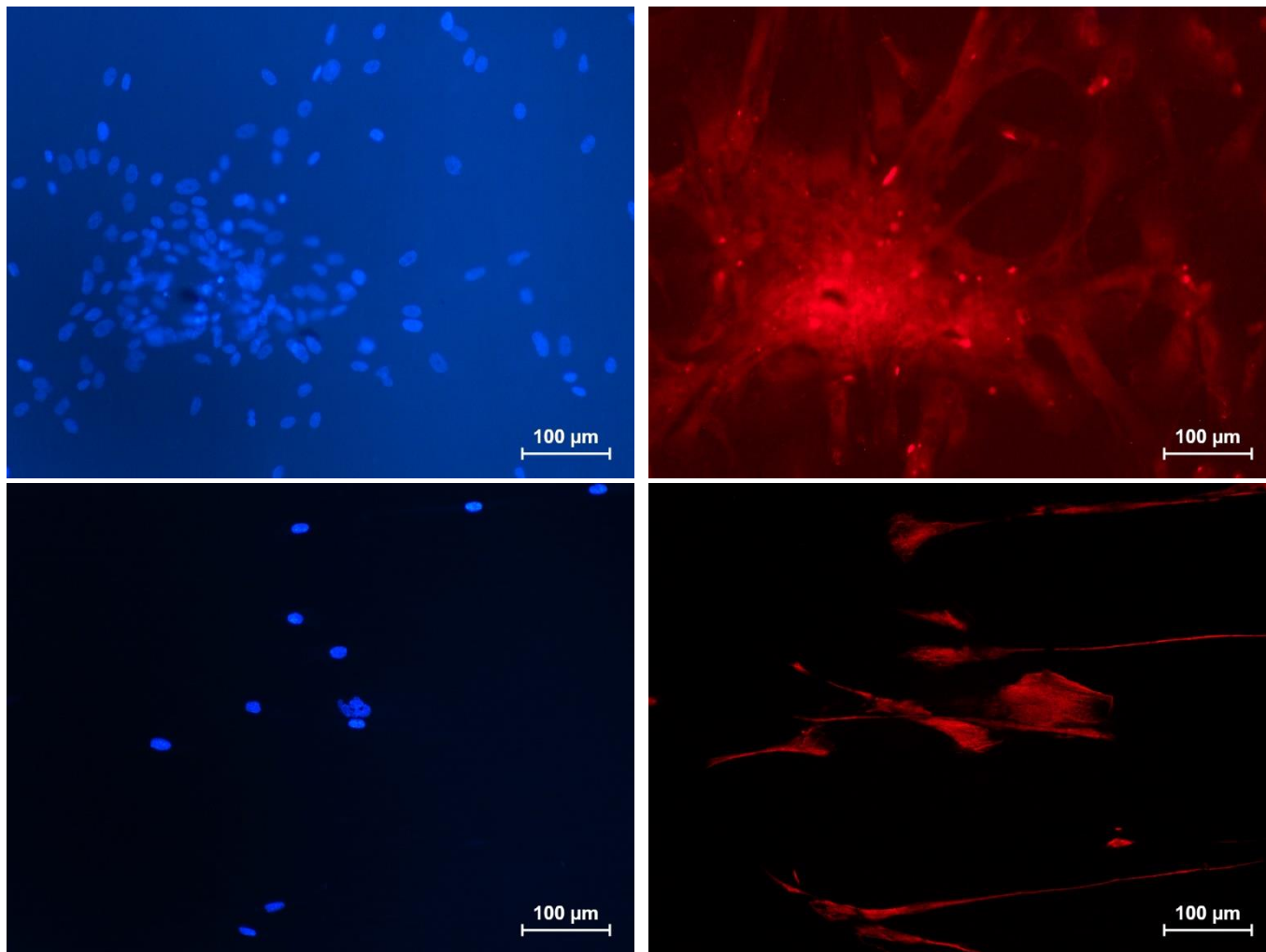


Abb. 18: Gingivafibroblasten auf poliertem Titan,
Kaltplasma-Konditionierung

(a) mittleres Messareal, Dapi-Färbung
(c) äußeres Messareal, Dapi-Färbung

(b) mittleres Messareal, Vimentin-Färbung
(d) äußeres Messareal, Vimentin-Färbung

Morphologie auf gestrahltem Titan

Die Zellen zeigten sich sehr langgezogen und dünn. Generell wirkten die Zellen eher kränkelnd.

Eigenschaft		Bewertung
mittlere Zellzahl pro 0,366 mm ² Messareal	Mitte / Außen	41,2 / 6,2
relative Zellzahl vgl. mit der Kontrollgruppe	Mitte / Außen	40,1 % / 48,8 %
Gesamtzellzahl pro Probekörper		2.842
Oberflächenbedeckung		flächig
morphologische Differenzierung		gering, schlank
Zellkontakte und -ausläufer		selten
Teilungsprozesse		selten
Orientierungsgrad		mäßig

Tab. 14: Fibroblastenmorphologie auf Kaltplasma-konditioniertem gestrahltem Titan

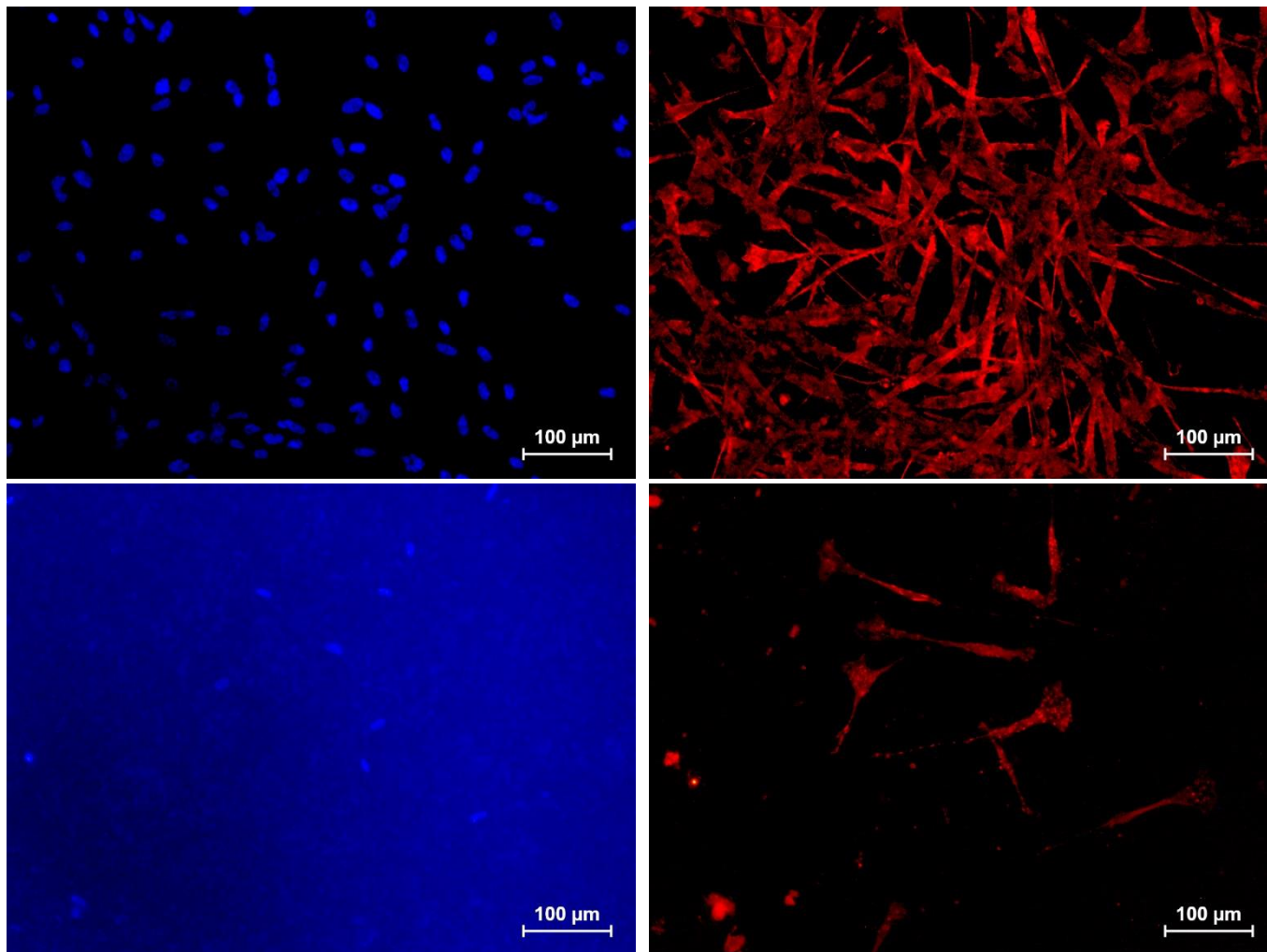


Abb. 19: Gingivafibroblasten auf gestrahltem Titan,
Kaltplasma-Konditionierung

(a) mittleres Messareal, Dapi-Färbung
(c) äußeres Messareal, Dapi-Färbung

(b) mittleres Messareal, Vimentin-Färbung
(d) äußeres Messareal, Vimentin-Färbung

4.2.4 Airpolishing-Konditionierung vor Fibroblastenapplikation

Morphologie auf poliertem Titan

Die Zellen zeigten eine zentral flächige Oberflächenbedeckung und einen hohen morphologischen Differenzierungsgrad. Sie wirkten lang, schlank und gesund. Es waren viele Zellkontakte ausgebildet und viele Teilungsprozesse sichtbar. Die Zellen erschienen orientiert mit vielen ausgebildeten Zellausläufern.

Eigenschaft		Bewertung
mittlere Zellzahl pro 0,366 mm ² Messareal	Mitte / Außen	436,5 / 37,0
relative Zellzahl vgl. mit der Kontrollgruppe	Mitte / Außen	187,3 % / 119,4 %
Gesamtzellzahl pro Probekörper		25.078
Oberflächenbedeckung		flächig
morphologische Differenzierung		ausgeprägt, gesund
Zellkontakte und -ausläufer		häufig
Teilungsprozesse		häufig
Orientierungsgrad		hoch

Tab. 15: Fibroblastenmorphologie auf Airpolishing-konditioniertem poliertem Titan

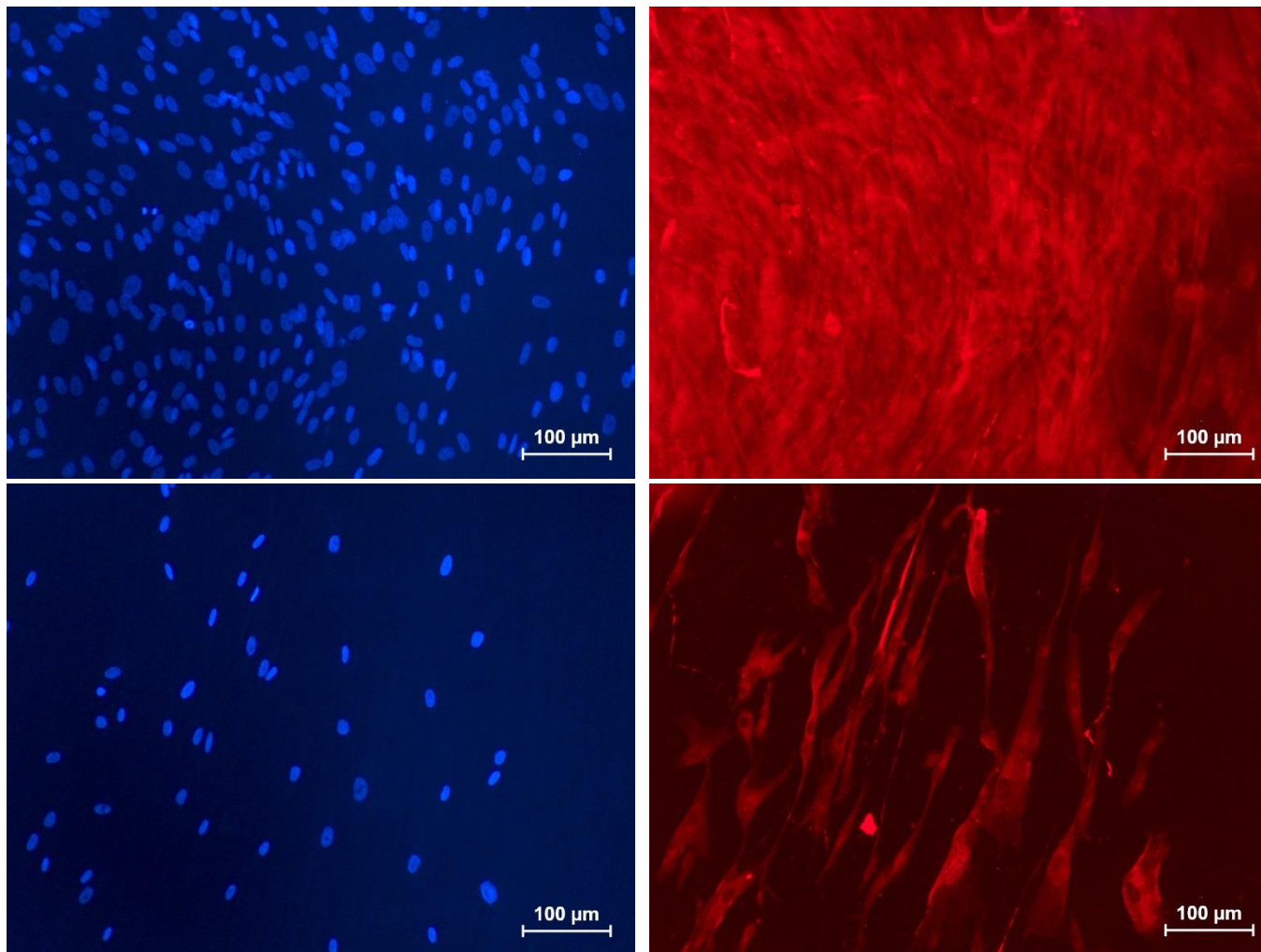


Abb. 20: Gingivafibroblasten auf poliertem Titan,
Airpolishing-Konditionierung

(a) mittleres Messareal, Dapi-Färbung
(c) äußeres Messareal, Dapi-Färbung

(b) mittleres Messareal, Vimentin-Färbung
(d) äußeres Messareal, Vimentin-Färbung

Morphologie auf gestrahltem Titan

Die Zellen zeigten eine flächige Oberflächenbedeckung mit geringfügiger Differenzierung. Teilweise waren Zellkontakte, jedoch kaum Teilungsprozesse zu beobachten. Die Morphologie war atypisch, eine Orientierung fehlte.

Eigenschaft		Bewertung
mittlere Zellzahl pro 0,366 mm ² Messareal	Mitte / Außen	153,6 / 25,5
relative Zellzahl vgl. mit der Kontrollgruppe	Mitte / Außen	149,3 % / 199,2 %
Gesamtzellzahl pro Probekörper		10.964
Oberflächenbedeckung		flächig
morphologische Differenzierung		gering, atypisch
Zellkontakte und -ausläufer		selten
Teilungsprozesse		selten
Orientierungsgrad		gering

Tab. 16: Fibroblastenmorphologie auf Airpolishing-konditioniertem gestrahltem Titan

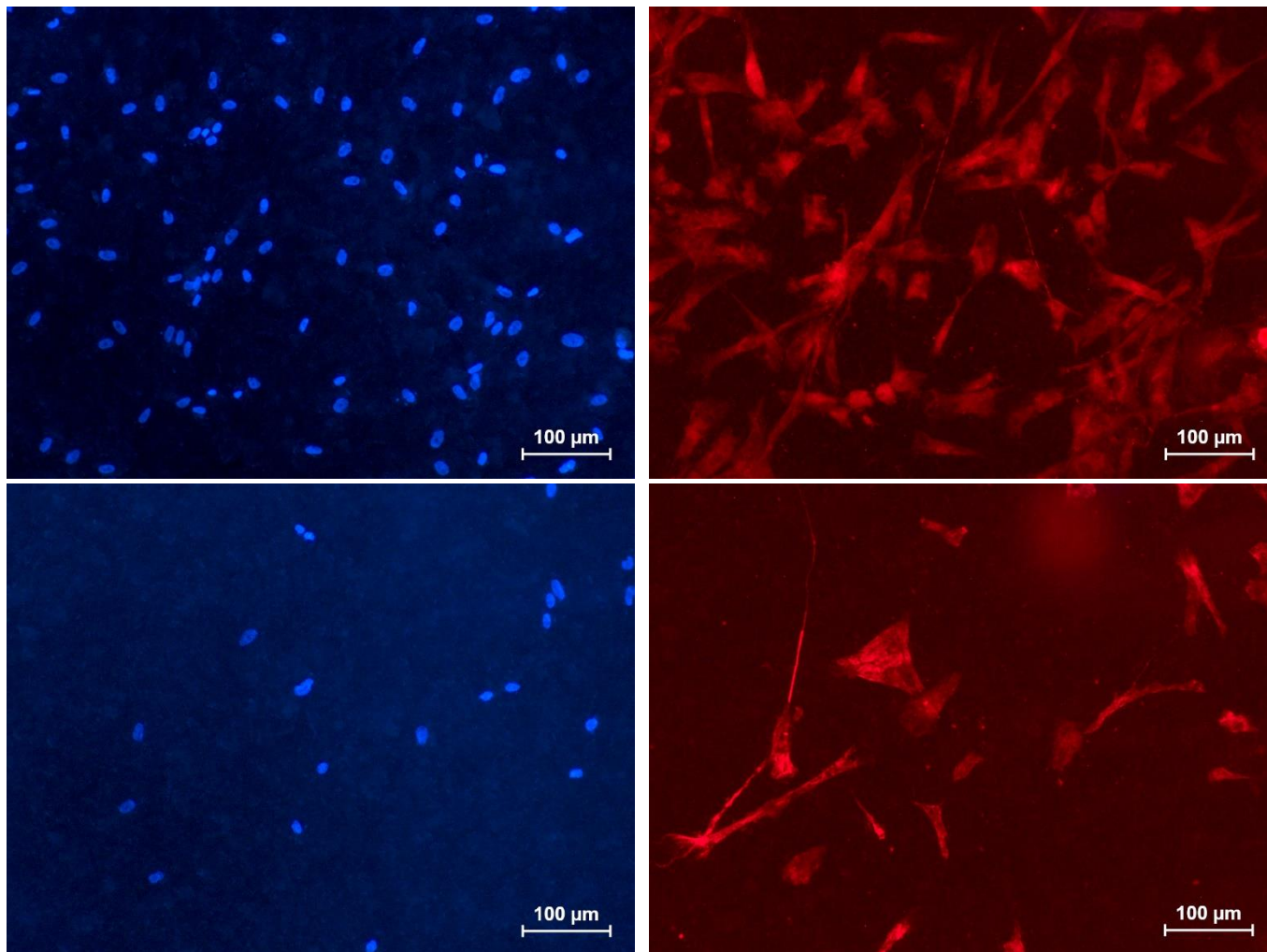


Abb. 21: Gingivafibroblasten auf gestrahltem Titan, Airpolishing-Konditionierung

(a) mittleres Messareal, Dapi-Färbung
(c) äußeres Messareal, Dapi-Färbung

(b) mittleres Messareal, Vimentin-Färbung
(d) äußeres Messareal, Vimentin-Färbung

4.2.5 Airpolishing- und Kaltplasma-Konditionierung vor Fibroblastenapplikation

Morphologie auf poliertem Titan

Die Zellen zeigten zentral eine flächige Oberflächenbedeckung mit hohem morphologischem Differenzierungsgrad und teilweise mit Zellkontakten. Viele Teilungsprozesse und ein hoher Orientierungsgrad konnten beobachtet werden. Insgesamt zeigten sich die Zellen sehr lang und schlank mit wenigen Zellausläufern.

Eigenschaft		Bewertung
mittlere Zellzahl pro 0,366 mm ² Messareal	Mitte / Außen	247,7 / 28,2
relative Zellzahl vgl. mit der Kontrollgruppe	Mitte / Außen	106,3 % / 91,2 %
Gesamtzellzahl pro Probekörper		15.476
Oberflächenbedeckung		flächig
morphologische Differenzierung		ausgeprägt, gesund
Zellkontakte und -ausläufer		selten
Teilungsprozesse		selten
Orientierungsgrad		hoch

Tab. 17: Fibroblastenmorphologie auf Airpolishing- und Kaltplasma-konditioniertem poliertem Titan

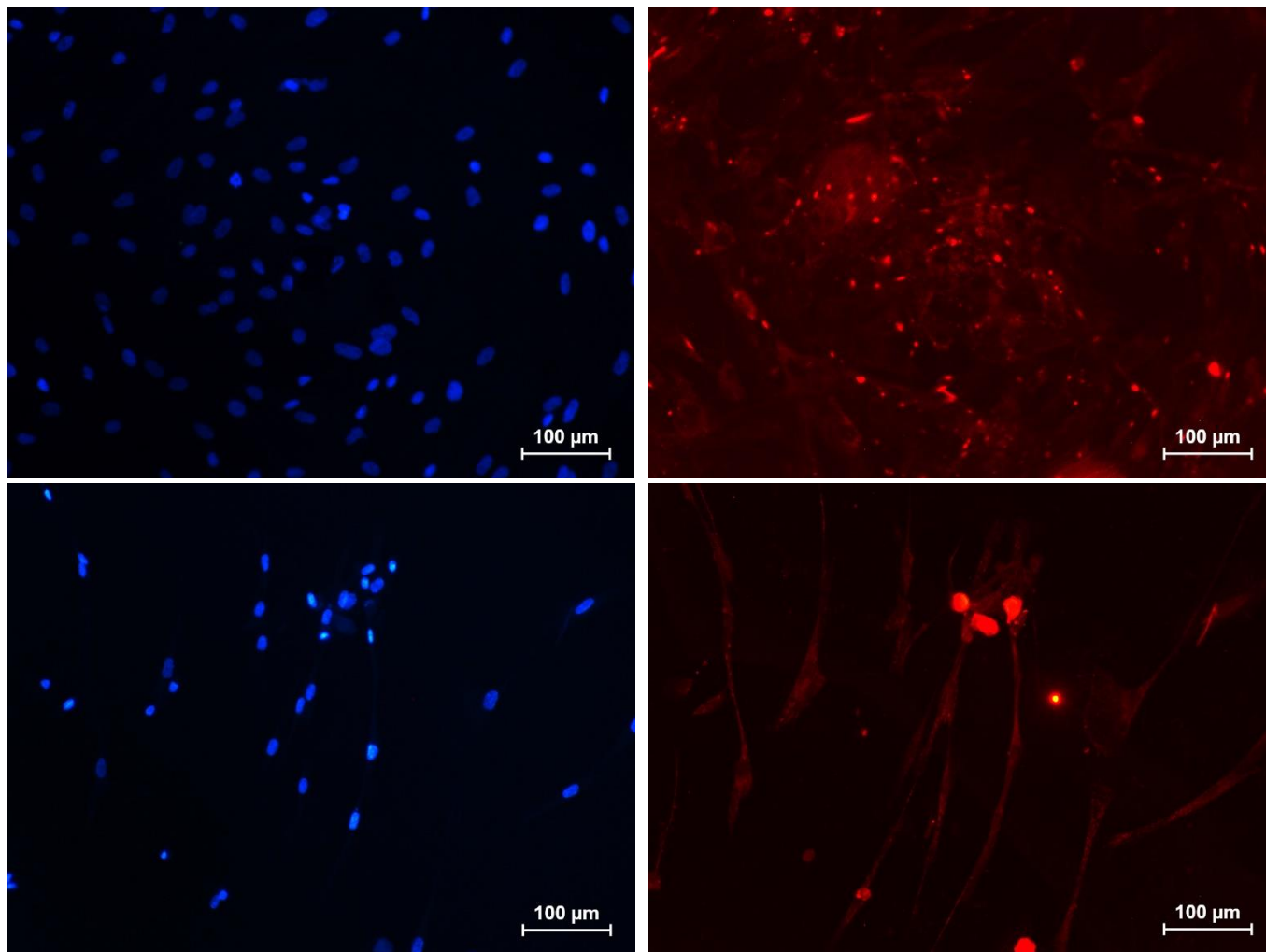


Abb. 22: Gingivafibroblasten auf poliertem Titan,
Airpolishing- und Kaltplasma-Konditionierung

(a) mittleres Messareal, Dapi-Färbung
(c) äußeres Messareal, Dapi-Färbung

(b) mittleres Messareal, Vimentin-Färbung
(d) äußeres Messareal, Vimentin-Färbung

Morphologie auf gestrahltem Titan

Die Zellen zeigten eine flächige Oberflächenbedeckung und kaum Differenzierung. Teilweise waren Zellkontakte ausgebildet. Teilungsprozesse waren kaum zu sehen. Die Zellen zeigten eine atypische Morphologie mit fehlender Orientierung und wenigen Zellausläufern.

Eigenschaft		Bewertung
mittlere Zellzahl pro 0,366 mm ² Messareal	Mitte / Außen	129,4 / 21,9
relative Zellzahl vgl. mit der Kontrollgruppe	Mitte / Außen	125,8 % / 170,8 %
Gesamtzellzahl pro Probekörper		9.305
Oberflächenbedeckung		flächig
morphologische Differenzierung		gering, atypisch
Zellkontakte und -ausläufer		teilweise
Teilungsprozesse		selten
Orientierungsgrad		gering

Tab. 18: Fibroblastenmorphologie auf Airpolishing- und Kaltplasma-konditioniertem gestrahltem Titan

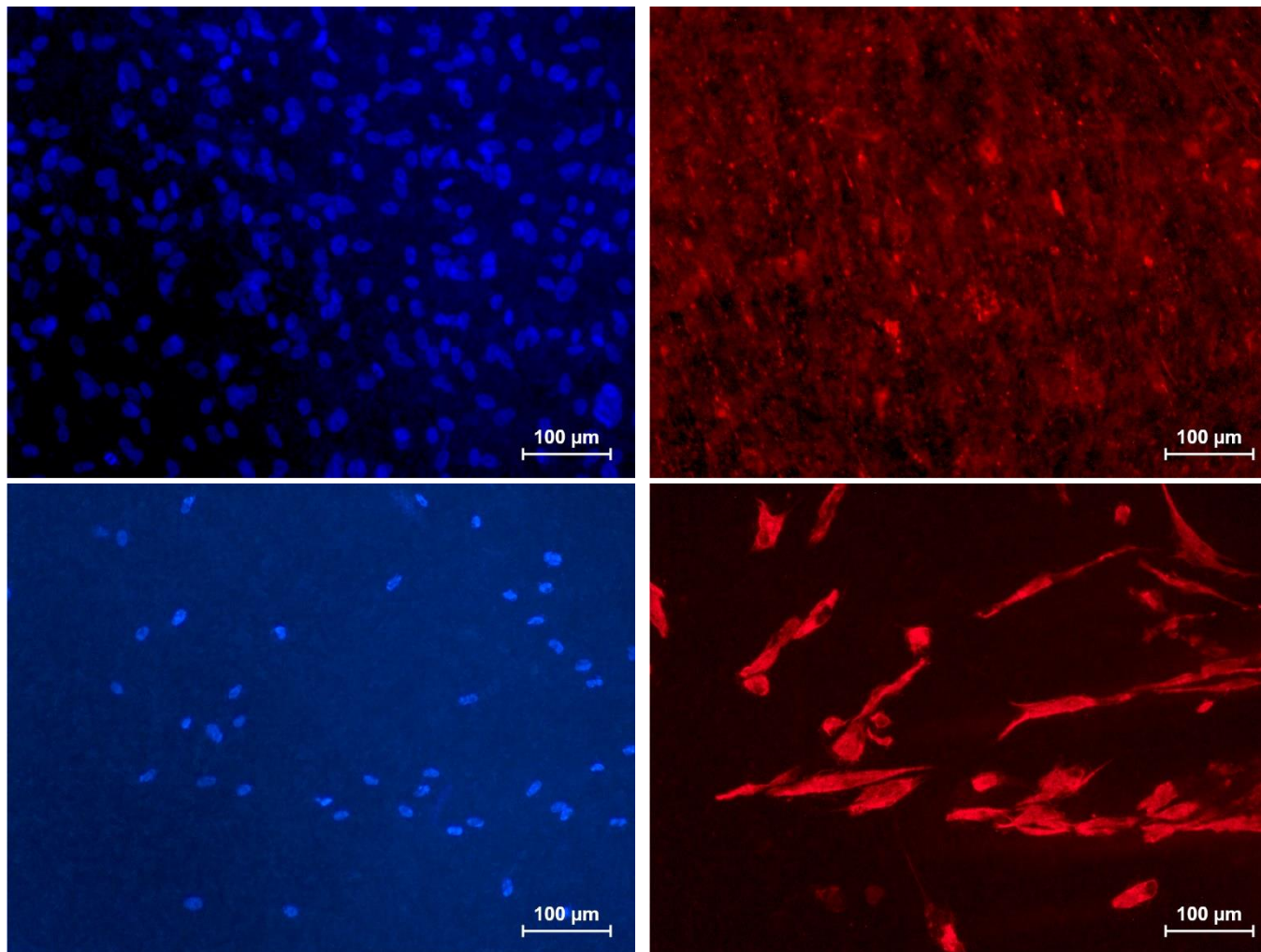


Abb. 23: Gingivafibroblasten auf gestrahltem Titan,
Airpolishing- und Kaltplasma-Konditionierung

(a) mittleres Messareal, Dapi-Färbung
(c) äußeres Messareal, Dapi-Färbung

(b) mittleres Messareal, Vimentin-Färbung
(d) äußeres Messareal, Vimentin-Färbung

4.2.6 HybenX-Konditionierung vor Fibroblastenapplikation

Morphologie auf poliertem Titan

Die Zellen zeigten zentral eine flächige Oberflächenbedeckung mit geringfügiger Differenzierung und teilweise mit Zellkontakten. Es waren kaum Teilungsprozesse vorhanden. Die Morphologie war atypisch verändert mit fehlender Orientierung und wenigen Zellausläufern.

Eigenschaft		Bewertung
mittlere Zellzahl pro 0,366 mm ² Messareal	Mitte / Außen	271,1 / 27,0
relative Zellzahl vgl. mit der Kontrollgruppe	Mitte / Außen	116,3 % / 87,1 %
Gesamtzellzahl pro Probekörper		16.261
Oberflächenbedeckung		flächig
morphologische Differenzierung		gering, atypisch
Zellkontakte und -ausläufer		selten
Teilungsprozesse		selten
Orientierungsgrad		gering

Tab. 19: Fibroblastenmorphologie auf HybenX-konditioniertem poliertem Titan

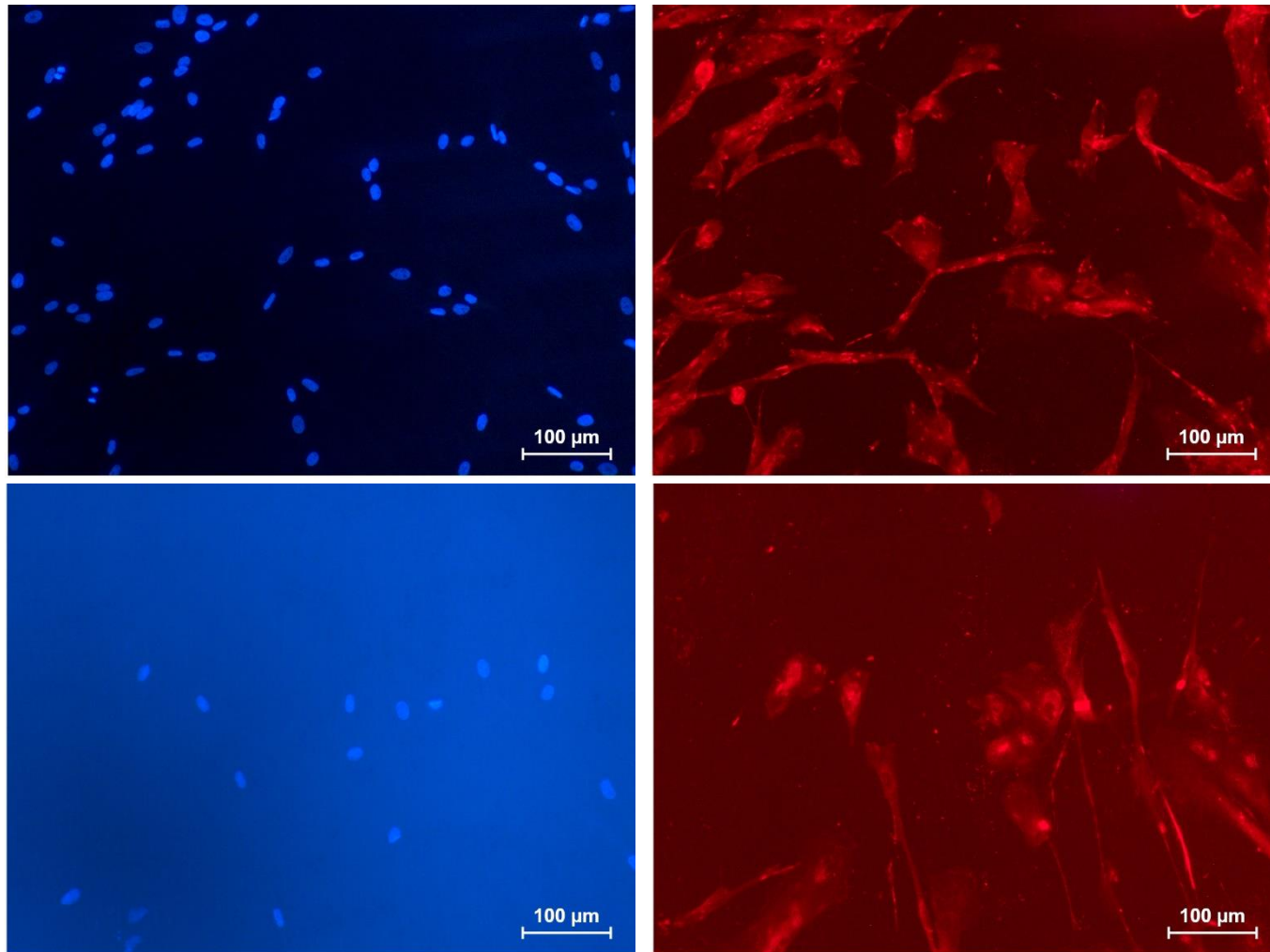


Abb. 24: Gingivafibroblasten auf poliertem Titan,
HybenX-Konditionierung

(a) mittleres Messareal, Dapi-Färbung
(c) äußeres Messareal, Dapi-Färbung

(b) mittleres Messareal, Vimentin-Färbung
(d) äußeres Messareal, Vimentin-Färbung

Morphologie auf gestrahltem Titan

Die Zellen zeigten zentral eine flächige Oberflächenbedeckung mit geringfügiger Differenzierung. Teilweise waren Zellkontakte ausgebildet. Es fanden sich kaum Teilungsprozesse. Insgesamt zeigte sich eine atypische Morphologie mit fehlender Orientierung.

Eigenschaft		Bewertung
mittlere Zellzahl pro 0,366 mm ² Messareal	Mitte / Außen	142,2 / 20,9
relative Zellzahl vgl. mit der Kontrollgruppe	Mitte / Außen	138,3 % / 163,4 %
Gesamtzellzahl pro Probekörper		9,693
Oberflächenbedeckung		flächig
morphologische Differenzierung		gering, atypisch
Zellkontakte und -ausläufer		selten
Teilungsprozesse		teilweise
Orientierungsgrad		gering

Tab. 20: Fibroblastenmorphologie auf HybenX-konditioniertem gestrahltem Titan

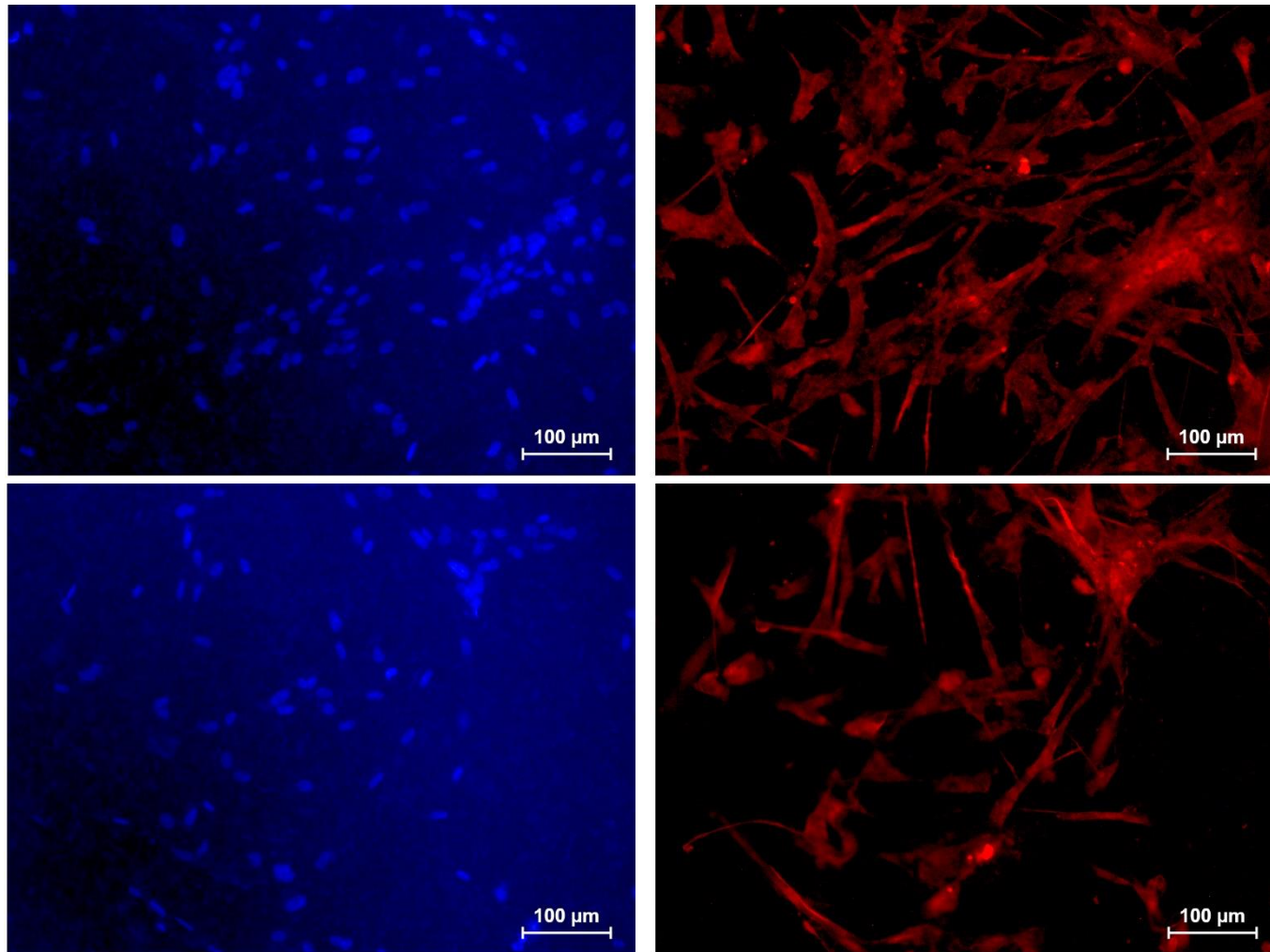


Abb. 25: Gingivafibroblasten auf gestrahltem Titan, HybenX-Konditionierung

(a) mittleres Messareal, Dapi-Färbung
(c) äußeres Messareal, Dapi-Färbung

(b) mittleres Messareal, Vimentin-Färbung
(d) äußeres Messareal, Vimentin-Färbung

4.2.7 HybenX-Konditionierung nach Fibroblastenapplikation

Morphologie auf Glas

Die Zellen zeigten eine geringe Oberflächenbedeckung, geringfügige Differenzierung und wenige Zellkontakte. Es waren kaum Teilungsprozesse, dafür aber eine atypische Morphologie und fehlende Orientierung erkennbar.

Eigenschaft		Bewertung
mittlere Zellzahl pro 0,366 mm ² Messareal	Mitte / Außen	2,9 / 2,6
relative Zellzahl vgl. mit der Kontrollgruppe	Mitte / Außen	0,9 % / 7,1 %
Gesamtzellzahl pro Probekörper		569
Oberflächenbedeckung		gering, atypisch
morphologische Differenzierung		gering
Zellkontakte und -ausläufer		selten
Teilungsprozesse		selten
Orientierungsgrad		gering

Tab. 21: Fibroblastenmorphologie nach HybenX-Konditionierung auf Glas

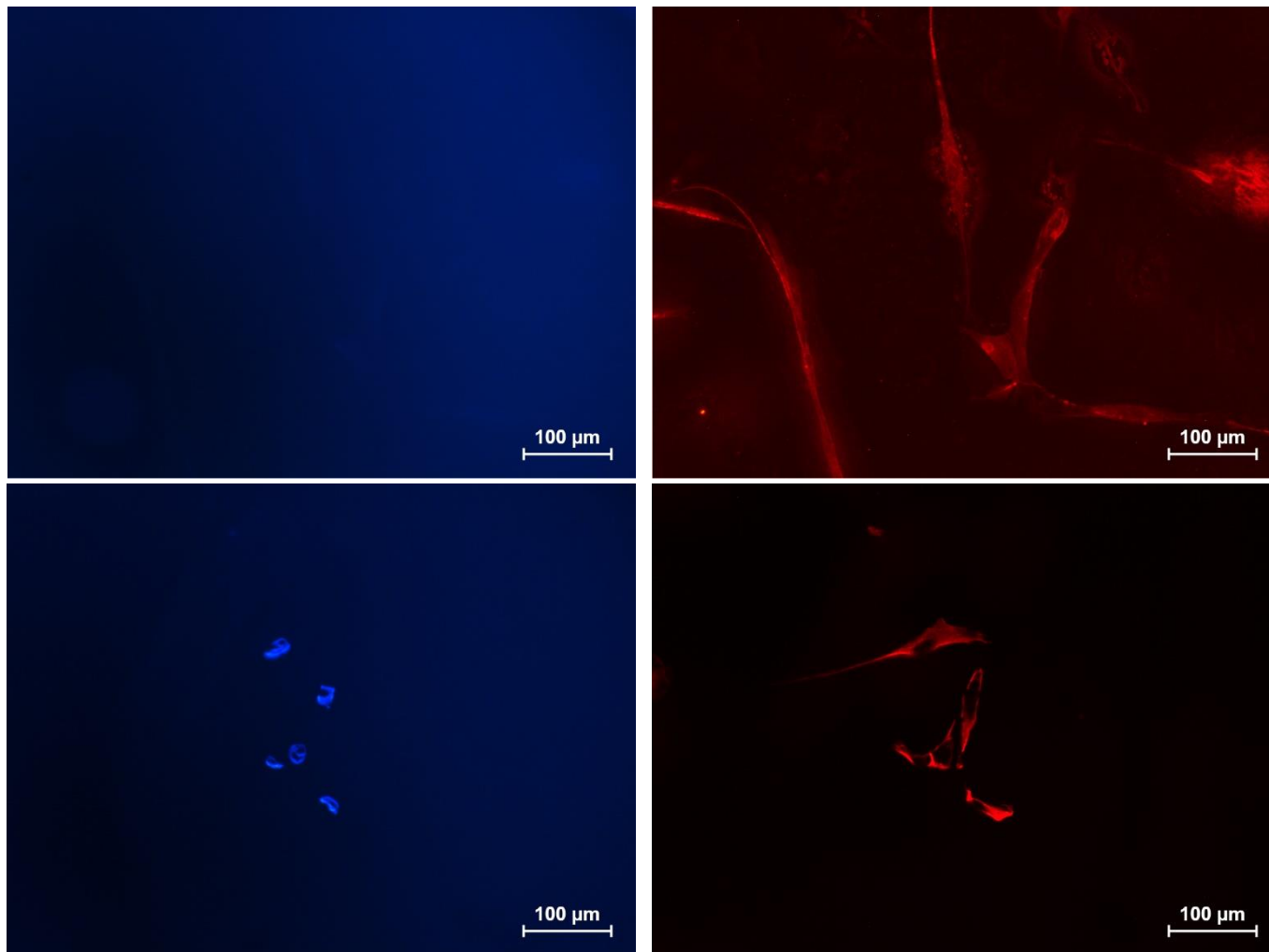


Abb. 26: Gingivafibroblasten auf Glas,
HybenX-Konditionierung

(a) mittleres Messareal, Dapi-Färbung
(c) äußeres Messareal, Dapi-Färbung

(b) mittleres Messareal, Vimentin-Färbung
(d) äußeres Messareal, Vimentin-Färbung

4.2.8 Kaltplasma-Konditionierung nach Fibroblastenapplikation

Morphologie auf Glas

Die Zellen zeigten eine geringe Oberflächenbedeckung mit atypischer Morphologie. Zumeist waren nur Zytoskelette vorhanden.

Eigenschaft		Bewertung
mittlere Zellzahl pro 0,366 mm ² Messareal	Mitte / Außen	59,1 / 5,4
relative Zellzahl vgl. mit der Kontrollgruppe	Mitte / Außen	18,4 % / 15,0 %
Gesamtzellzahl pro Probekörper		3.471
Oberflächenbedeckung		-
morphologische Differenzierung		atypisch
Zellkontakte und -ausläufer		-
Teilungsprozesse		-
Orientierungsgrad		-

Tab. 22: Fibroblastenmorphologie nach Kaltplasma-Konditionierung auf Glas

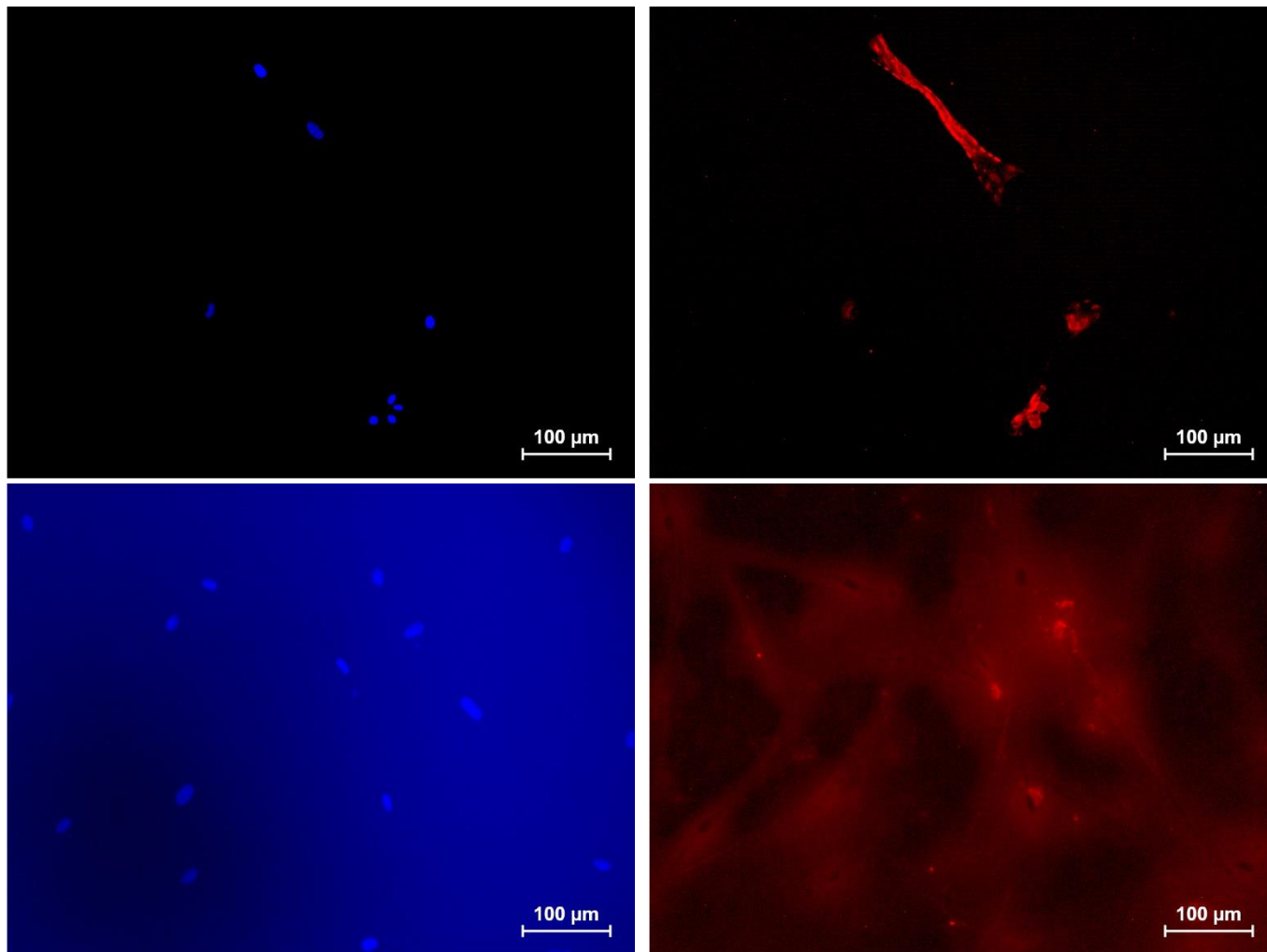


Abb. 27: Gingivafibroblasten auf Glas,
Kaltplasma-Konditionierung

(a) mittleres Messareal, Dapi-Färbung
(c) äußeres Messareal, Dapi-Färbung

(b) mittleres Messareal, Vimentin-Färbung
(d) äußeres Messareal, Vimentin-Färbung

Morphologie auf poliertem Titan

Es waren nur wenige Zellkerne sichtbar, die Zellkörper waren hauptsächlich Zytoskelette.

Eigenschaft		Bewertung
mittlere Zellzahl pro 0,366 mm ² Messareal	Mitte / Außen	23,8 / 11,2
relative Zellzahl vgl. mit der Kontrollgruppe	Mitte / Außen	10,2 % / 36,3 %
Gesamtzellzahl pro Probekörper		2.949
Oberflächenbedeckung		-
morphologische Differenzierung		atypisch
Zellkontakte und -ausläufer		-
Teilungsprozesse		-
Orientierungsgrad		-

Tab. 23: Fibroblastenmorphologie nach Kaltplasma-Konditionierung auf poliertem Titan

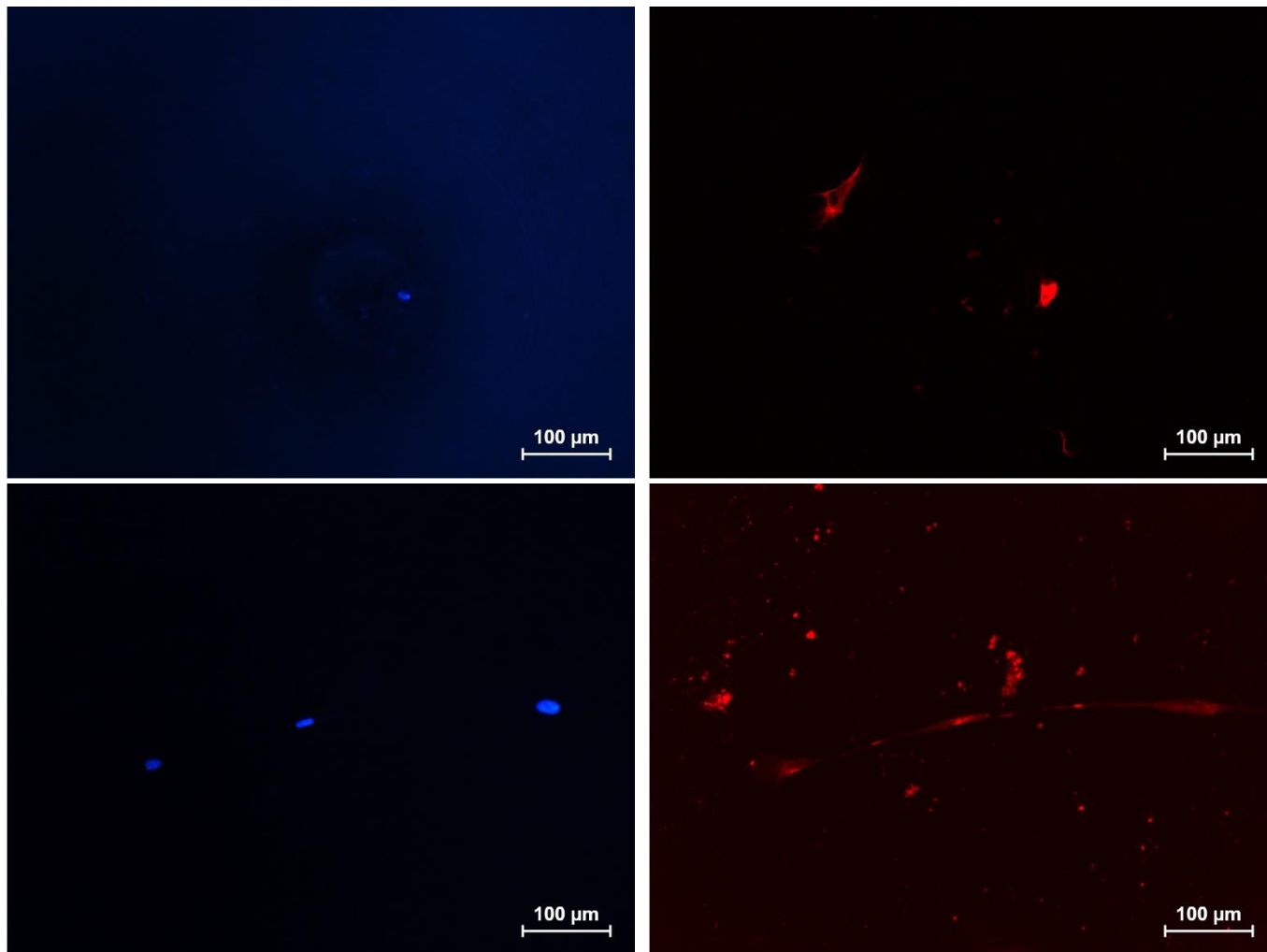


Abb. 28: Gingivafibroblasten auf poliertem Titan,
Kaltplasma-Konditionierung

(a) mittleres Messareal, Dapi-Färbung
(c) äußeres Messareal, Dapi-Färbung

(b) mittleres Messareal, Vimentin-Färbung
(d) äußeres Messareal, Vimentin-Färbung

Morphologie auf gestrahltem Titan

Es waren nur wenige Zellkerne sichtbar, die Zellkörper waren hauptsächlich Zytoskelette.

Eigenschaft		Bewertung
mittlere Zellzahl pro 0,366 mm ² Messareal	Mitte / Außen	14,7 / 2,7
relative Zellzahl vgl. mit der Kontrollgruppe	Mitte / Außen	14,3 % / 20,9 %
Gesamtzellzahl pro Probekörper		1.088
Oberflächenbedeckung		flächig
morphologische Differenzierung		atypisch
Zellkontakte und -ausläufer		-
Teilungsprozesse		-
Orientierungsgrad		-

Tab. 24: Fibroblastenmorphologie nach Kaltplasma-Konditionierung auf gestrahltem Titan

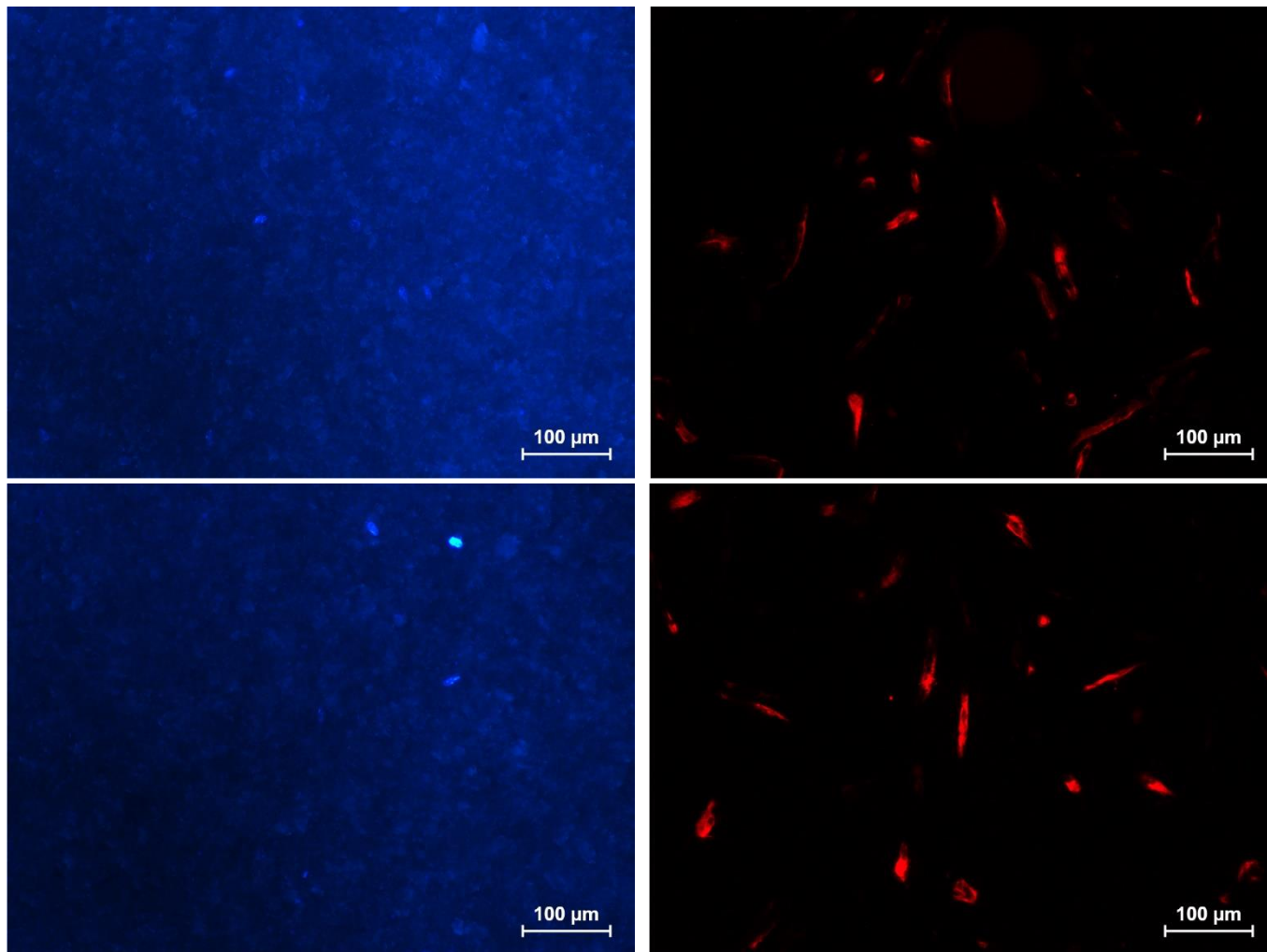


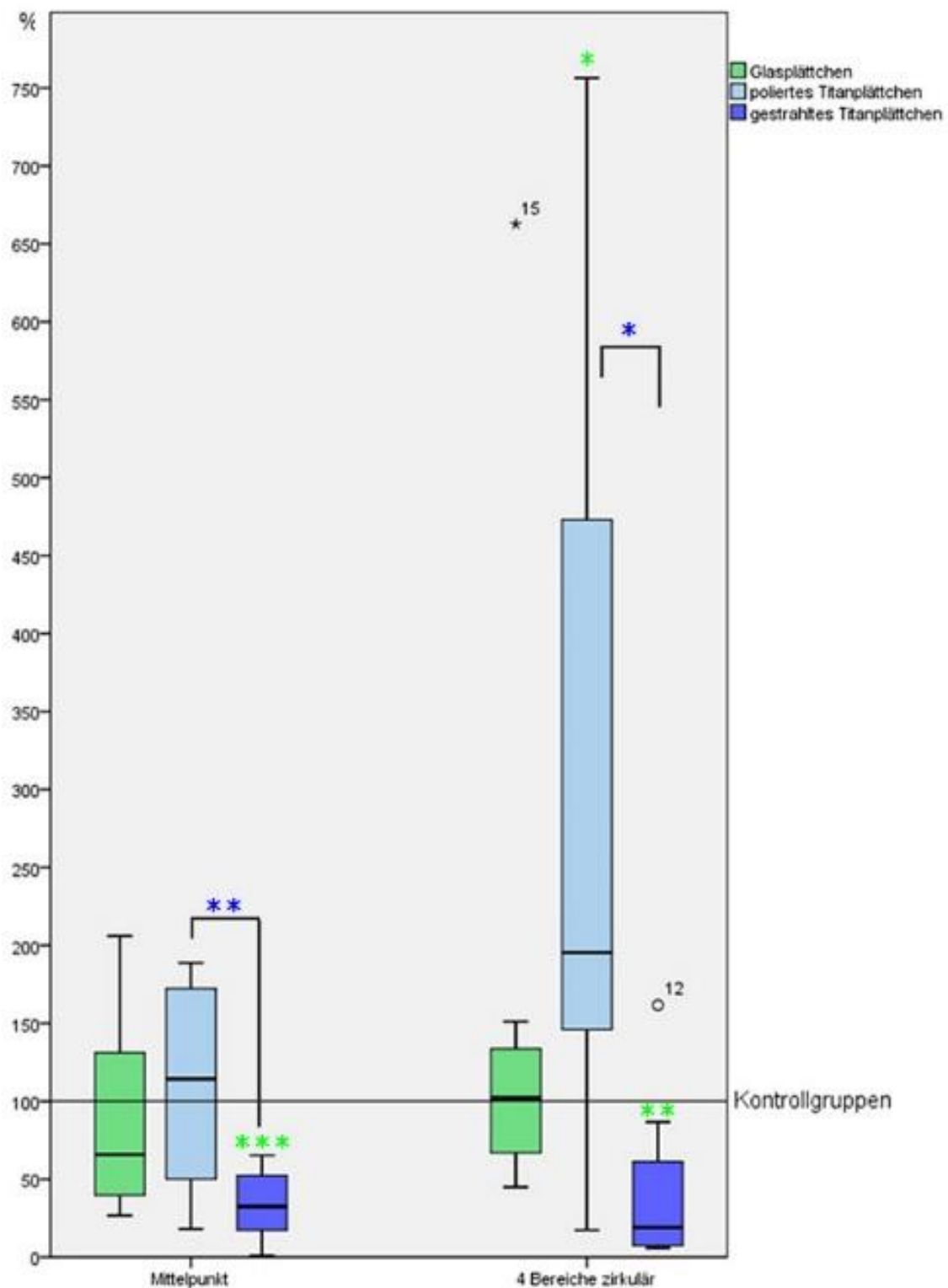
Abb. 29: Gingivafibroblasten auf gestrahltem Titan,
Kaltplasma-Konditionierung

(a) mittleres Messareal, Dapi-Färbung
(c) äußeres Messareal, Dapi-Färbung

(b) mittleres Messareal, Vimentin-Färbung
(d) äußeres Messareal, Vimentin-Färbung

4.3 Statistische Auswertung

Nachfolgend wurden die Versuchsergebnisse noch einmal graphisch aufgearbeitet. Hierbei wurden die Ergebnisse in prozentuale Relation zu den jeweiligen Kontrollgruppen gesetzt, welche dementsprechend der 100%-Marke entsprechen. Zudem wurden die Signifikanzen der verschiedenen Ergebnisse dargestellt.



Signifikanzen gegenüber:

100% Kontrollgruppe

Mitte gegenüber Außen

zwischen den Materialien

*

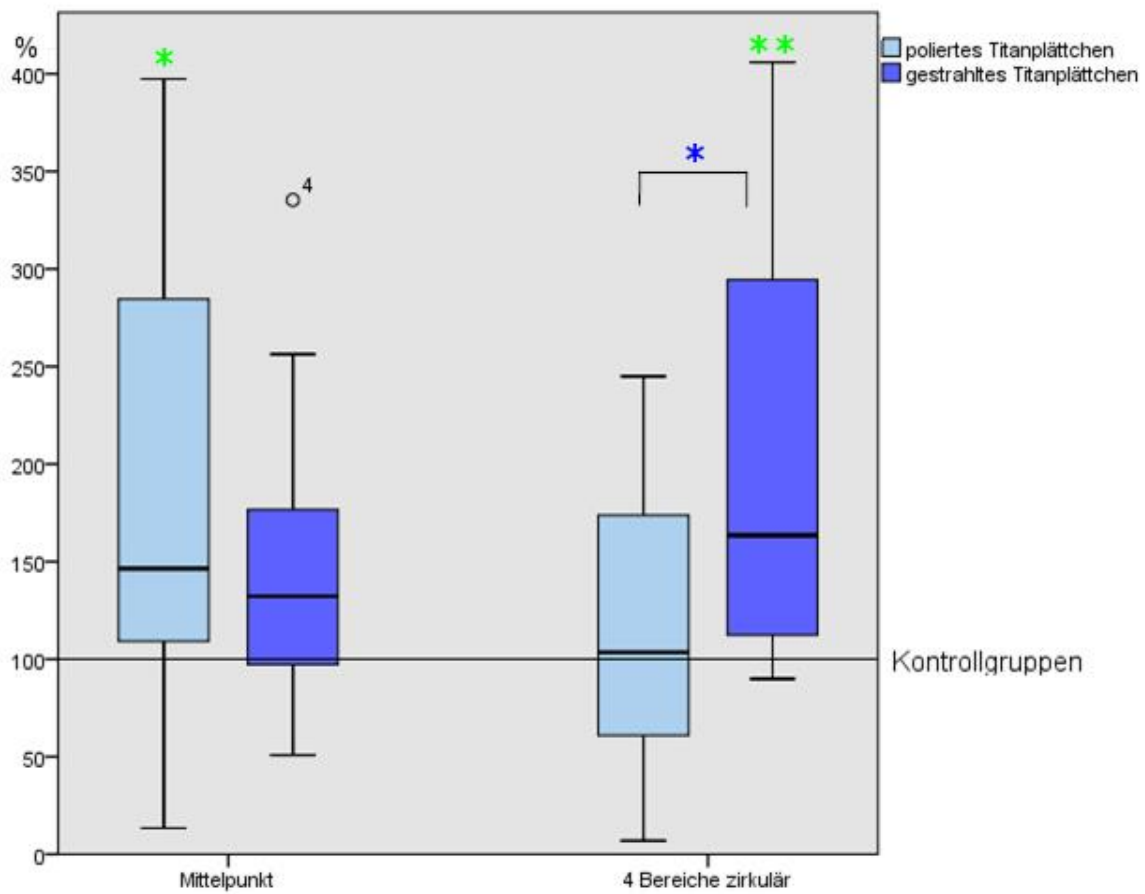
= signifikant

**

= sehr signifikant

= hoch signifikant

Abb. 30: Versuchsergebnisse Fibroblastenapplikation nach Kaltplasma-Konditionierung



Signifikanzen gegenüber:

100% Kontrollgruppe

Mitte gegenüber Außen

zwischen den Materialien

*

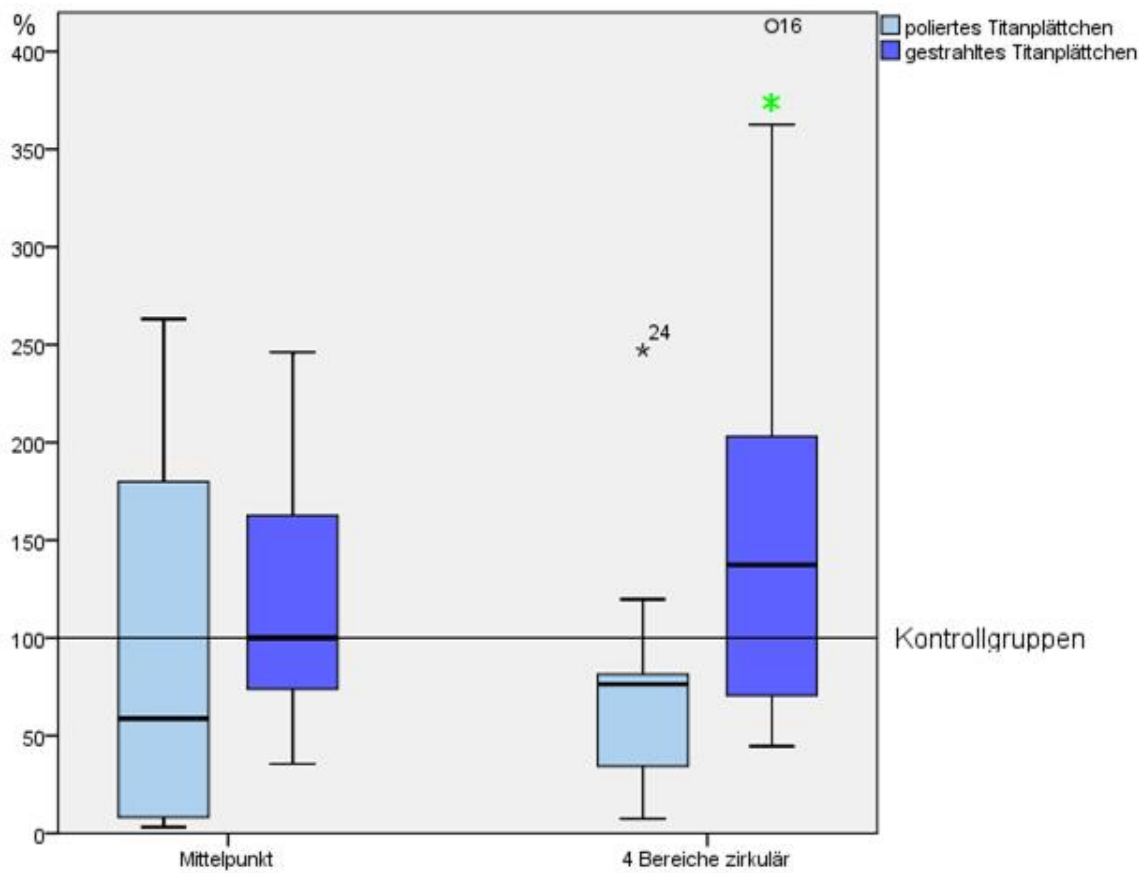
= signifikant

**

= sehr signifikant

= hoch signifikant

Abb. 31: Versuchsergebnisse Fibroblastenapplikation nach Airpolishing-Konditionierung



Signifikanzen gegenüber:

100% Kontrollgruppe

Mitte gegenüber Außen

zwischen den Materialien

*

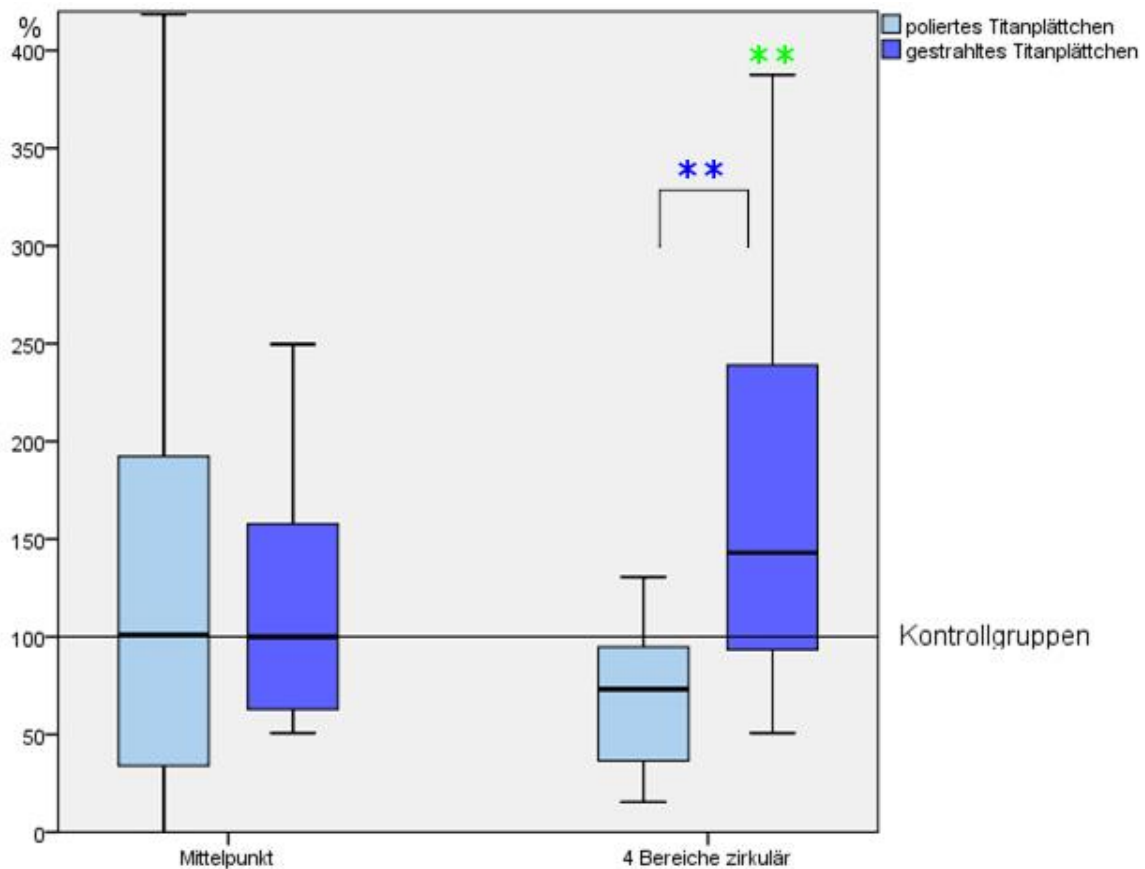
**

= signifikant

= sehr signifikant

= hoch signifikant

Abb. 32: Versuchsergebnisse Fibroblastenapplikation nach Airpolishing- und Kaltplasma-Konditionierung



Signifikanzen gegenüber:

100% Kontrollgruppe

Mitte gegenüber Außen

zwischen den Materialien

*

**

= signifikant

= sehr signifikant

= hoch signifikant

Abb. 33: Versuchsergebnisse Fibroblastenapplikation nach HybenX-Konditionierung

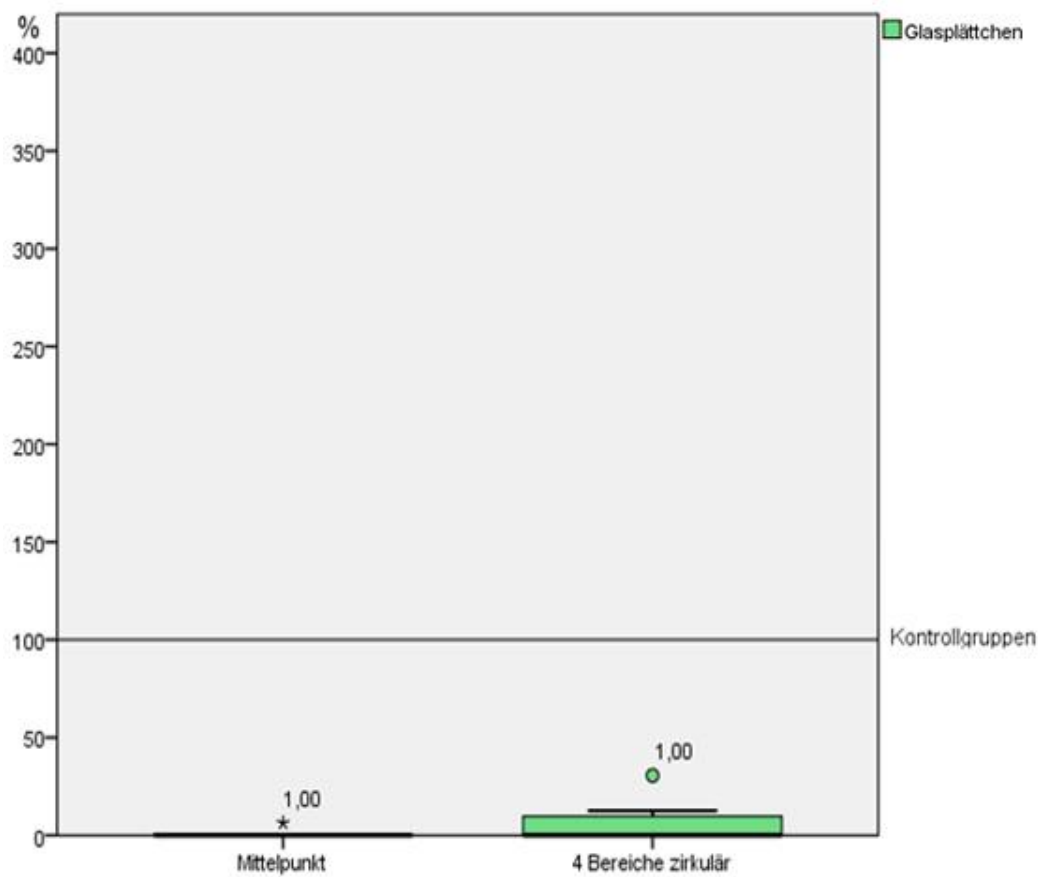
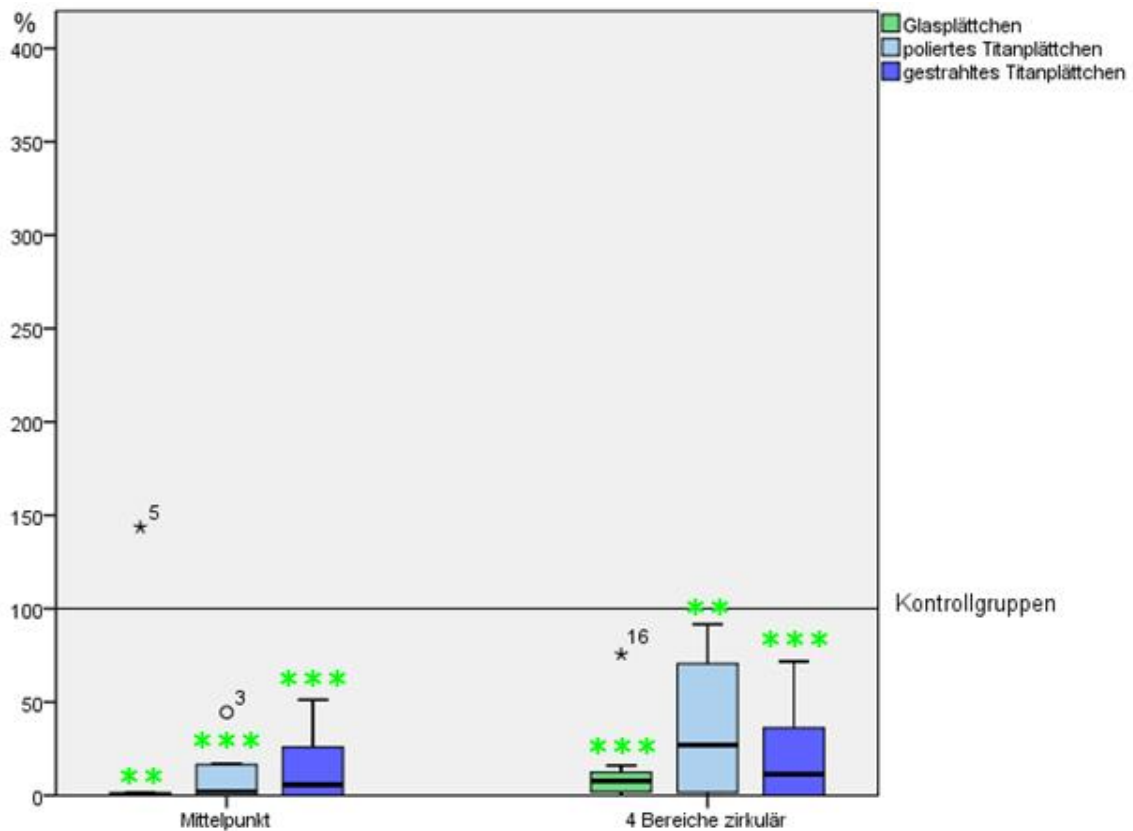


Abb. 34: Versuchsergebnisse HybenX-Konditionierung nach Fibroblastenapplikation



Signifikanzen gegenüber:

100% Kontrollgruppe

Mitte gegenüber Außen

zwischen den Materialien

*

= signifikant

**

= sehr signifikant

= hoch signifikant

Abb. 35: Versuchsergebnisse Kaltplasma-Konditionierung nach Fibroblastenapplikation

5 Diskussion

5.1 Methodenkritik

Im Verlauf der klinischen Funktion von Implantaten können Rezessionen beziehungsweise Periimplantitis entstehen, welche die Mikrostrukturen der Implantatoberflächen freilegen. Auf diesen Oberflächen lagern sich aufgrund ihrer Rauigkeit sehr schnell bakterielle Biofilme ab (Rabel et al. 2021). Für ihre Dekontamination können verschiedene Methoden verwendet werden. Das Ziel ist eine stabile Wiederanlagerung der periimplantären Mukosa an die Implantatoberfläche nach der Anwendung. Um zu untersuchen, inwieweit die Dekontaminationsmethoden die Implantatoberflächen chemisch oder mechanisch hinsichtlich der Adhäsion der Weichgewebszellen beeinflussen, wurde in dieser Arbeit ein In-vitro-Modell verwendet.

Für eine möglichst rasche Wiederanlagerung der Mukosa ist der oberflächenaktivierende Effekt von Kataplasma von großem Interesse. Der Einfluss von Kaltplasma auf die Benetzbarkeit von Titanoberflächen wurde in ähnlichen Untersuchungen bereits umfassend betrachtet (Ujino et al. 2019, Seon et al. 2015, Tschernin 2003). Da dies für Airpolishing und HybenX bisher nicht der Fall ist, wurde eine Benetzbarkeitsuntersuchung aller verwendeten Oberflächen- und Konditionierungsmethoden-Kombinationen vorgenommen.

Der erste Versuchsteil widmet sich den verschiedenen Dekontaminationsmethoden: physikalisch mit Kaltplasma, mechanisch mit Airpolishing, der Kombination mechanisch und physikalisch in Form von Airpolishing und Kaltplasma sowie chemisch mit HybenX. Bei der intraoralen Applikation von Plasma und HybenX

sind jedoch Auswirkungen auf das umliegende Gewebe zu erwarten, mit potenziellen Folgen für die Wiederanheftung an die Implantatoberfläche (Pini-Prato 2016). Deswegen wurden im zweiten Teil der Untersuchung HybenX und Kaltplasma auf einer vorher angezüchteten Zellschicht angewendet.

Gingiva besteht sowohl aus Keratinozyten als auch aus Fibroblasten. Da in früheren Versuchen jedoch Gingivafibroblasten verwendet wurden, wurden auch in dieser Arbeit für eine möglichst große Realitätsnähe und Vergleichbarkeit selbst angezüchtete Gingivafibroblasten verwendet (Schmage 2008, Schütte 2018, Mayer 2014, Pfeiffer 2004, Richard 2002).

Da bekannt ist, dass das Zellwachstum jeder Zelllinie variieren kann, wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet und jeder Versuchsansatz dreimal wiederholt, um die Kontinuität des Ergebnisses zu überprüfen. Trotzdem bleibt das Versuchsdesign dadurch limitiert, dass in einer Zellkultur nur eine Monolayer-Zellschicht ausgewertet werden kann, während in-vivo eine Multilayer-Gewebestruktur besteht. Aufgrund von variierendem Wachstumsverhalten von Fibroblasten auf unterschiedlichen Medien wurden Glasplättchen als Referenz zu den Implantatoberflächen genutzt. Insgesamt wurden zwei Referenzgruppen verwendet: Glasplättchen im Vergleich zu Titanoberflächen mit zwei verschiedenen Oberflächenstrukturen sowie die jeweils unbehandelte Oberflächenstruktur gegenüber den physikalischen, mechanischen beziehungsweise chemischen Vor- beziehungsweise Nachbehandlungen.

Als Zielparameter wurden die Zellzahl und die Zellmorphologie gewählt. Vergleichbare Literatur hat ebenfalls diese Parameter untersucht (Canullo et al. 2020, Lee et al. 2015, Shibli et al. 2003, Schmidt et al. 2017). Die Analyse von

Zellzahl und Morphologie ist die Basis der Zelluntersuchung und kann gegebenenfalls mit weiteren Methoden, wie zum Beispiel der metabolischen Aktivität, Proliferation, Zellviabilität oder Zytotoxizität, vertieft werden (Rabel et al. 2021, Guo et al. 2019, Kreisler et al. 2005). Dem Zellspreading, also der Verteilung der Zellen über die gesamte Oberfläche, wurde mit Messungen an insgesamt fünf Punkten je Plättchen Rechnung getragen.

Dadurch, dass initial in allen Gruppen jeweils 8.000 Zellen aufgebracht wurden, konnte nach dem Abstoppen des Wachstums die bis dahin gewachsene Zellzahl ermittelt werden. Für die Darstellungsform wurden relative Verhältnisse in Bezug auf die jeweilige Kontrollgruppe herangezogen, um mittels anerkannter wissenschaftlicher Methode die Vergleichbarkeit zu gewährleisten (Canullo et al. 2014, Seon et al. 2015).

5.2 Ergebniskritik

Bekanntermaßen verhält sich das Wachstum von Fibroblasten auf verschiedenen strukturierten Implantatoberflächen unterschiedlich. Strukturen mit geringer Rauigkeit, wie polierte Oberflächen mit einer Mittelrauigkeit von $<0,4 \mu\text{m}$ (Sawase et al. 2000, Quirynen et al. 1996), werden rasch von Fibroblasten überwachsen. Sie prägen sich morphologisch in ihrer typischen Form aus und bilden viele Zellkontakte miteinander (Schmage 2008). Diese Wuchsform entspricht der typischen Morphologie, die auch auf den Glasplättchen der Referenzgruppe beobachtet wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden neben polierten Titanoberflächen auch mikrorau, korundgestrahlte Titanproben mit einer Mittelrauigkeit von circa 0,8

µm verwendet. Auf den gestrahlten Implantatoberflächen befanden sich mit circa 6.600 Zellen nur ungefähr 34 % der auf den verglichenen Glasplättchen gewachsenen Zellen. Sie befanden sich hauptsächlich zentral auf den Glasplättchen und waren morphologisch ausgeprägt. In der Verteilung des Zellwachstums und der Häufung mittig und nach außen auslaufend zeigten alle Gruppen wenig Unterschiede und auch die Morphologie der Zellen zeigte keine erhebliche Variation. Dieses Verhalten ist konform zu früheren Arbeiten und den Erfahrungen aus der Literatur (Schmage 2008, Canullo et al. 2020).

Die Ergebnisse des Fibroblastenwachstums nach der Kaltplasma-Applikation stellten sich insbesondere auf der glatten Titanoberfläche vorteilhaft dar, was durch die Oberflächenaktivierung und die Reduktion der Oberflächenbenetzbarkeit erklärt werden kann. Die Oberflächenbenetzbarkeit reduziert sich ebenso auf Glas, jedoch geringer als bei der Titanoberfläche. Hierdurch lässt sich das entsprechend positive, jedoch in seiner quantitativen Ausprägung geringere Ergebnis erklären. Die Zellmorphologie zeigte sich sowohl auf polierten als auch auf gestrahlten Titanoberflächen sehr vorteilhaft ausgeprägt, was wiederum die Erfahrungen aus der Literatur bestätigt (Rabel et al. 2021, Lee et al. 2015). Allerdings bestand bei der gestrahlten Titanoberfläche eine Diskrepanz zwischen der guten Morphologie und der geringen Zellzahl. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Fibroblasten sich zwar gut auf der plasmabehandelten strukturierten Titanoberfläche anhaften, sich jedoch nicht so schnell über die Mikrorauigkeiten hinweg ausbreiten können, weshalb ihre Zahl bis zum Abstopzeitpunkt niedriger geblieben ist.

Somit kann der Einsatz von Kaltplasma auf polierten Titanoberflächen – zum Beispiel Abutments oder Gingivaformern – vor der Insertion am Patienten als sinnvoll bestätigt und unterstützt werden. Indes ist der Einsatz von Kaltplasma auf mikrostrukturierten Implantatkörpern vor der Insertion aus Sicht der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse nicht sinnvoll. Dieses entspricht jedoch nicht den Ergebnissen anderer Forschungsarbeiten. Sowohl Untersuchungen von Fibroblasten auf Kaltplasma-behandelten Titanoberflächen (Lee et al. 2015) als auch von Osteoblasten auf Kaltplasma-behandelten Titanoberflächen (Smeets et al. 2018, Henningsen et al. 2018a und 2018b) zeigen deutlich erhöhte Zelladhäsions- und -proliferationswerte und empfehlen die Kaltplasmabehandlung von Implantaten vor Insertion für weitere Untersuchungen. Auch eine Metaanalyse präklinischer Tierversuche von vor Insertion mit Kaltplasma behandelten Titanimplantaten zeigt deutlich erhöhten BIC (bone-to-implant contact) bei der Kaltplasmabehandlung (Pesce et al. 2020).

Das Airpolishing führte zu einem minimalen Abtrag der Titanoxidschicht von den Titanoberflächen und einer Abrundung der Rauigkeitsstrukturen, was auch in früheren Arbeiten beobachtet wurde (Kahili 2012, Thielemann 2012). Das Fibroblastenwachstum auf diesen Oberflächen ist von allen Vergleichsgruppen das beste und übersteigt die Zellanzahl der Kontrollgruppen erheblich, sowohl bei der polierten als auch bei der korundgestrahlten Oberfläche. Dies kann durch eine Aktivierung durch den Abtrag der Oxidschicht erklärt werden. Menini und Kollegen zeigten, dass die Oxidschicht der Titanoberflächen durch fünf Sekunden Airpolishing mit Glycin-Pulver entfernt wird, und konnten mittels EDX-Analyse erhöhte Mengen von Natrium, Sauerstoff und Silikonen an der Oberfläche

nachweisen (Menini et al. 2015). Die Morphologie der Gingivafibroblasten auf den polierten Titanoberflächen nach dem Airpolishing zeigt sich konform zu der hohen Zellzahl sehr gut differenziert. Dagegen ist die Morphologie der Gingivafibroblasten auf den gestrahlten Titanoberflächen schlechter ausgeprägt. Dies kann daran liegen, dass die Zellen sich auf der aktivierten Oberfläche zwar sehr schnell vermehren, jedoch nicht so differenziert ausprägen konnten.

Obwohl die Kombination aus mechanischer und physikalischer Dekontaminationsmethode (Airpolishing- und Kaltplasma-Konditionierung) zu einer ebenso guten Oberflächenbenetzbarkeit führte wie die ausschließliche Kaltplasmabehandlung, ergab die Kombination beider Methoden ein Ergebnis, welches sich nicht von der Kontrollgruppe unterscheidet. Dies ist verwunderlich, da beide Einzelmethoden – nur Kaltplasmabehandlung und nur Airpolishing – sowohl auf der polierten als auch auf der korundgestrahlten Titanoberfläche zu einer signifikanten Steigerung der Fibroblastenanzahl führte. Zudem sind die Gingivafibroblasten morphologisch etwas untypisch ausgeprägt. Daher kann zum jetzigen Zeitpunkt eine solch kombinierte Anwendung klinisch nicht empfohlen werden.

Die Applikation von HybenX auf Titan zeigte keine relevanten Unterschiede gegenüber den unbehandelten Flächen bezüglich der Zellzahl. Dies ist insofern nicht verwunderlich, da die Substanz vor dem Auftragen der Zellen sorgfältig abgespült wurde. Nichtsdestotrotz fällt die Veränderung der Wachstumsmorphologie der Fibroblasten auf. Auf polierten Titanoberflächen sahen sie glatter und undifferenzierter aus, während sie sich auf gestrahlten Titanoberflächen zwar länglich differenziert, jedoch in atypischer Form zeigten. Dieses spricht dafür, dass es doch chemische Rückstände auf den Oberflächen gegeben haben dürfte, welche

die morphologische Ausprägung der Zellen beeinträchtigten. Eine Anwendung vor Implantat- oder Abutment-Insertion ist aus Sicht dieser Arbeit daher nicht sinnvoll.

Die chemische Behandlung von Gingivafibroblasten mit HybenX führte zum Absterben der Zellen und einer Auflösung der Zellstruktur. Aus diesem Grund wurden die Versuche mit HybenX auf Zellen abgebrochen, nachdem die Versuche mit Fibroblasten auf Glasplättchen den letalen Effekt eindeutig nachgewiesen hatten. Zum Produkt HybenX liegen bislang keine evidenzbasierten Studien vor. Einige Falldarstellungen sind in der Literatur verfügbar (siehe Tabelle 3). In einer Falldarstellung und in der Produktbeschreibung des Herstellers wird von einer Dehydrierung der oberflächlichen Zellschichten nach intraoraler Applikation gesprochen, weshalb sich diese Oberfläche weißlich verändern würde (EPIEN Medical 2017, Pini-Prato 2016). Da die Lösung HybenX unter anderem aus Schwefelsäure besteht, ist zu erwarten, dass die Zellen verätzt und bei der Reaktion mit der Schwefelsäure so weit dehydriert werden, dass sie absterben und ihr Zellskelett aufgelöst wird. Inwieweit sich diese Reaktion in tiefere Zellschichten fortsetzt, kann aufgrund dieser Arbeit nicht aufgezeigt werden. Die Erforschung dieses Vorgangs ist dringlich zu empfehlen, bevor die Nutzung des Produktes in-vivo freigegeben wird.

Angesichts der sehr positiven Ergebnisse für das Zellwachstum nach Plasmabehandlung ist die Anwendung von Kaltplasma intraoral nach Dekontamination von bereits osseointegrierten Implantaten wünschenswert und hilfreich für die Wiederanlagerung der Mukosa. Allerdings gilt auch hier, dass zwangsläufig das umliegende Gewebe des osseointegrierten Implantates mitbetroffen ist. Die

Kaltplasma-Behandlung der Oberflächen erzeugt Hitze. Die Wärmeentwicklung des von uns verwendeten Geräts wurde mit $< 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ angegeben (relyon plasma 2021). Aus diesem Grund wurde in dieser Untersuchung auch das Kaltplasmaverfahren auf einer Zellschicht auf den jeweiligen Implantatoberflächen angewendet. Allerdings führte es zu einer erheblichen Verbrennung der Zellen. Jegliche Feuchtigkeit der Oberflächen wurde verdampft. Es überlebte jeweils nur eine minimale Zellzahl, welche so erhebliche morphologische Einschränkungen zeigte, dass unklar ist, ob ein weiteres Wachstum überhaupt möglich wäre. Ebenfalls fraglich ist, ob auch der periimplantäre Knochen von dieser Wärmeentwicklung beeinträchtigt werden könnte. Dessen thermische Belastbarkeit ist bereits bei 44°C erreicht (Eriksson und Albrektsson 1984). Auch hier ist eine Untersuchung des Einflusses auf Multilayer-Gewebestrukturen vor der Freigabe für In-vivo-Versuche erforderlich.

6 Schlussfolgerung

- Beide Nullhypothesen müssen abgelehnt werden.
- Die Konditionierung von polierten Titanoberflächen mit Kaltplasma hat sich bewährt und kann unter der Voraussetzung weiterer klinischer Testung aus Sicht dieser Studie für die klinische Anwendung empfohlen werden.
- Die Applikation von Airpolishing auf die Implantatoberfläche verbessert das Fibroblastenwachstum erheblich, wodurch eine Konditionierung der periimplantären Implantatoberfläche nach Reinigung sinnvoll erscheint.
- Die Kombination beider Verfahren (Airpolishing und Kaltplasma-Anwendung) hat keinen zusätzlichen positiven Effekt. Weshalb die Wirksamkeit bei Kombination beider Methoden nachlässt, sollte in zukünftigen Untersuchungen weiter beleuchtet werden.
- Die beiden Konditionierungsmethoden HybenX und Kaltplasma sind schädlich für vitale Zellen und sollten intraoral keine Anwendung finden.
- HybenX scheint auch bei der Vorbehandlung von Implantatbestandteilen extraoral Rückstände zu hinterlassen, die das Zellwachstum modifizieren.

7 Zusammenfassung

Ziele – In dieser In-vitro-Untersuchung wurde der Einfluss von drei verschiedenen Implantatreinigungsmethoden (Kaltplasma, Luft-Pulver-Wasserstrahl mit Glycin-Pulver und antibakterielles Gel) auf das Gingivafibroblastenwachstum untersucht. Prüfgrößen waren die Zellzahl und -morphologie, welche auf vorkonditionierten Oberflächen sowie nach Konditionierungskontakt von Fibroblasten untersucht wurden.

Material und Methoden – Glas, poliertes Titan und korundgestrahltes Titan wurden konditioniert und anschließend mit Fibroblasten besiedelt. Zudem wurden bereits mit Fibroblasten bewachsene Oberflächen mit den gleichen Methoden bearbeitet. Nach 96 Stunden wurde das Wachstum abgestoppt und die Fibroblasten zur Auswertung angefärbt.

Ergebnisse – Kaltplasma verbesserte die Benetzbarkeit aller Oberflächen. Das Fibroblastenwachstum war auf poliertem Titan besonders hoch (2,2- bis 2,8-fache Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe). Airpolishing verbesserte das Wachstum auf polierten (1,2- bis 1,9-fache Zellzahl) und gestrahlten (1,5- bis 2,0-fach) Oberflächen. Beide Methoden in Kombination zeigten schwächere Ergebnisse (poliert: 0,9- bis 1,1-fach, gestrahlt: 1,3- bis 1,7-fach). HybenX führte zwar teilweise zu einer leichten Zunahme der Zellzahl, jedoch auch zu massiven morphologischen Defiziten. Die Applikation von HybenX auf vitale Zellen führte zu deren Dehydrierung und einer fast vollständigen Dezimierung der Zellen (0,0- bis 0,1-fache Zellzahl). Die Applikation von Kaltplasma auf vitale Zellen verbrannte diese, wodurch maximal 36 % der Zellzahl der Kontrollgruppe erreicht wurde.

Fazit – Die Konditionierung von Titanoberflächen mit Airpolishing hat das Fibroblastenwachstum maßgeblich verbessert. Dasselbe gilt für die Plasmakonditionierung polierter Titanoberflächen. Beide Methoden in Kombination zeigten ebenso wie die Konditionierung mit HybenX weniger Erfolg. Sowohl die Kaltplasma-Applikation als auch die von HybenX wirkten sich letal auf vorhandene Fibroblasten aus.

8 Summary

Objectives – In this in-vitro study, the influence of three different implant cleaning methods (cold plasma, air-powder-water spray with glycine powder and anti-bacterial gel) on gingival fibroblast growth was examined. The test parameters were the cell count and morphology, which were examined on preconditioned surfaces and after use on fibroblasts.

Material and methods – Glass, polished titanium and corundum-blasted titanium were conditioned and then colonized with fibroblasts. In addition, surfaces already covered with fibroblasts were processed using the same methods. After 96 hours the growth was stopped, and the fibroblasts were stained for evaluation.

Results – Cold plasma improved the wettability of all surfaces. The fibroblast growth was particularly high on polished titanium (2.2 - 2.8 times the number of cells compared to the control group). The air-powder-water spray improved the growth on polished (1.2 - 1.9 times the cell count) and blasted (1.5 - 2.0) surfaces. Both methods in combination showed weaker results (polished: 0.9 -1.1, blasted: 1.3 - 1.7). HybenX sometimes lead to a slight increase in the number of cells, but also to massive morphological deficits. The application of HybenX to vital cells led to their dehydration and a near total decimation of the cells (0.0 - 0.1). The application of cold plasma burned vital cells, resulting in a maximum of 36 % the cell count compared to the control group.

Conclusion – Conditioning titanium surfaces with air-powder-water spray has improved the fibroblast growth significantly. Plasma conditioning of polished titanium surfaces showed even stronger results. Both methods in combination

showed less success. Same goes for the treatment with HybenX. Both the cold plasma application and that of HybenX have a lethal effect on living fibroblasts.

9 Literaturverzeichnis

Aparna, M., Sharma B. D., Sarita Y. B. (2008) 'Biofilms: Microbes and Disease', J Infect Dis, 12, 526-530.

Augthun, M., Tinschert, J., Huber, A. (1998) 'In vitro studies on the effect of cleaning methods on different implant surfaces', J Periodontol, 69 (8), 857-864.

Bartold, P., Narayanan, A. S. (1998) 'Biology of the periodontal connective tissue', Quintessence Publ Illinois, 173-195.

Bracke, J., Basara, M., Savord, E., Dunaway, A., Watkins, M. (2015) 'Pilot evaluation of a simple adjunctive method for improved removal of oral Biofilm during conventional scaling and root planing therapy', J Biol Regul Homeost Agents, 29 (1), 6-9.

Brunette, D. M. (1986) 'Fibroblasts on micromachined substrata orient hierarchically to grooves of different dimensions', Exp Cell Res, 164, 11-26.

Canullo, L., Cassinelli, C., Götz, W., Tarnow, D. (2013) 'Plasma of argon accelerates murine fibroblast adhesion in early stages of titanium disk colonization', Int J Oral Maxillofac Implants, 28 (4), 957-962.

Canullo, L., Penarrocha-Oltra, D., Marchionni, S., Bagán, L., Peñarrocha-Diago, M. A., Micarelli, C. (2014) 'Soft tissue cell adhesion to titanium abutments after different cleaning procedures: preliminary results of a randomized clinical trial', Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 19 (2), 177-183.

Canullo, L., Genova, T., Gross Trujillo, E., Pradies, G., Petrillo, S., Muzzi, M., Carossa, S., Mussano, F. (2020) 'Fibroblast Interaction with Different Abutment Surfaces: In Vitro Study', Int J Mol Sci, 21 (6), 1919.

Chrcanovic, B. R., Albrektsson, T., Wennerberg, A. (2014) 'Reasons for failures of oral implants', Journal of Oral Rehabilitation, 41 (6), 443-476.

Coelho, P. G., Giro, G., Teixeira, H. S., Marin, C., Witek, L., Thompson, V.P., Tovar, N., Silva, N. R. (2012) 'Argon-based atmospheric pressure plasma enhances early bone response to rough titanium surfaces', J. Biomed. Mater. Res. A, 100, 1901-1906.

Curtis, A., Wilkinson, C. (1999) 'New depths in cell behaviour: reactions of cells to nanotopography', Biochem Soc Symp, 65, 15-26.

de Gennes, P.-G., Brochard-Wyart, F., Quéré, D. (2004) 'Capillarity and Wetting Phenomena', Springer-Verlag, New York.

den Braber, E. T., de Ruijter, J. E., Ginsel, L. A., van Recum, A. F., Jansen, J. A. (1998) 'Orientation of ECM protein deposition, fibroblast cytoskeleton, and attachment complex components on silicone microgrooved surfaces', J Biomed Mater Res, 40, 291-300.

Derks, J., Tomasi, C. (2015) 'Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology', *J Clin Periodontol*, 42 (16), 158-171.

Donlan, R. M., Costerton, J. W. (2002) 'Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms', *Clin Microbiol Rev*, 15 (2), 167-193.

EPIEN Medical (2017) 'Frequently Asked Questions About HybenX Oral Tissue Decontaminant („HOTD“)' Online, URL: http://www.hybenx.it/wp-content/uploads/2015/07/FAQs_HOTD15Nov17-.pdf (Stand: 27.06.2021, 15:00 Uhr).

Eriksson, R. A., Albrektsson, T. (1984) 'The effect of heat on bone regeneration: an experimental study in the rabbit use the bone growth chamber', *J Oral Maxillofac Surg*, 42 (11), 705-711.

Fridman, A. A. (2012) 'Plasma chemistry', Cambridge University Press: Cambridge, 2012.

Fridman, G., Friedman, G., Gutsol, A., Shekhter, A. B., Vasilets, V. N., Fridman, A. (2008) 'Applied Plasma Medicine', *Plasma Process. Polym.*, 5, 503-533.

Geiger, B., Bershadsky, A. (2001) 'Assembly and mechanosensory function of focal contacts', *Curr Opin Cell Biol*, 13, 584-592.

González-Carrasco, J. L., Cifuentes Cuellar, S. C., Lieblich Rodríguez, M. (2019) 'Bone Repair Biomaterials', Woodhead Publishing, Cambridge, Second Edition, 103-140.

Guo, L., Smeets, R., Kluwe, L., Hartjen, P., Barbeck, M., Cacaci, C., Gosau, M., Henningsen, A. (2019) 'Cytocompatibility of Titanium, Zirconia and Modified PEEK after Surface Treatment Using UV Light or Non-Thermal Plasma', *Int J Mol Sci*, 20 (22), 5596.

Haribyan, M. (2019) 'Reinigungseffektivität verschiedener Methoden zur Periimplantitistherapie hinsichtlich der Zugänglichkeit', Hamburg, Dissertation.

Heinlin, J., Morfill, G., Landthaler, M., Stolz, W., Isbary, G., Zimmermann, J. L., Shimizu, T., Karrer, S. (2010) 'Plasma medicine: Possible applications in dermatology', *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft JDDG*, 8, 968-976.

Heitz-Mayfield, L. J. (2008) 'Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators', *J Clin Periodontol*, 35 (8), 292-304.

Henningsen, A., Smeets, R., Hartjen, P., Heinrich, O., Heuberger, R., Heiland, M., Precht, C., Cacaci, C. (2018a) 'Photofunctionalization and non-thermal plasma activation of titanium surfaces', *Clin Oral Invest*, 22, 1045-1054.

Henningsen, A., Smeets, R., Heuberger, R., Jung, O. T., Hanken, H., Heiland, M., Cacaci, C., Precht, C. (2018b) 'Changes in surface characteristics of titanium and zirconia after surface treatment with ultraviolet light or non-thermal plasma', *Eur J Oral Sci*, 126 (2), 1-9.

IFA Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (2021a) 'GESTIS Stoffdatenbank - Hydroxybenzolsulfonsäure Datenblatt', Online, URL: <https://gestis.dguv.de/data?name=070750> (Stand: 27.06.2021, 15:30 Uhr).

IFA Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (2021b) 'GESTIS Stoffdatenbank - Schwefelsäure Datenblatt', Online, URL: <https://gestis.dguv.de/data?name=001160> (Stand: 27.06.2021, 15:15 Uhr).

Isola, G., Matarese, G., Williams, R. C., Siciliano, V. I., Alibrandi, A., Cordasco, G., Ramaglia, L. (2018) 'The effects of a desiccant agent in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, controlled clinical trial', Clin Oral Investig, 22 (2), 791-800.

Kahili, F. (2012) 'Entfernung eines bakteriellen Biofilms von Implantatoberflächen', Hamburg: Dissertation.

Karaman, O., Kelebek, S., Demirci, E. A., Ibis, F., Ulu, M., Ercan, U. K. (2018) 'Synergistic effect of cold plasma treatment and RGD peptide coating on cell proliferation over titanium surfaces', Tissue Eng. Regen. Med., 15, 13-24.

Kreisler, M., Kohnen, W., Christoffers, A.-B., Götz, H., Jansen, B., Duschner, H., d'Hoedt, B. (2005) '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, 16 (1), 36-43.

Kröger, J. C., Haribyan, M., Nergiz, I., Schmäge, P. (2020) 'Air polishing with erythritol powder - In vitro effects on dentin loss', J Indian Soc Periodontol 2020, 24, 433-440.

Lee, J.-H., Kim, Y.-H., Choi, E.-H., Kim, K.-M., Kim, K.-N. (2015) 'Air atmospheric-pressure plasma-jet treatment enhances the attachment of human gingival fibroblasts for early peri-implant soft tissue seals on titanium dental implant abutments', Acta Odontologica Scandinavica, 73 (1), 67-75.

Lindhe, J. und Meyle, J. (2008) 'Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology', J Clin Periodontol, 35 (8), 282-285.

Liu, T. L., Kim, C. J. (2014) 'Repellent surfaces. Turning a surface superrepellent even to completely wetting liquids', Science, 346 (6213), 1096-1100.

Lombardo, G., Signoretto, C., Corrocher, G., Pardo, A., Pighi, J., Rovera, A., Caccuri, F., Nocini, P. F. (2015) 'A topical desiccant agent in association with ultrasonic debridement in the initial treatment of chronic periodontitis: a clinical and microbiological study', New Microbiol, 38 (3), 393-407

Lopez, M. A., Andreasi Bassi, M., Confalone, L., Silvestre, F., Arcuri, C. (2016) 'The treatment of peri-implant diseases: A new approach using hybenx® as a decontaminant for implant surface and oral tissues', *Oral Implantol (Rome)*, 9 (3), 106-114.

Lopez, M. A., Passarelli, P. C., Godino, E., Lombardo, N., Altamura, F. R., Speranza, A., Lopez, A., Papi, P., Pompa, G., D'Addona, A. (2021) 'The treatment of peri-implant diseases: A new approach using hybenx® as a decontaminant for implant surface and oral tissues', *Antibiotics*, 10 (5), 512.

Louropoulou, A., Slot, D. E. and Van der Weijden, F. (2014) 'The effects of mechanical instruments on contaminated titanium dental implant surfaces: a systematic review', *Clin Oral Implants Res*, 25 (10), 1149-1160.

Maquera-Huacho, P. M., Coradi Tonon, C., Ferreira Correia, M., Serignoli Francisconi, R., Ferreira Bordini, E. A., Marcantonio, E., Palomari Spolidorio, D. M. (2018) 'In vitro antibacterial and cytotoxic activities of carvacrol and terpinen-4-ol against biofilm formation on titanium implant surfaces', *Biofouling*, 34 (6), 699-709.

Matthes, R., Jablonowski, L., Holtfreter, B., Gerling, T., von Woedtke, T., Kocher, T. (2019) 'Fibroblast Growth on Zirconia Ceramic and Titanium Disks After Application with Cold Atmospheric Pressure Plasma Devices or with Antiseptics', *Int J Oral Maxillofac Implants*, 34 (4), 809–818.

Mayer, C. C. (2014) 'Konditionierung von Titanoberflächen mit physikalischem Plasma – Einfluss auf die initiale Besiedelung von Gingivafibroblasten', *Homburg/Saar: Dissertation*.

Menini, M., Piccardo, P., Baldi, D., Dellepiane, E., Pera, P. (2015) 'Morphological and Chemical Characteristics of Different Titanium Surfaces Treated by Bicarbonate and Glycine Powder Air Abrasive Systems', *Implant Dentistry*, 24 (1), 47-56.

Meyle, J., Gültig, K., Wolburg, H., von Recum, A. F. (1993) 'Fibroblast anchorage to microtextured surfaces', *J Biomed Mat Res*, 27, 1553-1557.

Nishihara, T., Koseki, T. (2004) 'Microbial etiology of periodontitis', *Periodontol 2000*, 36,14-26.

Papaioannou, W., Quirynen, M., Van Steenberghe, D. (1996) 'The influence of periodontitis on the subgingival flora around implants in partially edentulous patients', *Clin Oral Implants Res*, 7 (4), 405-409.

Persson, L. G., Berglundh, T., Lindhe, J., Sennerby, L. (2001) 'Re-osseointegration after treatment of peri-implantitis at different implant surfaces. An experimental study in the dog', *Clin Oral Implants Res*, 12 (6), 595-603.

- Pesce, P., Menini, M., Santori, G., De Giovanni, E., Bagnasco, F., Canullo, L.** (2020) 'Photo and Plasma Activation of Dental Implant Titanium Surfaces. A Systematic Review with Meta-Analysis of Pre-Clinical Studies', *J Clin Med*, 9 (9), 2817.
- Pfeiffer, F.** (2004) 'Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von Gingiva-Fibroblasten auf mikrostrukturierten Titanoberflächen', Tübingen: Dissertation.
- Piattelli, A., Degidi, M., Paolantonio, M., Mangano, C., Scarano, A.** (2003) 'Residual aluminum oxide on the surface of titanium implants has no effect on osseointegration', *Biomaterials*, 24 (22), 4081-4089.
- Pini-Prato, G., Magnani, C., Rotundo, R.** (2016) 'Treatment of Acute Periodontal Abscesses Using the Biofilm Decontamination Approach: A Case Report Study', *Int J Periodontics Restorative Dent*, 36 (1), 55-63.
- Quirynen, M., Bollen, C. M., Papaioannou, W., Van Eldere, J., van Steenberghe, D.** (1996) 'The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations', *Int J Oral Maxillofac Implants*, 11 (2), 169-178.
- Quirynen, M., de Soete, M., van Steenberghe, D.** (2002) 'Infectious risks for oral implants: a review of the literature', *Clin Oral Implants Res*, 13 (1), 1-19.
- Rabel, K., Kohal, R.-J., Steinberg, T., Rolauffs, B., Adolfsson, E., Altmann, B.** (2021) 'Human osteoblast and fibroblast response to oral implant biomaterials functionalized with non-thermal oxygen plasma', *Sci Rep*, 11 (1), 17302.
- Reiss, H.** (1992) 'Warum gibt es Benetzung', *Physik in unserer Zeit*, 23 (5), 204-212.
- relyon plasma** (2021) 'Produkt Information piezobrush PZ2 – Technische Daten', Online, URL: <https://www.relyon-plasma.com/relyon-plasma-produkte/piezobrush-pz2/> (Stand: 18.07.2021, 11:30 Uhr).
- Richard, M.** (2002) 'In vitro Untersuchung der Fibroblastenadhäsion und -proliferation an oberflächenmodifizierten Titanwerkstoffen', Berlin: Dissertation.
- Rompen, E., Domken, O., Degidi, M., Farias Pontes, A. E., Piattelli, A.** (2006) 'The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: a literature review', *Clin Oral Implants Res*, 17 (2), 55-67.
- Rupp, F., Liang, L., Geis-Gerstorfer, J., Scheideler, L., Hüttig, F.** (2018) 'Surface characteristics of dental implants: A review', *Dent Mater*, 34 (1), 40-57.
- Sahrmann, P., Ronay, V., Hofer, D., Attin, T., Jung, R. E., Schmidlin, P. R.** (2015) 'In vitro cleaning potential of three different implant debridement methods' *Clin Oral Implants Res*, 26 (3), 314-319.

Sanderink, R. B. A., Zitzmann, N. U., Saxer, U. P., Schlagenhauf, U., Persson, R., Erne, P. (2008) 'Parodontitis und Periimplantitis: in den menschlichen Körper disseminierende Biofilm-Infekte', *Die Quintessenz*, 59, 273-285.

Sawase, T., Wennerberg, A., Hallgren, C., Albrektsson, T., Baba, K. (2000) 'Chemical and topographical surface analysis of five different implant abutments', *Clin Oral Implants Res*, 11 (1), 44-50.

Schmage, P. (2008) 'Eignung verschiedener Oberflächenstrukturen am Implantat', Hamburg: Habilitation.

Schmage, P. (2010) 'Befundorientiertes Behandlungskonzept bei periimplantären Infektionen mit kombiniertem Einsatz mechanischer und desinfizierender Methoden - Übersicht und Falldarstellung', *Parodontologie*, 21 (4), 339-358.

Schmidt, K. E., Auschill, T. M., Heumann, C., Frankenberger, R., Eick, S., Sculean, A., Arweiler, N. B. (2018) 'Clinical and laboratory evaluation of the effects of different treatment modalities on titanium healing caps: a randomized, controlled clinical trial', *Clinical Oral Investigations*, 22, 2149–2160.

Schütte, A.-M. (2018) 'Zelladhäsion von Gingivafibroblasten an drei verschiedenen Abutmentmaterialien, Dentin und einem adhäsiven Kompositkunststoff', Kiel: Dissertation.

Schwarz, F., Rothamel, D., Sculean, A., Georg, T., Scherbaum, W., Becker, J. (2003) 'Effects of an 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*, 14 (6), 784-792.

Schwarz, F., Papanicolau, P., Rothamel, D., Beck, B., Hertel, M., Becker, J. (2006) 'Influence of plaque biofilm removal on reestablishment of the biocompatibility of contaminated titanium surfaces', *J Biomed Mater Res A*, 77 (3), 437-444.

Sculean, A., Gruber, R., Bosshardt, D. D. (2014) 'Soft tissue wound healing around teeth and dental implants', *J Clin Periodontol*, 41 (15), 6-22.

Seon, G. M., Seo, H. J., Kwon, S. Y., Lee, M. H., Kwon, B.-J., Kim, M. S., Koo, M.-A., Park, B. J., Park, J.-C. (2015) 'Titanium surface modification by using microwave-induced argon plasma in various conditions to enhance osteoblast biocompatibility', *Biomater Res*, 19 (1), 13.

Sepeur, S. (2008) 'Nanotechnologie: Grundlagen und Anwendungen', Vincentz Network, Hannover.

Shibli, J. A., Gonzales Silverio, K., Compagnoni Martins, M., Marcantonio jr., E., Rossa jr., C. (2003) 'Effect of air-powder system on titanium surface on fibroblast adhesion and morphology', *Implant Dent*, 12 (1), 81-86.

Shimizu, T., Steffes, B., Pompl, R., Jamitzky, F., Bunk, F., Ramrath, K., Georgi, M., Stolz, W., Schmidt, H., Urayama, T., Fujii, S., Morfill, G. E. (2008) 'Characterization of Microwave Plasma Torch for Decontamination', Plasma Process. Polym., 5, 577-582.

Sikarwar, B., Khandekar, B., Agrawal, S., Kumar, S., Muralidhar, K. (2012) 'Drop-wise Condensation Studies on Multiple Scales', Heat Transfer Engineering, 33 (4), 301-341.

Smeets, R., Henningsen, A., Jung, O., Heiland, M., Hammacher, C., Stein, J. M. (2014) 'Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis - a review' Head and Face Medicine, 10 (1), 34.

Smeets, R., Cacaci, C., Heuberger, R., Heinrich, O., Hartjen, P., Hanken, H., Precht, C., Henningsen, A. (2018) 'Influence of UV-light and non-thermal plasma on rough titanium surfaces in vitro', Oral Reconstruction Global Symposium 2018, Posterpräsentation.

Sollich, M. (2015) 'Reinigungseffekte des VECTOR 2-Prototypgeräts auf verschiedene Implantatoberflächen', Hamburg: Dissertation.

Teughels, W., van Assche, N., Sliepen, I., Quirynen, M. (2006) 'Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development', Clin Oral Impl Res, 17, 68-81.

Thielemann, I. (2012) 'Veränderung von Implantatoberflächen durch Reinigungsinstrumente', Hamburg: Dissertation.

Trejo, P. M., Bonaventura, G., Weng, D., Caffesse, R. G., Bragger, U., Lang, N. P. (2006) 'Effect of mechanical and antiseptic therapy on peri-implant mucositis: an experimental study in monkeys', Clin Oral Impl Res, 17, 294-304.

Tschernin, M. (2003) 'Oberflächeneigenschaften von Zahnrestaurationsmaterialien', München: Dissertation.

Ujino, D., Nishizaki, H., Higuchi, S., Komasa, S., Okazaki, J. (2019) 'Effect of Plasma Treatment of Titanium Surface on Biocompatibility', Appl. Sci., 9 (11), 2257.

Weiss, P. (1934) 'In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber', J Exp Zool, 68, 393-448.

Wimpenny, J., Manz, W., Szewzyk, U. (2000) 'Heterogeneity in biofilms', FEMS Microbiol Rev, 24 (5), 661-671.

Zitzmann, N. U., Walter, C. and Berglundh, T. (2006) 'Ätiologie, Diagnostik und Therapie der Periimplantitis - eine Übersicht', Dtsche Zahnärztl Z, 61 (12), 642-649.

10 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erarbeitung dieser Dissertation unterstützt haben.

Insbesondere gilt mein Dank Prof. Dr. med. dent. Petra Schmage für die Überlassung des Themas und Betreuung während der Arbeit. Ich danke ihr für die Unterstützung und die Diskussionen, die diese Arbeit ermöglicht haben.

CTA Frank Fischer danke ich für die fundierte Beratung und Unterstützung hinsichtlich der diversen labortechnischen Vorversuche und Versuche.

Dem Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. Udo Schumacher danke ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Zelllaborausstattung und besonders Christine Knies für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Einarbeitung in die Zellkultivierung.

Dr. med. dent. Mikael Haribyan gilt mein Dank für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Der Firma relyon plasma GmbH danke ich für die Überlassung des Kaltplasma-Handgeräts.

Zuletzt danke ich meiner Familie, insbesondere meinem Mann, für die unermüdliche Unterstützung und Motivation während dieser Arbeit.

11 Lebenslauf

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten

12 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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: