

Aus der Klinik für Kieferorthopädie

(Direktor: Prof. Dr. Helge Fischer-Brandies)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Zelladhäsion von primären humanen Gingivafibroblasten und
Osteoblasten an orthodontischen Mini-Implantaten – Eine in-vitro-
Studie**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Zahnmedizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Sarah Nadine Mirja Reimers

aus **Lüneburg**

Kiel (2021)

1.Berichterstatter: Prof. Dr. Helge Fischer-Brandies, Klinik für Kieferorthopädie

2.Berichterstatter: PD Dr. med. dent. Aydin Gülses, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 24.08.2022

gez.: Prof. Dr. Sinan Şen, Klinik für Kieferorthopädie

*Meiner Familie und meinen Freunden,
auf deren Unterstützung ich mich jederzeit verlassen kann
und die mir immer wieder Kraft geben.*

Vielen liebsten Dank an euch!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Orthodontische Mini-Implantate (OMIs) / Minischrauben.....	1
1.1.1. Aufbau	2
1.1.2. Umgang mit den Minischrauben	3
1.1.3. Erfolg, Risiken und Komplikationen	3
1.1.4. Material der Minischrauben	5
1.1.5. Hartgewebs- und Weichgewebsintegration.....	5
1.2. Zelladhäsion.....	7
1.2.1. Grundlagen der Zelladhäsion	7
1.2.2. Zelladhäsion an Biomaterialien	8
1.2.3. Methoden / Verfahren zur Modulation von Implantatoberflächen.....	9
1.3. Ziel der Studie	9
2. Materialien und Methoden	11
2.1. Materialien	11
2.1.1. Minischrauben	11
2.1.2. Zellen.....	13
2.1.3. Chemikalien und Gerätschaften	13
2.2. Charakterisierung der Oberflächenstruktur und Zusammensetzung der verwendeten Minischrauben.....	13
2.2.1. Oberflächenvermessung mittels Dentalscanner	13
2.2.2. Rasterelektronenmikroskopie zur Mikrostrukturanalyse der Oberfläche.....	13
2.2.3. EDX-Analyse zur Ermittlung der chemischen Zusammensetzung	14
2.3. Umgang mit der Zellkultur.....	14
2.4. Vorversuche zum XTT-Test.....	15
2.4.1. Zelladhäsion und Zytotoxizität von PTFE	15
2.4.2. Umsetzung des XTT durch Medium, Minischrauben und PTFE in Abwesenheit von Zellen.....	17
2.5. Hauptversuche	19
2.5.1. Quantitative Bestimmung der Zelladhäsion mittels XTT	19
2.5.2. Qualitative Bestimmung der Zelladhäsion mittels REM	20
2.6. Statistik.....	22
3. Ergebnisse	23
3.1. Charakterisierung der Oberflächenstruktur und Zusammensetzung der verwendeten Minischrauben.....	23

3.1.1. Oberflächenvermessung mittels Dentalscanner	23
3.1.2. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Minischrauben	23
3.1.3. EDX-Analyse zur Ermittlung der chemischen Zusammensetzung	26
3.2. Vorversuche zum XTT-Test	29
3.2.1. Zelladhäsion und Zytotoxizität von PTFE	29
3.2.2. Umsetzung des XTT durch Medium, Minischrauben und PTFE in Abwesenheit von Zellen.....	30
3.3. Hauptversuche	31
3.3.1. Quantitative Bestimmung der Zelladhäsion mittels XTT	31
3.3.2. Qualitative Bestimmung der Zelladhäsion mittels REM	34
4. Diskussion	45
4.1. Ergebnisse dieser Studie	45
4.2. Zelladhäsion an Minischrauben	47
4.3. Schlussfolgerung.....	48
4.4. Ausblick und weitere Forschungsansätze	49
5. Zusammenfassung	50
6. Literaturverzeichnis.....	52
7. Anhang.....	57
7.1. Abkürzungsverzeichnis.....	57
7.2. Abbildungsverzeichnis.....	58
7.3. Tabellenverzeichnis	59
7.4. Chemikalien und Gerätschaften	60
7.4.1 Chemikalien	60
7.4.2 Gerätschaften	61
7.5. Veröffentlichungen	62
7.6. Danksagung	63
7.7. Akademischer Lebenslauf.....	64
7.8. Eidesstattliche Erklärung	65

1. Einleitung

Therapeutische Zahnbewegungen in der Kieferorthopädie basieren im Wesentlichen auf dem Dritten Newtonschen Gesetz: Kräfte, die zwei Körper entgegengesetzt aufeinander ausüben, sind gleich groß ($\text{actio}=\text{reactio}$). Bei jeder gewünschten Zahnbewegung wirkt somit auch eine ebenso große Gegenkraft auf einen anderen Körper (Harten 2014, Baumgaertel 2014). Um gezielte Bewegungen durchzuführen, wird demnach die kieferorthopädische Verankerung unumgänglich. Hierunter lässt sich ein Widerlager verstehen, gegen das eine kieferorthopädische Kraft wirkt. Meist sind es andere Zähne, auf die die Gegenkraft wirkt, wodurch die Verankerung auch als Widerstand gegen unerwünschte Zahnbewegungen definiert wird (Baumgaertel et al. 2008, Cope 2005, Kılınç und Sayar 2016, Singh et al. 2010, Uzuner und Işık 2015). Seit langer Zeit wird diese Verankerung über die Verwendung von Zahngruppen sowie intra- und extraoraler Geräte erreicht. Jedoch sind diesen Methoden Grenzen gesetzt und hinzu kommt die oft fehlende Compliance der Patienten (Singh et al. 2010, Cope 2005, Büchter et al. 2005). Abhilfe können skelettale Verankerungselemente schaffen, die als TSAD (temporary skeletal anchorage devices) oder kurz TAD (temporary anchorage devices) bezeichnet werden. Das Prinzip der skelettalen Verankerung besteht darin, dass die Gegenkräfte auf knöcherne Strukturen wirken und somit die Zahnbewegungen lediglich auf die gewünschten Bewegungen beschränkt werden. Sie bieten somit die absolute Kontrolle über die Verankerung in allen Richtungen (Baumgaertel 2014, Hourfar und Lisson 2017). Zu diesen TADs zählen unter anderem schraubenförmige Implantate, die entweder osseointegrieren oder durch Retention ihren Halt erreichen (Uzuner und Işık 2015, Hourfar und Lisson 2017). Zu Letzterem gehören die Minischrauben, um die es in dieser Studie geht.

1.1. Orthodontische Mini-Implantate (OMIs) / Minischrauben

Orthodontische Mini-Implantate (OMI), oder meist Minischrauben genannt, sind kleine Implantate mit einem Durchmesser von 1 bis 2,3 mm und einer Länge von 4 bis 21 mm, die für kieferorthopädische Zwecke eingesetzt werden (Sander et al. 2011, Hourfar und Lisson 2017). Ihr Einsatz in der Kieferorthopädie hat sich in letzter Zeit immer mehr durchgesetzt. Sie überzeugen durch ihren Risiko-Nutzen-Faktor. Während sie einerseits kostengünstig sind, sind sie andererseits minimalinvasiv und zeichnen sich durch ihre einfache Handhabung, insbesondere bei der Insertion und der Entfernung, aus. Sie haben ein breites Einsatzspektrum wie beispielsweise Mittellinierverschiebung, Molarendistalisation, Molarenaufrichtung, Oberkieferexpansion oder posteriore Intrusion (Baumgaertel et al. 2008, Hourfar und Lisson 2017).

1.1.1. Aufbau

OMIs lassen sich in drei Abschnitte einteilen:

- Kopf
- Hals / Gingivahals / transgingivaler Bereich
- Gewinde / Gewindeschäft

Der Kopf ist der Abschnitt des Implantats, der in die Mundhöhle ragt und zur Befestigung von kieferorthopädischen Elementen dient. Der Hals ist der mittlere Anteil und wird von der Gingiva umgeben. Seine Funktion besteht in der Isolierung des Knochens vor Bakterien aus der Mundhöhle, wodurch die Entstehung einer Perimukositis / Periimplantitis vorgebeugt wird. Das Gewinde, als letzter Abschnitt, ist von Knochen umgeben und dient dem Halt der Minischraube im Kiefer. Der Halt wird vorwiegend durch die Retention in der Kortikalis erlangt, wodurch die Dicke der Kortikalis eine entscheidende Rolle für die Primärstabilität spielt (Sander et al. 2011, Ludwig et al. 2007).

Die meisten OMIs sind zylindrisch oder zylindrisch-konisch geformt. Je nach Ausführung des Gewindes können sie selbstschneidend oder selbstbohrend sein. Selbstschneidende Minischraube haben eine stumpfe Spitze und abgerundete Flanken. Sie benötigen eine Vorbohrung vor der Insertion. Selbstbohrende Minischrauben hingegen werden direkt in den Knochen gebohrt und sind dafür durch scharfe Flanken und eine scharfe Spitze gekennzeichnet (Sander et al. 2011, Singh et al. 2010).

Minischrauben besitzen eine glatte Oberfläche, die für ein leichtes Entfernen sorgt. Sie erreichen ihren Halt lediglich durch Makroretention. Dies grenzt sie von anderen orthodontischen Implantaten, wie beispielsweise Gaumenimplantate, ab. Sie hingegen haben eine raue Oberfläche und erreichen ihren Halt sowohl über Makro- als auch Mikroretention (Ludwig et al. 2007).

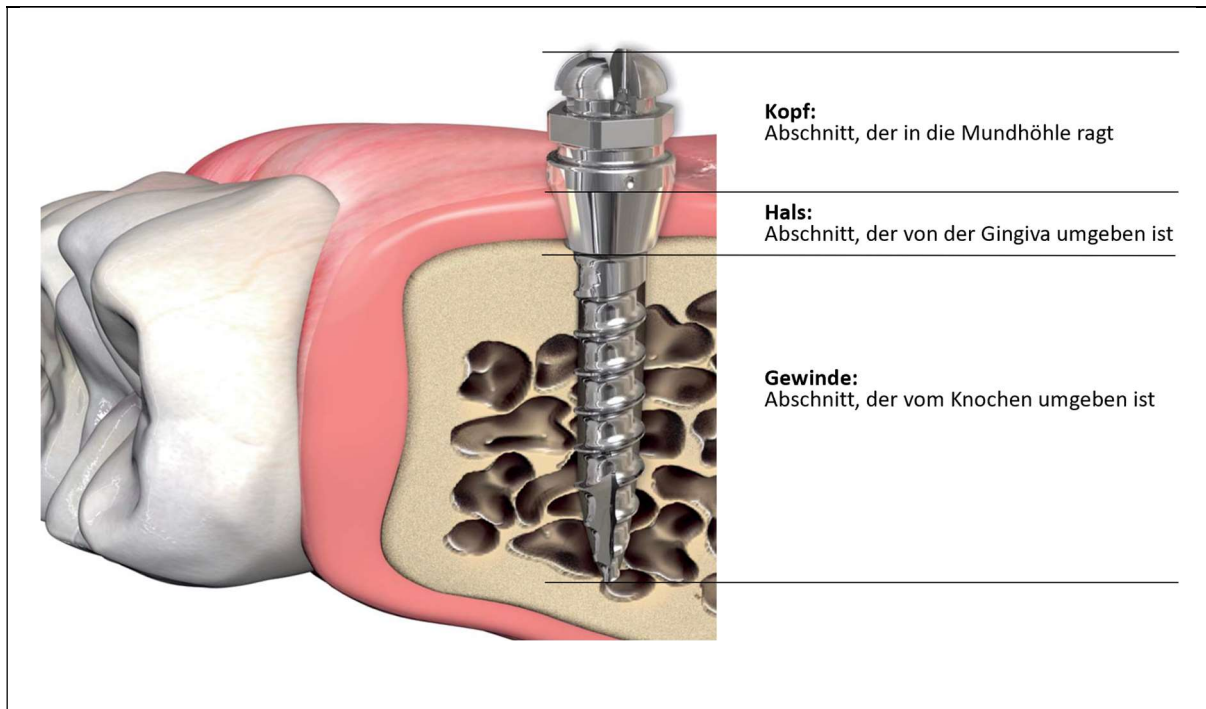


Abb. 1: Aufbau der Minischraube und Lokalisation im Gewebe (hier: tomas®-pin)
geändert nach tomas – das Handbuch, mit freundlicher Genehmigung von Dentaforum

1.1.2. Umgang mit den Minischrauben

Minischrauben überzeugen durch ihre einfache Handhabung. Nach ihrer Insertion können sie sofort belastet werden und sind somit direkt einsatzfähig. Zudem können sie nach ihrem Einsatz ganz leicht herausgedreht werden, ohne die Notwendigkeit einer Anästhesie. Minischrauben können ohne Vorbehandlung des Weichgewebes gesetzt werden oder es wird zuvor ein kleiner Teil aus der Schleimhaut gestanzt, was vor allem bei beweglicher Mukosa Anwendung findet (Hourfar und Lisson 2017, Baumgaertel 2014).

Bedeutend für den erfolgreichen Halt der Minischrauben ist die Primärstabilität, die durch die Retention direkt bei der Insertion erreicht wird. Durch die Primärstabilität können die Minischrauben auch direkt oder zeitnah belastet werden und sind somit sofort einsatzfähig (Uzuner und Işık 2015, Hourfar und Lisson 2017).

1.1.3. Erfolg, Risiken und Komplikationen

Die Erfolgsrate von orthodontischen Minischrauben liegt im Durchschnitt bei 84%. Insgesamt wurden Erfolgsraten von 59,4% bis hin zu 100% angegeben (Hourfar und Lisson 2017).

Die Komplikationen, die bei Minischrauben auftreten, können Ihre Ursache in der Insertion vom Zahnarzt, im Patienten selbst (z.B. durch systemische Erkrankungen) oder in der Minischraube haben (Uzuner und Işık 2015)

Als beispielhafte Komplikationen zu nennen sind: Mobilität der Minischraube bis hin zum Stabilitätsverlust, partielle Osseointegration einhergehend mit der erschwerten Entfernung, Entzündung um die Minischraube, Überwucherung durch das Weichgewebe, Beschwerden wie Schmerzen oder Irritationen, Beschädigung anatomischer Strukturen und Fraktur der Minischraube. (Uzuner und Işık 2015, Hyde et al. 2010, Kravitz und Kusnoto 2007).

Zu den genauen Angaben der Häufigkeit der verschiedenen Komplikationen gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Unter anderem werden als häufigste Ursache das Lösen oder der Verlust der Schraube angegeben. Dies tritt in etwa 10-20% der Insertionen auf (Hyde et al. 2010, Baumgaertel 2014). Die Stabilität der Minischraube hängt primär von der Knochenqualität und Quantität ab (Uzuner und Işık 2015). Zudem beeinflussen weitere Faktoren wie das periimplantäre Gewebe, das Design der Minischraube, die Operationstechnik und die Kraftapplikation die Stabilität (Kravitz und Kusnoto 2007). Starke Lockerung der Minischraube kann auch auftreten, wenn die Minischraube nicht innerhalb von 2 Wochen beladen wird. Dies fördert die Proliferation des Epithels zwischen Gewindeschraube und Knochen und führt zu starker Mobilität (Dibart 2007). Konträr dazu kann es auch vorkommen, dass es zur partiellen Osseointegration der Schraube kommt, was das Entfernen der Schraube erschwert (Kravitz und Kusnoto 2007).

Des Weiteren werden auch Entzündungen mit einer erhöhten Verlustrate in Verbindung gebracht (Meeran et al. 2012). So stieg die Verlustrate der Minischrauben bei entzündetem Gewebe um 30% an. Die Ursache hierfür liegt darin, dass ein gesundes Weichgewebe Voraussetzung für die Abdichtung des Knochens vor Bakterien ist. Wenn dies nicht der Fall ist, können Entzündungen, kleinere Infektionen und Periimplantitis die Folge sein. Bei der Periimplantitis kommt es dann unter anderem auch zum Knochenabbau und folglich zu einer höheren Mobilität der Minischraube (Kravitz und Kusnoto 2007). Infektionen können vor allem dann auftreten, wenn der Gingivahals nicht glatt ist (Singh et al. 2010). Leichte Infektionen können durch Putzen und Mundspüllösungen beherrscht werden (Uzuner und Işık 2015).

Als zweithäufigste Komplikation gaben Hyde et al. Irritationen und Überwucherungen an. Bei der Überwucherung handelt es sich um eine teilweise oder komplette Bedeckung des Implantatkopfes (Ziebura et al. 2012, Hyde et al. 2010). Während einige Autoren die Überwucherung lediglich als lästige Komplikation angaben (Ziebura et al. 2012), beschreiben andere Autoren, dass die Überwucherung mit Beschwerden und sogar Schmerzen einhergeht (Kuroda und Tanaka 2014). Sowohl die Minischraube, als auch die Attachments können bedeckt werden. Der überlappende Anteil kann ohne Inzision und ohne Anästhesie mit Fingerdruck freigelegt werden. Um die Überwucherung zu minimieren kann beispielsweise ein Wachskügelchen oder ein Separiergummi angebracht werden. Zusätzlich kann Chlorhexidin

als Mundspüllösung verwendet werden, das sowohl den Entzündungsgrad als auch die Epithelisierung verringert und somit der Überwucherung entgegenwirkt (Kravitz und Kusnoto 2007). Eine Plaqueakkumulation am Implantatkopf sollte verhindert werden. Zudem sollten im Zweifelsfall Minischrauben mit längerem Hals verwendet werden. Überwucherungen treten häufig auf, wenn die Minischraube zu tief in das Vestibulum gesetzt wird. Das Setzen der Minischraube in Bereiche mit keratinisierter Gingiva hat sowohl positiven Einfluss auf den Entzündungsgrad als auch auf die Hypertrophie des Weichgewebes. Letztendlich kann somit also auch die Stabilität beeinflusst werden. Einige OMI sind mit einem Kragen am Gingivahals ausgestattet um eine Überwucherung des Weichgewebes zu verhindern (Ziebura et al. 2012, Uzuner und Işık 2015).

1.1.4. Material der Minischrauben

Die Minischrauben bestehen aus der Titanlegierung TiAl6V4. Diese Legierung zeichnet sich durch eine hohe Biokompatibilität aus und wird vielfach in der chirurgischen Implantologie verwendet. Ursache dieser Biokompatibilität ist die hohe Affinität zum Sauerstoff, wodurch sich eine stabile Oxidschicht auf der Oberfläche bildet, die das Titan passiviert und gegen andere Medien chemisch inaktiviert (Ludwig et al. 2007, Wintermantel 2008, Finke et al. 2018, Strub et al. 2011). Im Vergleich zu Reintitan bietet die TiAl6V4-Legierung zudem den großen Vorteil der besseren mechanischen Stabilität (Singh et al. 2010).

Einige Minischrauben werden vor Ende des Fertigungsprozesses anodisiert. Das Anodisieren beschreibt einen Prozess, bei dem die Oxidationsschicht an der Oberfläche verstärkt wird. Folglich erhöht sich damit die Korrosionsbeständigkeit (Briehl 2014). Zusätzlich können die OMI durch das Anodisieren farblich kodiert werden, denn je nach Dicke der Oxidschicht, bildet sich ein Film in unterschiedlicher Farbe (Velten et al. 2002). Je nach angelegter Spannung während des Anodisierens können Oxidschichten mit unterschiedlicher Dicke und unterschiedlicher Oberflächenstruktur erreicht werden, was wiederum Einfluss auf das Zelladhäsionsverhalten hat. So hat sich bei Reintitan gezeigt, dass bei einer angelegten Spannung von 100V eine nanostrukturierte Oberfläche entsteht, die dem Wurzelzement ähnelt und im Vergleich zu Spannungen von 200V und 300V eine höhere Zelladhäsion hervorruft (Chen et al. 2009).

1.1.5. Hartgewebs- und Weichgewebsintegration

Direkt nach ihrer Insertion erhalten die Minischrauben ihre Primärstabilität sowohl durch die mechanische Retention des Gewindes als auch durch den Druck zwischen Knochen und Schaft (sog. Pressfitting). Mit der Zeit relaxiert sich jedoch das Knochengewebe und die Primärstabilität nimmt ab. Die Minischraube erhält nun jedoch eine Sekundärstabilität durch

Anlagerung von Geflechtknochen an das Gewinde (Sander et al. 2011). Durch die glatte Oberfläche der Minischraube kommt es dabei jedoch nicht zur Osseointegration (Hourfar und Lisson 2017). Bei einer Osseointegration würde es zu einer strukturellen und funktionellen Verbindung zwischen Knochen und Implantat kommen, bei der es keine relative Bewegung zwischen Knochen und Implantat mehr geben würde (Mavrogenis et al. 2009). Da dies bei Minischrauben jedoch nicht auftritt, können sie, nach Ihrer Gebrauchsphase, ganz leicht wieder durch Herausdrehen entfernt werden. Dennoch werden an Minischrauben teilweise Kalzifikationsinseln gefunden, was eine partielle Osseointegration widerspiegelt (Hourfar und Lisson 2017). Dass die Osseointegration unerwünscht ist, lässt sich auch aus der Bruchgefahr bei Entfernung der Minischraube ableiten (Kuroda und Tanaka 2014).

Wie bereits beschrieben, besteht die Aufgabe des Gingivahalses der Minischrauben in der Abdichtung des Knochens. Er wirkt somit dem Eindringen von Mikroorganismen aus der Mundhöhle entgegen und beugt eine Periimplantitis vor (Sander et al. 2011). Um dies zu gewährleisten, soll sich die Gingiva eng anlagern. Begünstigt wird dies durch eine glatte Oberfläche (Ludwig et al. 2007). Bei der Weichgewebsintegration konzentriert sich die Literatur auf dentale Implantate. Für die Osseointegration von dentalen Implantaten ist die Weichgewebsintegration ein besonders essenzieller Bestandteil des langlebigen Erfolgs und es gibt dementsprechend viel Literatur über die Grenzfläche von Implantat und Weichgewebe. Für die Weichgewebsintegration sollten die Implantate aus einem biokompatiblen Material bestehen, das die Adhäsion von Epithel- und Bindegewebszellen erlaubt (Touati et al. 2005). Die TiAl6V4-Legierung wird dabei nicht nur in der Kieferorthopädie verwendet, sondern ist auch seit Langem in der dentalen Implantologie bekannt (Strub et al. 2011). Die Mukosa bildet dabei einen ‚biological seal‘, wodurch eine biologische und physiologische Abdichtung rund um das Implantat geschaffen wird (Alva et al. 2013). Innerhalb von zwei bis drei Wochen bildet sich diese Abdichtung, die vergleichbar mit dem Saumepithel ist. Über eine interne Basallamina und Hemidesmosomen sind die Epithelzellen mit der Implantatoberfläche verbunden. Dennoch hat sich gezeigt, dass das Saumepithel an Implantaten schwächer ist als am Zahn (Atsuta et al. 2016). Die periimplantären Bindegewebsfasern inserieren auch nicht in das Implantat, sondern verlaufen parallel zur Implantatoberfläche (Schwenzer und Eckelt 2009). Sie stehen dabei über einen Klebeffekt durch den hohen Gehalt an Glykosaminoglykanen mit dem Implantat in Kontakt und bieten somit eine trauma-resistente Anhaftung der Gingiva (Alva et al. 2013). Die mechanische Resistenz ist dennoch gering (Touati et al. 2005).

Ob eine solche Weichgewebsintegration auch für OMI in Frage kommt sei dahingestellt. Dentale Implantate bleiben schließlich über einen viel längeren Zeitraum in situ als Minischrauben. Eine primär enge Anlagerung wird erreicht, indem der Gingivahals das

Gewebe dehnt und somit wie ein Korken in einer Flasche wirkt (Ludwig et al. 2007). Da die gleiche Legierung auch bei OMI verwendet wird liegt es aber nahe, dass sich auch hier als sekundäre Anlagerung eine biologische Abdichtung ausbilden kann.

1.2. Zelladhäsion

Durch Zellkulturen können zahlreiche grundlegende Vorgänge auf zellulärer Ebene erforscht werden (Schmitz, 2011). Grundlegendes Wissen über die Interaktion von Zellen mit Substraten ist wichtig für Bereiche wie Tissue Engineering, medizinische Implantation und pharmazeutische Produkte (Flemming et al. 1999).

1.2.1. Grundlagen der Zelladhäsion

Die Zelladhäsion definiert sich als spezifischer rezeptorvermittelter Kontakt zwischen Zellen untereinander (Zell-Zell-Adhäsion) oder zwischen Zellen und ihrer extrazellulären Matrix (Zell-Matrix-Adhäsion) (Schmitz 2011). Die Extrazellulärmatrix (EZM) ist ein Geflecht aus Faserproteinen und Glykanen, die von den Zellen sezerniert werden (Christen et al. 2016). In der Zellkultur gibt es eine dritte Form der Zelladhäsion, bei der die Zelle an ein Substrat haftet (Zell-Substrat-Adhäsion) (Schmitz 2011).

Die Lehre von der Zelladhäsion kann in den Vorgang der Adhäsion und des Detachments eingeteilt werden (Khalili und Ahmad 2015). Detachment beschreibt dabei das Ablösen von Zellen von einem Substrat (Schmitz 2011).

Die meisten Zellen aus Wirbeltieren brauchen eine Oberfläche bzw. ein Substrat, an das sie adhären können. Diese Zellen werden als adhärenente Zellen bezeichnet und stammen aus Geweben, die im Organismus nicht beweglich sind. Von diesem Adhäsionsverhalten ausgenommen sind Suspensionszellen, die sich von frei zirkulierenden Zellen im Körper ableiten und Teil des hämatopoetischen Systems sind (Frahm 2014, Schmitz 2011).

Die Zelladhäsion ist also Voraussetzung für das Überleben adhärenenter Zellen, spielt aber auch bei der Proliferation, der Zelldifferenzierung, dem Zellzyklus und der Migration eine wichtige Rolle (Khalili und Ahmad 2015, Zhu et al. 1999, Kim et al. 2011). Adhärenente Zellen zeigen eine Proliferationshemmung, die von der Zelldichte abhängt (Schmitz 2011). Dieses Phänomen wird Kontaktinhibition genannt und beschreibt eine Tendenz, dass Zellen in Regionen mit höherer Zelldichte ihre Migration und Proliferation einstellen (Warne et al. 2017).

Die Zelladhäsion in vitro verläuft in drei Phasen ab, in der sich die Zellen morphologisch verändern:

- Phase 1: Über Elektrostatische Interaktion entsteht ein initialer Kontakt der Zelle mit dem Substrat.
- Phase 2: Über vereinzelte Integrin-vermittelte Kontakte bindet die Zelle an das Substrat und beginnt sich abzuflachen sowie auszubreiten.
- Phase 3: Die Rezeptor-Liganden-Paare vervielfachen sich, sodass es zu immer mehr fokaler Adhäsion kommt und die Adhäsion verstärkt sich. Zeitgleich organisiert sich das Zytoskelett um, sodass es zur kompletten Ausbreitung der Zelle auf der Oberfläche kommt.

Dabei wird die Adhäsion immer stärker je länger die Zelle an dem Substrat haftet (Khalili und Ahmad 2015).

1.2.2. Zelladhäsion an Biomaterialien

Die Affinität von Zellen zu Substraten spielt bei dem Design und der Entwicklung von Biomaterialien eine wichtige Rolle. Für bestimmte Anwendungen werden nämlich auch unterschiedliche Anforderungen an die Zelladhäsion gestellt (Khalili und Ahmad 2015). So sind beispielsweise einerseits Oberflächen von Interesse, an denen keine Zellen adhärieren und proliferieren können, um z.B. Überwucherungen zu verhindern oder temporäre Implantate einwandfrei wieder entfernen zu können. Andererseits ist die Zelladhäsion an bestimmten Substraten erwünscht (Kluger und Pretzsch 2010, Khalili und Ahmad 2015, Han et al. 2017).

Die Zelladhäsion kann sowohl durch Oberflächenrauigkeit als auch durch chemische Modifizierung (z.B. durch Adhäsionsproteine wie RGD) erhöht werden (Lloyd 2003). Es ist schon länger bekannt, dass die Topographie im Mikrometer-Bereich Einfluss auf Zelleigenschaften wie Morphologie und Proliferation hat. Dies trifft auch für die Nano-Struktur der Oberflächentopographie zu (Kunzler et al. 2007, Stevens und George 2005).

Dabei kann die Reaktion der Zellen auf das Substrat von Zelltyp zu Zelltyp unterschiedlich sein. So heftet sich beispielsweise ein bestimmter Zelltyp an eine bestimmte Oberfläche gut an und kann proliferieren, während sich ein anderer Zelltyp nicht anhaftet (Kluger und Pretzsch 2010). Osteoblasten lagern sich beispielweise gerne an rauen Oberflächen an, während Epithel und Bindegewebe glatte Oberflächen präferieren (Pfeiffer 2004). Diese unterschiedlichen Ansprüche der Zellen an Substrate können dazu genutzt werden, Implantatoberflächen so zu gestalten, dass sich an bestimmten Bereichen nur ein spezieller Zelltyp anheftet (Cochran et al. 1994). Für orale Implantate wurden bereits Beschichtungen entwickelt, die die Adhäsion von Osteoblasten fördern, während die Adhäsion von Fibroblasten gehemmt wird. Diese Strategie bietet weiteres Potential für selektive Implantatbeschichtung (Santos 2013).

1.2.3. Methoden / Verfahren zur Modulation von Implantatoberflächen

Es gibt verschiedene Methoden zur Modulation von Implantatoberflächen um selektive Zelladhäsion zu ermöglichen. Einerseits besteht die Möglichkeit in der Modulation der Oberflächentopographie durch die Textur über glatte oder raue Oberflächen. Vor allem zu erwähnen ist die Mikro- oder Nanostrukturierung durch Rauigkeit (Kunzler et al. 2007). Erreicht wird dies durch Säure-Ätzung oder Sandstrahlung (Ramalingam et al. 2012).

Als weiterer Punkt ist die chemische Oberflächenbeschichtung zu nennen. Von großer Bedeutung sind hier zelladhäsive Moleküle wie Extrazellulärmatrix-Proteine (Fibronektin, Vitronectin oder Kollagen), bei denen der Vorteil in der selektiven Bindung eines bestimmten Zelltyps nach seinem favorisierten EZM-Protein besteht. Ebenso können die Oberflächen auch nur mit kleinen Peptiden benetzt werden, die lediglich die Bindungssequenz des natürlichen Proteins enthalten (Kantlehner et al. 2000). Des Weiteren können Implantate mit Wachstumsfaktoren wie BMPs beschichtet werden, die auch anderweitig Einsatz in der Zahnmedizin finden (Carreira et al. 2014).

1.3. Ziel der Studie

Bei der Anwendung von OMIs kann es zu verschiedenen Komplikationen kommen, die beispielsweise Lockerung / Verlust, Entzündungen, Überwucherungen oder partielle Osseointegration beinhalten.

Wie bereits beschrieben, spielt die Zelladhäsion an Biomaterialien eine zentrale Rolle, da aufgrund dessen bestimmte Komplikationen eingegrenzt sowie Funktion und Erfolg von Produkten verbessert werden können.

Ziel dieser Studie ist die Untersuchung der Zelladhäsion von Fibroblasten und Osteoblasten an kommerziellen Minischrauben. Hierzu wurden sowohl qualitative als auch quantitative Versuche durchgeführt.

Der Fokus wurde dabei vor allem auf die Adhäsion von Fibroblasten an den Köpfen/Hälsen sowie der Osteoblasten an den Gewinden gelegt. Es wurden demnach diejenigen Zelltypen an den Schraubenanteilen schwerpunktmäßig betrachtet, die auch unter physiologischen Bedingungen mit ihnen in Kontakt stehen.

Konkrete Fragestellungen lauten:

1. Findet Zelladhäsion von Fibroblasten und Osteoblasten an den Minischrauben statt?
2. Gibt es Unterschiede in der Zelladhäsion zwischen den einzelnen Produkten?

3. Geben eventuelle Oberflächenmodifikationen Aufschluss auf eine Beeinflussung der Zelladhäsion?
4. Gibt es Unterschiede in der Zelladhäsion an den verschiedenen Bereichen der Minischrauben?
5. Gibt die Studie Aufschluss über mögliche Komplikationen, die auf der Zelladhäsion an den Minischrauben beruhen können?

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Minischrauben

Für die Studie wurden folgende vier OMI's von den jeweiligen Firmen mit entsprechenden Angaben bereitgestellt:

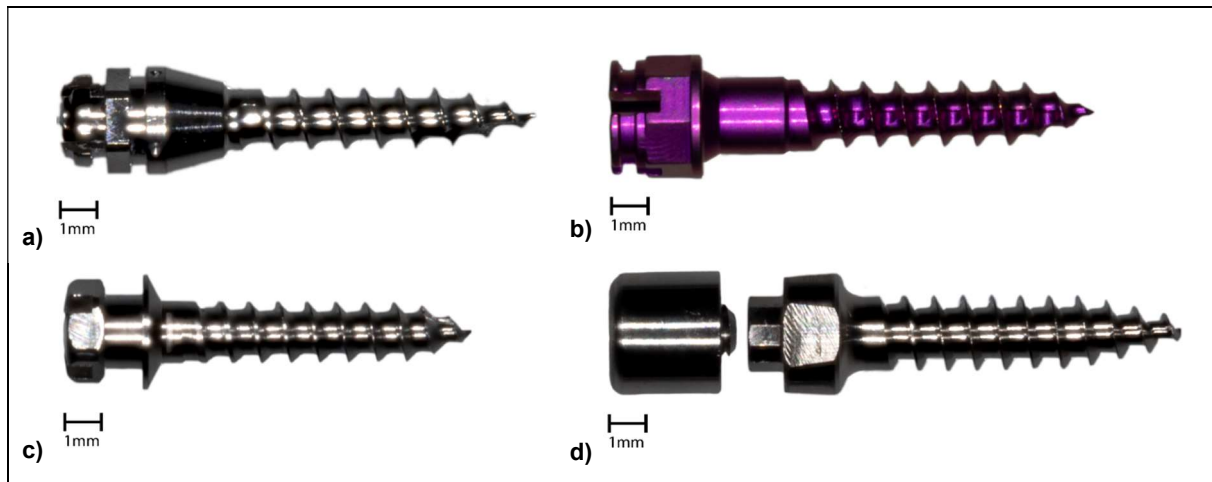
Produktname	Maße	Handelsfirma (Firmensitz)	Herstellerfirma (Firmensitz)	Artikel- nummer
tomas®-pin SD N 08	1,6 x 8mm	Dentaurum (Ispringen, Deutschland)		302-108-30
OrthoEasy® Pin	1,7 x 8mm	Forestadent (Pforzheim, Deutschland)		1101A2308
Dual Top™ G2	1,6 x 8mm	Promedia (Siegen, Deutschland)	Jeil Medical (Seoul, Republik Korea)	16-G2-008
BENEFit® KFO-Schraube	2,0 x 9mm	Dentalline (Birkenfeld, Deutschland)	PSM Medical Solutions (Gunningen, Deutschland)	33-54209

Tab. 1: Herstellerangaben zu den OMI's

Das BENEFit-System setzt sich dabei aus einer Minischraube und einem Abutment zusammen. Für diese Studie wurde folgendes Abutment gewählt:

Produktname	Handelsfirma (Firmensitz)	Herstellerfirma (Firmensitz)	Artikel- nummer
BENEFit® Abutment Standard	Dentalline (Birkenfeld, Deutschland)	PSM Medical Solutions (Gunningen, Deutschland)	33-54430

Tab. 2: Herstellerangaben zu dem zugehörigen Abutment der BENEFit® KFO-Schraube

**Abb. 2: Untersuchte OMIs**

- a) tomas®-pin SD N 08 (Dentaurum, Ispringen, Deutschland)
- b) OrthoEasy® Pin (Forestadent, Pforzheim, Deutschland)
- c) Dual Top™ G2 (Promedia, Siegen, Deutschland / Jeil Medical, Seoul, Republik Korea)
- d) BENEFit® KFO-Schraube + BENEFit® Abutment Standard (Dentalline, Birkenfeld, Deutschland / PSM Medical Solutions, Gunningen, Deutschland)

Laut Herstellerangaben bestehen alle vier Minischrauben aus einer TiAl6V4-Legierung. Sie entspricht der Norm ASTM F 136 (American Society for Testing and Materials 2013) oder der DIN EN ISO 5832-3 und lässt sich hier unter der Werkstoffnummer 3.7165 finden (Deutsches Institut für Normung e.V. 2017). Alle vier Implantatfirmen verweisen auf eine dieser Angaben. Allerdings bestätigte Dentalline auf Nachfrage, dass durch PMS DEMO-Schrauben geliefert wurden, die von den Minischrauben, die an Kunden geliefert werden, abweichen können.

Die Oberflächenzusammensetzung des OrthoEasy® Pins weist hier eine Besonderheit auf, da sie anodisiert wurde und somit eine verstärkte Oxidschicht aufweist. Laut Herstellerangaben dient dies der Farbkodierung zur Unterscheidung von anderen Varianten als auch zur Verbesserung der Primärstabilität.

Für die Versuche und Messungen wurden von jedem Produkt die gleiche Anzahl an Schrauben verwendet:

Untersuchung	Verfahren	Anzahl der verwendeten Schrauben
Oberflächenvermessung	Dentalscanner	1
Mikrostrukturanalyse der Oberfläche	REM	1
Ermittlung der chemischen Zusammensetzung	EDX	3
quantitative Bestimmung der Zelladhäsion	XTT	10
qualitative Bestimmung der Zelladhäsion	REM	4
total		19

Tab. 3: Verwendung der Minischrauben in den Versuchen

2.1.2. Zellen

Es wurde die Zelladhäsion von zwei verschiedenen Zelllinien an den Minischrauben untersucht. Hierzu wurden primäre humane Fibroblasten aus der Gingiva eines extrahierten Molaren gezüchtet (hgF), sowie eine kommerziell erworbene humane Osteoblastenzelllinie (Human Osteoblasts (HOB), Cat. No.: C- 12720, Lot No.: 439Z037.2, PromoCell, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

2.1.3. Chemikalien und Gerätschaften

Eine Liste der verwendeten Chemikalien und Gerätschaften lässt sich im Anhang dieser Arbeit finden (s. Abschnitt 7.4.)

2.2. Charakterisierung der Oberflächenstruktur und Zusammensetzung der verwendeten Minischrauben

2.2.1. Oberflächenvermessung mittels Dentalscanner

Zur Ermittlung der Oberfläche der Minischrauben wurde ein Dentalscanner eingesetzt. Dieser erzeugt ein virtuelles 3D-Modell. Mit Hilfe der Software Geomagic Wrap konnten die Schrauben virtuell am Übergang Kopf/Hals zugeschnitten werden und die Oberfläche des Gewindes sowie des Hals/Kopfes berechnet werden.

2.2.2. Rasterelektronenmikroskopie zur Mikrostrukturanalyse der Oberfläche

Als Methode zur Beurteilung der Oberfläche und der chemischen Zusammensetzung von Materialien hat sich die Rasterelektronenmikroskopie in Kombination mit der EDX bewährt (Michler 2019).

In der Rasterelektronenmikroskopie wird ein gebündelter Elektronenstrahl erzeugt, der auf die Probenoberfläche trifft. Dadurch werden Elektronen aus dem Probenmaterial emittiert und von einem Detektor aufgefangen. In einem Rastermuster wird der Strahl Zeile für Zeile über die Probe bewegt, sodass ein Gesamtbild entsteht, das eine deutlich höhere Auflösung als ein Lichtmikroskops hat. Wenn es sich bei den untersuchten Materialien nicht um leitfähige Stoffe handelt, müssen diese vorab mit einer leitfähigen Beschichtung vorbehandelt werden. Dieser Prozess wird als Sputtern bezeichnet (Michler 2019, Depla und Mahieu 2008).

Mittels der Rasterelektronenmikroskopie wurden Bilder zur Mikrostrukturanalyse der Implantatoberfläche angefertigt. Hierfür wurden die Minischrauben für 15 Minuten in einem Ultraschallbad mit Alkohol gereinigt und anschließend mittels eines Kohlenstoffplättchens auf

einem Probesteller fixiert. Mit einer 100- und 500-fachen Vergrößerung wurden Bilder vom Kopf-, Hals- und Gewinde-Bereich angefertigt. Die einzelnen Bereiche wurden zuvor an mehreren Stellen betrachtet, sodass Partien für die Aufnahmen gewählt wurden, die repräsentativ für die jeweilige Schraubenoberfläche sind.

2.2.3. EDX-Analyse zur Ermittlung der chemischen Zusammensetzung

Zudem entsteht in der Rasterelektronenmikroskopie beim Auftreffen der Elektronen auf das Probenmaterial Röntgenstrahlung, dessen Energie kennzeichnend, für die sich in dem Material befindlichen Elemente ist. Durch die Analyse dieser energetisch charakteristischen Strahlung können somit Rückschlüsse auf die chemische Zusammensetzung der Oberfläche des Probenmaterials geschlossen werden. Das Verfahren wird energiedisperse Röntgenanalyse (EDX) genannt. Es sind sogar Aussagen zu der relativen Häufigkeit der Elemente möglich. (Michler 2019, Hornbogen und Skrotzki 2009).

Für die EDX-Analyse wurden pro Hersteller je drei Schrauben verwendet. Sie wurden zuvor für 15 Minuten in einem Ultraschallbad mit Alkohol gereinigt. Die Kalibrierung erfolgte mit einer Kupfer-Aluminium-Probe, sodass lediglich bestimmt werden konnte, welche Elemente in den Schrauben vorhanden sind.

Da die EDX-Analyse die Zusammensetzung der oberflächlichen Schichten ermittelt, werden eventuelle Verunreinigungen mitbestimmt. Sie zeigen sich beispielsweise durch Elemente wie Kohlenstoff im EDX-Spektrum.

2.3. Umgang mit der Zellkultur

Generell erfolgten alle Versuche und die anderen Arbeitsschritte der Zellkultivierung unter einer sterilen Werkbank. Die Inkubation der Zellen fand im Brutschrank mit konstanter Temperatur von etwa 37°C, einer Luftfeuchte von 95% und einer CO₂-Begasung von 5% statt. Die Zellen wurden nach erfolgreicher Vermehrung in Zellkulturflaschen (T175) ausgesät.

Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel und ein- bis zweimal wöchentlich wurden die Zellen passagiert.

Für die Fibroblasten (hgF) wurde als Nährmedium α -MEM verwendet, das mit destilliertem Wasser verdünnt und mit Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) auf einen pH-Wert von 7,2 - 7,5 eingestellt wurde. Anschließend wurde es steril gefiltert. Für die Osteoblasten (HOB) wurde das vom Hersteller empfohlene Osteoblast Basal Medium verwendet. Beide Nährmedien wurden zuletzt so komplementiert, dass folgende Bestandteile enthalten waren: 10% fetales Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Amphotericin B. Sobald der Zellrasen eine

etwa 80-90%ige Konfluenz erreicht hatte, wurden die Zellen passagiert. Als Vorbereitung hierfür wurden die Flaschen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde Trypsin in einer Verdünnung mit PBS von 1:10 hinzugegeben, um die Zellen vom Boden zu lösen. Nach drei Minuten im Brutschrank und kurzem Vortexen wurde das Trypsin mit dem doppelten Volumen an FBS-haltigem Medium inhibiert. Die Zellsuspension wurde durch Pipettieren homogenisiert. Zu gleichen Teilen wurde die Zellsuspension mit Trypanblau gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Es wurden mindestens drei Quadranten ausgezählt und die Zellzahl bestimmt:

$$\text{Zellzahl/ml} = 2 \times 10^4 / \text{ml} \times \text{Summe der Zellzahl der einzelnen Quadranten} / \text{Anzahl der Quadranten}$$
$$\text{Zellzahl insgesamt} = \text{Zellzahl/ml} \times \text{Volumen (ml)}$$

Zentrifugiert wurde die Suspension für 15 Minuten bei 230g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit dem geeigneten Medium homogenisiert. Entsprechende Volumina wurden entnommen und in neue Flaschen ausgesät.

Für die Gewinnung von primären Fibroblasten (hgF) wurde das Explantat wie folgt aufbereitet: Ein extrahierter Zahn mit seinem Restgewebe wurde in 30 ml PBS gewaschen und anschließend wurden kleine Stückchen der Gingiva an der Schmelz-Zement-Grenze abgeschnitten. Diese wurden in die Vertiefungen einer 6-Well-Platte gegeben und es wurden wenige Tropfen α -MEM darauf gegeben. Die Platte wurde für 45 Minuten inkubiert bis ein weiterer Milliliter α -MEM zugegeben wurde. Die Platte wurde erneut im Brutschrank inkubiert und nach drei Tagen wurde das erste Mal das Medium gewechselt. Nach einer Woche wurden die Zellen in den Wells passagiert und in Zellkulturflaschen (T25) ausgesät.

2.4. Vorversuche zum XTT-Test

Zur Validierung der Messmethode wurde in zwei Vorversuchen einerseits die Zelladhäsion und Zytotoxizität von hgF auf PTFE und andererseits die Wechselwirkung des XTT mit dem Medium, den Minischrauben und dem PTFE untersucht.

2.4.1. Zelladhäsion und Zytotoxizität von PTFE

Als Kontrolle bzw. Vergleich hinsichtlich des Ausmaßes der Zelladhäsion wurde PTFE (Polytetrafluorethylen) als Probe in den Hauptversuch mit einbezogen. PTFE ist unter den Handelsnamen Teflon oder Gorotex bekannt und ist ein Material, an dem aufgrund der starken Hydrophobizität nur erschwert Zelladhäsion stattfindet (Lamichhane et al. 2016, Pařízek et al. 2011, Gabriel et al. 2016). Um eine Gerinnung zu vermeiden, findet PTFE aus diesem Grund auch zahlreichen Einsatz als Implantatmaterial in Bereichen, die mit Blut in Kontakt stehen.

Der weitverbreitete Gebrauch dieses Materials in der Medizin spricht für seine Biokompatibilität (Korzinskas et al. 2018, Pařízek et al. 2011). Zytotoxizität sollte demnach nicht auftreten aber eine erschwerte Adhäsion, die letztendlich auch den Tod der adhären lebenden Zellen zur Folge hat.

Um zu überprüfen, in welchem Ausmaß Zelladhäsion an dem PTFE erfolgt und um auszuschließen, dass diese durch eine Zytotoxizität des Teflons zustande kommt, wurde folgender Kontrollversuch durchgeführt: Eine 12-Well-Platte wurde wie in Abbildung 3 bestückt. In Spalte 1 befindet sich ein Stück PTFE mit einer Oberfläche von 128mm². Spalte 2, 3 und 4 beinhalten ein TC-Deckgläschen mit einer Oberfläche von 265,46mm², das so modifiziert ist, dass Zelladhäsion leicht stattfindet. In die ersten drei Spalten wurde eine Aussaat von 2×10^5 Fibroblasten in α -MEM vorgenommen. Spalte 4 dient als Blank und wurde lediglich mit α -MEM befüllt. Spalte 3 mit dem TC-Deckgläschen dient als Positivkontrolle bezüglich der Zelladhäsion. In Spalte 2 wurde nach 30 Minuten ein Insert mit PTFE eingehängt, sodass das Medium mit dem PTFE in Kontakt steht. Diese Spalte dient als Zytotoxizitätskontrolle des PTFEs. Spalte 1 spiegelt die Negativkontrolle bezüglich der Zelladhäsion wider. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank (ein Zeitraum, in dem davon ausgegangen wird, dass sich die Zellen noch nicht verdoppelt haben) wurden das PTFE und die TC-Deckgläser in eine neue Platte überführt, mit RPMI gespült und eine XTT-RPMI-PMS Lösung hinzugegeben. Die Platte wurde weitere drei Stunden im Brutschrank inkubiert und anschließend die XTT/PMS/RPMI-Lösung in eine 96-Well Platte überführt. Die Werte wurden mittels Photometrie bei einer Wellenlänge von 470/750nm ermittelt und durch die Oberfläche des PTFE-Plättchens bzw. des TC-Deckgläschens geteilt:

Zelladhäsion \triangleq optische Dichte (OD) / Oberfläche

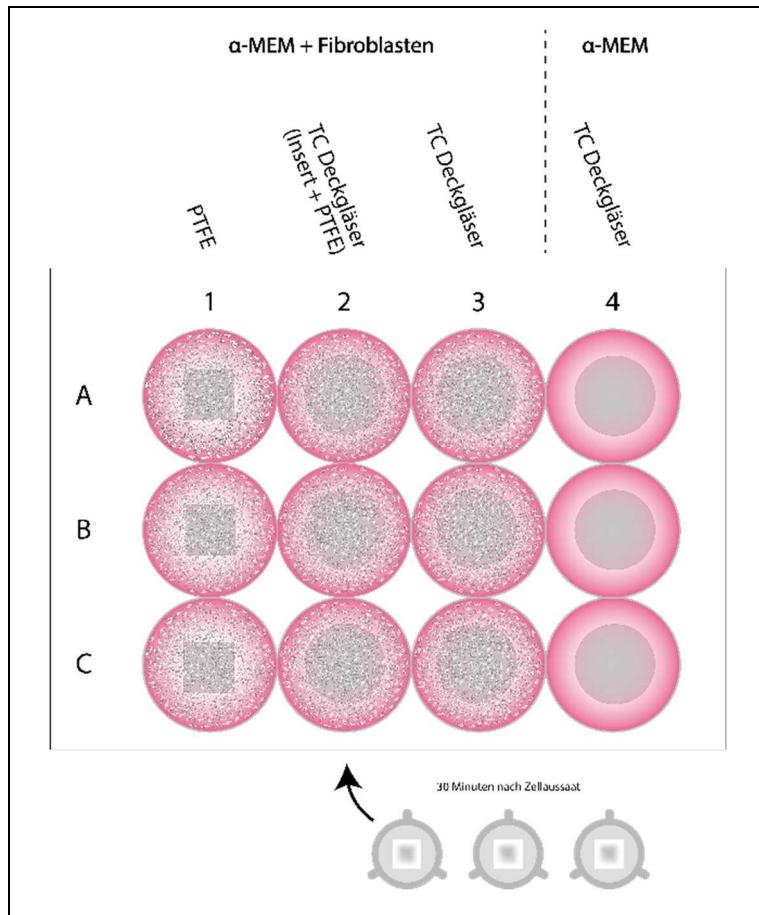


Abb. 3: Zellaussaat für die Ermittlung der Zelladhäsion und Zytotoxizität von PTFE
 2×10^3 Fibroblasten / 2ml / Well

2.4.2. Umsetzung des XTT durch Medium, Minischrauben und PTFE in Abwesenheit von Zellen

Der XTT-Test, der in dieser Studie Anwendung findet, basiert auf der enzymatischen Aktivität vitaler Zellen. Diese reduzieren XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid), ein farbloses Tetrazolium-Salz, in Anwesenheit von PMS zu einem löslichen orangefarbenen Formazan. Die Intensität der Färbung und der metabolische Umsatz sind dabei zueinander proportional, sodass mittels Photometrie Aussagen zu der Zellvitalität getroffen werden können (Schmitz 2011). Da bei adhären Zellen die Adhäsion Voraussetzung für die Vitalität der Zellen ist, ist der XTT-Umsatz / Oberfläche proportional zur Zelladhäsion. Der XTT-Umsatz / Oberfläche wird hier demnach als Maß für die Zelladhäsion angesehen. Die Zellvitalität wurde dabei mittels XTT-Test gemäß der ISO-Norm 10993-5:2009(E) (International Organization for Standardization 2009) ermittelt. Dabei wurde mit finalen Konzentrationen von 0,28mM XTT und 2µM PMS gearbeitet.

Um auszuschließen, dass der Farbumschlag des XTT durch andere Reaktionen als durch die enzymatische Umsetzung der adhärenierten Zellen zustande kommt, wurde folgender Kontrollversuch durchgeführt (Abb.4): Je eine Minischraube pro Hersteller und das PTFE wurden in eine 48-Well-Platte gegeben und zusammen mit je 1ml Osteoblast Basal Medium inkubiert. In der nächsten Spalte wurden weitere 5 Vertiefungen lediglich mit 1ml Medium befüllt. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurden die Minischrauben und das PTFE mit einer sterilen Pinzette in leere Wells überführt. Die übergebliebenen Wells mit dem Medium wurden mit RPMI gespült und anschließend wurde in alle Vertiefungen inklusive einer weiteren Spalte mit fünf Vertiefungen je 1ml XTT/RPMI/PMS-Lösung gegeben. Nach 3 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden je 130µl in eine 96-Well-Platte umpipettiert und die Werte mittels Photometrie bestimmt:

Zelladhäsion \triangleq optische Dichte (OD)

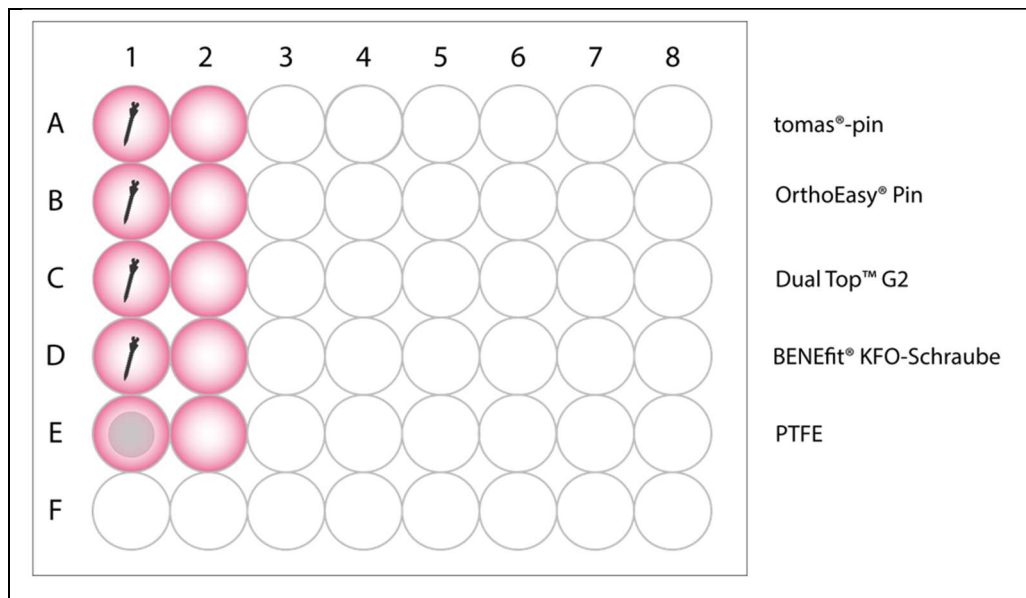


Abb. 4: Umsetzung des XTT durch Medium, Minischrauben und PTFE in Abwesenheit von Zellen

1ml Osteoblast Basal Medium / Well

2.5. Hauptversuche

Die Zelladhäsion an den Minischrauben wurde sowohl quantitativ als auch qualitativ bestimmt.

2.5.1. Quantitative Bestimmung der Zelladhäsion mittels XTT

Da alle Proben und Lösungen in diesem Versuch als nicht zytotoxisch gelten, kann die Zelladhäsion quantitativ indirekt über die Zellvitalität bestimmt werden.

Für die qualitative Bestimmung der Zelladhäsion an den Minischrauben wurden die Schrauben zunächst am Übergang vom Gewinde zum Hals mit einer Trennmaschine getrennt und vor der Verwendung in der Zellkultur für 15 Minuten im Ultraschallbad in Alkohol gereinigt und anschließend 15 Minuten bei 121°C sterilisiert. An den Köpfen/Hälsen wurde die Adhäsion der Fibroblasten und an den Gewinden die Adhäsion der Osteoblasten betrachtet. Es wurden demnach die jeweiligen Anteile der Schrauben mit den Zelltypen in Kontakt gebracht, von denen sie auch unter physiologischen Bedingungen umgeben sind.

Hierfür wurden zwei 96-Well-Platten jeweils wie folgt bestückt (Abb. 5): In Zeile A-D wurden pro Herstellertyp in je 10 Wells die jeweiligen Schraubenanteile gelegt. In Zeile E wurde je ein ausgestanztes PTFE-Plättchen gegeben. In Zeile A-F erfolgte eine Zellaussaat von 2×10^4 Zellen pro Well. Zeile F dient somit als Positivkontrolle bezüglich der Zelladhäsion. In Zeile G wurde lediglich Medium gegeben. Es dient als Blank.

Nach der Zellaussaat wurden die Platten für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Schraubenanteile und die PTFE-Plättchen in eine neue 96-Well-Platte überführt. Die Gewinde wurden dabei aufgrund der Form in Glasröhrchen anstatt in Wells gegeben. Sowohl in die neue Platte als auch in die alte Platte wurden 170µl XTT-PRMI-PMS-Lösung in jedes Well gegeben. Die Platten wurden für weitere drei Stunden inkubiert und regelmäßig geschwenkt bevor je 130µl der Lösung in neue 96-Well-Platten umpipettiert wurden. Die Ergebnisse wurden am Photometer mit der Software MikroWin Version 5.54 ermittelt und durch die Oberfläche der Schraubenanteile bzw. des PTFE-Plättchens geteilt:

Zelladhäsion \triangleq optische Dichte (OD) / Oberfläche

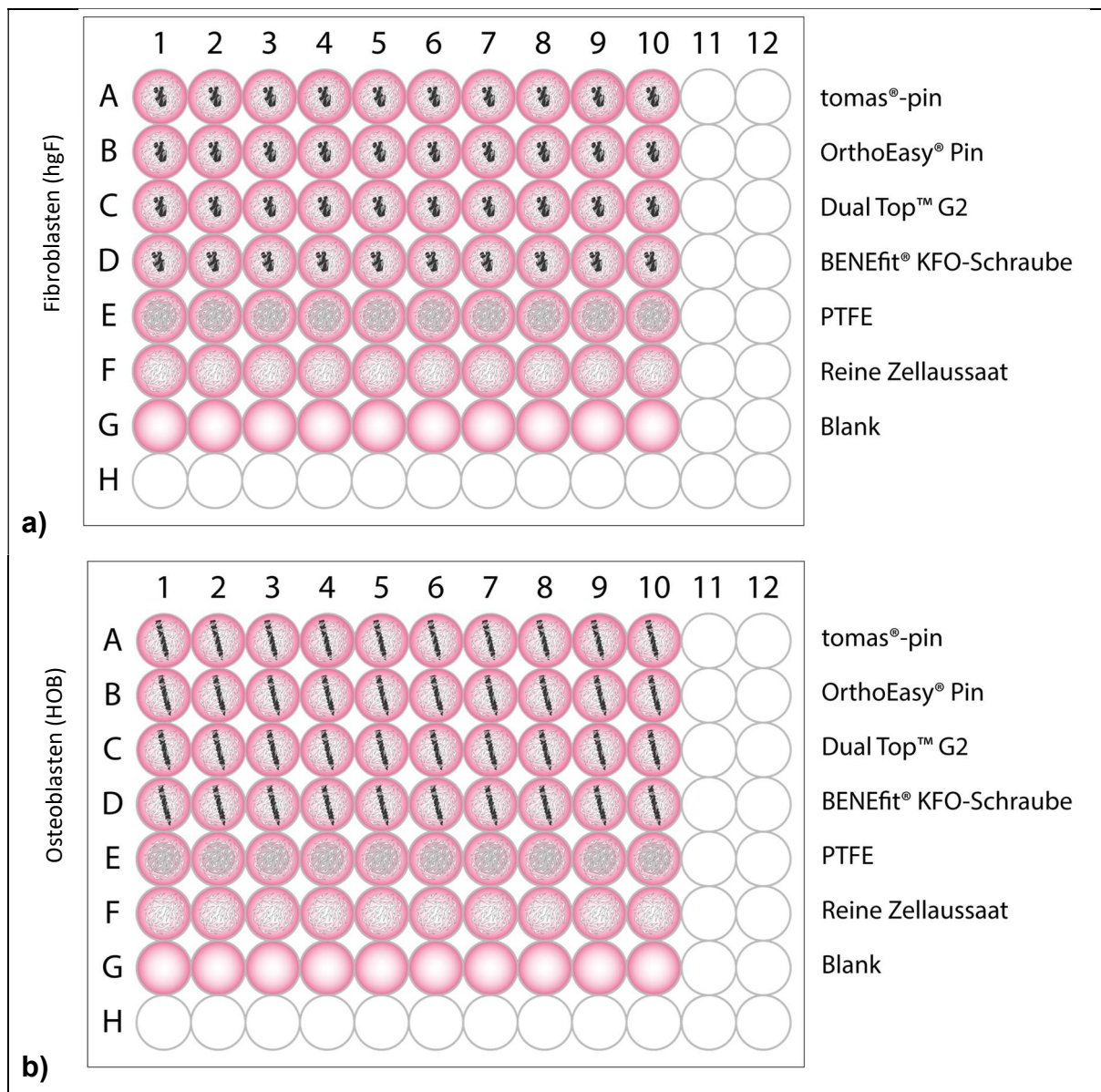


Abb. 5: Zellaussaat für die quantitative Bestimmung der Adhäsion der Zellen mittels XTT

Zellaussaat von 2×10^4 Zellen / 250 μ l / Well

a) Adhäsion der Fibroblasten (hgF) an den Köpfen / Hälsen

b) Adhäsion der Osteoblasten (HOB) an den Gewinden

2.5.2. Qualitative Bestimmung der Zelladhäsion mittels REM

In einem weiteren Durchlauf wurden die Minischrauben mit den zwei unterschiedlichen Zelltypen in Kontakt gebracht und die Adhäsion mittels REM qualitativ beurteilt. In diesem Versuchsteil wurden die OMI nicht getrennt, sondern die jeweiligen Zelltypen an allen Bereichen der Minischrauben betrachtet. Die Schrauben wurden vor der Verwendung in der Zellkultur ebenfalls für 15 Minuten im Ultraschallbad in Alkohol gereinigt und anschließend 15 Minuten bei 121°C sterilisiert.

Hierfür wurden zwei 24-Well-Platten jeweils wie folgt bestückt (Abb. 6): In Spalte 1-4 wurden pro Herstellertyp in je 2 Wells die entsprechenden Schrauben gelegt. In Spalte 5 wurde je ein zugeschnittenes PTFE-Plättchen und in Zeile 6 je ein TC-Deckglas gegeben. In Zeile A und B erfolgte eine Zellaussaat von 9×10^4 Zellen pro Well.

Nach der Zellaussaat wurden die Platten für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die adhärenierten Zellen an den Schrauben, den PTFE-Plättchen und den TC-Deckgläser auf folgende Weise fixiert und getrocknet. Das alte Medium wurde abgesaugt und die Wells wurden drei Mal mit PBS gewaschen. Auf die Minischrauben, die PTFE-Plättchen sowie die TC-Deckgläser wurde 2,5%ige Glutaraldehyd-Lösung zur Fixierung der Zellen gegeben. Die Platte wurde für 45 Minuten kühl gelagert. Im Anschluss wurden die Proben erneut mit PBS gespült und die Zellen durch eine aufsteigende Alkoholreihe und HMDS entwässert (1x für 5min 25% ETOH, 1x für 5min 50% ETOH, 1x für 5min 75% ETOH, 1x für 5min 95% ETOH, 3x für 10min 100% ETOH, 1x für 10min 50% HMDS, 2x für 10min 100% HMDS). Die Proben wurden auf Filterpapier ausgelegt, damit die überschüssige Flüssigkeit aufgesaugt wird. Es erfolgte eine trockene Lagerung im Exsikkator für mindestens eine Nacht. Anschließend wurden die Proben auf Probentellern fixiert und mithilfe eines Sputter-Gerätes eine 5nm dicke Goldschicht auf ihre Oberfläche aufgetragen.

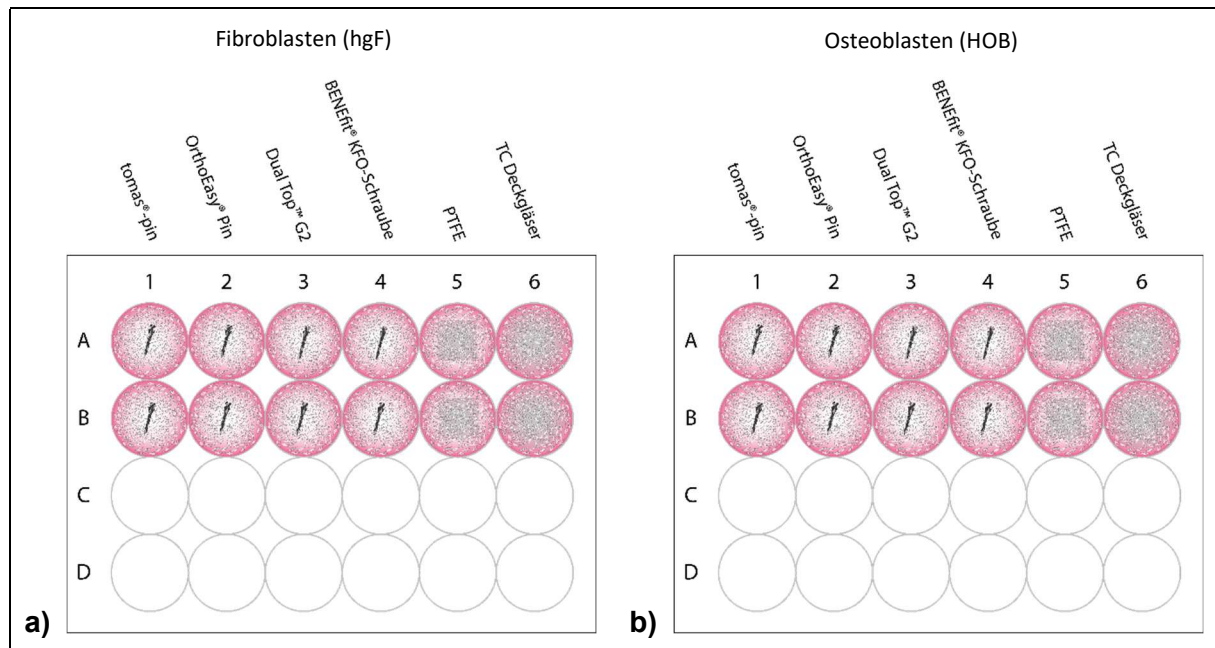


Abb. 6: Zellaussaat für die qualitative Bestimmung der Adhäsion von Fibroblasten (a) und Osteoblasten (b) mittels REM

Zellaussaat von 9×10^4 Zellen / 1ml / Well

- a) Adhäsion der Fibroblasten an den Minischrauben
- b) Adhäsion der Osteoblasten an den Minischrauben

2.6. Statistik

Die statistische Auswertung sowie die graphische Darstellung der quantitativen Ergebnisse der Vor- und Hauptversuche erfolgten mit Hilfe von Excel. Hierbei wurden die XTT-Werte auf die Probenoberfläche bezogen, um normierte Werte zu erhalten.

Bei der statistischen Auswertung wurde durch den Kolmogorov-Smirnov-Test zunächst die Normalverteilung der Werte überprüft. Im Anschluss wurde mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) nach statistisch signifikanten Unterschieden zwischen den gesamten Kategorien gesucht. Zuletzt wurden anhand des Scheffé-Post-Hoc-Tests signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Kategorien herausgearbeitet. Es wurde mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ gearbeitet.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Oberflächenstruktur und Zusammensetzung der verwendeten Minischrauben

3.1.1. Oberflächenvermessung mittels Dentalscanner

Die Oberflächenvermessung der Minischrauben mit Hilfe des Dentalscanners, der VisCAM View-Software und der Geomagic Wrap-Software ergab die untenstehenden Werte. Die Flächen verstehen sich inklusive der Querschnittsfläche, die durch die Trennung der Schrauben entstanden ist.

	Oberflächenvermessung mittels Dentalscanner		Oberfläche laut Herstellerangaben [mm ²]
	Oberfläche der Köpfe/Hälse [mm ²]	Oberfläche der Gewinde [mm ²]	
tomas®-pin SD N 08	43,08	35,07	79,33 (Gesamtoberfläche)
OrthoEasy® Pin	62,99	42,93	keine Angabe
Dual Top™ G2	41,9	37,48	39,12 (Gewindeoberfläche)
BENEFIT® KFO-Schraube	84,71	54,4	keine Angabe
PTFE	39,27	39,27	

Tab. 4: Oberflächenvermessung mittels Dentalscanner

3.1.2. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Minischrauben

Zum Vergleich der Oberfläche der verschiedenen Produkte wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen bei 500-facher Vergrößerung angefertigt (Abb. 7-11).

Der Großteil der Köpfe der unterschiedlichen Produkte weist Überstände an den Kanten auf. An allen Köpfen sind Schliiffacetten erkennbar, die sich jedoch in ihrer Ausprägung unterscheiden (Abb. 7a-10a).

Die Hälse der verschiedenen Minischrauben unterscheiden sich deutlich in ihrer Mikrostruktur. Während einige Hälse eine glatte Oberfläche besitzen (tomas®-pin und Dual Top™ G2), weisen andere eine feine Rillenstruktur auf (OrthoEasy® Pin und BENEFIT® KFO-Schraube). Teilweise sind punktförmige Einkerbungen diesen Strukturen aufgelagert (OrthoEasy® Pin und Dual Top™ G2) (Abb. 7b-10b).

Ergebnisse

Die Gewinde aller Produkte weisen eine Rillenstruktur auf. Bei einigen OMIs zeigt sich diese durchgezogen (tomas®-pin und BENeFit® KFO-Schraube), bei anderen auf Abschnitte begrenzt (Dual Top™ G2 und OrthoEasy® Pin). Die Schrauben weisen deutliche Unterschiede bezüglich ihrer Schneidekanten auf. Während einige Produkte scharfkantige Schneiden besitzen, weisen andere abgerundete oder abgeflachte Schneiden auf (Abb. 7c-10c).

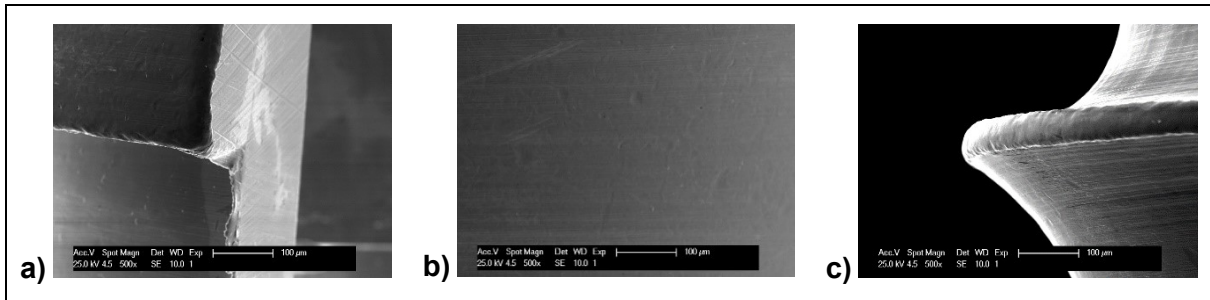


Abb. 7: Oberflächenstruktur des tomas®-pins

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Oberflächenstruktur an verschiedenen Bereichen des tomas®-pins bei 500-facher Vergrößerung.

- a) Kopf: Substanzüberstände an den Kanten des Kopfes; erkennbare feine Schliiffacetten im Bereich des Kreuzslots
- b) Hals: unregelmäßige Einkerbungen aufgelagert auf einer glatten Oberfläche
- c) Gewinde: feine durchgezogene Rillenstruktur an den Flanken; abgerundete Schneide

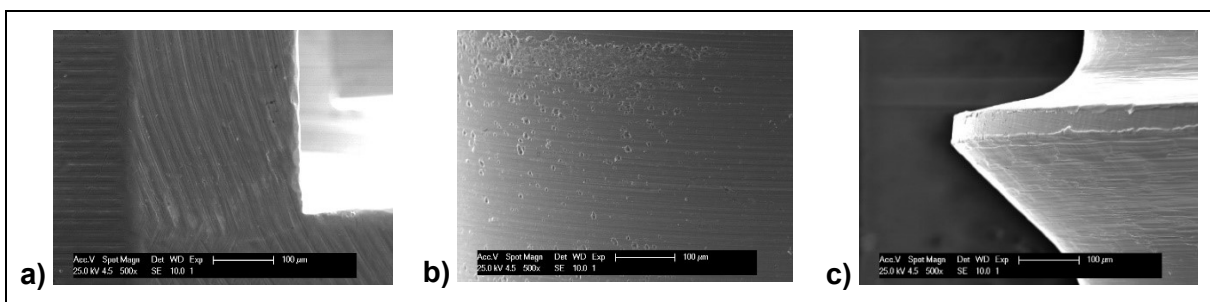


Abb. 8: Oberflächenstruktur des OrthoEasy® Pins

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Oberflächenstruktur an verschiedenen Bereichen des OrthoEasy® Pins bei 500-facher Vergrößerung.

- a) Kopf: definierte Kanten ohne Überstände, aber mit diversen Einkerbungen; teilweise breite Schliiffacetten
- b) Hals: punktförmige Einkerbungen aufgelagert auf einer feinen durchgezogenen Rillenstruktur
- c) Gewinde: feine abschnittsweise Rillenstruktur an den Flanken; abgeflachte Schneide

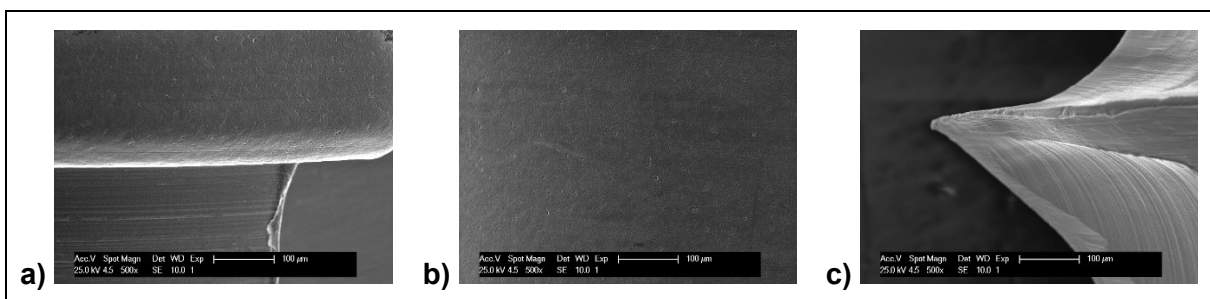


Abb. 9: Oberflächenstruktur der Dual Top™ G2

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Oberflächenstruktur an verschiedenen Bereichen der Dual Top™ G2 bei 500-facher Vergrößerung.

- a) Kopf: Substanzüberstände an den Kanten des Kopfes; erkennbare feine Schliiffacetten
- b) Hals: punktförmige Einkerbungen aufgelagert auf einer glatten Oberfläche
- c) Gewinde: feine abschnittsweise Rillenstruktur an den Flanken; spitze scharfkantige Schneide

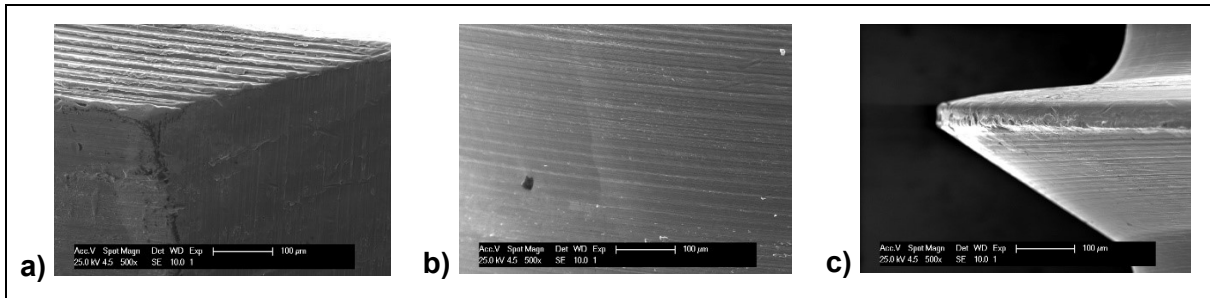


Abb. 10: Oberflächenstruktur der BENEFit® KFO-Schraube

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Oberflächenstruktur an verschiedenen Bereichen der BENEFit® KFO-Schraube bei 500-facher Vergrößerung.

- a) Kopf: Substanzüberstände an den Kanten des Kopfes; teilweise breite Schliffacetten
- b) Hals: durchgezogene Rillenstruktur ohne Einkerbungen
- c) Gewinde: feine durchgezogene Rillenstruktur an den Flanken; abgerundete Schneide

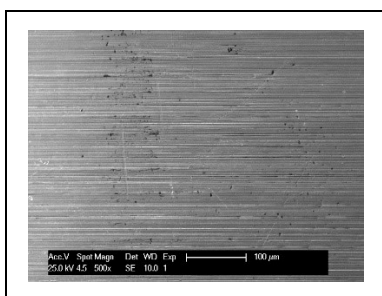


Abb. 11: Oberflächenstruktur des BENEFit® Abutment Standard

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Oberflächenstruktur des BENEFit® Abutment Standard bei 500-facher Vergrößerung; feine durchgezogene Rillenstruktur

3.1.3. EDX-Analyse zur Ermittlung der chemischen Zusammensetzung

Wie bereits im Material-/Methoden-Teil beschrieben erfolgte die Kalibrierung mit einer Kupfer-Aluminium-Probe, wodurch lediglich auf das Vorhandensein von Elementen geschlossen werden kann. Dennoch konnte mit der Ausnahme von einem Teil der BENEFit® KFO-Schrauben gezeigt werden, dass alle Elemente nachweisbar waren und sich die Konzentrationen untereinander ähneln.

Bei zwei BENEFit® KFO-Schrauben waren im EDX-Spektrum keine Peaks für Aluminium und Vanadium zu finden, was auf Reintitan als Material schließen lässt. Nach Rücksprache mit Dentalline hat sich herausgestellt, dass die Schrauben, die von PSM zur Verfügung gestellt wurden, DEMO-Schrauben waren, die von den an Kunden verkauften Schrauben abweichen können.

Bei den OrthoEasy® Pins ist in dem Spektrum ein weiterer Peak zu erkennen, der sich Sauerstoff zuordnen lässt. Dies ist auch zu erwarten, da die Schrauben durch eine Oxidschicht farblich kodiert sind.

Zudem ist bei allen Produkten ein Peak bei 0,26 keV erkennbar, der sich Kohlenstoff zuordnen lässt. Dies deutet auf Verunreinigungen der Oberfläche durch die Umgebung hin.

Ergebnisse

Bei den Abutments konnten alle Elemente, die laut Herstellerangabe vorhanden sind, auch nachgewiesen werden.

	Ti	Al	V	Fe	O	C	N	H
Massenanteil (%) laut Herstellerangabe (gem. DIN ISO 5832-3 / ASTM F 136)	Rest	5,5-6,75 / 5,5-6,50	3,5-4,5	max. 0,3 / 0,25	max. 0,2 / 0,13	max. 0,08	max. 0,05	max. 0,015 / 0,012

Tab.5: Legierungsbestandteile der Minischrauben laut Herstellerangaben

	Cr	Ni	Mo	Mn	Si	Cu	N	C	P	S
Massenanteil (%) laut Herstellerangabe	17,00- 19,00	13,00- 15,50	2,50- 3,20	max. 2,00	max. 1,00	max. 0,50	max. 0,10	max. 0,03	max. 0,025	max. 0,01

Tab.6: Legierungsbestandteile des BENEFIT® Abutment Standard laut Herstellerangaben
Werkstoff: X2CrNiMo18-15-3

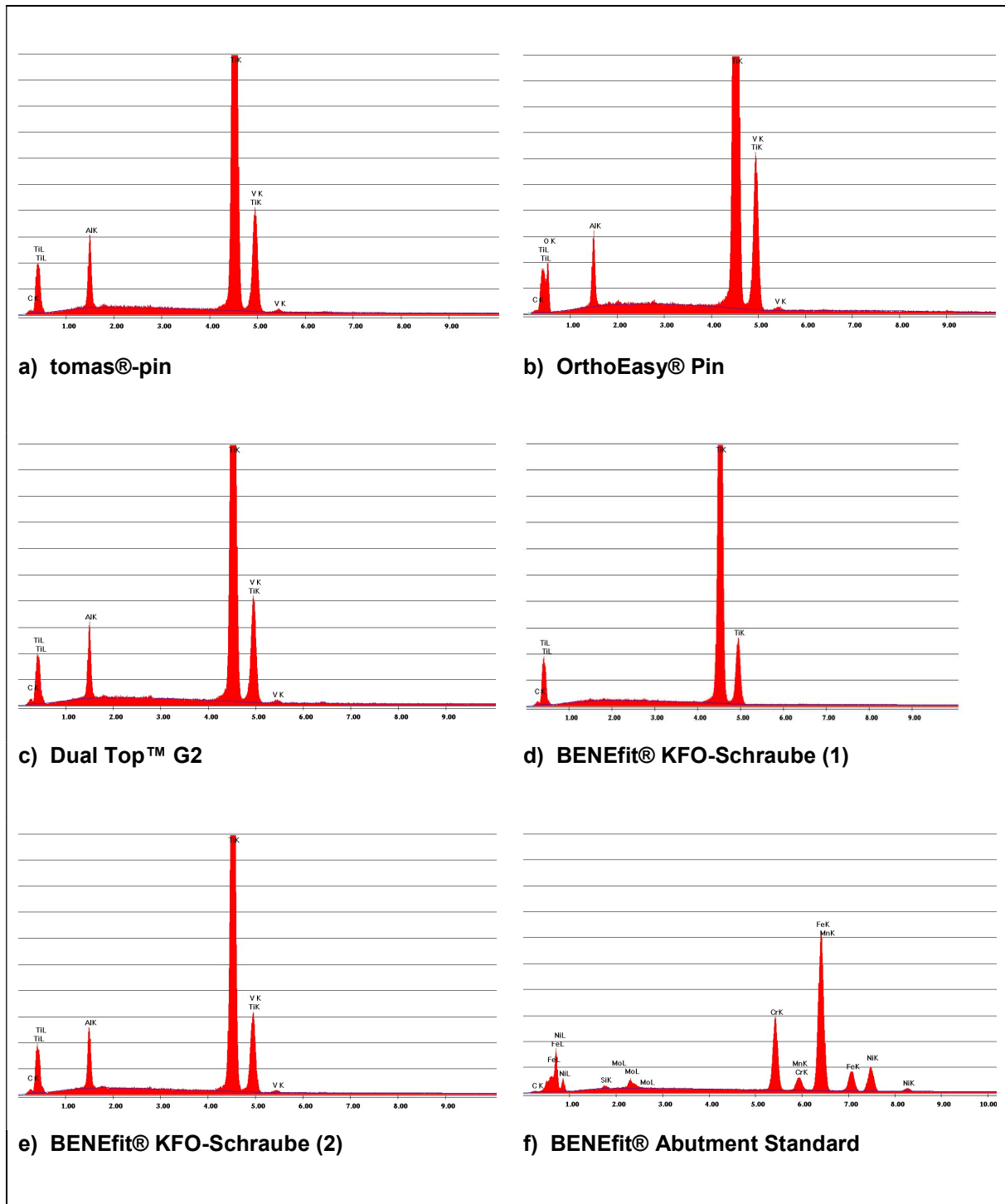


Abb. 12: EDX-Spektrum der Legierungen der Minischrauben und des Abutments

Hauptpeaks der K-Schale, vereinzelte Angabe der Nebenpeaks der L-Schale

- a) tomas®-pin: Peak bei 0,26keV lässt auf Kohlenstoff schließen
- b) OrthoEasy® Pin: Peak bei 0,50keV zeigt den Sauerstoff aus der Oxidschicht an, Peak bei 0,26keV lässt auf Kohlenstoff schließen
- c) Dual Top™ G2: Peak bei 0,26keV lässt auf Kohlenstoff schließen
- d) BENEFit® KFO-Schraube (1): Lediglich Peaks für Titan und Kohlenstoff erkennbar
- e) BENEFit® KFO-Schraube (2): Peak bei 0,26keV lässt auf Kohlenstoff schließen
- f) BENEFit® Abutment Standard: Peak bei 0,26keV lässt auf Kohlenstoff schließen

3.2. Vorversuche zum XTT-Test

3.2.1. Zelladhäsion und Zytotoxizität von PTFE

Die Messung mittels Photometrie ergab einen signifikanten Unterschied zwischen dem XTT-Umsatz bei der Zellaussaat auf dem PTFE und bei der Zellaussaat auf dem TC-Deckglas sowie zwischen dem XTT-Umsatz bei der Zellaussaat auf dem PTFE und dem Blank. Kein signifikanter Unterschied ergab sich zwischen dem XTT-Umsatz bei der Zellaussaat auf den TC-Deckgläsern und der Zellaussaat auf den TC-Deckgläsern + Insert mit PTFE. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass PTFE keinen zytotoxischen Effekt aufweist und dass an PTFE lediglich geringe Zelladhäsion stattfindet.

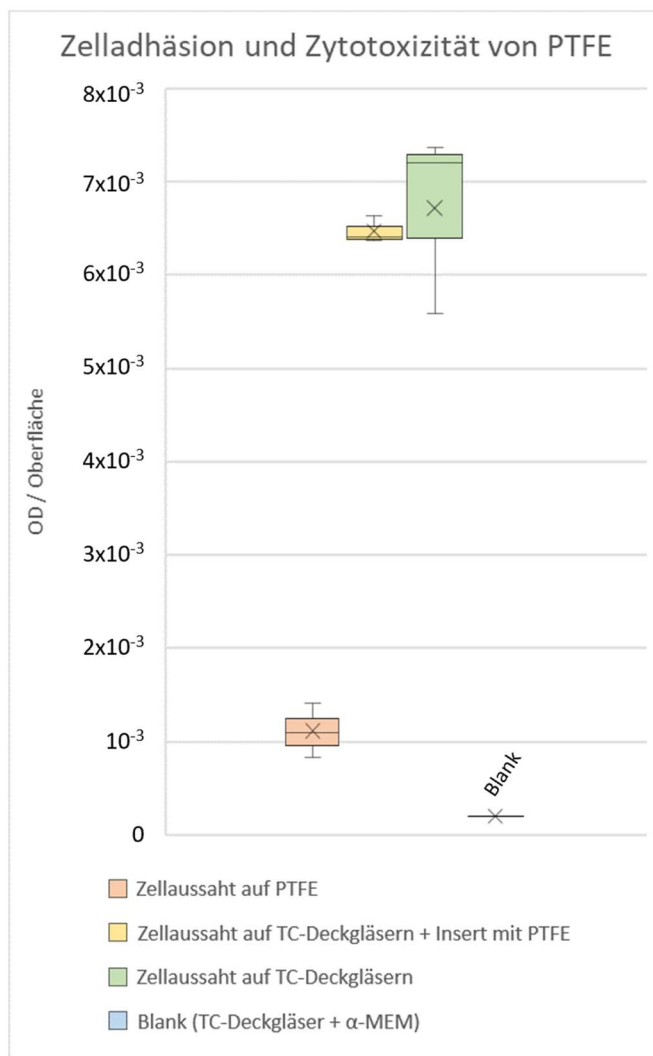


Abb. 13: Zelladhäsion und Zytotoxizität von PTFE

Zellaussaat auf PTFE	MW: $1,11 \times 10^{-3}$ OD/mm ²	SD: $2,88 \times 10^{-4}$ OD/mm ²
Zellaussaat auf TC-Deckgläsern + Insert mit PTFE	MW: $6,47 \times 10^{-3}$ OD/mm ²	SD: $1,43 \times 10^{-4}$ OD/mm ²
Zellaussaat auf TC-Deckgläsern	MW: $6,72 \times 10^{-3}$ OD/mm ²	SD: $9,87 \times 10^{-4}$ OD/mm ²
Blank	MW: $2,00 \times 10^{-4}$ OD/mm ²	SD: $4,35 \times 10^{-6}$ OD/mm ²

3.2.2. Umsetzung des XTT durch Medium, Minischrauben und PTFE in Abwesenheit von Zellen

Die Messung mittels Photometrie ergab zwischen allen Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass keine Umsetzung des XTT durch das Medium, die Minischrauben oder das PTFE stattfindet.

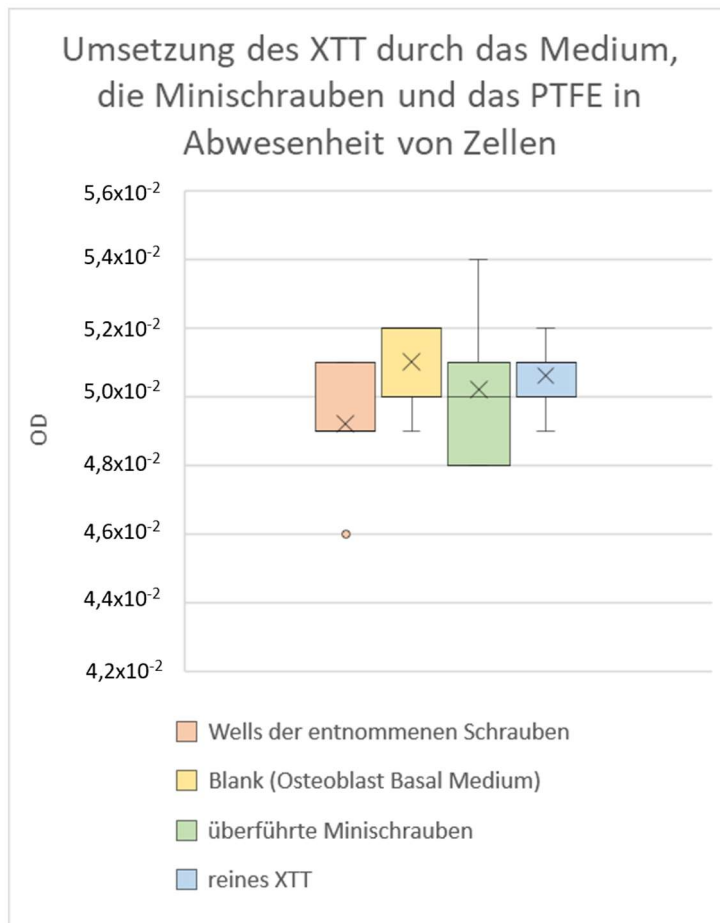


Abb.14: Umsetzung des XTT durch Medium, Minischrauben und PTFE in Abwesenheit von Zellen

Wells der entnommenen Schrauben
Blank (Osteoblast Basal Medium)
Überführte Minischrauben
Reines XTT

MW: 4,92x10⁻² OD
MW: 5,10x10⁻² OD
MW: 5,02x10⁻² OD
MW: 5,06x10⁻² OD

SD: 2,05x10⁻³ OD
SD: 1,41x10⁻³ OD
SD: 2,49x10⁻³ OD
SD: 1,14x10⁻³ OD

3.3. Hauptversuche

3.3.1. Quantitative Bestimmung der Zelladhäsion mittels XTT

Die Messungen mittels Photometrie ergaben bei allen Schraubenanteilen der Hersteller und bei beiden Zelllinien einen signifikant größeren Unterschied zu dem Blank.

Bei den Fibroblasten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Zelladhäsion an den Köpfen/Hälsen unter den verschiedenen Herstellerfirmen. Es ergab sich auch kein signifikanter Unterschied zum PTFE. Bei den Osteoblasten hingegen bestanden teilweise signifikante Unterschiede zwischen der Zelladhäsion an den Gewinden der unterschiedlichen Herstellerfirmen. Die Unterschiede lagen zwischen dem tomas®-pin und der BENEFIT® KFO-Schraube, sowie zwischen der Dual Top™ G2 und der BENEFIT® KFO-Schraube vor. Des Weiteren war hier ein signifikanter Unterschied bei allen Gewinden der unterschiedlichen Herstellerfirmen zu dem PTFE vorhanden.

Ergebnisse

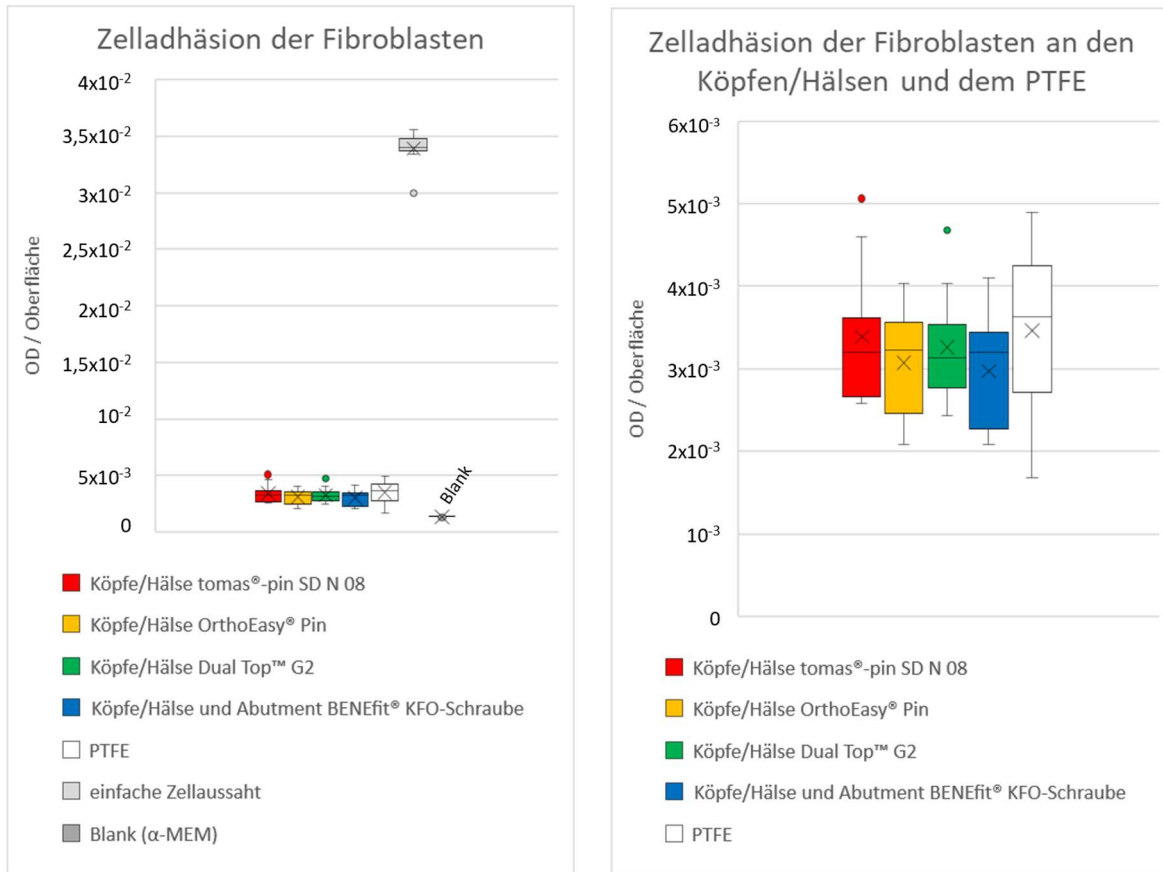


Abb. 15: Quantitative Bestimmung der Zelladhäsion von Fibroblasten (hgF) mittels XTT

Köpfe/Hälsen tomas®-pin	MW: $3,38 \times 10^{-3}$ OD/mm ²	SD: $8,67 \times 10^{-4}$ OD/mm ²
Köpfe/Hälsen OrthoEasy® Pin	MW: $3,07 \times 10^{-3}$ OD/mm ²	SD: $6,61 \times 10^{-4}$ OD/mm ²
Köpfe/Hälsen Dual Top™ G2	MW: $3,26 \times 10^{-3}$ OD/mm ²	SD: $6,90 \times 10^{-4}$ OD/mm ²
Köpfe/Hälsen BENEFIT® KFO-Schraube	MW: $2,97 \times 10^{-3}$ OD/mm ²	SD: $7,06 \times 10^{-4}$ OD/mm ²
PTFE	MW: $3,46 \times 10^{-3}$ OD/mm ²	SD: $1,06 \times 10^{-3}$ OD/mm ²
einfache Zellaussaat	MW: $3,39 \times 10^{-2}$ OD/mm ²	SD: $1,56 \times 10^{-3}$ OD/mm ²
Blank (α-MEM)	MW: $1,32 \times 10^{-3}$ OD/mm ²	SD: $3,60 \times 10^{-5}$ OD/mm ²

Ergebnisse

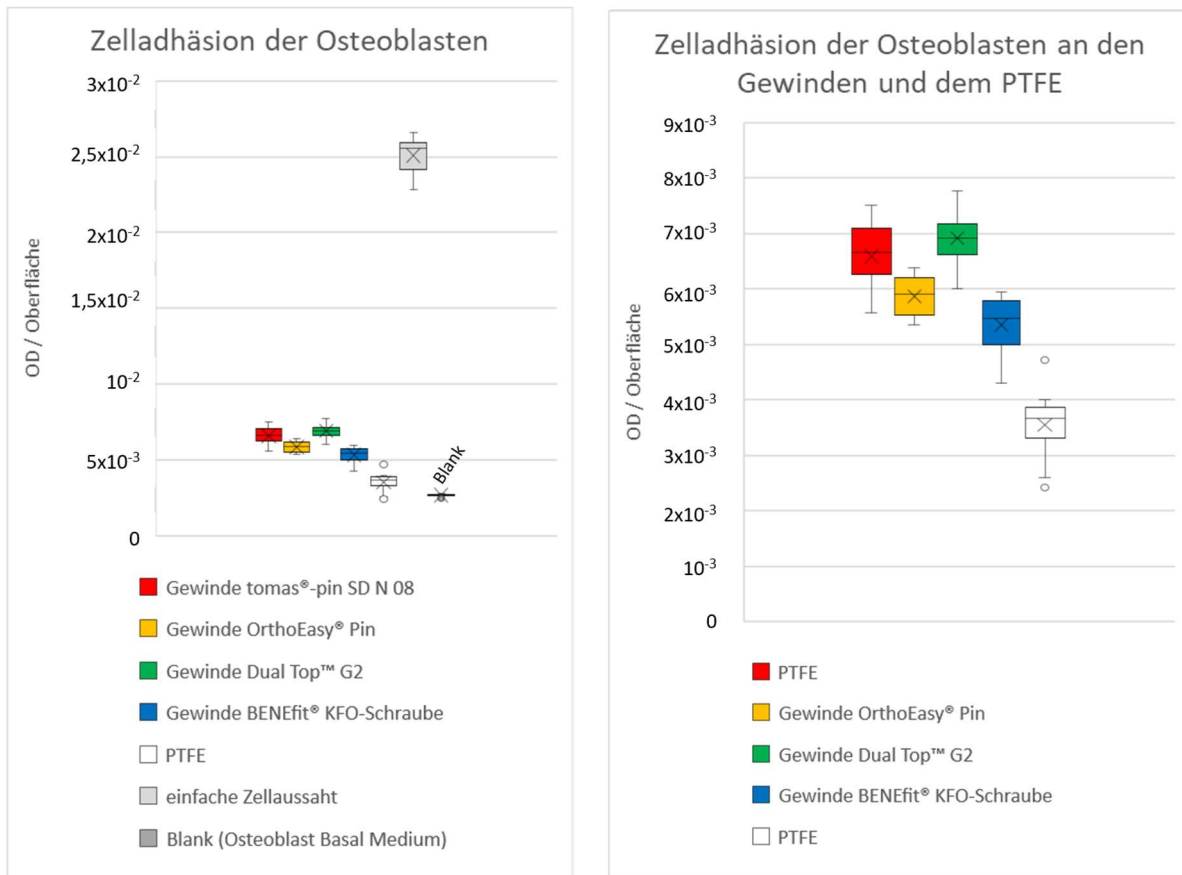


Abb. 16: Quantitative Bestimmung der Zelladhäsion von Osteoblasten (HOB) mittels XTT

Gewinde tomas®-pin	MW: $6,59 \times 10^{-3}$ OD/mm ²	SD: $6,39 \times 10^{-4}$ OD/mm ²
Gewinde OrthoEasy® Pin	MW: $5,87 \times 10^{-3}$ OD/mm ²	SD: $3,83 \times 10^{-4}$ OD/mm ²
Gewinde Dual Top™ G2	MW: $6,92 \times 10^{-3}$ OD/mm ²	SD: $5,35 \times 10^{-4}$ OD/mm ²
Gewinde BENEFIT® KFO-Schraube	MW: $5,35 \times 10^{-3}$ OD/mm ²	SD: $5,41 \times 10^{-4}$ OD/mm ²
PTFE	MW: $3,54 \times 10^{-3}$ OD/mm ²	SD: $6,68 \times 10^{-4}$ OD/mm ²
einfache Zellaussaat	MW: $2,51 \times 10^{-2}$ OD/mm ²	SD: $1,23 \times 10^{-3}$ OD/mm ²
Blank (α-MEM)	MW: $2,69 \times 10^{-3}$ OD/mm ²	SD: $8,76 \times 10^{-5}$ OD/mm ²

3.3.2. Qualitative Bestimmung der Zelladhäsion mittels REM

Bei allen Herstellerfirmen ist in allen Abschnitten der OMIs Zelladhäsion sowohl der Fibroblasten als auch der Osteoblasten erkennbar (Abb. 17-20 + 22-25). Abschnitte, an denen keine Zellen anhaften, waren nicht vorhanden.

Zur Veranschaulichung der Zellform unter optimalen Adhäsionsbedingungen wurden TC-Deckgläser als Positivkontrolle verwendet (Abb. 21a + 26a). Hier lässt sich eine hohe Zelldichte vorfinden und die Fibroblasten zeigen sich lang ausgestreckt und spindelförmig, während die Osteoblasten eine flächige und polygonale Form annehmen. Auf dem PTFE, das als Negativkontrolle verwendet wurde, zeigt sich die Zellform unter schlechten Adhäsionsbedingungen (Abb. 21b + 26b). Bei beiden Zelltypen sind hier entweder keine oder nur vereinzelt Zellen zu erkennen, die sich abgekugelt oder nur geringfügig ausgestreckt darstellen.

Auch auf den Minischrauben zeigen sich die Fibroblasten überwiegend spindelförmig und die Osteoblasten in polygonaler Form. In bestimmten Bereichen wird die Zellform allerdings durch die Implantatoberfläche beeinflusst bzw. moduliert. In Bereichen mit Rillenstruktur (wie am Schraubengewinde) strecken sich die Zellen vermehrt spindelförmig und parallel zu den Rillen aus, während hingegen an glatten Flächen (wie meist am Implantathals) die polygonale Zellform überwiegt. Hier zeigen sich vor allem die Fibroblasten auch nur mäßig und unregelmäßig ausgestreckt, während die Ausbreitung am Gewinde viel stärker ausgeprägt ist.

Insgesamt zeigt sich in Bereichen mit Rillenstruktur eine tendenziell höhere Zelldichte als an glatten Flächen. Genaue quantitative Aussagen lassen sich mit den rasterelektronenmikroskopischen Bildern allerdings nicht treffen.

Bei dem OrthoEasy® Pin (Abb. 18 + 23), der als einziges Produkt eine Oxidschicht aufweist, zeigen sich keine Unterschiede in der Zelladhäsion zu den anderen Minischrauben. Insgesamt sind keine Unterschiede in der Qualität der Zelladhäsion zwischen den einzelnen Produkten zu erkennen.

Unabhängig vom Implantatbereich sind bei beiden Zelltypen vereinzelt auch abgekugelte Zellen sichtbar.

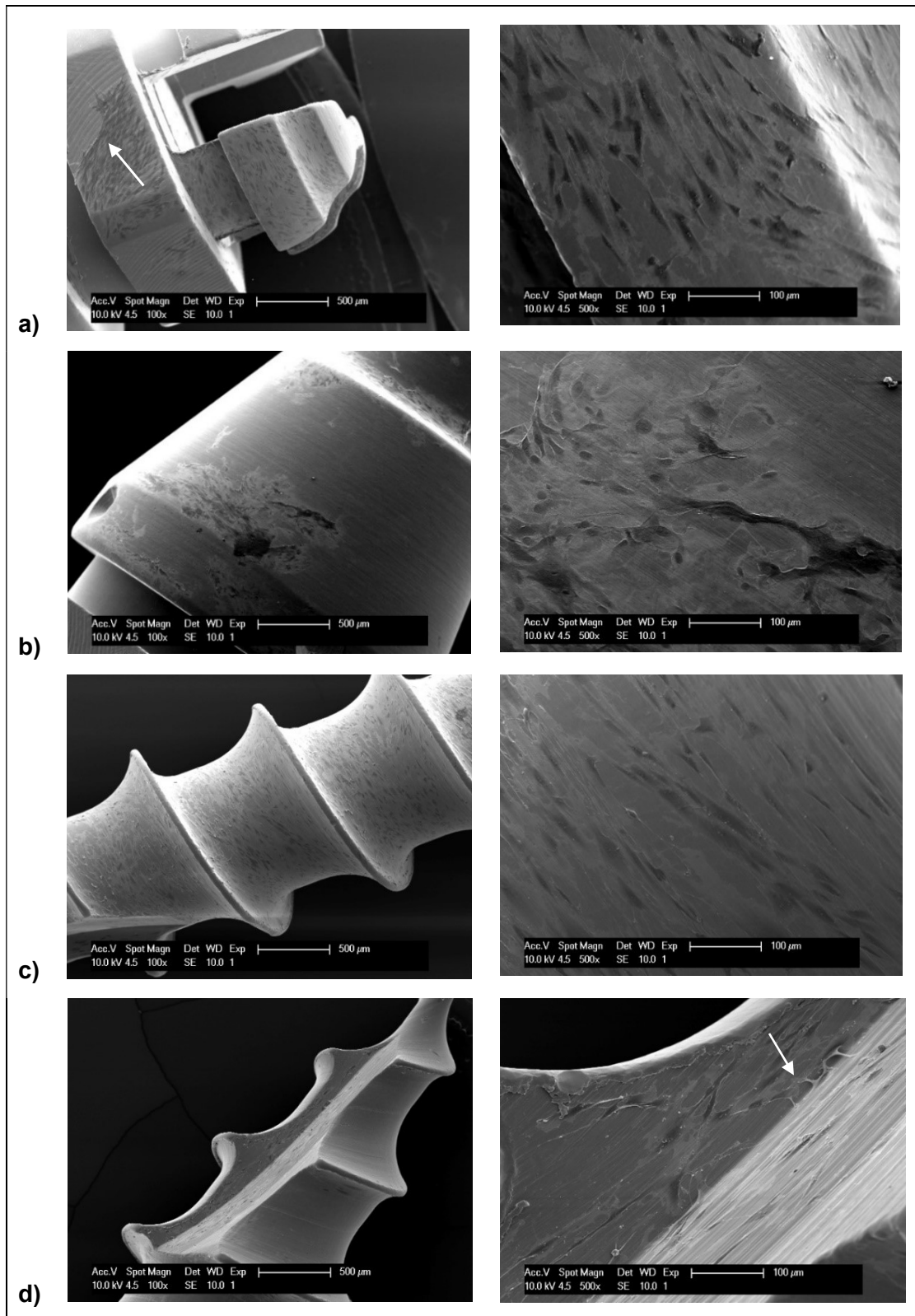


Abb. 17: Adhäsion von Fibroblasten an dem tomas®-pin

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Zelladhäsion von Fibroblasten an verschiedenen Bereichen des tomas®-pins bei 100- und 500-facher Vergrößerung.

- a) Kopf: Spindelförmig ausgestreckte Zellen, abgerissener Zellrasen (Pfeil)
- b) Hals: mäßig ausgestreckte Zellen mit polygonaler Form
- c) Gewinde: spindelförmig ausgestreckte Zellen mit Ausrichtung entlang der Rillen
- d) Gewinde (Spitze): Spindelförmig ausgestreckte Zellen mit Ausrichtung entlang der Rillen und deutlichen Ausläufern (Pfeil)

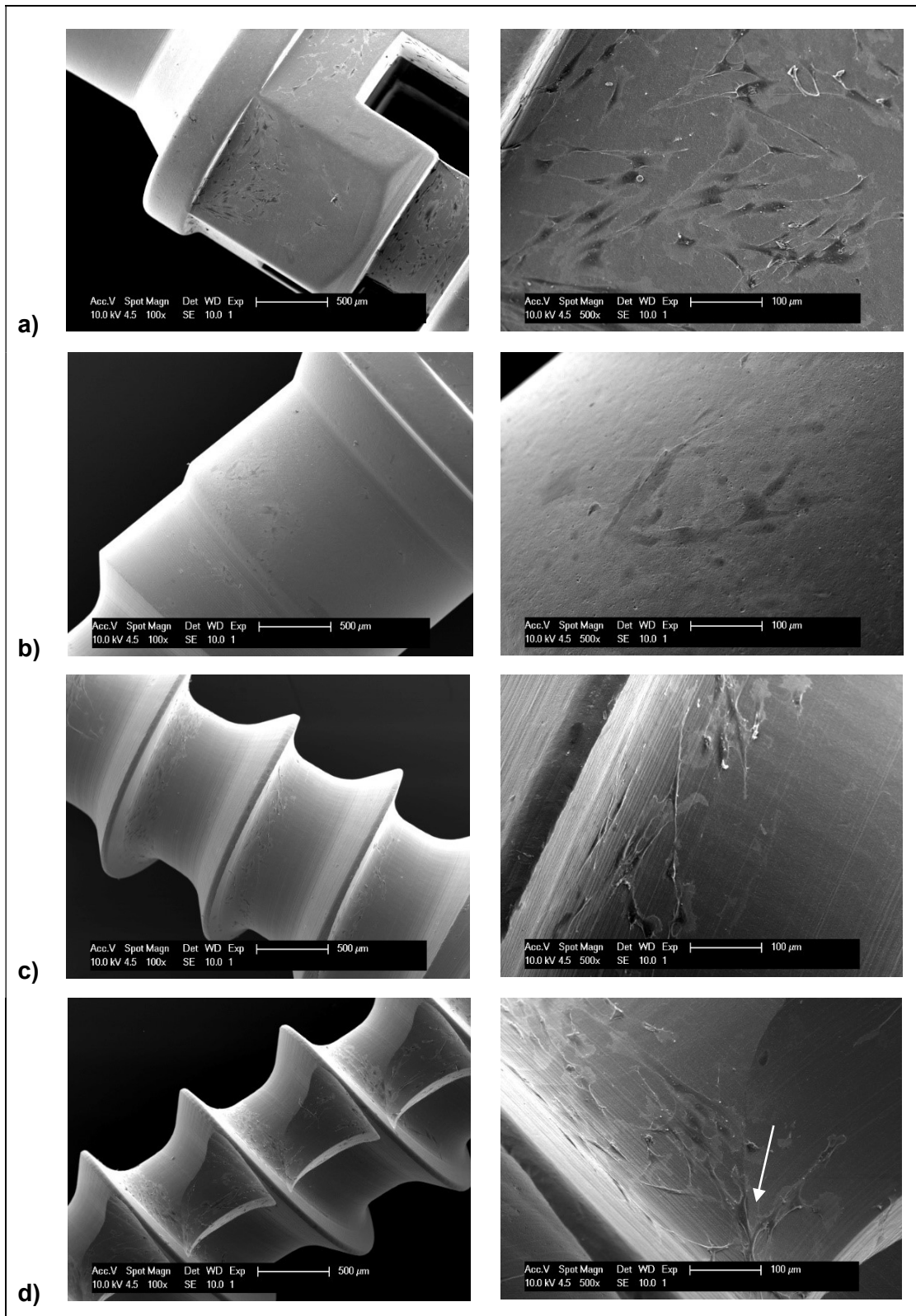


Abb. 18: Adhäsion von Fibroblasten an dem OrthoEasy® Pin

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Zelladhäsion von Fibroblasten an verschiedenen Bereichen des OrthoEasy® Pins bei 100- und 500-facher Vergrößerung.

- a) Kopf: Spindelförmig bis polygonal ausgestreckte Zellen
- b) Hals: Mäßig ausgestreckte Zellen mit polygonaler Form; geringe Zelldichte
- c) Gewinde: Spindelförmig ausgestreckte Zellen
- d) Gewinde (Kerben): Spindelförmig ausgestreckte Zellen, die Ausrichtung entlang der Rillen ist besonders an der Kante der Kerben zu erkennen (Pfeil)

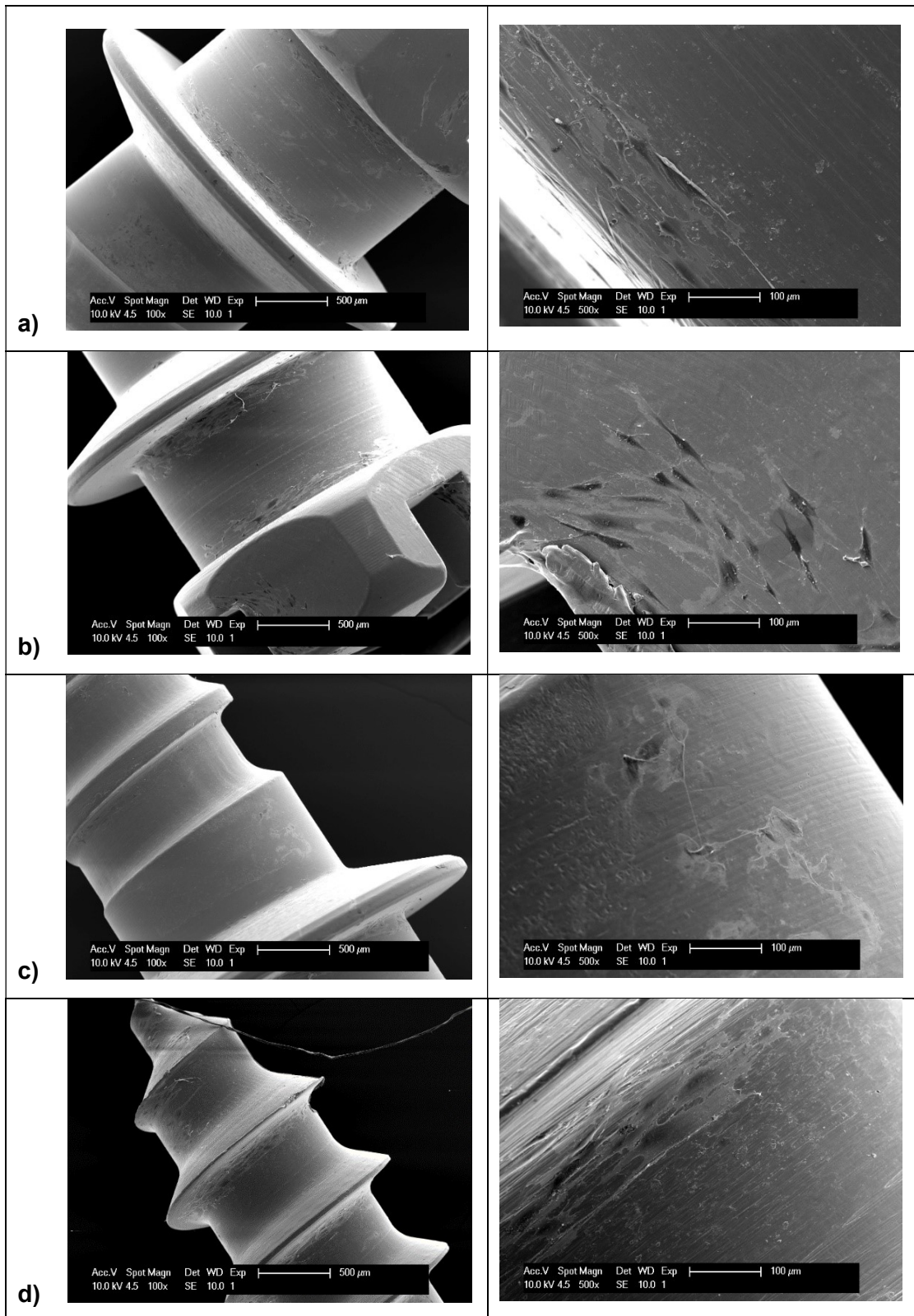


Abb. 19: Adhäsion von Fibroblasten an der Dual Top™ G2

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Zelladhäsion von Fibroblasten an verschiedenen Bereichen der Dual Top™ G2 bei 100- und 500-facher Vergrößerung.

- a)** Kopf: Spindelförmig ausgestreckte Zellen mit Ausrichtung entlang der Rillen
- b)** Kopf: Spindelförmig bis polygonal ausgestreckte Zellen
- c)** Hals: Mäßig ausgestreckte Zellen mit polygonaler Form
- d)** Gewinde: Spindelförmig ausgestreckte Zellen mit Ausrichtung entlang der Rillen

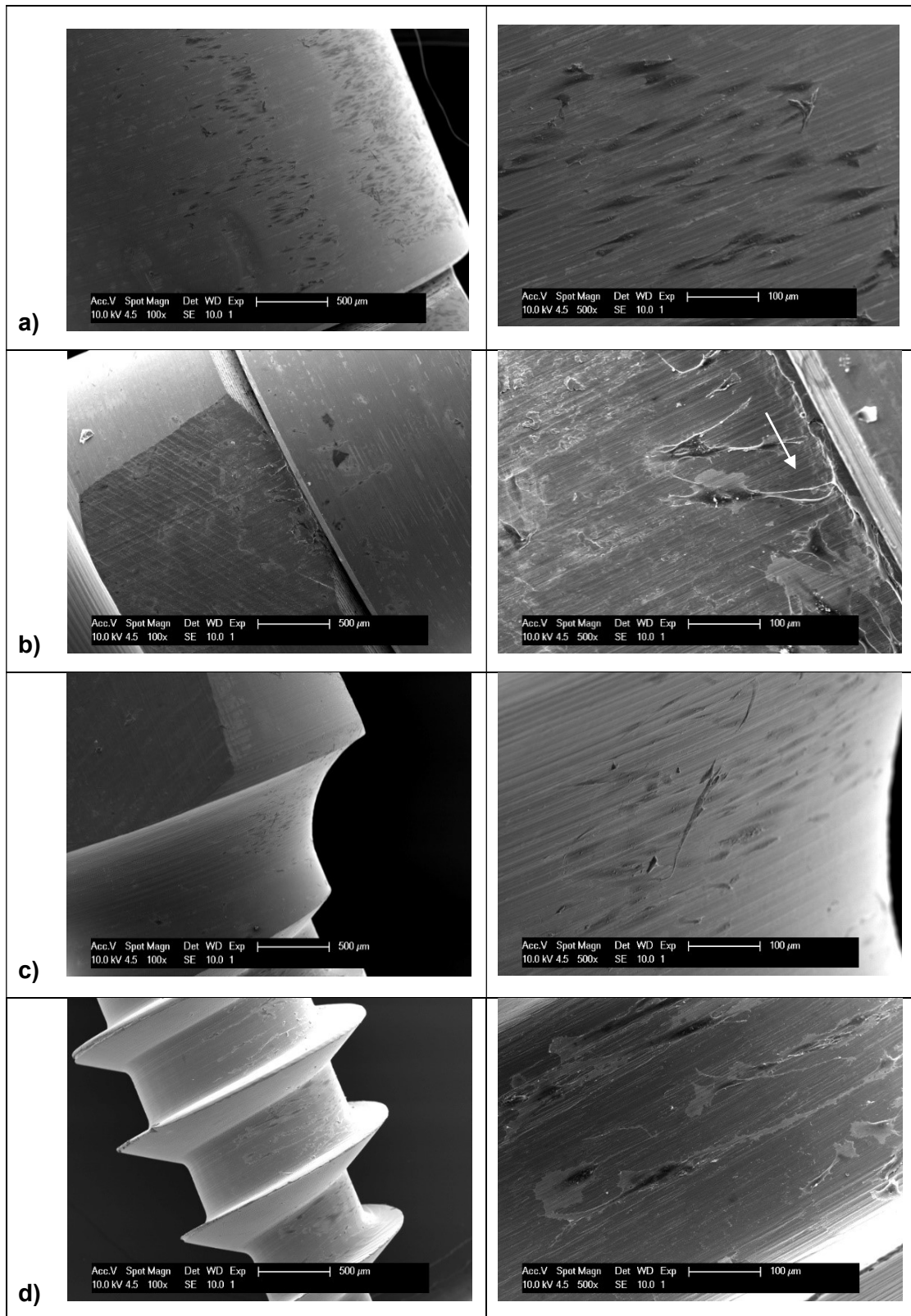


Abb. 20: Adhäsion von Fibroblasten an der BENEFIT® KFO-Schraube

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Zelladhäsion von Fibroblasten an verschiedenen Bereichen der BENEFIT® KFO-Schraube bei 100- und 500-facher Vergrößerung.

- a) Abutment: Spindelförmig ausgestreckte Zellen mit Ausrichtung entlang der Rillen
- b) Kopf: Spindelförmig ausgestreckte Zellen mit Ausrichtung entlang der Rillen und vereinzelt Ausläufern (Pfeil)
- c) Hals: Spindelförmig ausgestreckte Zellen entlang der Rillen
- d) Gewinde: Spindelförmig bis polygonal ausgestreckte Zellen mit Ausrichtung entlang der Rillen

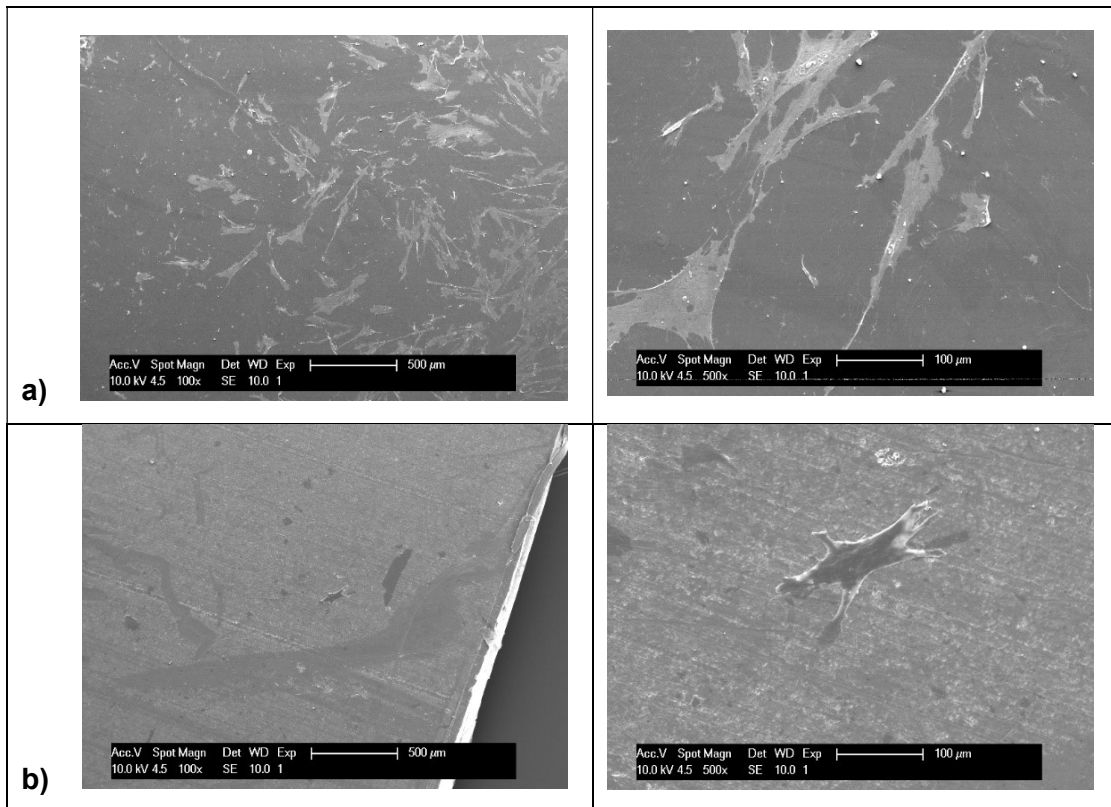


Abb. 21: Adhäsion von Fibroblasten an den Kontrollproben

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Zelladhäsion von Fibroblasten an den verschiedenen Kontrollproben bei 100- und 500-facher Vergrößerung.

- a)** TC-Deckgläschen (Positivkontrolle): Spindelförmig bis polygonal ausgestreckte Zellen mit zahlreichen Ausläufern, hohe Zelldichte
- b)** PTFE (Negativkontrolle): mäßig ausgestreckte bis abgekugelte Zellen, lediglich vereinzelte Zellen

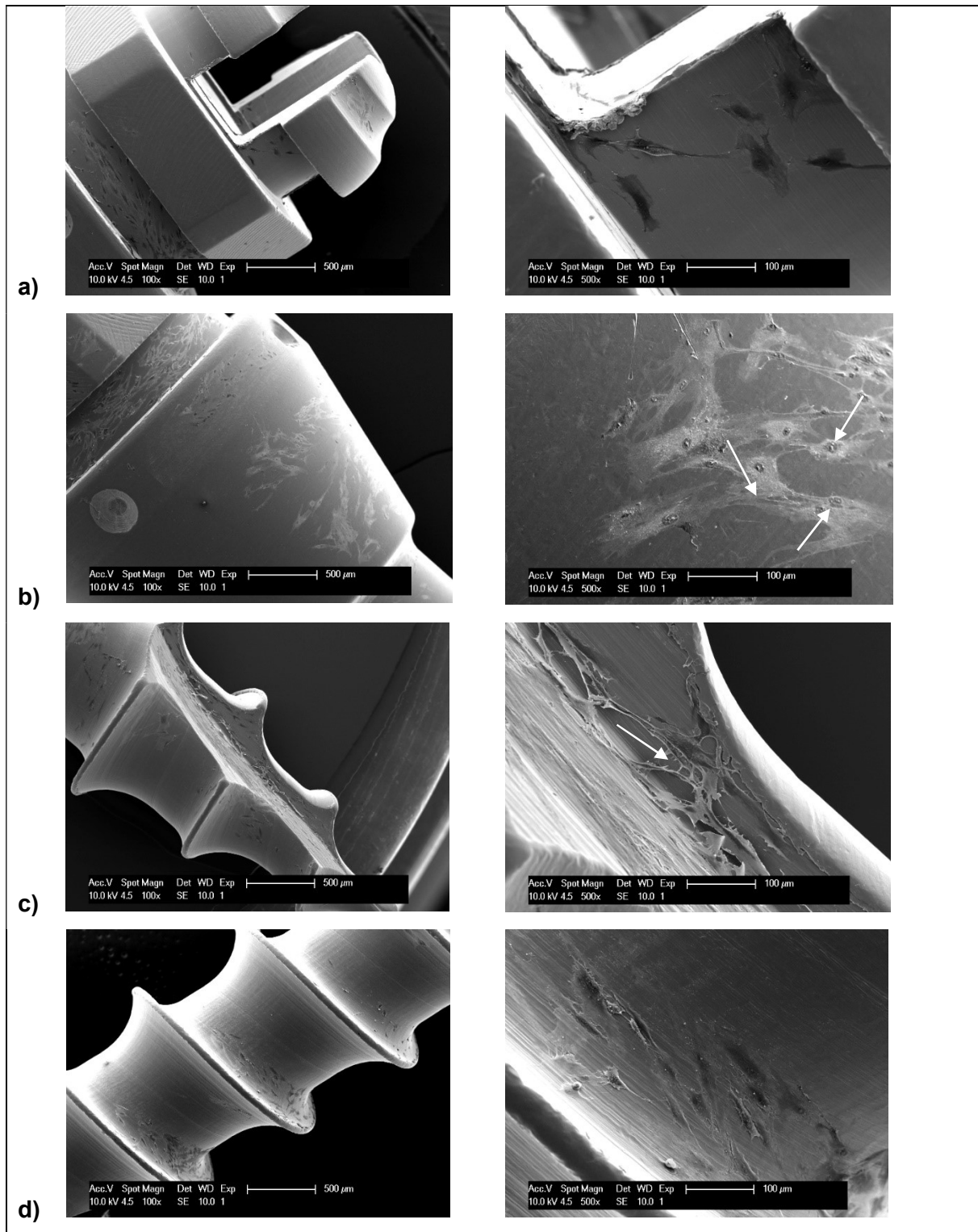


Abb. 22: Adhäsion von Osteoblasten an dem tomas®-pin

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Zelladhäsion von Osteoblasten an verschiedenen Bereichen des tomas®-pins bei 100- und 500-facher Vergrößerung.

- a) Kopf: Polygonale Zellen mit Ausläufern; geringe Zelldichte
- b) Hals: Polygonale Zellen mit starken Ausläufern und gut erkennbaren Zellkernen (Pfeile); geringe Zelldichte
- c) Gewinde: Polygonale Zellen mit starken Ausläufern; gute Vernetzung der Zellen untereinander erkennbar (Pfeil)
- d) Gewinde: Polygonale bis spindelförmige Zellen mit Ausrichtung entlang der Rillen erkennbar

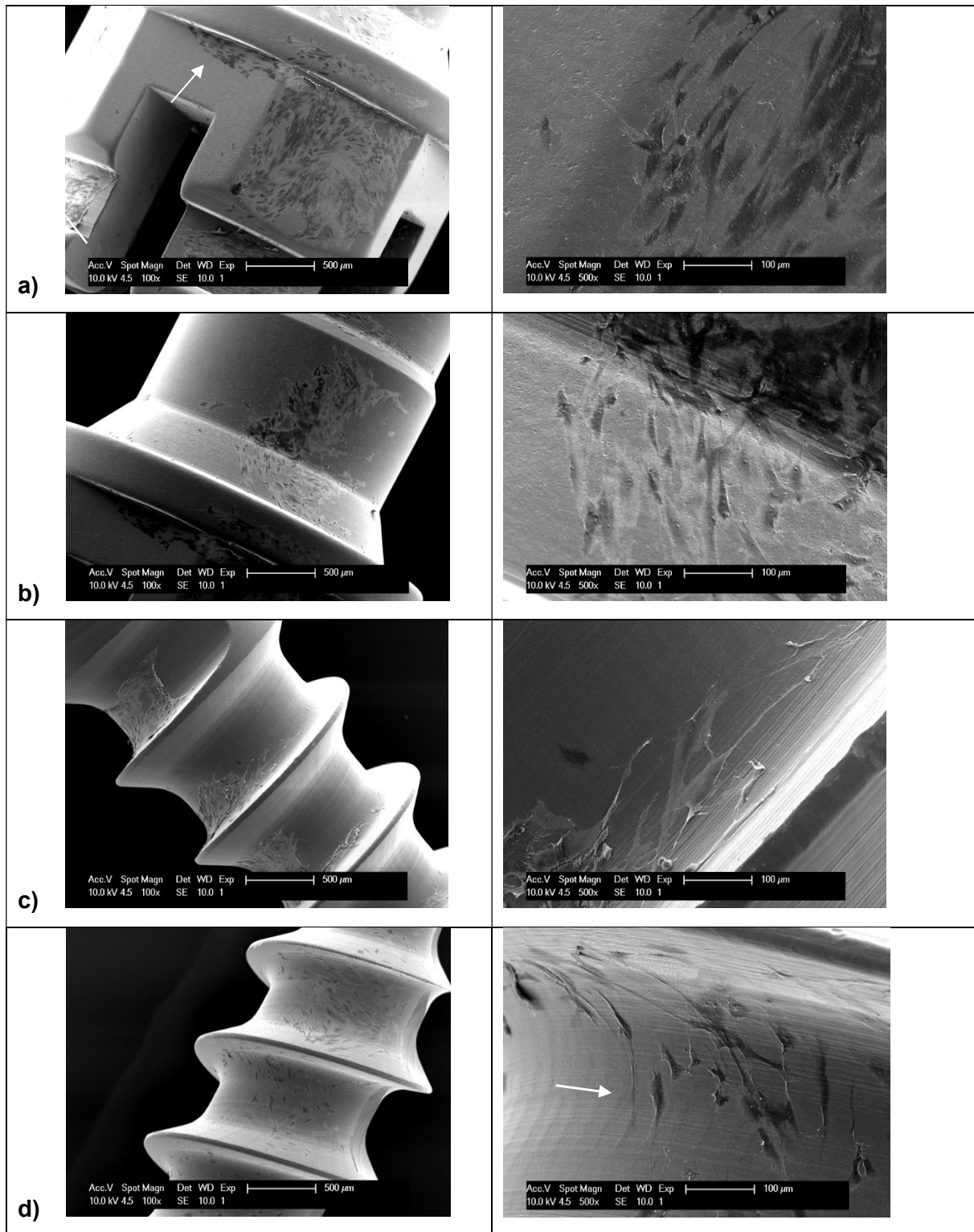


Abb. 23: Adhäsion von Osteoblasten an dem OrthoEasy® Pin

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Zelladhäsion von Osteoblasten an verschiedenen Bereichen des OrthoEasy® Pins bei 100- und 500-facher Vergrößerung.

- a) Kopf: Polygonal bis spindelförmig ausgestreckte Zellen; hohe Zelldichte; abgerissener Zellrasen (Pfeil)
- b) Hals: Polygonale Zellen mit zahlreichen Ausläufern
- c) Gewinde: Polygonale bis spindelförmig ausgestreckte Zellen mit ausgeprägten Zellausläufern mit Ausrichtung entlang der Rillen
- d) Gewinde: Polygonal bis spindelförmig ausgestreckte Zellen mit Ausrichtung entlang der feinen Längsrillen sowie entlang der überlagernden Querrillen (Pfeil)

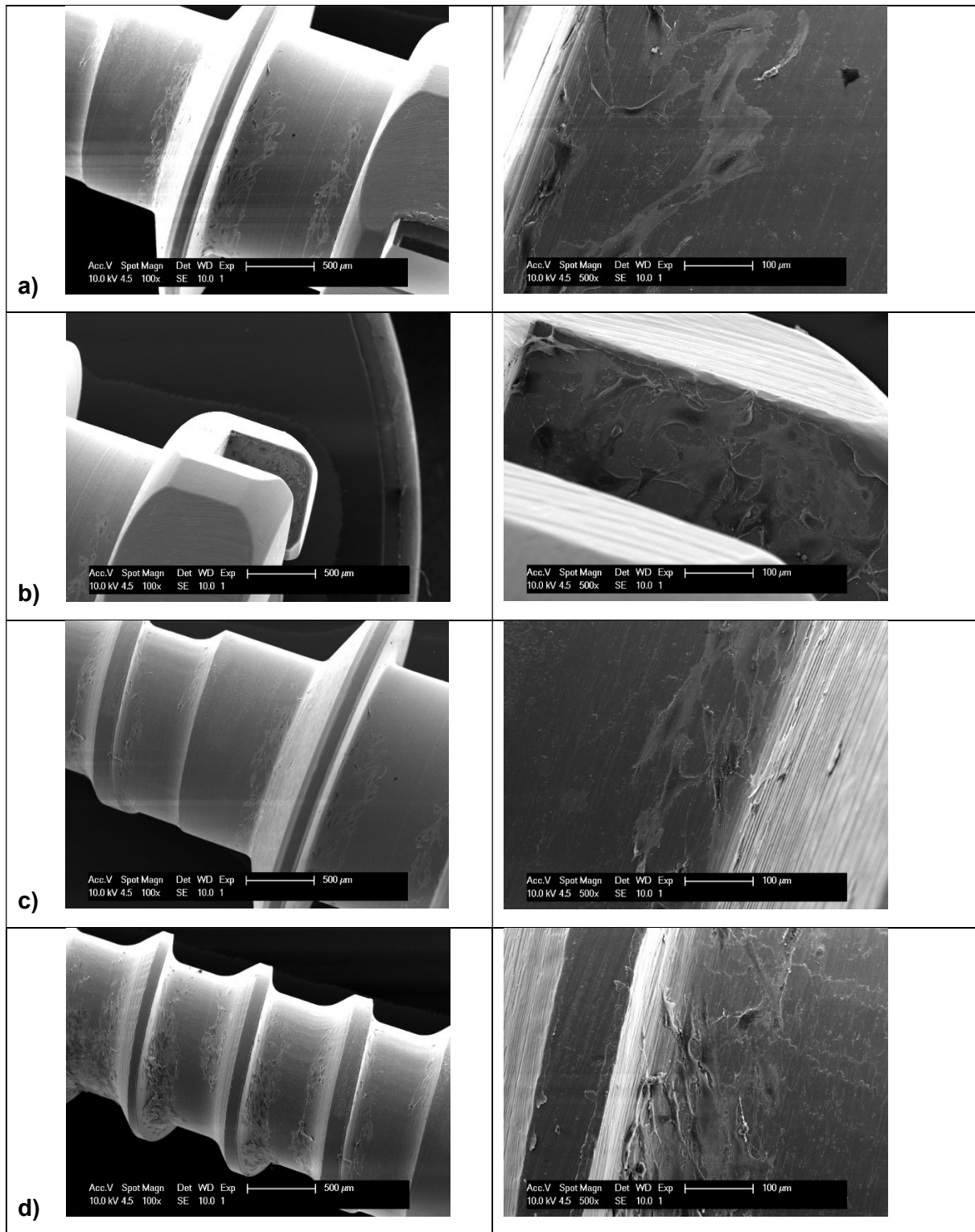


Abb. 24: Adhäsion von Osteoblasten an der Dual Top™ G2

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Zelladhäsion von Osteoblasten an verschiedenen Bereichen der Dual Top™ G2 bei 100- und 500-facher Vergrößerung.

- a) Kopf: Polygonale Zellen mit Ausläufern
- b) Kopf: Polygonale Zellen mit ausgeprägten Ausläufern
- c) Hals: Polygonale Zellen mit Ausläufern
- d) Gewinde: Polygonale bis spindelförmige Zellen

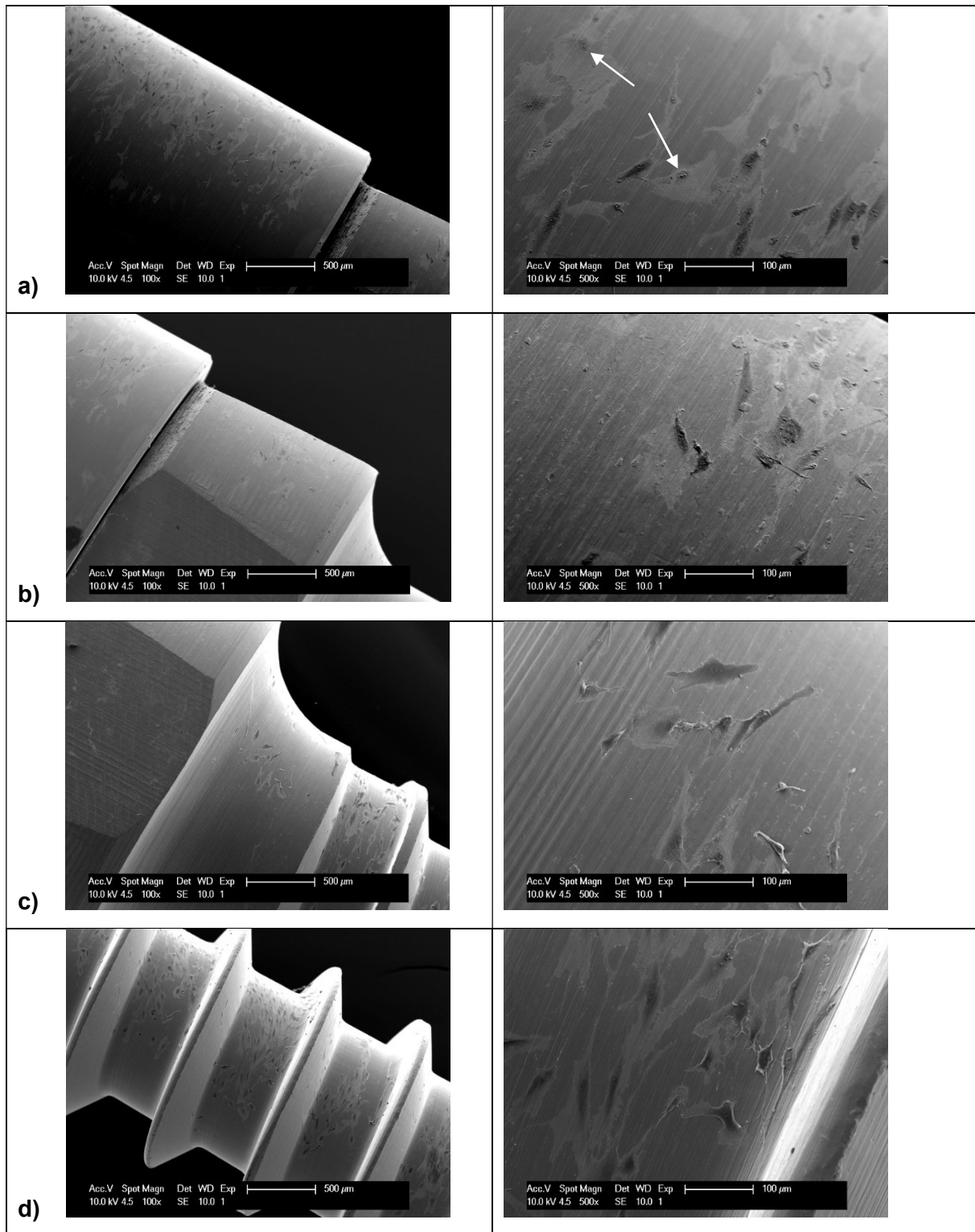


Abb. 25: Adhäsion von Osteoblasten an der BENEFit® KFO-Schraube

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Zelladhäsion von Osteoblasten an verschiedenen Bereichen der BENEFit® KFO-Schraube bei 100- und 500-facher Vergrößerung.

- a) Abutment: Polygonale Zellen mit gut erkennbaren Zellkernen (Pfeile)
- b) Kopf: Zellreste von polygonalen Zellen erkennbar
- c) Hals: Polygonale Zellen
- d) Gewinde: Polygonale bis spindelförmig gestreckte Zellen mit ausgeprägten Ausläufern und Ausrichtung entlang der Rillenstruktur

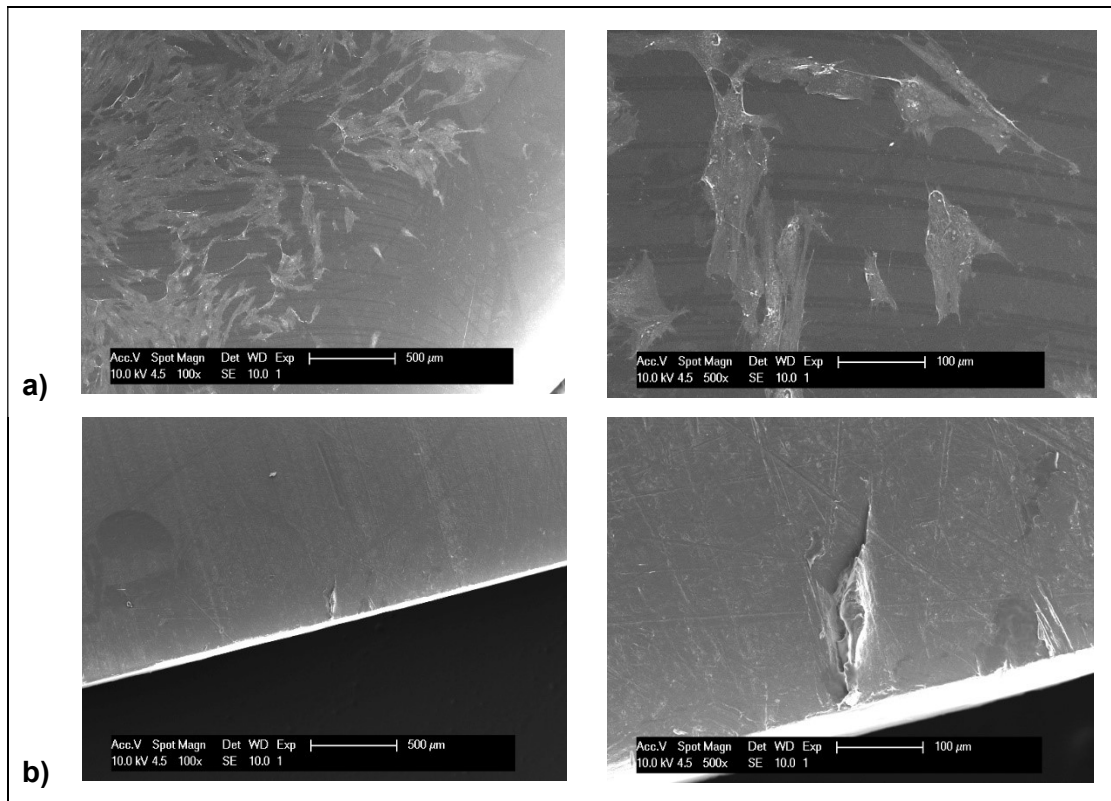


Abb. 26: Adhäsion von Fibroblasten an den Kontrollproben

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Zelladhäsion von Fibroblasten an den verschiedenen Kontrollproben bei 100- und 500-facher Vergrößerung.

- a) TC-Deckgläschen (Positivkontrolle): Spindelförmig bis polygonal ausgestreckte Zellen mit zahlreichen Ausläufern, hohe Zelldichte
- b) PTFE (Negativkontrolle): mäßig ausgestreckte bis abgekugelte Zelle, lediglich vereinzelte Zelle

4. Diskussion

4.1. Ergebnisse dieser Studie

In den rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte aufgezeigt werden, dass sich die Minischrauben nicht nur in ihrer Form, sondern auch in ihrer Mikrostruktur der Oberfläche unterscheiden. Sie weisen allerdings auch Gemeinsamkeiten, wie beispielsweise die Rillenstruktur am Gewinde, auf.

Durch die EDX-Analyse konnten, mit Ausnahme einzelner BENEFIT® KFO-Schrauben, alle Elemente laut Herstellerangabe bestätigt werden. Allerdings waren die gelieferten BENEFIT®-KFO-Schrauben, wie im Ergebnisteil beschrieben, lediglich DEMO-Schrauben, die von den an Kunden verkauften Schrauben abweichen können. Es kann demnach nicht ausgeschlossen werden, dass sich weitere andersartige BENEFIT®-KFO-Schrauben in den Versuchen befanden.

Zudem wurde Sauerstoff als Element auf der Oberfläche des OrthoEasy® Pins gefunden, der die Oxidschicht zur farblichen Kodierung dieser Schrauben anzeigt.

Des Weiteren lässt sich bei allen Produkten ein Peak bei 0,26keV Kohlenstoff zuordnen, was für eine Verunreinigung der Oberfläche spricht. Da einige der Minischrauben steril geliefert wurden, der Kohlenstoff aber bei allen Produkten nachweisbar war, handelt es sich vermutlich um eine Kontamination aus der Umgebung.

Bei den Ergebnissen der quantitativen Bestimmung der Zelladhäsion mittels XTT zeigte sich, dass bei beiden Zelllinien und bei allen Produkten ein signifikant größerer Unterschied zu dem Blank besteht, was dafür spricht, dass Zelladhäsion an den OMI's stattgefunden hat. Dies unterstreichen auch die Bilder, die mit dem Rasterelektronenmikroskop aufgenommen wurden, denn in allen Bereichen der Schrauben, zeigten sich sowohl bei den Osteoblasten (HOB) als auch bei den Fibroblasten (hgF) ausgestreckte Zellkörper, was eine erfolgreiche Zelladhäsion widerspiegelt.

Bei den Fibroblasten konnte im XTT-Test kein signifikanter Unterschied in der Zelladhäsion an den Köpfen/Hälsen der verschiedenen Implantate festgestellt werden. Generell besteht aber auch kein signifikanter Unterschied in der metabolischen Aktivität der Zellen an den Implantaten gegenüber dem PTFE. Dies spricht entweder für eine geringere fibroblastische Zelladhäsion an den Minischrauben oder für eine verminderte Sensitivität dieser Methodik. Die rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Zellen bestätigt jedoch eine deutlich erhöhte Zelladhäsion an den Implantaten im Vergleich zum PTFE. Während auf dem PTFE keine oder

nur wenige abgekugelte Zellen zu erkennen waren, befanden sich an den Köpfen/Hälsen zahlreiche ausgestreckte Zellen. Die Differenz der Ergebnisse lässt auf eine verminderte Sensitivität des XTT-Versuchs schließen. Die Ungenauigkeit im XTT-Test könnte durch die geringe Zahl von adhärierten Zellen mit folglich schwachem Signal zustande kommen.

Bei den Osteoblasten bestätigt sich im XTT-Test ein signifikanter Unterschied in der Zelladhäsion an den Gewinden im Vergleich zum PTFE. Es zeigt sich demnach, dass die Zelladhäsion an den OMI größer ist als an dem PTFE. Des Weiteren gibt es teilweise signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Minischrauben untereinander. Dies könnte vermuten lassen, dass die Zelladhäsion zwischen den Implantatherstellern variiert.

Dennoch sind die Werte mit Vorsicht zu bewerten, da bei der Oberflächenvermessung der Minischrauben einige Ungenauigkeiten zu beachten sind. Hierdurch kann die Größe der erhaltenen Oberfläche nur als Richtwert angesehen werden, was für die Normierung des XTT-Umsatzes relevant ist. Einerseits hat der Dentalscanner lediglich eine Genauigkeit von 10µm. Andererseits wurden bei der virtuellen Oberflächenvermessung die Implantatschnittstellen per Hand eingegeben, was für weitere Ungenauigkeiten sorgt. Zudem ist zu beachten, dass auch beim Sägen Implantatmaterial an der Schnittstelle verloren geht sowie auch eine Variabilität beim Sägen der Schrauben auftritt. Abschließend sind Pipettierungenauigkeiten zu nennen, da es sich lediglich um Zellsuspensionen und keine Lösungen handelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Zelladhäsion sowohl der Fibroblasten an den Köpfen/Hälsen als auch der Osteoblasten an den Gewinden an allen Implantaten stattgefunden hat. Es konnten keine oder lediglich geringe Unterschiede zwischen den Implantatfirmen bezüglich des quantitativen Ausmaßes aufgezeigt werden. Ein quantitativer Einfluss der Mikrostrukturierung auf die Zelladhäsion konnte ebenfalls nicht aufgezeigt werden. Da alle Minischrauben aus dem gleichen Material gefertigt wurden, sind dies zu erwartende Ergebnisse. Ein konkretes quantitatives Ausmaß der Zelladhäsion lässt sich aus diesem Versuchsaufbau jedoch nicht ableiten und um hier genauere Aussagen treffen zu können, wären weitere Experimente notwendig.

Aus den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigt sich, dass Zelladhäsion sowohl der Fibroblasten als auch der Osteoblasten an allen Bereichen der Minischrauben erfolgreich stattgefunden hat. Zwischen den verschiedenen Produkten sind keine qualitativen Unterschiede erkennbar.

Die Ausrichtung der Zellen nach der Rillenstruktur, die Zellform sowie die unterschiedliche Zelldichte, die sich an strukturierten im Vergleich zu glatten Flächen ergibt, spricht dafür, dass eine Modulation der Implantatoberfläche zwecks Zelladhäsion sinnvoll sein kann. Die Zellen

scheinen eine Oberfläche mit einer Mikrostrukturierung wie an den Gewinden zu bevorzugen. Mit den rasterelektronischen Bildern lassen sich jedoch lediglich qualitative Aussagen treffen. Eine genaue quantitative Aussage zu dem Ausmaß der Adhäsion der verschiedenen Zelltypen an den unterschiedlichen Bereichen der Schrauben ist aus den Bildern allerdings nicht möglich. Hierzu wären weitere quantitative Versuche beispielsweise mittels XTT-Test notwendig. Allerdings zeigt sich insgesamt, dass in allen Bereichen eine erfolgreiche Zelladhäsion stattfindet.

Die Kodierung von Minischrauben durch eine Oxidschicht scheint keinen Einfluss auf die Zelladhäsion zu haben. Weder im quantitativen Versuchsteil zeigen sich signifikante Unterschiede zu anderen Produkten, noch die qualitativen Untersuchungen mittels der rasterelektronenmikroskopischen Bilder weisen auf Unterschiede in der Zelladhäsion hin.

4.2. Zelladhäsion an Minischrauben

Prinzipiell liegt nahe, dass an Bereichen, die von einem bestimmten Gewebe umgeben werden, eine Adhäsion von Zellen eines anderen Gewebetyps, unerwünscht ist. Beispielhaft zu nennen sei hier, dass es zur Mobilität der Schraube kommen kann, wenn das Epithel am Gewinde adhärieren und zwischen Knochen und Gewindeschraube wachsen würde (Dibart 2007). Als weiteres Beispiel kann die Überwucherung des Kopfes genannt werden. Durch Oberflächen, die keine Zelladhäsion und Proliferation erlauben, kann man ein Überwuchern eingrenzen (Kluger und Pretzsch 2010).

Die Frage, ob eine Anheftung von Zellen an Minischrauben generell unerwünscht ist, bleibt diskussionswürdig. Wie bereits beschrieben, zählen Minischrauben zu den temporären Implantaten. Einerseits wird in der Literatur bei einer solchen Form der Implantate die Notwendigkeit beschrieben, dass es nicht zur Zelladhäsion kommt, damit sie einwandfrei und atraumatisch wieder entfernt werden können (Han et al. 2017). Andererseits liegt es nahe, dass durch die Zelladhäsion das Remodeling erreicht wird, was wiederum für die Verankerung im Knochen sorgt (Carvalho Bueno und Tarkany Basting 2015). Schließlich relaxiert der Knochen nach gewisser Zeit und die Sekundärstabilität kann nur durch die Anlagerung von Knochen an das Gewinde gewährleistet werden (Sander et al. 2011). Die gleiche Überlegung kann man auf das Weichgewebe übertragen. Da es sich bei oralen Implantaten um ein offenes Implantatsystem handelt, ist die dichte Anlagerung des Weichgewebes notwendig, um das Eindringen von Bakterien zu verhindern und somit einer Entzündung entgegenzuwirken (Ludwig et al. 2007).

Es zeigt sich also, dass ein gewisses Maß an Haftung an das umgebene Gewebe durchaus von Vorteil sein kann. Es darf aber nicht so groß werden, dass das Entfernen der Minischraube zum Problem wird.

4.3. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse liefern Antworten auf die zu Beginn gestellten Fragen:

1. Eine erfolgreiche Adhäsion von Fibroblasten (hgF) und Osteoblasten (HOB) konnte an den hier untersuchten Produkten in allen Bereichen der Minischrauben nachgewiesen werden. Bereiche, an denen eine Adhäsion von bestimmten Zellen nicht stattfindet, waren nicht vorhanden.
2. Zwischen den einzelnen Produkten gab es dabei keine oder lediglich geringe Unterschiede.
3. Die Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop zeigen auf, dass die Oberflächenbeschaffenheit die Zelladhäsion beeinflusst und eine Modulation der Oberfläche demnach sinnvoll sein kann. Die Form, Ausrichtung und Dichte der Zellen wird hierbei durch eine Mikrostrukturierung moduliert. Eine Beeinflussung der Zelladhäsion durch eine Oxidschicht konnte allerdings nicht aufgezeigt werden.
4. Anhaltspunkte auf Unterschiede in der Zelladhäsion an den verschiedenen Bereichen der Minischrauben geben lediglich die rasterelektronischen Bilder. Die Zellen, insbesondere die Fibroblasten scheinen die mikrostrukturierte Oberfläche an den Gewinden zu bevorzugen. Insgesamt zeigt sich allerdings, dass in allen Bereichen eine erfolgreiche Zelladhäsion stattfindet.
5. Die Adhäsion von Osteoblasten am Gewinde könnte einen Hinweis auf eine Stabilitätsförderung, gleichzeitig aber auch auf eine partielle Osseointegration, darstellen. Ebenso kann die Adhäsion der Fibroblasten am Kopf-/Halsbereich ein Indikator für ein enges Anliegen der Schleimhaut sein, wodurch Infektionen vermieden werden. Möglicherweise kann hierdurch aber auch eine bindegewebige Überwucherung mitverantwortet werden. Zudem liegt nahe, dass eine Anlagerung der Fibroblasten am Gewinde zu einer Proliferation zwischen Knochen und Gewinde führen kann, was einen Stabilitätsverlust bis hin zum Verlust der Schraube verursachen kann.

Um genauere Informationen der Gewebeanhaftung an den OMI und einer eventuellen Modifikation zu erhalten, sind weitere in vitro und in vivo Studien erforderlich.

4.4. Ausblick und weitere Forschungsansätze

Im Hinblick auf weitere in vitro-Studien wäre der quantitative Vergleich der Adhäsion der einzelnen Zelltypen an den verschiedenen Bereichen der Schrauben interessant. In diesem Rahmen wäre auch eine Untersuchung der Adhäsion von Epithelzellen an den Minischrauben aufschlussreich, mit denen die Implantate schließlich ebenfalls in Kontakt stehen.

Zudem wäre es sinnvoll zu untersuchen, in welchem Ausmaß eine Zelladhäsion des umgebenen Gewebes von Vorteil für die Mini-Implantation ist. Schließlich soll sich das umliegende Gewebe gut an die Minischrauben anlegen, sodass die Stabilität im Knochen sowie ein dichter Verschluss durch die Gingiva gewährleistet wird, andererseits soll das Gewebe nicht daran festwachsen oder überwuchern.

Zugleich wäre interessant zu untersuchen inwieweit eine selektive Zelladhäsion bei den Minischrauben klinisch überhaupt notwendig ist. Wenn das Einwachsen der OMI durch Proliferation des umgebenen Gewebes zustande kommt, das den Schraubenkopf einkapselt, würde auch eine selektive Zelladhäsion nichts an diesem Zustand ändern. Wenn das gingivale Gewebe allerdings an dem Schraubenkopf haftet oder vielleicht sogar festwächst, wäre eine Modifikation durchaus sinnvoll. Des Weiteren erscheint eine selektive Zelladhäsion auch bei Problemen der Schraubenlockerung, die durch eine Proliferation des Epithels zwischen Gewinde-Schaft und Knochen zustande kommt, sinnvoll.

Es gibt bereits viel Forschung im Bereich der Oberflächenmodifikation von medizinischen Materialien, die jedoch stets ausgeweitet werden kann. In weiteren Studien kann untersucht werden, inwieweit bereits vorhandene Oberflächenmodifikationen auf Minischrauben übertragen werden können oder inwieweit Oberflächen dahingehend verändert werden können, um bestimmte Komplikationen einzudämmen.

5. Zusammenfassung

Orthodontische Mini-Implantate (OMI) / Minischrauben sind eine gute Möglichkeit für skelettale Verankerung. Dabei können jedoch Komplikationen wie Entzündung, Lockerung, partielle Osseointegration oder Überwucherung beobachtet werden. Zelladhäsion spielt an Biomaterialien eine zentrale Rolle, da hierdurch bestimmte Komplikationen eingegrenzt werden können. Ziel ist die Untersuchung des Adhäsionsverhaltens primärer Gingivafibroblasten und Osteoblasten an kommerziellen OMIs. Der Fokus liegt dabei auf der Adhäsion der Fibroblasten am Kopf/Hals und der Osteoblasten am Gewinde.

Es wurden OMIs von vier Herstellern untersucht: tomas®-pin SD N 08 (Dentaurum), OrthoEasy® Pin (Forestadent), Dual Top™ G2 (Promedia/Jeil Medical) und BENEfit® KFO-Schraube + BENEfit® Abutment Standard (Dentalline/ PSM Medical Solutions). Es handelt sich um Schrauben aus TiAl6V4, lediglich Dentalline lieferte OMIs aus Titan sowie TiAl6V4. Als Zellen wurden primäre humane Fibroblasten aus der Gingiva eines extrahierten Molaren gezüchtet (hgF), sowie eine kommerziell erworbene humane Osteoblastenzelllinie (Human Osteoblasts (HOB), Cat. No.: C- 12720, Lot No.: 439Z037.2, PromoCell, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die Zelladhäsion wurde qualitativ mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) und quantitativ indirekt über die photometrische Bestimmung der Zellvitalität im XTT-Test beurteilt.

Die XTT-Testung zeigte für beide Zelltypen einen deutlichen Umsatz des Tetrazoliumsalzes. Dabei wiesen die Produkte der einzelnen Hersteller im Fall der Fibroblasten keine, die der Osteoblasten hingegen signifikante, wenn auch geringe, Unterschiede auf. Mittels REM konnte für alle Produkte in allen Bereichen Adhäsion der beiden Zelltypen nachgewiesen werden. Die Osteoblasten zeigten sich überwiegend polygonal und die Fibroblasten spindelförmig ausgestreckt, was für eine qualitativ erfolgreiche Zelladhäsion spricht. In vielen Bereichen konnte festgestellt werden, dass die Zellform durch die Implantatoberfläche beeinflusst wird. Eine Beeinflussung der Zelladhäsion durch eine Oxidschicht konnte durch diese Studie nicht aufgezeigt werden.

Eine erfolgreiche Adhäsion von Osteoblasten am Gewinde konnte nachgewiesen werden. Dies könnte einen Hinweis auf eine Stabilitätsförderung, gleichzeitig aber auch auf eine partielle Osseointegration, darstellen. Ebenso konnte im Kopf-/ Halsbereich eine erfolgreiche Adhäsion von Fibroblasten festgestellt werden. Möglicherweise kann hierdurch eine bindegewebige Überwucherung in vivo mitverantwortet werden. Andererseits kann dies ein Indikator für ein enges Anliegen der Schleimhaut sein, wodurch Infektionen vermieden werden. Ebenso liegt nahe, dass eine Adhäsion der Fibroblasten am Gewinde keinen positiven Einfluss

Zusammenfassung

auf die Stabilität der Minsichraube haben kann. Die Oberflächenbeschaffenheit scheint die Zelladhäsion zu beeinflussen und eine Modulation der Oberfläche kann demnach sinnvoll sein.

6. Literaturverzeichnis

Alva, H., Prasad, K. D., Prasad, A. D. (2013): Bioseal. The physiological and biological barrier for osseointegrated supported prosthesis. *J Dent Implant*, 3(2): 148–152

American Society for Testing and Materials (2013): Standard Specification for Wrought Titanium-6Aluminum-4Vanadium ELI (Extra Low Interstitial) Alloy for Surgical Implant Applications (UNS R56401). ASTM International, West Conshohocken, PA

Atsuta, I., Ayukawa, Y., Kondo, R., Oshiro, W., Matsuura, Y., Furuhashi, A., Tsukiyama, Y., Koyano, K. (2016): Soft tissue sealing around dental implants based on histological interpretation. *J Prosthodont Res*, 60(1): 3–11

Baumgaertel, S. (2014): Temporary skeletal anchorage devices. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 145(5): 558–564

Baumgaertel, S., Razavi, M. R., Hans, M. G. (2008): Mini-implant anchorage for the orthodontic practitioner. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 133(4): 621–627

Briehl, H. (2014): *Chemie der Werkstoffe*. 3. Aufl., Springer-Verlag, Wiesbaden

Büchter, A., Wiechmann, D., Koerdt, S., Wiesmann, H. P., Piffko, J., Meyer, U. (2005): Load-related implant reaction of mini-implants used for orthodontic anchorage. *Clin Oral Implants Res*, 16(4): 473–479

Carreira, A. C., Lojudice, F. H., Halcsik, E., Navarro, R. D., Sogayar, M. C., Granjeiro, J. M. (2014): Bone morphogenetic proteins. *J Dent Res*, 93(4): 335–345

Carvalho Bueno, R., Tarkany Basting, R. (2015): In vitro study of human osteoblast proliferation and morphology on orthodontic mini-implants. *Angle Orthod*, 85(6): 920–926

Chen, Z. X., Takao, Y., Wang, W. X., Matsubara, T., Ren, L. M. (2009): Surface characteristics and in vitro biocompatibility of titanium anodized in a phosphoric acid solution at different voltages. *Biomed Mater*, 4(6): 1–8

Christen, P., Jaussi, R., Benoit, R. (2016): *Biochemie und Molekularbiologie (Eine Einführung in 40 Lerneinheiten)*. Springer-Verlag, Berlin / Heidelberg

Cochran, D., Simpson, J., Weber, H.P., Buser, D. (1994): Attachment and Growth of Periodontal Cells on Smooth and Rough Titanium. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 9(3): 289–297

- Cope, J. B. (2005): Temporary anchorage devices in orthodontics: A paradigm shift. *Semin Orthod*, 11: 3-9
- Depla, D., Mahieu, S. (2008): *Reactive sputter deposition*. Springer-Verlag, Berlin / Heidelberg
- Dentaurum (2016): *tomas Das Handbuch*. Dentaurum, Ispringen
- Deutsche Institut für Normung e.V. (2017): *Chirurgische Implantate – Metallische Werkstoffe – Teil 3: Titan 6-Aluminium 4-Vanadium Knetlegierung (ISO 5832-3:2016); Deutsche Fassung EN ISO 5832-3:2016*. Beuth Verlag GmbH, Berlin
- Deutsche Institut für Normung e.V. (2009): *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität (ISO 10993-5:2009); Deutsche Fassung EN ISO 10993-5:2009*, Beuth Verlag GmbH, Berlin
- Dibart, S. (2007): *Practical advanced periodontal surgery*. Blackwell Munksgaard, Ames (Iowa)
- Frahm, S. (2014): *Systematische Untersuchung der Inkulturnahme adhärent wachsender Zellen*. Med Diss., Lübeck
- Finke, H., Koos, B., Fischer-Brandies, H., Es-Souni, M. (2018): Biokompatibilität kieferorthopädischer Miniimplantate in vitro an humanen Gingivafibroblasten und SAOS-2-Osteoblastenkulturen. *J Orofac Orthop*, 79(5): 328–336
- Flemming, R. G., Murphy, C. J., Abrams, G. A., Goodman, S. L., Nealey, P. F. (1999): Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials*, 20(6): 573–588
- Gabriel, M., Niederer, K., Becker, M., Raynaud, C. M., Vahl, C.-F., Frey, H. (2016): Tailoring Novel PTFE Surface Properties: Promoting Cell Adhesion and Antifouling Properties via a Wet Chemical Approach. *Bioconjug Chem*, 27(5): 1216–1221
- Han, E. D., Kim, B. H., Seo, Y. H. (2017): Anti-cell adhesion characteristics of nanotextured surface for implantable biomedical device. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, 18(2): 239–244
- Harten, U. (2014): *Physik für Mediziner*. 14. Aufl., Springer-Verlag, Berlin / Heidelberg
- Hourfar, J., Lisson, J.A. (2017): *Wissenschaftliche Stellungnahme zur Verankerung mit Gaumenimplantaten und Kortikalisschrauben in der Kieferorthopädie*. DGKFO, Homburg / Saar

Hyde, J. D., King, G. J., Greenlee, G. M., Spiekerman, C., Huang, G. J. (2010): Survey of orthodontists' attitudes and experiences regarding miniscrew implants. *J Clin Orthod*, 44(8): 481–486

International Organization for Standardization (2009): Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (ISO 10993-5:2009(E)); IHS under license with ISO, Genf

Kantlehner, M., Schaffner, P., Finsinger, D., Meyer, J., Jonczyk, A., Diefenbach, B., Nies, B., Hölzemann, G., Goodman, S. L., Kessler, H. (2000): Surface Coating with Cyclic RGD Peptides Stimulates Osteoblast Adhesion and Proliferation as well as Bone Formation. *ChemBioChem*, 1(2): 107–114

Khalili, A. A., Ahmad, M. R. (2015): A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *Int J Mol Sci*, 16(8): 18149–18184

Kelm, D. (2010): Die Breite der keratinisierten Mukosa an Implantaten bei Patienten mit behandelter generalisierter (4-Jahres-Ergebnisse einer prospektiven Kohortenstudie). *Med Diss.*, Marburg

Kılınç, D. D., Sayar, G. (2016): Various Contemporary Intraoral Anchorage Mechanics Supported with Temporary Anchorage Devices. *Turk J Orthod*, 29(4): 109-113

Kim, S.-H., Turnbull, J., Guimond, S. (2011): Extracellular matrix and cell signalling: The dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol*, 209(2): 139–151

Kluger, P. J., Pretzsch, F. (2010): Mehr Strukturen für die Zellkultur (Prozesskette für die Serienfertigung mikrostrukturierter Zellkulturoberflächen). GIT-Verlag

Korzinkas, T., Jung, O., Smeets, R., Stojanovic, S., Najman, S., Glenske, K., Hahn, M., Wenisch, S., Schnettler, R., Barbeck, M. (2018): In Vivo Analysis of the Biocompatibility and Macrophage Response of a Non-Resorbable PTFE Membrane for Guided Bone Regeneration. *Int J Mol Sci*, 19(10): 2952

Kravitz, N. D., Kusnoto, B. (2007): Risks and complications of orthodontic miniscrews. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 131(4): 43–51

Kunzler, T. P., Huwiler, C., Drobek, T., Vörös, J., Spencer, N. D. (2007): Systematic study of osteoblast response to nanotopography by means of nanoparticle-density gradients. *Biomaterials*, 28(33): 5000–5006

- Kuroda, S., Tanaka, E. (2014): Risks and complications of miniscrew anchorage in clinical orthodontics. *Japanese Dental Science Review*, 50(4): 79–85
- Lamichhane, S., Anderson, J. A., Remund, T., Sun, H., Larson, M. K., Kelly, P., Mani, G. (2016): Responses of endothelial cells, smooth muscle cells, and platelets dependent on the surface topography of polytetrafluoroethylene. *J Biomed Mater Res A*, 104(9): 2291–2304
- Lloyd, A. (2003): Engineering surfaces to enhance cell adhesion (Surface Engineering). *Materials Today*, 6(11): 19
- Ludwig, B., Böhm, B., Glasl, B., Landes, C., Lietz, T., Schopf, P., Wilmes, B. (2007): *Mini-Implantate in der Kieferorthopädie (Innovative Verankerungskonzepte)*. 6. Aufl., Quintessenz, Berlin
- Mavrogenis, A. F., Dimitriou, R., Parvizi, J., Babis, G. C. (2009): Biology of implant osseointegration. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 9(2): 61–71
- Meeran, N. A., Venkatesh, K. G., Jaseema, P. M. F. (2012): Current trends in miniscrew utilization among Indian orthodontists. *J Orthod Sci*, 1(2): 46–50
- Michler, G. H. (2019): *essentials - Kompakte Einführung in die Elektronenmikroskopie*. Springer-Verlag, Wiesbaden
- Pařízek, M., Novotná, K., Bačáková, L. (2011): The role of smooth muscle cells in vessel wall pathophysiology and reconstruction using bioactive synthetic polymers. *Physiol Res*, 60(3): 419–437
- Pfeiffer, F. (2004): *Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von Gingiva-Fibroblasten auf mikrostrukturierten Titanoberflächen*. Med. Diss., Karlsruhe
- Ramalingam, M., Ramakrishna, S., Best, S. (2012): *Biomaterials and Stem Cells in Regenerative Medicine*. CRC Press, Hoboken
- Sander, F. M., Schwenzer, N., Ehrenfeld, M. (2011): *Zahn-Mund-Kieferheilkunde – Kieferorthopädie*. 2. Aufl., Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart / New York
- Santos, R. (Hg.) (2013): *Biological and biomimetic adhesives (Challenges and opportunities)*. RSC Publ, Cambridge
- Schmitz, S. (2011): *Der Experimentator (Zellkultur)*. 3. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Schwenzer, N., Eckelt, U. (2009): Zahnärztliche Chirurgie. 4. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart / New York

Singh, K., Kumar, D., Jaiswal, R. K., Bansal, A. (2010): Temporary anchorage devices – Mini-implants. Natl J Maxillofac Surg, 1(1): 30-34

Stevens, M. M., George, J. H. (2005): Exploring and engineering the cell surface interface. Science, 310(5751): 1135–1138

Strub, J. R., Kern, M., Türp, J. C., Witkowski, S., Heydecke, G., Wolfart, S. (2011): Curriculum - Prothetik. 4. Aufl., Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin / Barcelona / Beijing / Chicago / Istanbul / Kopenhagen / London / Mailand / Moskau / Neu-Delhi / Paris / Prag / São Paulo / Seoul / Tokio / Warschau

Touati, B., Rompen, E., van Dooren, E. (2005): A new concept for optimizing soft tissue integration. Pract Proced Aesthet Dent, 8(4): 6–10

Uzuner, F. D., Işık aslan, B. (2015), In: İlser Turkyilmaz (2015): Current Concepts in Dental Implantology. 211-237, Books on Demand, Rijeka

Velten, D., Biehl, V., Aubertin, F., Valeske, B., Possart, W., Breme, J. (2002): Preparation of TiO(2) layers on cp-Ti and Ti6Al4V by thermal and anodic oxidation and by sol-gel coating techniques and their characterization. J Biomed Mater Res, 59(1): 18–28

Warne, D. J., Baker, R. E., Simpson, M. J. (2017): Optimal Quantification of Contact Inhibition in Cell Populations. Biophys J, 113(9): 1920–1924

Wintermantel, E., Ha, S.-W. (2008): Medizintechnik (Life Science Engineering). 4. Aufl., Springer-Verlag, Berlin / Heidelberg

Ziebura, T., Flieger, S., Wiechmann, D. (2012): Mini-implants in the palatal slope -a retrospective analysis of implant survival and tissue reaction. Head Face Med, 8(32): 1–6

Zhu, X., Roovers, K., Davey, G, Assoian, R. K. (1999), In: Guan, J.-L.: Signaling through cell adhesion molecules. 130-138, CRC Press, Boca Raton

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

α-MEM	Minimum Essential Medium
ANOVA	analysis of variance; einfaktorielle Varianzanalyse
Al	Aluminium
Cr	Chrom
EDX	Energiedisperse Röntgenspektroskopie
EZM	Extrazellulärmatrix
FBS	fetal bovine serum; fetales Kälberserum
Fe	Eisen
HOB	Human Osteoblast
Mn	Mangan
Mo	Molybdän
MW	Mediumwechsel
Ni	Nickel
OMI	Orthodontisches Mini-Implantat / MInischraube
PBS	Phosphate buffered saline; Phosphatgepufferte Salzlösung
PMS	Phenazine-methosulfate
PTFE	Polytetrafluorethylen
REM	Rasterelektronenmikroskop
RGD	Aminosäuresequenz aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure
RPMI	Bestimmtes Zellkulturmedium
SD	Standartabweichung
Si	Silizium
TAD	temporary anchorage devices
Ti	Titan
TSAD	temporary skeletal anchorage devices
TiAl6V4	Titanlegierung bestehend aus Titan, 6 Massenprozent Aluminium und 4 Massenprozent Vanadium
V	Vanadium
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid

7.2. Abbildungsverzeichnis

1	Aufbau der Minischraube und Lokalisation im Gewebe (hier: tomas®-pin).....	3
2	Untersuchte OMs.....	12
3	Zellaussaat für die Ermittlung der Zelladhäsion und Zytotoxizität von PTFE	17
4	Umsetzung des XTT durch Medium, Minischrauben und PTFE in Abwesenheit von Zellen.....	18
5	Zellaussaat für die quantitative Bestimmung der Adhäsion der Zellen mittels XTT	20
6	Zellaussaat für die qualitative Bestimmung der Adhäsion von Fibroblasten (a) und Osteoblasten (b) mittels REM.....	21
7	Oberflächenstruktur des tomas®-pins.....	25
8	Oberflächenstruktur des OrthoEasy® Pins.....	25
9	Oberflächenstruktur der Dual Top™ G2.....	25
10	Oberflächenstruktur der BENEFit® KFO-Schraube.....	26
11	Oberflächenstruktur des BENEFit® Abutment Standard.....	26
12	EDX-Spektrum der Legierungen der Minischrauben und des Abutments.....	28
13	Zelladhäsion und Zytotoxizität von PTFE.....	29
14	Umsetzung des XTT durch Medium, Minischrauben und PTFE in Abwesenheit von Zellen	30
15	Quantitative Bestimmung der Zelladhäsion von Fibroblasten (hgF) mittels XTT....	32
16	Quantitative Bestimmung der Zelladhäsion von Osteoblasten (HOB) mittels XTT	33
17	Adhäsion von Fibroblasten an dem tomas®-pin.....	35
18	Adhäsion von Fibroblasten an dem OrthoEasy® Pin.....	36
19	Adhäsion von Fibroblasten an der Dual Top™ G2.....	37
20	Adhäsion von Fibroblasten an der BENEFit® KFO-Schraube.....	38
21	Adhäsion von Fibroblasten an den Kontrollproben.....	39
22	Adhäsion von Osteoblasten an dem tomas®-pin.....	40
23	Adhäsion von Osteoblasten an dem OrthoEasy® Pin.....	41
24	Adhäsion von Osteoblasten an der Dual Top™ G2.....	42
25	Adhäsion von Osteoblasten an der BENEFit® KFO-Schraube.....	43
26	Adhäsion von Fibroblasten an den Kontrollproben.....	44

7.3. Tabellenverzeichnis

1	Herstellerangaben zu den OMIs.....	11
2	Herstellerangaben zu dem zugehörigen Abutment der BENEFIT® KFO-Schraube.	11
3	Verwendung der Minischrauben in den Versuchen.....	12
4	Oberflächenvermessung mittels Dentalscanner.....	23
5	Legierungsbestandteile der Minischrauben laut Herstellerangaben.....	27
6	Legierungsbestandteile des BENEFIT® Abutment Standard laut Herstellerangaben.....	27

7.4. Chemikalien und Gerätschaften

7.4.1 Chemikalien

Beschreibung	Produktname	Herstellerfirma
α-MEM	Minimum Essential Medium Eagle, Nr. M0644-10X1L	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH (Hamburg, Deutschland)
Amphotericin B	Amphotericin BL0, 009/50167352	BioWest (Nuaillé, Frankreich).
FBS	FBS Superior stabil, FBS.S 0615	Bio & Sell GmbH (Feucht, Deutschland)
Glutaraldehyd-Lösung	Glutaraldehyde, 25% Aqueous Solution, Cat-Nr.: 354400-500ML	EMD Millipore Cprp. (Billerica, USA)
HMDS	Hexamethyldisilazane, reagent grade, ≥ 99%, Nr.: 440191-100ML	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Osteoblast Basal Medium	Osteoblast Basal Medium, Cat.No.: C-27010	PromoCell (Heidelberg, Deutschland)
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o Magnesium, w/o Calcium, Sterile Filtered, ID-Nr.: MS00EI1001	BioWest (Nuaillé, Frankreich)
Penicillin/Streptomycin	Penicillin-Streptomycin Solution, ID-Nr.: MS00K1100E	BioWest (Nuaillé, Frankreich)
PMS	Phenazine.methosulfate pure C ₁₃ H ₁₁ N ₂ ·CH ₃ SO ₄ , Mr 306.3, Nr.:32030	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
RPMI	RPMI 1640, w/o L-Glutamine, w/o Phenol Red, Sterile Filtered, ID-Nr.: MS009D100N	BioWest (Nuaillé, Frankreich)
Trypanblau	Trypan Blue solution 0,4%, T8154-100ml	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH (Hamburg, Deutschland)
Trypsin	Trypsin-EDTA, ID-Nr. MS00QI1008	BioWest (Nuaillé, Frankreich)
XTT	XTT C ₂₂ H ₁₆ N ₇ O ₁₃ S ₂ Na, M,674.53, Nr.: 38450.02	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)

7.4.2 Gerätschaften

Beschreibung	Produktname	Herstellerfirma
Analysewaage	ABT 220-5DM	KERN & SOHN GmbH (Balingen, Deutschland)
Biofuge stratos-Zentrifuge	Biofuge stratos	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
Brutschrank	CO2-Brutschrank INC 153	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Dentalscanner	Q900, Serien-Nr.: q1324231b	3shape (Kopenhagen, Dänemark)
Excel	Microsoft Office Professional Plus 2019,	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Geomagic Wrap-Software	Geomagic Wrap 2017	3D Systems (Rock Hill, USA)
Insert	Insert, 12 Well, PET 8µm, TL, Nr.: 83.3931.800	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Mikroskop zur Zellzählung	Optiphot-2	Nikon GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
MikroWin Version 5.54	MikroWin Version 5.54	Labsis Laborsysteme GmbH (Neunkirchen-Seelscheid, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	(Neubauer-improved, 0,100mm Tiefe, 0,0025mm², 0640010,	Marienfeld-Superior (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Photometer	µQuant	BioTek® Instruments Inc. (Bad Friedrichshall, Deutschland)
PTFE	Polytetrafluoroethylene Film, Thickness:0.25mm, FP301350	Goodfellow GmbH (Hamburg, Deutschland)
Rasterelektronenmikroskops / REM	XL 30CP,	Philips (Amsterdam, Niederlande)
Sägeblatt	Diamond Cut-off Wheel 230CA	Struers (Willich, Deutschland)
Sputter-Gerät	SCD500 Sputter Coater	BalTec AG (Pfäffikon ZH, Schweiz)
sterile Werkbank	SCANLAF - Mars Safety Class 2	LaboGene (Bjarkesvej, Dänemark)
TC Deckgläser	TC Deckgläser (Thermanox), Durchmesser 13mm, steril, Nr.: 174950	Thermo Electron LED GmbH (Langenselbold, Deutschland)
Trennmaschine	Accutom-5	Struers (Ballerup, Dänemark)
VisCAM View-Software	VisCAM View 5.2	Marcam Engineering GmbH (Bremen, Deutschland)
Zellkulturflaschen (T25)	(TC-Flasche T25, Stand., Bel. Ka., REF-Nr.: 83.3910.002,	SARSTEDT AG & Co. KG, (Nümbrecht, Deutschland)
Zellkulturflasche (T175)	TC-Flasche T175, Stand., Bel. K., REF-Nr.: 83.3912.002	SARSTEDT AG & Co. KG, (Nümbrecht, Deutschland)
6-Well-Platte	(TC-Platte 6 Well, Standard, F, REF-Nr. 83.3920,	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
12-well-Platte	TC-Platte 12 Well, Standard, F, REF-Nr.: 83.3921	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
24-well-Platte	TC-Platte 24 Well, Standard, F, REF-Nr.: 83.3922	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)

7.5. Veröffentlichungen

Posterpräsentation auf der DGKFO 2021 (In-vitro-Studie über die Zelladhäsion von primären humanen Gingivafibroblasten und Osteoblasten an orthodontischen Mini-Implantaten)

7.6. Danksagung

Zuletzt möchte ich die Gelegenheit nutzen, den Personen zu danken, die durch ihre Hilfe diese Arbeit in einem solchen Umfang machbar gemacht haben.

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Helge Fischer-Brandies und meiner Betreuerin Frau Dr. Martha Es-Souni herzlich danken, die maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Frau Dr. Es-Souni hat mich durch alle Versuche im Labor geführt und mich in meinen ersten Erfahrungen in der Wissenschaft und der Zellkultur stets begleitet.

Mein weiterer Dank gilt auch Frau Anna Jürgensen, Herrn Frank Lehmann und Herrn Robert Ciesielski. Frau Jürgensen war mir, als Labortechnische Assistentin, für alle Angelegenheiten zur Zellkultur eine große Hilfe. Herr Lehmann hat mich, als wissenschaftlicher Mitarbeiter aus der Prothetik, in die Rasterelektronenmikroskopie eingeführt und sich auch für meine sonstigen Fragen auf dem Gebiet Zeit genommen. Herr Ciesielski war eine große Hilfe bezüglich organisatorischer Angelegenheiten, wie der Veröffentlichung.

Herzlichen Dank auch an die Fachhochschule Kiel, die mir die Geräte zur Verfügung gestellt haben, mit denen ich die Minischrauben trennen konnte. Ebenso gilt mein Dank dem Sell-Speicher/Patienten, die mir die Gewebespende zur Verfügung gestellt haben.

Einen großen Dank möchte ich auch dem Institut für Medizinische Informatik und Statistik aussprechen. Insbesondere möchte ich hier Frau Prof. Dr. Astrid Dempfle danken, die mich mit der statistischen Beratung für Mediziner unterstützt hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Handels- / und Herstellerfirmen für die kostenlose Zurverfügungstellung der Minischrauben als auch bei deren freundlichen Mitarbeitern bedanken: Dentaurum (Ispringen, Deutschland), Forestadent (Pforzheim, Deutschland), Promedia (Siegen, Deutschland) / Jeil Medical (Seoul, Republik Korea) sowie Dentalline (Birkenfeld, Deutschland) / PSM Medical Solutions (Gunningen, Deutschland).

Danken möchte ich auch meiner Familie und meinen Freunden, bei denen ich mir Rat und Hilfe einholen konnte und die für den privaten Ausgleich gesorgt haben. Insbesondere zu nennen sind hier Dr. Franziska Papenfuß, die mir stets bei Fragen zur wissenschaftlichen Arbeit und beim Korrekturlesen zur Seite stand, sowie Johannes Tölle, der mir viele wertvolle Ratschläge gab und mir mit der Fotografie als auch mit der Erstellung von Abbildungen sehr geholfen hat. Großer Dank gilt auch meinen Eltern, die mich jederzeit in all meinen Vorhaben unterstützt haben und auf die ich immer zählen kann.

7.7. Akademischer Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Sarah Nadine Mirja Reimers

Geboren am: 26.03.1994

Geburtsort: Lüneburg

Adresse: Samwerstraße 11, 24118 Kiel

Staatsbürgerschaft: deutsch

Familienstand: ledig

Bildungsweg:

08/2000 - 06/2004	Grundschule Westergellersen
08/2004 - 06/2010	Gymnasium Oedeme, Lüneburg
08/2010 - 06/2011	Stratford High-School (Auslandsschuljahr in den USA)
08/2011 - 04/2013	Gymnasium Oedeme, Lüneburg
04/2013	Abitur
10/2013	Immatrikulation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
09/2014	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
09/2016	Zahnärztliche Prüfung
02/2019	Anmeldung und Zulassung zum Promotionsverfahren
11/2019	Zahnärztliche Approbation

Beruflicher Werdegang:

Seit 11/2020	Assistenz Zahnärztin in der Praxis Robert Stein, Hohenwestedt
--------------	---

7.8. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meines Betreuers/meiner Betreuerin und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich keine anderen als die in der Arbeit aufgeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat, weder ganz noch in Teilen.

Ort, Datum

Unterschrift