

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

(Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang)

Im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**In-vitro Untersuchung der bakteriellen Adhäsion auf
Titanplatten mit einer zwitterionischen Beschichtung aus
photopolymerisiertem Polysulfobetain-Methacrylat**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Zahnmedizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von

Antonia Jela Lopar

Aus Reinbek

Kiel 2022

1. Berichterstatter: PD Dr. Aydin Gülses
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Graetz
Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2023
Zum Druck genehmigt: Kiel, den 17.08.2023

gez. Prof. Dr. Franziska Theilig
(Vorsitzende des Promotionsausschusses)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Titan als Biomaterial	1
1.2 Titan in der Zahnheilkunde	2
1.3 Bakterielle Besiedelung und Biofilmbildung	4
1.3.1 Ablauf der bakteriellen Besiedelung in der Mundhöhle	5
1.4 Periimplantäre Infektionen	7
1.4.1 Pathogenese	9
1.5 Oberflächen von Implantaten und ihre Beschichtungsmöglichkeiten	9
1.5.2 Antifouling-Beschichtungen	11
1.5.3 Polymerbeschichtungen	12
1.5.1 Hydrophilie und Hydrophobizität an Titanoberflächen	13
1.6 Ziele und Hypothese	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Materialien und Geräte	17
2.2 Beschichtung der Proben	19
2.3 Voruntersuchung der Oberflächenmorphologie und chemischen Zusammensetzung	19
2.3.1 Rasterelektronenmikroskopie	19
2.3.2 Kontaktwinkelmessung und Benetzbarkeit	20
2.3.3 FT-IR-Analyse	20
2.4 Versuchsaufbau	20
2.5 Biofilmbesiedelung	22
2.6 Laboruntersuchung der Versuchsproben	23
2.6.1 Lebend-Tot-Differenzierung	23
2.6.1.1 LIVE/DEAD (Baclight) Färbung	23
2.6.1.2 Fluoreszenzmikroskopie	24
2.6.2 Rasterelektronenmikroskopie	24
2.6.2.1 Vorbereitung der Proben	24
2.6.2.2 Mikroskopische Analyse	25

2.6.3 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten	26
2.6.3.1 Quantitative Auswertung der KBE	26
3 Ergebnisse	27
3.1 Voruntersuchung der Proben	27
3.1.1 Untersuchung der Oberfläche	27
3.4.2 Kontaktwinkelmessung und Benetzbarkeit	29
3.4.3 FT-IR-Analyse	29
3.2 Auswertung der Proben nach bakterieller Besiedelung.....	30
3.2.1 Fluoreszenzmikroskopie	30
3.2.2 Rasterelektronenmikroskopie.....	32
3.2.3 Koloniebildende Einheiten.....	34
4 Diskussion	36
4.1. Diskussion der Methoden	36
4.1.1 Versuchsaufbau	36
4.1.2 Kontrollproben.....	38
4.1.3 Beeinflussung des Biofilms	39
4.1.4 pSBMA als Beschichtungsmaterial	40
4.1.5 Beschichtungsverfahren	41
4.1.6 Versuchsauswertung	42
4.2 Schlussfolgerung	43
5 Zusammenfassung.....	44
5.1 Abstract	46
6 Literaturverzeichnis	47
7 Anhang	60
7.1 Abbildungsverzeichnis	60
7.2 Tabellenverzeichnis	60
7.3 Abkürzungsverzeichnis.....	61
8 Publikationen.....	62

9 Eidesstattliche Versicherung	63
--------------------------------------	----

Anmerkung

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird die Sprachform des generischen Maskulinums verwendet und soll im Folgenden als geschlechtsunabhängig verstanden werden.

1 Einleitung

1.1 Titan als Biomaterial

Titan findet seit den 1950er Jahren in allen Bereichen der Medizin Anwendung und gilt heutzutage als Material der Wahl im Bereich der Osteosynthesematerialien und Implantattechnologie. Dies ist auf seine günstigen chemischen und mechanischen Eigenschaften zurückzuführen. Verschiedene Arbeitsgruppen fanden bereits im Laufe des letzten Jahrhunderts in Zellkultur- und Tierversuchen heraus, dass Titan im Gegensatz zu anderen Metallen eine hohe biologische Verträglichkeit aufweist [1-3]. Diese biologische Materialverträglichkeit wird als *Biokompatibilität* bezeichnet [4, 5]. Im Laufe der Zeit wurden zahlreiche potenzielle Materialien zur Frakturbehandlung getestet, aber erst die Einführung von Titan als Osteosynthesematerial sorgte in Bezug auf die Biokompatibilität und die mechanischen Eigenschaften für zufriedenstellende Ergebnisse [6]. Die Biokompatibilität des Titans ist unter anderem auf die Fähigkeit zurückzuführen, unter Luftkontakt eine permanente Oxidschicht (TiO_2) zu entwickeln, die eine Dicke von circa 3 nm besitzt und sich unmittelbar nach der Titanbearbeitung bildet [7, 8]. Diese Passivierungsschicht verhindert, dass es, in-vivo eingebracht, zur Korrosion und folglich zu unerwünschten Gewebsreaktionen kommt [9, 10]. Weiter wird Titan als *bioinert* beschrieben. Sofern enossal eingebracht, werden Titanimplantate vom Körper nicht als fremd angesehen, sondern von neugebildetem Knochen umschlossen. Diese Form der Integration des Implantates wird auch als Kontaktosteogenese bezeichnet [11, 12]. Bei Stahl oder Kobaltbasislegierungen kommt es dagegen zu einer Distanzosteogenese. Das heißt, das Material wird vom umliegenden Gewebe toleriert, jedoch lagert sich kein neugebildetes Gewebe an, sodass ein feiner Spalt bestehen bleibt [5, 10]. Auch das Elastizitätsmodul hat einen entscheidenden Einfluss auf die Verträglichkeit eines Materials. So weist Titan im Vergleich zu Implantatstahl ein niedrigeres Elastizitätsmodul auf und ist somit elastischer bei mechanischer Belastung. Aufgrund seiner deutlich geringeren Dichte ist es zudem leichter als Stahl [13]. Ein weiterer Vorteil ist das geringe Auftreten von Artefakten bei computertomographischen Untersuchungen und Ferromagnetismus bei der Magnetresonanztomographie [14]. Titan wurde bereits 1996 von Haug als potenziell permanentes Osteosynthesematerial beschrieben [15]. Nichtsdestotrotz kommt es immer wieder zu Sekundärinfektionen. Auch bei Patienten mit

medizinischen Titanimplantaten stellen diese eine ernstzunehmende Komplikation dar und sind nicht ungewöhnlich [16].

1.2 Titan in der Zahnheilkunde

Die Deutsche Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK) definiert die Implantologie in der Zahnheilkunde als „*enossale Implantologie, die als wissenschaftlich anerkannte Therapie integraler Bestandteil der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde ist*“. Implantate dienen als künstliche Pfeiler, die unter anderem zur Verankerung von Zahnersatz eingesetzt werden und zu einem hohen Prozentsatz als klinisch erfolgreich einzustufen sind ¹. Die Anzahl der pro Jahr gesetzten Implantate in Deutschland ist laut der deutschen Gesellschaft für Implantologie e.V. (DGI) in den letzten Jahrzehnten auf aktuell rund 1,3 Millionen gestiegen. Die ersten Implantate aus Titan zum Zahnersatz wurden 1969 von Per Ingvar Brånemark im Tierversuch untersucht. Es zeigte sich, dass unter Einhaltung bestimmter Gesichtspunkte, eine reizfreie Integration des Materials zur Wiederherstellung der Kaufunktion möglich ist [3]. Brånemark war es, der den Begriff *Osseointegration* in der Zahnheilkunde eingeführt hat, mit dem eine sowohl strukturelle als auch funktionelle Verbindung zwischen Implantatoberfläche und neugebildetem Knochen gemeint war [17, 18]. Heutzutage wird der Begriff *Osseointegration* jedoch eher als eine Art Fremdkörperreaktion angesehen, bei der Knochen an den Grenzflächen gebildet wird, um das Implantat vom Gewebe abzuschirmen [19].

Im Bereich der dentalen Implantate wurden im Laufe der Zeit verschiedene Implantatformen und Implantatsysteme entwickelt. Durchgesetzt haben sich letztendlich rotationssymmetrische Implantate aus Titan mit konischer oder zylindrischer Form [8, 20].

¹ Wissenschaftliche Stellungnahme der DGZMK von 2005; Implantologie in der Zahnheilkunde (Quelle: DZZ 8 (60/2005) Dtsch. Zahnärztl. Z. 60, 915-9416 (2005))

Neben dem Ersatz verloren gegangener Zähne durch Implantate, gibt es in der Zahnheilkunde weitere Bereiche, in denen Titan und dessen Legierungen Verwendung finden, beispielsweise die Rekonstruktion von Knochendefekten unter Zuhilfenahme von Titannetzen, sogenannten Titanmeshs. Diese können entweder intraoperativ an den Defekt angepasst oder in Form von individualisierten CAD/CAM-Titanmeshs (Yxoss®, ReOss Ltd., Filderstedt, Germany) verwendet werden. Die individualisierten CAD/CAM-Titanmeshs werden auf der Grundlage einer digitalen Volumentomographie oder Computertomographie entsprechend dem Defekt hergestellt. Diese können dann in Kombination mit autologem und xenogenem Material intraoperativ eingebracht werden und erzielen laut klinischer Studien vielversprechende Ergebnisse [21, 22]. Aber auch bei einem sich über den gesamten Kiefer erstreckenden qualitativen und quantitativen Knochendefizit gibt es Titanstrukturen, die via CAD/CAM Verfahren individuell angefertigt werden. Diese sogenannten additiv hergestellten subperiostalen Kieferimplantate (AMSJI, additively manufactured sub-periosteal jaw implant) dienen dann als Haltestruktur für den darauf geplanten Zahnersatz, wenn andere, gängige Therapieoptionen nicht durchführbar sind [23].

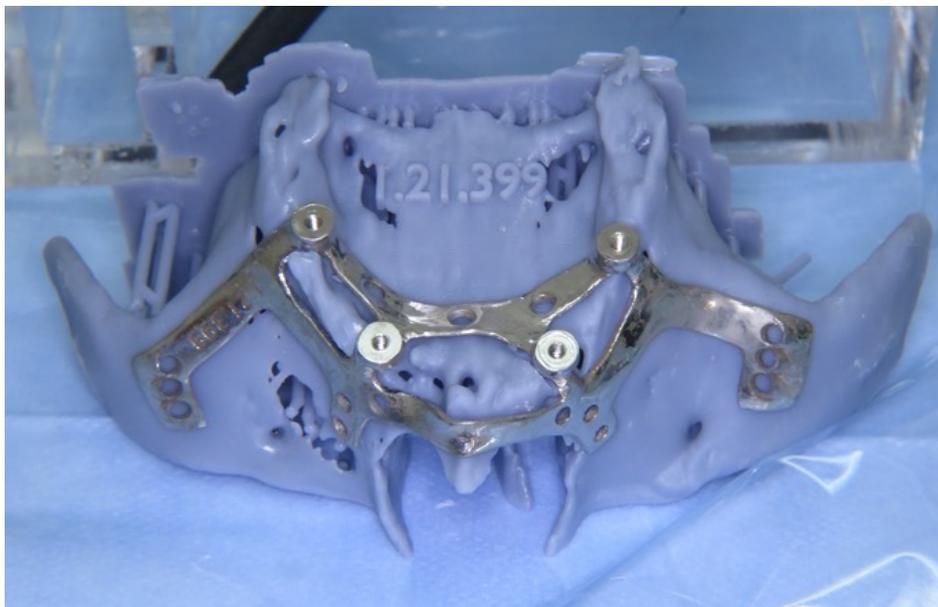


Abbildung 1: Foto eines subperiostalen patientenspezifischen Kieferimplantates für den Oberkiefer (AMSJI).

Neben der Verwendung von Titan als Material für Titanimplantate oder Leit- bzw. Haltestrukturen wird es auch in Form von anodisch oxidiertem, weißem oder grauem Granulat verwendet. Es findet beispielsweise Anwendung bei der Behandlung von Knochendefekten, die infolge von periimplantären Erkrankungen entstanden sind [24]. Enossale Titanimplantate versprechen im gesunden Organismus eine hohe Überlebens- und Erfolgsrate, was durch entsprechende Langzeitergebnisse in klinischen Studien belegt wurde [25, 26]. Systemische Erkrankungen können jedoch die Heilungsbereitschaft mindern und haben somit erheblichen Einfluss auf die Erfolgsrate [27, 28]. So weisen beispielsweise parodontal vorgeschädigte Kiefer ein nachweislich höheres Risiko für periimplantäre Erkrankungen auf [29-32]. Implantate sind gleichzeitig aber eine häufig verwendete Therapieform des durch den Rückgang des Zahnhalteapparates geschädigten Kiefers [33]. Aus diesem Grund ist es von großem Interesse, Wege zu finden, die eine Osseointegration auch bei kompromittierten Patienten ermöglichen. Die aktuelle Forschung beschäftigt sich daher mit dem Einfluss der oberflächlichen Beschaffenheit von Implantaten auf die Osseointegration [20, 34].

1.3 Bakterielle Besiedelung und Biofilmformation

Biofilme werden beschrieben als eine *„mikrobiell adhärenente Gemeinschaft, die durch Zellen gekennzeichnet ist, die irreversibel an einem Substrat, einer Grenzfläche oder aneinander gebunden sind, eingebettet in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen, die durch sie selbst produziert wird“* [35-37]. Außerdem weisen sie einen sich verändernden Phänotyp auf, der sich abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit und Gentranskription adhärent wachsender Bakterien anpasst [35]. Der Aufbau dieser mikrobiellen Gemeinschaften wird als komplexe dreidimensionale Struktur beschrieben, die in Form von Monoschichten einzelner Zellen bis hin zu dicken, schleimigen Strukturen makroskopischer Größe auftritt [38]. Biofilme finden sich überall dort, wo genügend Wasser und Nährstoffe vorhanden sind. Dies betrifft alle Grenzflächen, wie zum Beispiel zwischen Gas- und Flüssigphasen, Flüssig- und Festphasen oder auch Flüssig- und Flüssigphasen [36, 38]. Biofilme bestehen zu 15-20% aus Bakterienzellen und zu 75-80% aus extrazellulären Bestandteilen [39]. Der bakterielle Anteil kann aus einer Bakterienart oder einer Mischung verschiedener Bakterien bestehen [35]. Die meisten Bakterien, die in natürlichen, klinischen und industriellen Umgebungen vorkommen, sind adhärent an

Oberflächen gebunden [40]. Man unterscheidet zwischen nützlichen, residenten Bakterien und schädlichen, pathogenen Bakterien. Die Organisation der Mikroorganismen in einem hochkomplexen Biofilm schützt die Bakterien vor äußeren Einflüssen, was zur Steigerung der Pathogenität führt und das Wachstum und Überleben der Bakterien fördert [41]. So weisen Biofilme im Vergleich zu Bakterien, die in planktonischer (freischwebender, nicht adhären) Form auftreten, eine hohe Resistenz gegenüber chemischen, antimikrobiellen Mitteln und Antibiotika auf [42]. Innerhalb des Bakteriengefüges besteht ein Austausch an Informationen, der zur Ausschüttung von Signalmolekülen führt und die Änderung von Funktionen der Mikroorganismen zur Folge hat [41]. Dieser Informationsaustausch wird heute als *Quorum sensing* bezeichnet [43]. Erstmals wurde der Begriff 1994 von Winans [44, 45] verwendet. Das Phänomen wurde aber bereits 1970 von Nealson et al. beschrieben, zu dieser Zeit jedoch noch als sogenannte *Autoinduktion* [44, 46].

1.3.1 Ablauf der bakteriellen Besiedelung in der Mundhöhle

Der Prozess der Biofilmbildung kann in verschiedene Phasen eingeteilt werden. Dieser Vorgang ist höchst komplex und wird hier nur in vereinfachter Form dargestellt. Zuerst erfolgt die Adhäsion der Bakterien an die jeweilige Oberfläche, darauf folgt die Proliferation und Adhäsion weiterer Bakterien und zuletzt die Freisetzung von Tochterkolonien [47, 48]. In der Mundhöhle sind mindestens 700 verschiedene Bakterienspezies bekannt, die mit dem Wirtsorganismus in einem ökologischen Gleichgewicht stehen [41]. Es wird jedoch von bis zu 19.000 verschiedenen Phylotypen in der oralen Mikroflora ausgegangen [49]. Grundvoraussetzung für die Adhäsion der Bakterien ist das Vorhandensein eines sogenannten *Pellikels*. Hierbei handelt es sich um ein dünnes Häutchen von 0,1-1 µm Dicke, das aus Proteinen, Polysacchariden, Enzymen und Immunglobulinen besteht [50]. Verschiedene Parameter wie das Substratangebot haben Einfluss auf die Pellikelbildung [51]. Zu Beginn erfolgt die initiale Besiedelung durch die sogenannten *Frühbesiedler*, die am Pellikel haften. Hierbei handelt es sich überwiegend um Kokken und Aktinomyzeten, die sich mithilfe von speziellen Oberflächenmolekülen, Adhäsinen, an Pellikelrezeptoren verankern können [52].

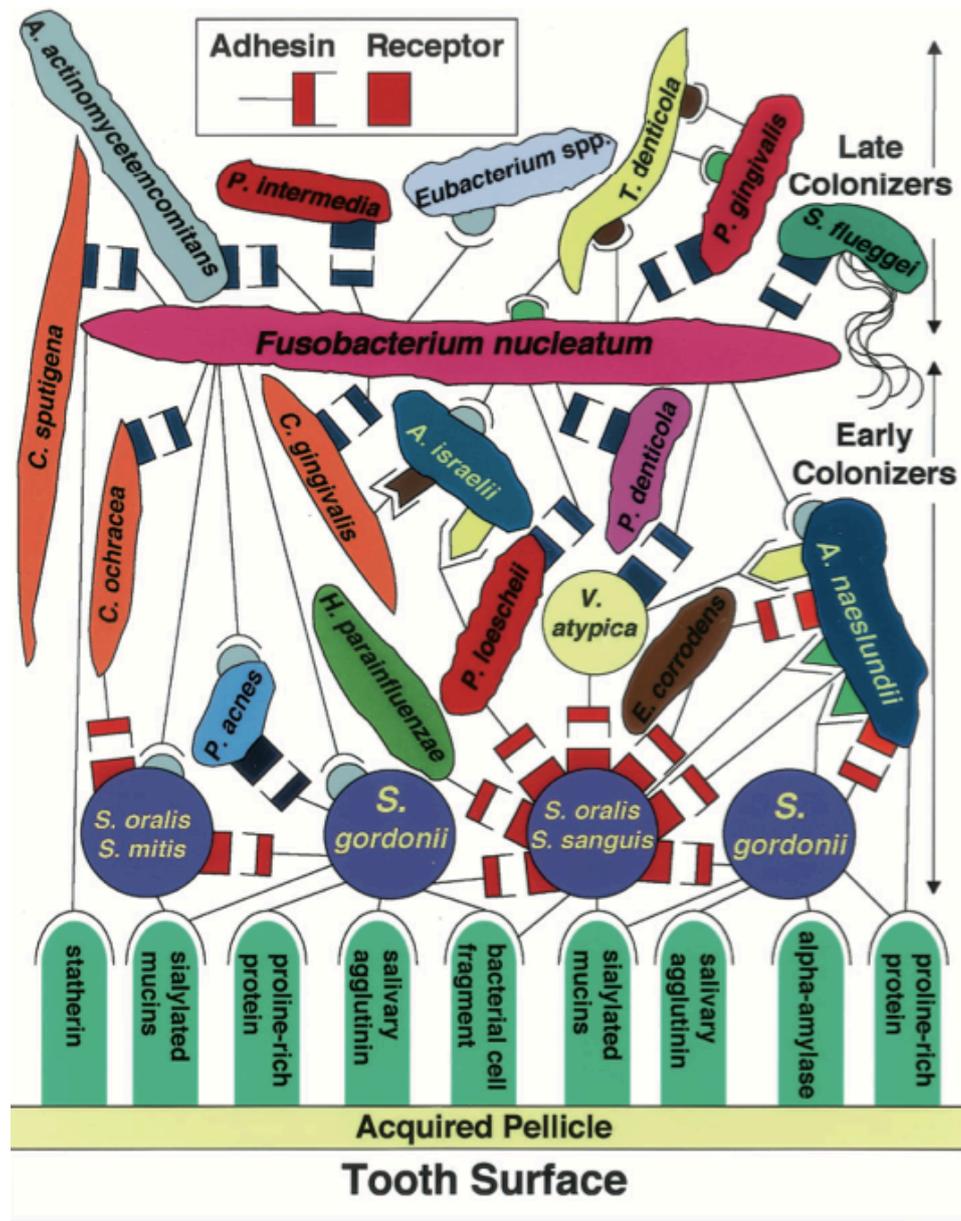


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Biofilms in der Mundhöhle nach Kolenbrander et al. 40; Es zeigt das komplexe Zusammenspiel der einzelnen bakteriellen Spezies, die sich durch ihre Interaktion als Gemeinschaft auch vor antibakteriellen Noxen wie Antibiotika schützen können. Copyright © 2002, American Society for Microbiology

Die initiale Adhäsion ist ein Prozess, der wenige Minuten bis hin zu einigen Stunden in Anspruch nimmt [53, 54]. Es wird davon ausgegangen, dass die initiale Adhäsion von Bakterien eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Infektionen spielt, da sie die Umgebung für parodontal pathogene Bakterien der späten Besiedlung vorbereitet, die anspruchsvollere Wachstumsbedingungen benötigen [55, 56]. Die Plaque wächst durch Teilungsvorgänge und Akkumulation weiterer Bakterien, sogenannter *Spätbesiedler*. Diese haften durch spezielle Adhäsions- und Kohäsionsphänomene, durch Zell-Zellkontakte oder Plaquematrixkomponenten.

Während Frühbesiedler nur mit Frühbesiedlern, jedoch nicht mit Spätbesiedlern kommunizieren, bedarf es eines Vermittlers, der jene Bakterien koaggregiert (*bridging*) [40]. Diese Aufgabe übernehmen bestimmte Bakterien, die als Brückenbildner fungieren, wie das *Fusobacterium nucleatum*. Mit zunehmendem Alter der Plaque kommt es zu steigender Schichtdicke, wodurch die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung in den unteren Schichten sinkt [41]. So nimmt der Anteil an anaeroben Bakterien mit der Zeit zu, gleichzeitig sinkt der Anteil aerober Bakterienspezies [40]. Nach der Adhäsion und Reifung des Biofilms erfolgt die Freisetzung von Tochterkolonien und die damit einhergehende Ausbreitung [47]. Diese Freisetzung erfolgt im Wesentlichen durch Abschilferung und Erosion. Bei der Erosion handelt es sich um einen Vorgang des gleichmäßigen Abtrages einzelner oder mehrerer Zellen, wohingegen bei der Abschilferung Zellkonglomerate von bis zu 1000 Zellen aus dem Biofilm freigesetzt werden [57]. Auf diese Weise erfolgt eine Ausbreitung des Biofilms, bei der die Bakterien aufgrund ihres Verbundes weiterhin vor antibakteriellen Noxen geschützt sind [58]. Auch dieser Prozess der Freisetzung von Tochterkolonien wird durch das quorum sensing gesteuert [47]. Aufgrund der Tatsache, dass Biofilme ursächlich für viele Infektionen sind und gleichzeitig eine hohe Resistenz gegenüber antibakteriellen Noxen aufweisen, ist es von großem Interesse, Oberflächen zu entwickeln, die die Biofilmbindung bereits im Stadium der initialen Adhäsion hindern, sodass die Plaquebildung frühzeitig beeinträchtigt wird [55].

1.4 Periimplantäre Infektionen

Die periimplantären Infektionen unterteilen sich zunächst in zwei Untergruppen, die periimplantäre Mukositis sowie die Periimplantitis. Die Mukositis ist eine reversible Entzündung, die das suprakrestale Weichgewebe betrifft. Sie stellt die Voraussetzung für eine Periimplantitis dar, bei der es sich um eine irreversibel-progressive Entzündung handelt und neben dem suprakrestalen Weichgewebe auch den umliegenden Knochen betrifft [59, 60]. Beide Erkrankungen werden mit einem bakteriellen Geschehen assoziiert [61].

Durch die steigende Zahl der gesetzten Implantate weltweit kommt es häufiger zu periimplantären Erkrankungen. Laut S3-Leitlinie der AWMF von Mai 2016 zur Behandlung periimplantärer Infektionen an Zahnimplantaten liegt die gewichtete durchschnittliche Prävalenz der periimplantären Mukositis bei 43% und der Periimplantitis bei 22%² [62, 63]. Laut Konsensusbericht des „*Sixth European*

Workshop on Periodontology“ entwickeln sogar etwa 80% aller gesetzter Implantate eine Mukositis, bei bis zu 56% aller gesetzten Implantate kommt es im Verlauf zur einer Periimplantitis [59].

Merkmale sind klinische Entzündungszeichen wie Rötung, Schwellung, Blutung auf leichte Sondierung (Bleeding-on-probing, BOP) und eine mögliche Suppuration.

Ebenso dient der röntgenologisch messbare voranschreitende Verlust an umgebender Knochensubstanz als Parameter [64-66]. Ein weiterer klinischer Parameter für eine Periimplantitis sind erhöhte Sondiertiefen im Vergleich zur Ausgangsmessung [64, 67]. Ein Rückgang von jährlich 0,2 mm ab dem ersten Jahr nach Insertion wird jedoch als physiologisch angesehen [66].

Auch wenn die Anzahl der Kontraindikationen für dentale Implantate im Laufe der Zeit gesunken ist, gibt es immer noch Faktoren, die den Erfolg eines Implantates mindern können. Neben der Plaqueakkumulation als Hauptursache werden weitere Faktoren wie Nikotinkonsum, Diabetes, die häusliche Mundhygiene sowie Zementreste diskutiert [68]. Vorerkrankungen wie Parodontitis, die den Zahnhalteapparat irreversibel schädigen und etwa 10-15% der Erwachsenen weltweit betreffen, führen sehr häufig zum Zahnverlust [69, 70]. Als Therapieoption infolge einer Parodontitis verloren gegangener Zähne wird dann häufig ein Implantat gewählt [33], was jedoch bei kompromittierten Patienten zum Misserfolg führen kann. So wiesen Patienten, die eine Parodontitis in ihrer Anamnese zeigten, eine geringere Überlebensrate von dentalen Implantaten sowie einen vermehrten periimplantären Knochenverlust auf [29, 30]. Es wird somit deutlich, dass eine Korrelation zwischen einer bereits vorhandenen, unbehandelten Parodontitis und einer Periimplantitis besteht [31, 32].

² S3-Leitlinie (Langversion), Die Behandlung periimplantärer Infektionen an Zahnimplantaten, AWMF-Registernummer 083-023, (Stand: Mai 2016, derzeit in Bearbeitung)

1.4.1 Pathogenese

Nach der Implantation besiedeln Bakterien aus parodontalen Taschen benachbarter Zähne oder des umliegenden Weichgewebes die Implantatoberfläche [71, 72]. Die initiale Adhäsion beginnt an supragingivalen Unregelmäßigkeiten der Implantatoberfläche. Die Keimbesiedlung kann sich dann entlang des Implantatkörpers ausbreiten. Unregelmäßigkeiten des Implantatkörpers schützen die Bakterien vor Abscherkräften und den natürlichen Reinigungskräften des Speichels [73, 74]. Auch der Bereich zwischen Implantat und Abutment kann als Nische für bakterielle Adhäsion dienen [75-77]. Die mikrobielle Umgebung des Implantates scheint der mikrobiellen Zusammensetzung angrenzender Zähne sehr ähnlich zu sein [72, 74, 78]. Ebenso können die natürlichen Zähne des Patienten als Reservoir parodontopathogener Keime dienen. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass dieselben parodontopathogenen Spezies der Mundhöhle von Patienten auch an der Oberfläche angrenzender Implantate vorzufinden sind [79]. Allerdings sind sowohl die Parodontitis als auch die Periimplantitis zwei verschiedene Krankheiten, die auch solche betrachtet werden müssen, da es signifikante Unterschiede auf mRNA-Ebene gibt, was bereits nachgewiesen werden konnte [80].

Mit der Reifung der Plaque und der Zunahme pathogener Keime entsteht ein entzündliches Infiltrat, das zu einer Mukositis führt. Es sind erste Entzündungszeichen wie Schwellung, Rötung und Schmerzen erkennbar [67]. Eine solche Entzündung kann sich im weiteren Verlauf entlang der Implantatbasis ausbreiten, was zu einer Resorption des Alveolarknochens führt und durch erhöhte Sondiertiefen sowie röntgenologisch deutlich wird [74]. Der Pathomechanismus, der von einer periimplantären Mukositis zu einer Periimplantitis führt, ist nicht vollständig geklärt. Zudem kann der Beginn einer Periimplantitis frühzeitig einsetzen und einen nichtlinearen, progressiven Verlauf haben [67].

1.5 Oberflächen von Implantaten und ihre Beschichtungsmöglichkeiten

Nachdem sich Titan im Laufe der Zeit gegen die konkurrierenden Materialien durchgesetzt hat, liegt das Augenmerk nun auf der oberflächlichen Beschaffenheit des Materials. Es gilt daher zu klären, welche Oberflächenmodifikationen für eine qualitative und quantitative Verbesserung der initialen Heilungsphase der Osseointegration sorgt. Hierbei spielt der Grad an Knochen-Implantat-Kontakt (BIC) und die Sekundärstabilität eine wichtige Rolle [34]. Es gibt bereits zahlreiche Ansätze,

wie Implantate in Bezug auf ihre oberflächliche Beschaffenheit modifiziert werden können. Man unterscheidet zwischen abtragenden (subtraktiven) Verfahren wie Säureätzung, Sandstrahlung oder einer Kombination aus beidem und auftragenden (additiven) Verfahren, die die physiko-chemischen Eigenschaften verändern und somit einen Einfluss auf die lokalen biologischen Prozesse haben [81, 82].

Bereits in den 1970er Jahren stellte Baumhammers fest, dass sandgestrahlte Oberflächen im Vergleich zu glatten Oberflächen vorteilhaft in Bezug auf die Anhaftung von Bindegewebszellen sind [17, 83]. Eine raue Oberfläche begünstigt sowohl die Knochenverankerung als auch die biomechanische Stabilität [20]. Es gibt eine Vielzahl additiver Verfahren, die Einfluss auf die physiko-chemischen Eigenschaften nehmen und somit das zelluläre und bakterielle Geschehen beeinflussen. Additive Verfahren wie die anodische Oxidation (TiUnite®, Nobel Biocare, Switzerland) führe zu einer vergrößerten Oberfläche, die dem natürlichen Knochen sehr ähnlich ist und für eine schnellere Knochenanlagerung und Osseointegration sorgen soll. In einer klinischen Studie über einen Zeitraum von 10 Jahren konnte eine hohe Erfolgsrate dieser Implantate nachgewiesen werden [84]. Auch das Auftragen einer osteokonduktiven Calciumphosphatbeschichtung, durch Hydroxylapatit, fördert die Osseointegration und somit auch die Stabilität des Implantats [85-87]. Es konnte sogar eine verbesserte Osseointegration im Vergleich zu konventionellen Titanoberflächen festgestellt werden [88].

Eine weitere Möglichkeit, die biologischen Prozesse zu beeinflussen, ist die Verwendung von fluoridmodifizierten Titanimplantaten, die einen erhöhten Knochen-Implantat-Kontakt aufweisen und somit günstige klinische Ergebnisse erzielen konnten [89]. Weiter zeigten Oberflächenmodifikationen von Titan mit organischen Molekülen wie Proteinen oder Polysacchariden bereits vielversprechende Ergebnisse in Bezug auf die zelluläre Anhaftung und Osseointegration [90, 91]. Auch die Beschichtung mit Bisphosphonaten wurde hinsichtlich ihres Einflusses auf die Osseointegration untersucht und zeigte eine Verbesserung über einen Zeitraum von 5 Jahren, der röntgenologisch nachgewiesen werden konnte [92].

Ein weiteres auftragendes Verfahren ist die Beschichtung von Titanoberflächen mit Goldstrukturen. Durch Au-Beschichtungen wird die Oberfläche nicht nur chemisch, sondern auch in ihrer Mikro- und Nanostruktur verändert. Es konnte in einer in-vitro Studie über einen kurzen Zeitraum ein positiver Effekt auf die zellulären Aktivitäten festgestellt werden [93]. Fraglich bleibt jedoch, ob derartige Beschichtungen auch über

längeren Zeitraum stabil sind und der angestrebte Effekt auch dauerhaft erreicht werden kann.

Neben der Zellanheftung, dem Zellwachstum und der Zelldifferenzierung als Messinstrumente für die Wirkung einer modifizierten Implantatoberfläche, ist ein anderer wichtiger Aspekt der Einfluss auf die bakterielle Anhaftung. Auch das bakterielle Geschehen kann durch die oberflächliche Beschaffenheit eines Implantatmaterials beeinflusst werden. So konnte durch Grössner-Schreiber et al. belegt werden, dass oberflächliche Hartbeschichtungen aus Zirkoniumnitrid (ZrN) und Titanitrid (TiN) eine wesentlich geringere Bakterienakkumulation aufweisen, als eine reine Titanbeschichtung [55].

Eine andere antibakteriell wirksame Form bietet die Beschichtung mit Silber. Silberionen werden langsam freigesetzt und sorgen für einen antimikrobiellen Effekt, ohne eine zytotoxische Auswirkung auf Osteoblasten oder Fibroblasten zu haben [94, 95]. Silberbeschichtungen finden bereits Anwendung im Bereich der transurethralen Katheter zum Schutze vor aufsteigenden Infektionen [96]. Hierbei zeigte sich, dass die Beschichtung mit Silber vor Infektionen ausgehend von sowohl gram-positiven als auch von gram-negativen Bakterien schützt [97]. Aber auch im Bereich der dentalen Implantologie können derartige Beschichtungen einen hemmenden Effekt auf die bakterielle Adhäsion bieten. Titanoberflächen, die mit silberbeladenem Polydopamin beschichtet wurden, zeigten ein deutlich verzögertes bakterielles Wachstum im Vergleich zu Titanoberflächen ohne zusätzliche Beschichtung [98, 99]. Der Nutzen von Silberionen im menschlichen Körper ist jedoch sehr kritisch zu sehen, da freigesetzte Silber-Ionen im Verdacht stehen, eine zellschädigende Wirkung aufzuweisen, auch wenn diese in einer eingebetteten Struktur verwendet werden [100].

1.5.2 Antifouling-Beschichtungen

Biofouling bezeichnet die unerwünschte Ablagerung von Mikroorganismen auf Oberflächen. Die dabei entstehenden Beläge werden als *Biofilm* bezeichnet [101]. Beschichtungen, die eine solche bakterielle Adhäsion verhindern können, werden unterteilt in antimikrobielle oder Antifouling-Beschichtungen. Antimikrobielle Beschichtungen sind in der Lage, Mikroorganismen abzutöten, wenn sich diese der Oberfläche nähern. Antifouling-Beschichtungen haben hingegen abweisende Eigenschaften gegenüber Bakterien bzw. beeinträchtigen die Ausbildung einer

Biofilmstruktur [102]. Antifouling-Beschichtungen sind in den verschiedensten Bereichen von Interesse, im medizinischen Bereich vor allem in Bezug auf chirurgische Instrumente, medizinische Implantate und Prothesen sowie Kontaktlinsen [103, 104]. Aber auch im Bereich der Schiffsindustrie und der Wasseraufbereitungssysteme spielt die Vermeidung von Biofilmen eine große Rolle [53].

Es gibt bereits verschiedene antimikrobielle sowie Antifouling-Strategien, die zur Funktionalisierung von Titan dienen. Neben der bereits erwähnten Beschichtung mit Silberionen [98, 99] gibt es auch die Möglichkeit, Titanoberflächen mit bakteriziden Metallionen wie Kupfer oder Zink zu funktionalisieren [105]. Zudem besteht die Möglichkeit, Titan mit bakterienabweisenden Nanostrukturen wie Titan-Nanoröhren zu modifizieren [106, 107]. Auch die Beschichtung mit antibakteriellen Agenzien wie Antibiotika oder antibakteriellen Peptiden stellt eine Strategie zur frühzeitigen Unterbindung der bakteriellen Anlagerung dar [108, 109].

Einige Studien zielen in ihrer Strategie bereits auf bestimmte Bereiche wie das Interface zwischen Implantat und Abutment ab, da diese Bereiche prädestiniert für die bakterielle Adhäsion sind [76, 77].

1.5.3 Polymerbeschichtungen

Zusätzlich zu den oben genannten Strategien hat sich das Aufbringen von physiologisch inertem Polymer auf Titanoberflächen in den letzten Jahren zu einer vielversprechenden Antifouling-Strategie entwickelt [110]. Es gibt bereits eine Reihe unterschiedlicher Polymere, die sich für den Einsatz im menschlichen Organismus eignen und einen positiven Effekt auf die Inhibition bakterieller Adhäsion darstellen. Ein Beispiel ist die Beschichtung mit Polyethylenglykol (PEG), denn diese besitzt günstige Eigenschaften wie eine hohe Löslichkeit, eine geringe Immunogenität sowie geringe Toxizität [111]. In Form von langen Ketten, die auf einer Oberfläche aufgebracht werden, soll es dem PEG gelingen, eine Proteinresistenz auszubilden. Durch ihre Wechselwirkung mit dem umliegenden Wasser kommt es aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen bei Annäherung eines Proteins zur Kompression der PEG-Ketten. Dies führt zu abstoßenden elastischen Kräften [112, 113].

Neben PEG und dessen Derivaten, eignen sich auch Beschichtungen mit Nafion [114-116] oder Poly (oligo ethylenglycol) Methylether Methacrylat (POEGMA) [117]. Zwitterionische Polymere wie beispielsweise Polysulfobetain-Methacrylat (pSBMA), N, N-dimethyl-N-(2- Methacryloyloxyethyl-N-(3-Sulfopropyl) ammonium betaine (SPE) sind ebenfalls geeignet. Sie wiesen neben superhydrophilen Eigenschaften eine gute Biokompatibilität sowie geringe Zytotoxizität auf [118]. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von Wassel et al. wurde die Beschichtung mit Polysulfobetain-Methacrylat-Bürsten direkt auf die Porenwände von NiTi-Nanoröhren dargestellt [119]. Diese Bürsten sorgten für eine antiadhäsive Oberfläche, die eine verbesserte Benetzung aufwies und sich zur Verwendung auf Titanimplantaten eignet. Während die Wechselwirkung der PEG Ketten auf Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen ist, kommt es bei zwitterionischen Polymeren wie pSBMA durch elektrostatische Kräfte zu einer Hydratation, die deutlich stärker ist [120].

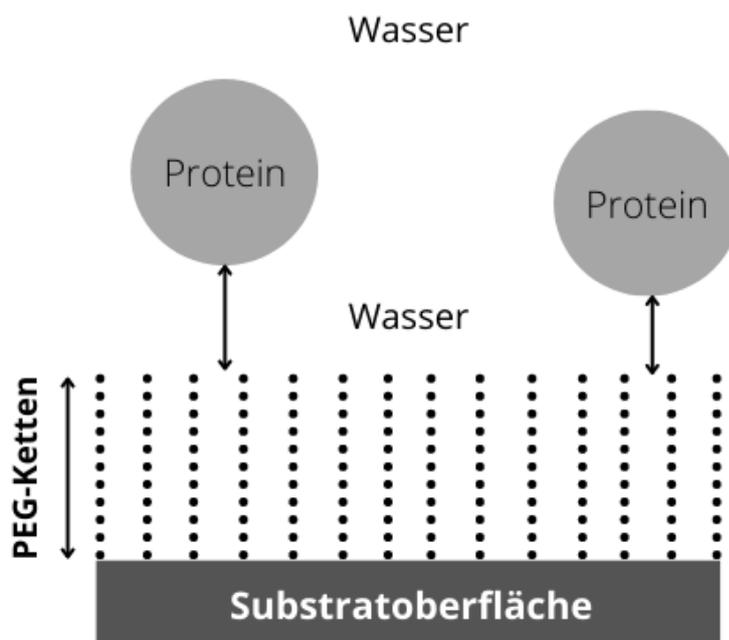


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer PEG-Beschichtung nach dem Beispiel von Jeon et al. 112. Dargestellt sind Proteine, Wasser und ein festes Substrat mit terminal befestigten PEG-Ketten. Durch ihre Wechselwirkung mit dem umliegenden Wasser kommt es aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen bei Annäherung eines Proteins zur Kompression der PEG-Ketten, was zu abstoßenden Kräften bei bakterieller Anhaftung führt.

1.5.1 Hydrophilie und Hydrophobizität an Titanoberflächen

Zunächst gilt es zu klären, was mit den Begriffen *Hydrophobizität* und *Hydrophilie* in diesem Zusammenhang gemeint ist. Sie beschreiben die Wechselwirkung eines Materials mit dem Medium Wasser. Als Messinstrument dient der

Wasserkontaktwinkel. Hierbei handelt es sich um einen messbaren Winkel, der entsteht, wenn ein Wassertropfen auf eine Oberfläche eines Feststoffes trifft. Hydrophobe Oberflächen weisen einen Kontaktwinkel von $>90^\circ$ auf. Wasserkontaktwinkel von 5 bis 90° gelten für hydrophile Oberflächen und Oberflächen mit einem Wasserkontaktwinkel von $<5^\circ$ gelten als superhydrophil [34]. Stark hydrophile Oberflächen bilden eine Art Monolayer aus mobilen Wassermolekülen, die nicht von Zellen und Proteinen verdrängt werden können [74].

Titan besitzt aufgrund der natürlichen Kontamination durch Hydrokarbon und Karbonate aus der Umgebungsluft sowie seiner natürlichen Hydrophobizität eine geringe Oberflächenenergie [121]. An Titanoberflächen mit erhöhter Oberflächenenergie und Hydrophilie konnte ein positiver Effekt auf die Benetzbarkeit, die Affinität von Proteinen und die erhöhte Adhäsion von Osteoblasten in Studien nachgewiesen werden [5, 20, 122, 123]. Hydrophobe Oberflächen hingegen haben keinen positiven Einfluss auf Weich- und Hartgewebe [34]. Sie stehen sogar im Verdacht, eine Denaturierung von Proteinen auslösen zu können [124].

Auch das bakterielle Geschehen kann durch hydrophile Konditionierung beeinflusst werden. So sei die bakterielle Anhaftung an Oberflächen mit superhydrophilem Charakter wesentlich geringer als an Oberflächen mit weniger hydrophilem Verhalten [125]. Die Firma Straumann hat sich die positiven Eigenschaften von temporär hydrophilen Oberflächen in Form der SLActive® Implantate bereits zunutze gemacht. Die zuvor gestrahlte und geätzte Oberfläche wird nach einer Stickstoffspülung bis kurz vor der Implantatinserktion in Natriumchlorid (NaCl) gelagert, was für eine hydrophile Oberfläche sorgt [34]. Die SLA Implantate hingegen, die lediglich sandgestrahlt und säuregeätzt wurden, zeichnen sich durch eine hydrophobe Oberfläche aus, mit einer niedrigen Oberflächenenergie. Die raue Mikrostruktur wirkte sich zwar positiv auf die osteogenen Eigenschaften aus, jedoch sorgte die Hydrophobizität für eine geringere Benetzbarkeit [123]. Die Konditionierung mit NaOH bewirkt eine erhöhte Oberflächenenergie und Hydrophilie, wodurch die Benetzbarkeit der Implantate steigt, was einen positiven Effekt auf den Einheilungsprozess hat [126].

Eine weitere Form der Konditionierung zur Erzeugung einer superhydrophilen Oberfläche ist die Behandlung mit ultraviolettem Licht (UV-Licht) oder einer Behandlung mit Kaltplasma. Durch die Behandlung mit UV-Licht werden die Kohlenstoffverbindungen an der Titanoberfläche verringert, was zur Hydrophilierung führt. Auch durch diese Form der Oberflächenkonditionierung verbessert sich die

Benetzbarkeit der Oberfläche und wird die Osseointegration des Implantats gefördert [127-129]. Die Behandlung mit Kaltplasma scheint ein ebenso vielversprechendes Verfahren zur Oberflächenmodifikation zu sein, da es Oberflächen hydrophile Eigenschaften verleihen kann [130], einen antibakteriellen Einfluss besitzt [131] und auch einen positiven Effekt auf die Regeneration des umliegenden Gewebes zu haben vermag [132].

1.6 Ziele und Hypothese

Das angestrebte Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit ist es, herauszufinden, inwiefern sich die bakterielle Adhäsion durch eine superhydrophile Oberflächenbeschichtung aus Polysulfobetain-Methacrylat beeinflussen lässt.

Bei der hier verwendeten Antifouling-Beschichtung handelt es sich um ein zwitterionisches, photopolymerisierbares Material, welches durch seine Wechselwirkung mit Wasser einen bakterienabweisenden Effekt haben soll. Es werden insgesamt 12 sandgestrahlte und säuregeätzte Titanplättchen mit dieser Polymerbeschichtung versehen. 12 weitere, unbeschichtete Titanplättchen, die im Vorfeld nur sandgestrahlt und säuregeätzt wurden, dienen als Kontrollprobe und werden auf dieselbe Weise behandelt und untersucht. Pro Durchgang dient ein Thermanox™ Deckglas als Positiv-Kontrolle.

Es wird die Hypothese aufgestellt, dass die Titanproben mit der Beschichtung aus Polysulfobetain-Methacrylat eine geringere bakterielle Adhäsion aufweisen im Vergleich zu den Titanplättchen ohne Beschichtung. Zur qualitativen Beurteilung des bakteriellen Wachstums werden die Versuchsproben mittels Fluoreszenzmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie untersucht und im Anschluss semiquantitativ ausgewertet.

Zusätzlich dient die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) dazu, eine quantitative Auswertung der Proben durchzuführen.

Folgende Fragen gilt es im Einzelnen zu klären:

- Kann eine bakterielle Besiedelung mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Rasterelektronenmikroskopie nachgewiesen werden?
- Inwiefern unterscheidet sich die bakterielle Besiedelung der Plättchen mit einer Beschichtung aus Polysulfobetain-Methacrylat zu denen ohne zusätzliche Beschichtung?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

Material	Hersteller
[2-(Methacryloyloxy)-ethyl]-dimethyl-(3-sulfopropyl)-ammoniumhydroxid 95%	SBMA, Sigma Aldrich, MO, USA
1-Phenyl-1,2-propanedion (PPD)	SBMA, Sigma Aldrich, MO, USA
3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat (TMSPMA)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
6-/12-Well-Platten	Sarstedt AG &Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Agar-Platten, BHI Agar	Sarstedt AG &Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Ampuwa Spüllösung, steriles Wasser für Spülzwecke	Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Bac-Light LIVE/DEAD™ BacLight™ Bakterien-Viabilitäts-Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, USA
BHI, Brain-heart-Infusion Broth	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
doppelseitiges Klebepunkte, PELCO Tabs, double coated	Agar Scientific Ltd, Stansted, Essex, UK
Enterococcus faecalis, ATCC 29212	Leibniz Institute DSM, Braunschweig, Germany
Ethanol, 50%, 60%, 70%, 90%, 100%	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Glas Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Baden-Württemberg, Deutschland
Glutaraldehydlösung 25%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hexamethyldisilazan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Kunststoffpipette 10 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Küvette, UV-transparente Einmal-Küvetten	Sarstedt AG &Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Mounting-Oil	Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, USA
PBS, Dulbeccos Phosphate buffered saline	Biowest, Nuaille, Frankreich
Pinzette, nach College, steril	Carl Martin GmbH, Solingen, Deutschland
Probenröhre 50 ml	Sarstedt AG &Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Probenteller für REM, SEM Specimen Stubs	Agar Scientific Ltd, Stansted, Essex, United Kingdom
Reaktionsgefäß, SafeSeal Reagiergefäß 2 ml, PP	Sarstedt AG &Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
TC-Schale 60, Cell+	Sarstedt AG &Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Thermo Scientific™ Nunc™ Thermanox™ Deckgläser, Ø 13mm	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Titan-Plättchen, Reintitan Grad 4, Ø 10mm	BEGO Medical GmbH, Bremen, Deutschland

Tabelle 1: Zusammenstellung verwendeter Materialien

Gerät	Hersteller
Autoklav, MELAG Vacuklav 24	MELAG Medizintechnik GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Axio Observer.Z1, Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Axio Vision Rel. 4.8	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
AxioCam MRc 5, Mikroskopie-Kamera	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Brutschrank Hereaus B6060	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
EDX (Energiedispersive Röntgenspektroskopie)	EDAX, Inc., Oxford, Großbritannien
Einkanal-Pipetten mit variabler Volumeneinstellung Eppendorf research® 10-100µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Exsikkator	Erich Eydam KG, Kiel, Deutschland
Inkubator: C24 Incubator shaker	New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA
Keimzählgerät BZG 25	Xylem Analytics Germany Sales GmbH und Co. KG, Weilheim, Deutschland
Lichtspektroskopie, Spectramax Plus 384	Microplate Spectrophotometer, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
Pipettierhilfe Accu-Jet®	Brand GmbH Co.KG, Wertheim, Deutschland
REM XL30CP	Philips Electron Optics GmbH, Kassel
Rüttler Rotamax 120	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Deutschland
SEM Ultra Plus	Carl Zeiss AG, Dresden, Deutschland
Sputter-Coater SCD 500	BAL-TEC
Ultraschallbad, Branson 2210 R-MT Ultrasonic Cleaner	Branson Ultrasonics Corporation, Danbury/CT, USA
Vortex Schüttler K-550-GE	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

Tabelle 2: Zusammenstellung verwendeter Geräte

2.2 Beschichtung der Proben

Für die Durchführung des Versuchs wurden insgesamt 24 kommerziell gefertigte Titanproben verwendet, die bereits sandgestrahlt und säuregeätzt waren (TiPure^{Plus}, BEGO Medical GmbH, Bremen, Germany). 12 dieser Proben wurden ohne weitere Beschichtung verwendet, die restlichen 12 Proben wurden mit einer Beschichtung aus pSBMA versehen. Die Beschichtung erfolgte durch das *Institut für Werkstoff- und Oberflächentechnologie der Fachhochschule Kiel* und wird im Folgenden nur der Vollständigkeit halber grob geschildert.

Für die Beschichtung wurden die Titanplättchen für 5,5 Minuten einer Plasmareinigung unterzogen, die mit Sauerstoff durchgeführt wurde. Unmittelbar danach wurden die Proben für 2 Stunden bei 70°C mit einer ethanolhaltigen Lösung aus 20%-igem 3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat (TMSPMA) bedampft und eine weitere Stunde bei 100°C ausgehärtet. Darauffolgend wurden sie gespült und über Nacht getrocknet. Für die Beschichtung der Proben wurden zwei Lösungen hergestellt: eine wässrige Lösung, die 28 Gewichtsprozent SBMA ([2-(Methacryloyloxy)-ethyl]-dimethyl-(3-sulfopropyl)-ammoniumhydroxid) enthielt und eine zweite Lösung, eine 52mM-haltige PPD-Initiatorlösung (1-Phenyl-1,2-propanedion, PPD). Die Flüssigkeiten wurden in einem Verhältnis von 1:625 (PPD-Initiatorlösung:SBMA) gemischt und anschließend eine Menge 0,35 ml auf die Titanoberfläche appliziert und photopolymerisiert. Nachdem die Photopolymerisation abgeschlossen war, wurden die Proben in einem Ultraschallbad aus destilliertem Wasser von Materialüberschüssen befreit, getrocknet und danach steril bei Raumtemperatur gelagert.

2.3 Voruntersuchung der Oberflächenmorphologie und chemischen

Zusammensetzung

Die Voruntersuchung der Titanproben mit und ohne pSBMA Beschichtung erfolgte durch die Materialwissenschaftler des *Institutes für Werkstoff- und Oberflächentechnologie der Fachhochschule Kiel*.

2.3.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die Untersuchung der Oberflächentopografie und chemischen Zusammensetzung der Proben wurde vor und nach der pSBMA-Beschichtung vorgenommen. Hierfür wurde ein hochauflösendes analytisches Rasterelektronenmikroskop (REM) (SEM Ultra Plus,

ZEISS, Deutschland), mit der Möglichkeit der energiedispersiven Röntgenanalyse (INCAx-act, Oxford Instruments, UK) verwendet.

2.3.2 Kontaktwinkelmessung und Benetzbarkeit

Die Benetzbarkeit der Proben wurde mittels Kontaktwinkelmessung durchgeführt. Dafür wurden sowohl die unbeschichteten Proben als auch die beschichteten Proben mittels eines Kontaktwinkelmessgerätes (OCA20, Data Physics Instruments GmbH, Berlin, Germany) untersucht, indem jeweils ein 2µl-Tropfen Milli-Q-Wassers auf die Oberfläche aufgebracht und dann die Benetzungswinkel ausgewertet wurden. Je kleiner der Winkel ist, der sich aus der Tangente des Tropfenumrisses und der Basislinie (Festkörper) ergibt, desto benetzbarer ist die zu prüfende Oberfläche. Die Benetzbarkeit dient als Maß für die Hydrophilie des zu prüfenden Festkörpers.

2.3.3 FT-IR-Analyse

Zur chemischen Analyse der Proben wurden sowohl die unbeschichteten als auch die beschichteten Titanplättchen mittels ATR-Infrarotspektroskopie (von englisch attenuated total reflection, abgeschwächte Totalreflexion) untersucht. Hierfür wurden die Transmissionsspektren der Proben in einem FT-IR-Spektrometer (F) (Spectrum, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) im Bereich von 4000-400 cm⁻¹ gemessen.

2.4 Versuchsaufbau

Die insgesamt 24 Proben wurden in je vier Testgruppen eingeteilt. Jede Testgruppe bestand aus drei Titanplättchen mit Antifouling-Beschichtung, drei Titanplättchen ohne zusätzliche Beschichtung und je einem Nunc™ Thermanox™ Deckglas als Positivkontrolle. Pro Testgruppe wurden ein Titanplättchen mit Antifouling-Beschichtung, ein Titanplättchen ohne Beschichtung und das Thermanox™ Deckglas mit der Bac-Light, LIVE/DEAD™ Färbung gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Je ein weiteres Titanplättchen mit Antifouling-Beschichtung und ein unbeschichtetes Titanplättchen wurden zur Rasterelektronenmikroskopie sowie zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE; engl. colony-forming units, CFU) verwendet. Zusätzlich wurde ein beschichtetes Titanplättchen und ein unbeschichtetes Plättchen ohne bakterielle Besiedelung zur Untersuchung der Oberflächenbeschaffenheit im Rasterelektronenmikroskop verwendet.

Versuchsaufbau

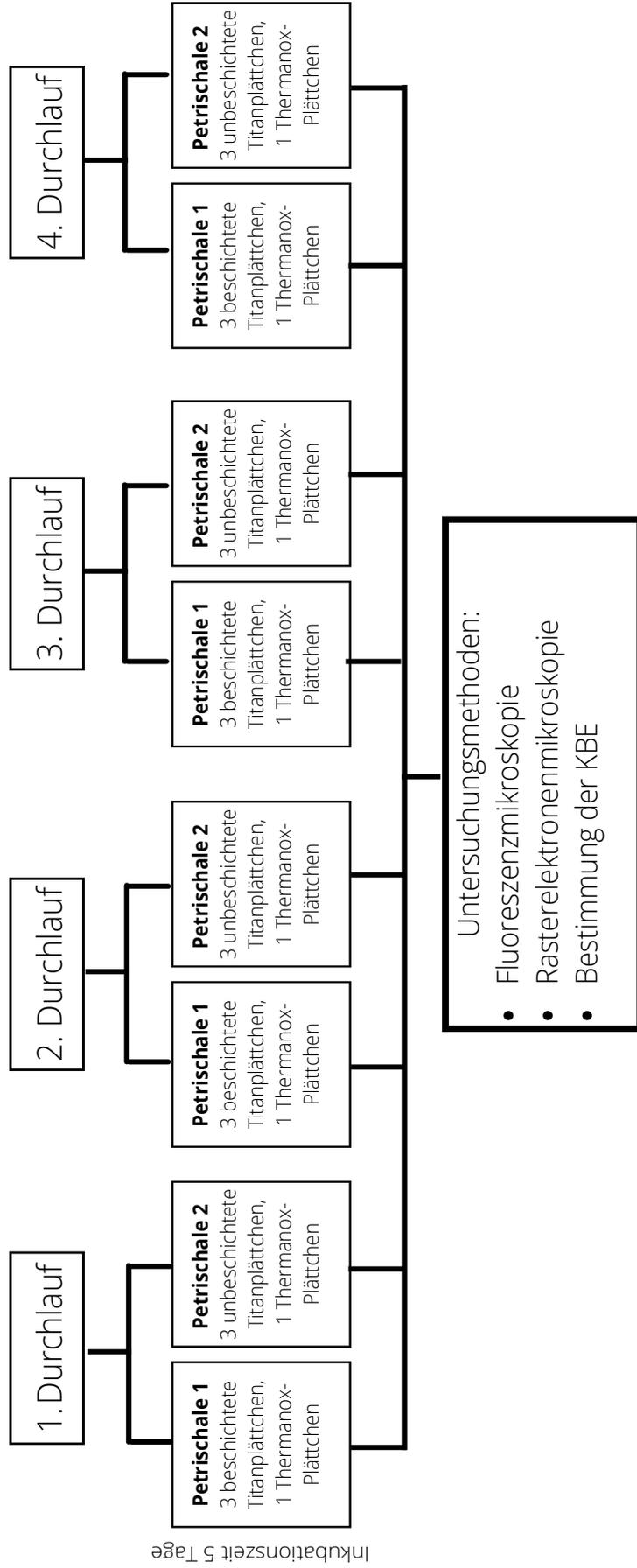


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus und dessen Reihenfolge. Die 24 Proben wurden in je vier Testgruppen eingeteilt. Jede Testgruppe bestand aus drei Titanplättchen mit Antifouling-Beschichtung, drei Titanplättchen ohne zusätzliche Beschichtung und je einem Nunc™ Thermanox™ Deckglas als Positivkontrolle. Im Anschluss erfolgte die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie sowie Bestimmung der KBE.

2.5 Biofilmbesiedelung

Am Tag vor dem Versuchsstart wurde eine Übernachtskultur des *Enterococcus faecalis* angesetzt. Diese Übernachtskultur bestand aus 10 ml steriler Nährstofflösung (BHI) sowie 100 µl *E. faecalis* (ATCC 29212) und wurde bei 37° über 24 Stunden inkubiert (Brutschrank Heraeus B6060, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland). Alle Plättchen wurden vorab mittels UV-Licht sterilisiert. Hierfür wurden die Plättchen mit ultraviolettem Licht für 30 min bestrahlt. Pro Versuchsgruppe wurde eine Petrischale mit drei beschichteten Plättchen versehen und eine weitere Petrischale mit drei unbeschichteten Plättchen. Hinzu kamen pro Petrischale ein Thermanox™ Deckglas. An Tag 1 des Versuchs wurden zunächst beide Schalen mit Aqua destillata befüllt und die Plättchen hierin für 1,5 Stunden gewässert. Nach 1,5 Stunden wurde das Aqua dest. heraus pipettiert und die Petrischalen mit 10 ml BHI befüllt sowie mit 10 µl der Übernachtskultur beimpft (Verhältnis 1:1000). Die Petrischalen wurden anschließend im Brutschrank bei 37° inkubiert.

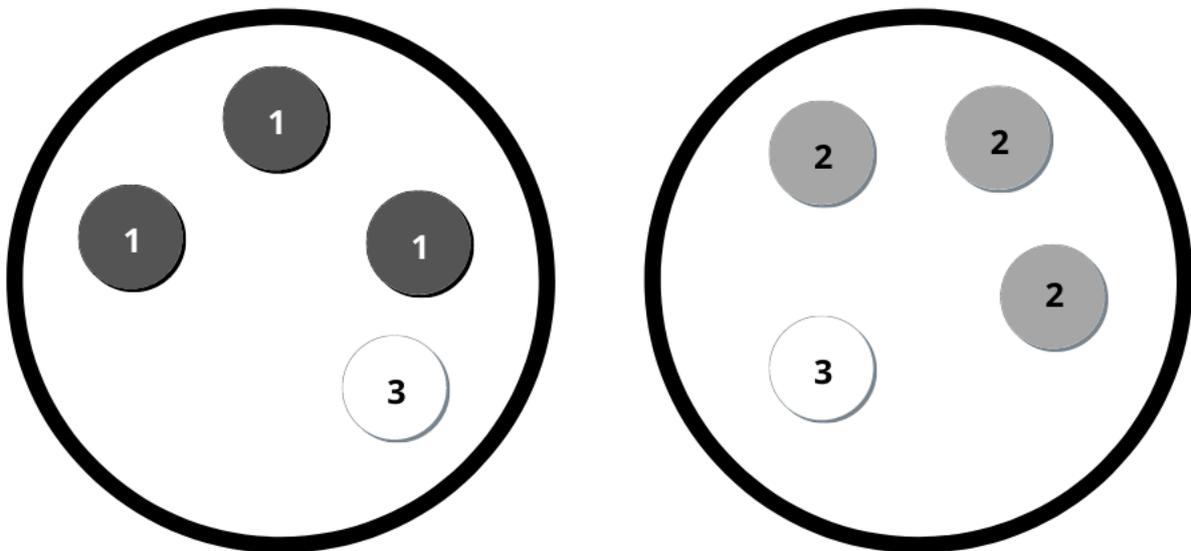


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Versuchsproben in den Petrischalen. Links: Testschale mit drei beschichteten Titanplättchen (1) und einem Thermanox™ Deckglas (3) in Bakteriensuspension; rechts: Testschale mit drei unbeschichteten Titanplättchen (2) und einem Thermanox™ Deckglas (3) in Bakteriensuspension. Die Proben wurden bei 37°C inkubiert, das Nährmedium wurde an Tag 3 gewechselt und die Auswertung erfolgte an Tag 5.

An Tag 3 wurde das Nährmedium in den Petrischalen gewechselt. Hierfür wurde das Nährmedium abpipettiert und durch 10 ml BHI ersetzt. Beide Schalen wurde erneut mit 10µl *E. faecalis* beimpft. Zur quantitativen Kontrolle der Bakteriensuspension wurde diese vor jedem Wechsel per Spektralphotometrie auf ihre optische Dichte hin

untersucht. Die photometrische Messung fand bei einer Wellenlänge von 600nm (OD600) statt. Die Messung der optischen Dichte wurde am Tag der Auswertung sowohl mit der Bakteriensuspension aus der Petrischale mit beschichteten Titanplättchen als auch aus der Testschale mit den unbeschichteten Titanplättchen durchgeführt.

2.6 Laboruntersuchung der Versuchsproben

An Tag 5 des Versuchsaufbaus erfolgte die Auswertung der Proben. Für die Untersuchungen mit den jeweiligen Verfahren wurden alle Plättchen nach derselben Spülmethode gereinigt. Hierfür wurde zunächst die Bakteriensuspension aus den Petrischalen abpipettiert und durch 10 ml Dulbeccos Phosphate buffered saline (PBS) ersetzt. Danach wurden die Plättchen jeweils in neue, sterile Petrischalen umgesetzt, die mit 10 ml PBS befüllt wurden. Darauf folgten insgesamt zehn Spülvorgänge, bei denen die Titanplättchen erneut mit 10ml PBS gespült wurden, sodass möglichst nur die adhärennten Bakterien verbleiben konnten. Im Anschluss daran wurden die Plättchen aus der Petrischale entnommen und im Zuge der Laboruntersuchungen den weiteren Verfahren unterzogen.

2.6.1 Lebend-Tot-Differenzierung

2.6.1.1 LIVE/DEAD (Baclight) Färbung

Die LIVE/DEAD™ BacLight™ Färbung wurde zur Ermittlung von lebenden und toten Bakterien verwendet. Sie besteht aus zwei Nukleinsäurefärbungen, SYTO 9 und Propodiumiodid. Das SYTO 9 dringt in die Bakterienmembran ein und färbt die lebendige Zelle grün. Propodiumiodid hingegen dringt nur in Zellen mit beschädigter Zellmembran ein und erzeugt zusammen mit dem anderen Farbstoff eine rote Färbung. Bei Anregung mit Licht in der entsprechenden Wellenlänge erscheinen die Bakterien beim Mikroskopieren in fluoreszierendem Rot oder Grün. Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung mittels LIVE/DEAD (Baclight) Färbung wurden pro Plättchen 5 µl Propodiumiodid und 5 µl STYTO™ des Bac-Light LIVE/DEAD™ BacLight™ Bakterien-Viabilitäts-Kit L7012 in einem Eppendorf Reaktionsgefäß vermischt. Von diesem Gemisch wurden dann jeweils 10 µl auf das Plättchen gegeben und mit der Pipettenspitze gleichmäßig verteilt. Die Plättchen wurden dann für 15 min im Dunkeln und bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Farbstoff ausgiebig mit PBS abgespült, sodass sich in der

umgebenden Flüssigkeit kein überschüssiger Farbstoff mehr befand. Die Proben wurden dann unverzüglich zur weiteren Untersuchung transportiert.

2.6.1.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung der Proben wurde mit Hilfe des Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskopes (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland), der zugehörigen Farbkamera und Software durchgeführt. Hierzu wurden die Proben auf einen Glasobjektträger gesetzt und in das Fluoreszenzmikroskop eingelegt. Die Proben wurden bei 20-facher Vergrößerung mit dem Grünfilter (FS38-GFP, 470/40) und dem Rotfilter (FS43-DS Red, 550/25) mikroskopiert und fotografiert. Hierfür wurden zufällig gewählte Bildausschnitte verwendet, die im Anschluss semiquantitativ ausgewertet wurden. Die Einteilung erfolgte in 4 Grade (Tabelle 3) von Grad 1 „keine Keime detektierbar“ bis Grad 4 „dichter Keimbefall“ ähnlich, wie es bereits in anderen Arbeiten durchgeführt wurde [133]. Das Gesichtsfeld mit dem höchsten Grad zählte für den gesamten Ausschnitt.

Grad	Beschreibung
1	keine Keime detektierbar
2	vereinzelt Keime detektierbar
3	viele Keime und Konglomerate
4	dichter Keimbefall

Tabelle 3: Darstellung der 4 Grade des bakteriellen Befalls. Entsprechend dieser Graduierung erfolgte die semiquantitative Auswertung der Proben nach fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung. Unter Grad 1 versteht man eine Oberfläche ohne bakteriellen Befall, Grad 2 steht für vereinzelte, detektierbare Keime, Grad 3 spiegelt eine Oberfläche mit vielen Keimen und Konglomeraten wider und bei Grad 4 liegt ein dichter Keimbefall vor.

2.6.2 Rasterelektronenmikroskopie

2.6.2.1 Vorbereitung der Proben

Die Proben, die für die Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop vorgesehen waren, wurden nach dem Spülen in 3%igem Glutaraldehyd fixiert. Hierfür wurden die Proben in ein 50 ml Probenröhrchen mit 25 ml der Glutaraldehydlösung gegeben und für 2 Stunden bei 4° Celsius im Kühlschrank gelagert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Plättchen mit PBS gewaschen und danach mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe

dehydriert. Hierzu wurden die Plättchen zweimal über 10 min in 50%igem, 60%igem, 70%igem und 90%igem und Ethanol gelagert. Die Dehydrierung mit 100%igem Ethanol erfolgte dreimalig. Die Proben wurden daraufhin auf einem Probenteller mit einem hierfür vorgesehenem beidseitigem Klebepunkt fixiert und luftgetrocknet, bis der Rest des 100%igen Ethanols vollständig verflogen war. Danach wurden die Proben mit 2 Tropfen 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan (HMDS) benetzt und unter dem Abzug luftgetrocknet. Das HMDS ersetzt die *kritische-Punkt-Trocknung* (CPD = critical point drying). Die Proben wurden über Nacht in einem Exsikkator gelagert und am folgenden Tag wurde die Proben mit einer 15 nm dicken Goldschicht versehen. Hierzu wurden die Proben in einen Sputter Coater (Sputter Coater SCD 500, BAL-TEC GmbH, Schalksmühle, Deutschland) gesetzt und unter Hochspannung mit einer Goldschicht bei einer Stromstärke von 35 mA bedampft.

2.6.2.2 Mikroskopische Analyse

Die Analyse der Proben wurde im Rasterelektronenmikroskop (XL30CP von Philips Electron Optics GmbH, Kassel) durchgeführt. Sie wurden beschriftet und in korrekter Höhe in das Gerät eingesetzt. Daraufhin wurde die Kammer geschlossen und ein Vakuum erzeugt. Die Spannung betrug bei 50-facher Vergrößerung 10kV und bei 15.000 Vergrößerung 25kV, eine Stromstärke von 30 μ A wurde nicht überschritten. Die Proben wurden bei 500-facher bis 3500-facher Vergrößerung ausgewertet. Die Dokumentation erfolgte anhand von Fotografien, die im Anschluss gespeichert und ausgewertet wurden. Die Auswertung der REM-Bilder wurde mit Hilfe derselben semiquantitativen Auswertung wie die der Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt und dokumentiert. Hierfür wurden die Fotografien entsprechend ihrem Bakterienbefall in 4 Grade eingeteilt, von Grad 1 „keine Keime detektierbar“ bis Grad 4 „dichter Keimbefall“ ähnlich, wie es bereits in anderen Arbeiten durchgeführt wurde [133].

Grad	Beschreibung
1	keine Keime detektierbar
2	vereinzelt Keime detektierbar
3	viele Keime und Konglomerate
4	dichter Keimbefall

Tabelle 4: Semiquantitative Auswertung der Proben in der Rasterelektronenmikroskopie. Die Einteilung erfolgte ebenfalls in 4 Grade. Unter Grad 1 versteht man eine Oberfläche ohne bakteriellen Befall, Grad 2 steht für vereinzelt, detektierbare Keime, Grad 3 spiegelt eine Oberfläche mit vielen Keimen und Konglomeraten wider und bei Grad 4 liegt ein dichter Keimbefall vor.

2.6.3 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten

Die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) diente der quantitativen Untersuchung der adhären, lebenden Bakterien. Hierfür wurden nach dem Spülvorgang jeweils ein Titanplättchen mit Antifouling-Beschichtung und ein Titanplättchen ohne Beschichtung aus der Petrischale entnommen. Diese Plättchen wurden über der Petrischale mit jeweils 5 ml PBS ab gespült und in ein mit 5 ml PBS gefülltes Well einer 6-Well Platte überführt. Um den Biofilm von der Oberfläche des Titanplättchens zu lösen, wurde die 6-Well Platte für 10 min im Ultraschallbad geschallt. Im Anschluss daran wurde die Bakteriensuspension aus der 6-Well Platte entnommen und in einer Verdünnungsreihe zur KBE Bestimmung vorbereitet. Zu diesem Zweck wurden zunächst 10 µl der Bakteriensuspension in 0,9 ml NaCl gelöst, was einer Verdünnung von 1:100 (10^{-2}) entspricht. Diese verdünnte Bakteriensuspension wurde dann in 3 weiteren Stufen bis zu 1:100.000 verdünnt und je 3 Tropfen bestehend aus 25 µl auf einer BHI-Agarplatte aufpipettiert. Diese Agar-Platte wurde dann für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden konnten die Kolonien mit Hilfe eines Keimzählgerätes (Keimzählgerät BZG 25 Xylem Analytics Germany Sales GmbH und Co. KG, Weilheim, Deutschland) ausgezählt werden.

2.6.3.1 Quantitative Auswertung der KBE

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe von Microsoft Excel gesammelt und sortiert. Die deskriptive, statistische Auswertung erfolgte mittels IBM®, SPSS®, Statistics version 24.0 für Windows (IBM Germany GmbH, Ehningen, Germany). Zudem wurde ein Zweistichproben-t-Test durchgeführt, um die Signifikanz zu ermitteln. Die Signifikanzschwelle wurde bei $p < 0.05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Voruntersuchung der Proben

Die Voruntersuchung der Titanproben mit und ohne pSBMA Beschichtung erfolgte am *Institut für Werkstoff- und Oberflächentechnologie der Fachhochschule Kiel*.

3.1.1 Untersuchung der Oberfläche

Zum Nachweis der Beschichtung wurde eine Analyse der Proben mittels Energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) angefertigt. In Tabelle 5 sind die Werte dargestellt für a) unbeschichtete Titanoberfläche und b) Titanoberfläche mit pSBMA-Beschichtung. Abbildung 6 zeigt repräsentative Ausschnitte der Proben topografie sowie die dazugehörigen EDX Analysen von a) unbeschichtete Titanoberfläche und b) Titanoberflächen mit pSBMA-Beschichtung. S steht für den Peak des gemessenen Anteils an Schwefel. Zudem ist einmal der Anteil in Gewichtsprozent (%) und Atomverhältnis (%) dargestellt. Die Tabelle macht deutlich, dass an den Proben mit einer pSBMA-Beschichtung ein Schwefel-Anteil von ca. 0.25 Gewichts-% zu erkennen ist, wohingegen bei den unbeschichteten Proben nur ein Titan-Anteil zu messen war. Dies ist als Nachweis für das Vorhandensein der Beschichtung zu sehen.

	Element	Gewichts-%	Atomverhältnis (%)
a)	S	0	0
	Ti	100.00	100.00
	Total	100.00	

	Element	Gewichts-%	Atomverhältnis (%)
b)	S	0.25	0.37
	Ti	99.75	99.63
	Total	100.00	

Tabelle 5: EDX Analyse der Proben: a) unbeschichtete Titanoberfläche und b) Titanoberfläche mit pSBMA-Beschichtung; S steht für den Peak des gemessenen Anteils an Schwefel. Zudem ist einmal der Anteil in Gewichts-% und Atomverhältnis (%) dargestellt. Die Tabelle macht deutlich, dass bei den Proben mit einer pSBMA-Beschichtung ein Schwefel-Anteil von ca. 0.25 Gewichts-% festzustellen ist, wohingegen bei den unbeschichteten Proben nur ein Titan-Anteil zu messen war.

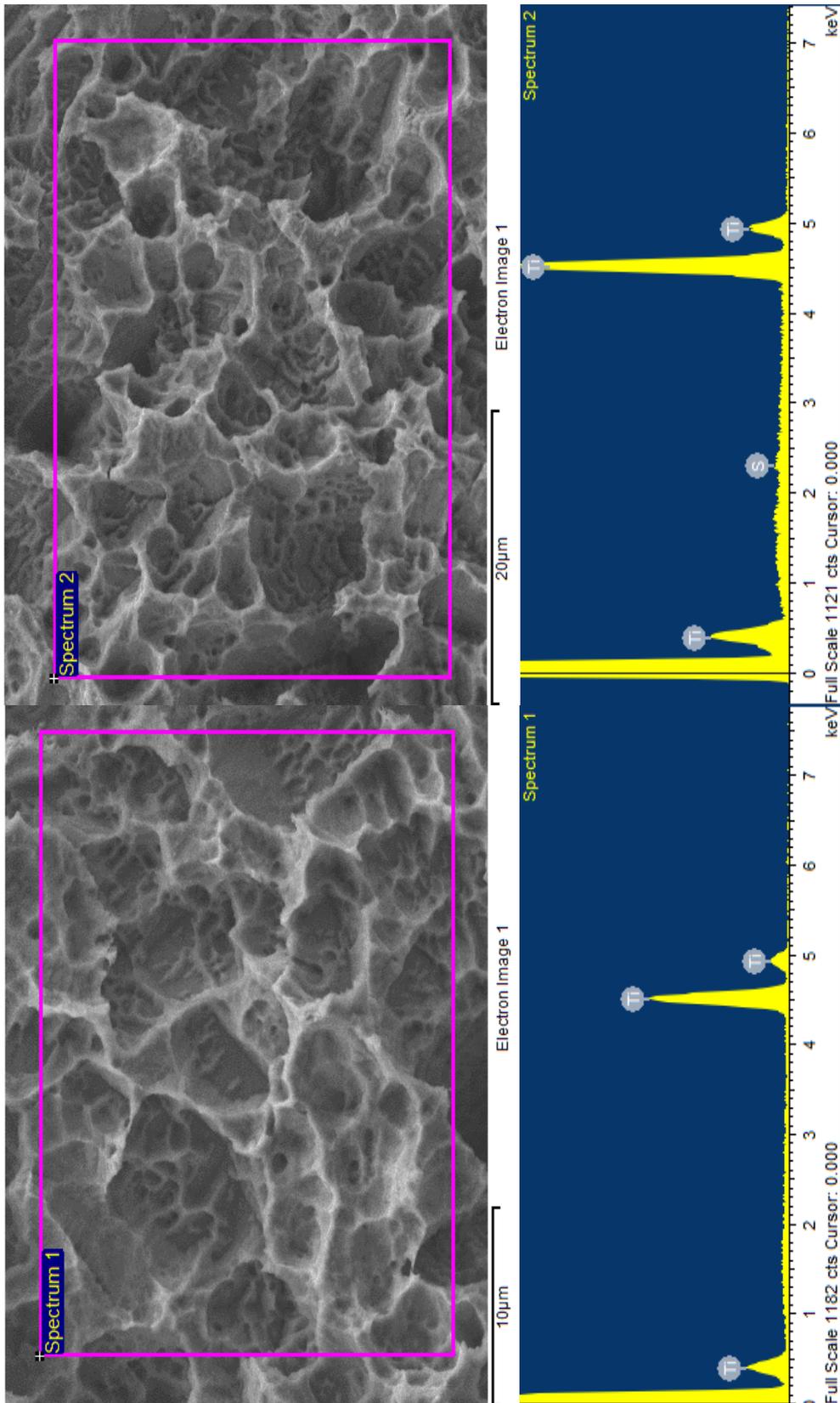


Abbildung 6: visuelle Darstellung der EDX Analyse der Titanoberfläche links vor und rechts nach der Beschichtung. Auch anhand dieser Darstellung wird noch einmal deutlich, dass an den beschichteten Proben ein Schwefel-Anteil zu messen ist, wohingegen bei den unbeschichteten Proben kein Schwefel nachzuweisen war, was als Nachweis für die Angesehenheit der Beschichtung zu sehen ist.

3.4.2 Kontaktwinkelmessung und Benetzbarkeit

Die Benetzbarkeit der unbeschichteten Titanoberfläche und der Titanoberfläche mit pSBMA-Beschichtung ist in Abbildung 7 dargestellt. Die unbehandelte, raue Titanoberfläche, die vorab sandgestrahlt und säuregeätzt wurde, weist einen hydrophoben Charakter auf. Der Kontaktwinkel (WCA) liegt bei 123° (als hydrophob gelten WCA $>90^\circ$). Die Titanoberfläche mit pSBMA Beschichtung zeigt einen WCA von 3° , was auf einen superhydrophilen Charakter schließen lässt (als superhydrophil gelten Oberflächen mit einem WCA $<5^\circ$, s. weiter oben im Text).

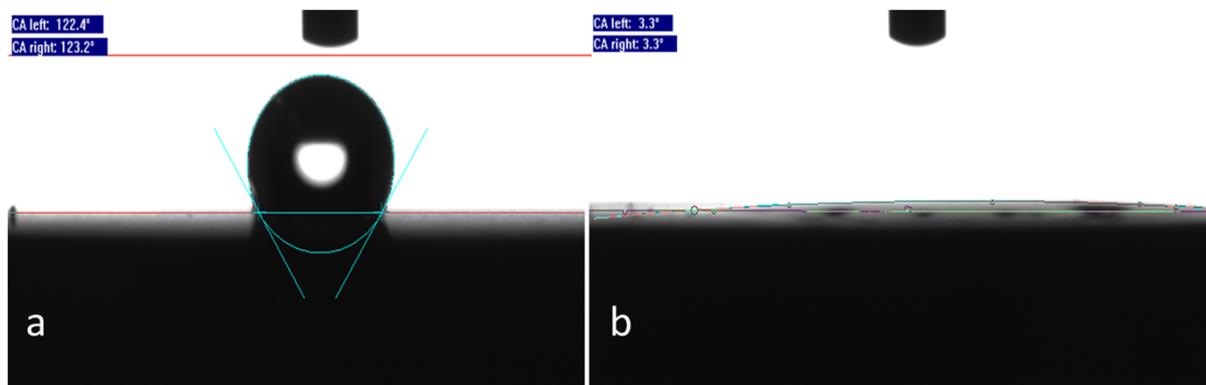


Abbildung 7 Kontaktwinkelmessung der beiden Proben: a) zeigt die unbeschichtete, native Titanoberfläche mit einem Wasserkontaktwinkel (WCA) von 123° ; b) zeigt die Titanoberfläche mit pSBMA-Beschichtung; es konnte ein WCA von 3° gemessen werden, was auf einen superhydrophilen Charakter schließen lässt.

3.4.3 FT-IR-Analyse

Die FT-IR Transmissionsanalyse dient der Analyse der chemischen Zusammensetzung des Oberflächenmaterials. Es wurde sowohl an den Titanplättchen ohne Beschichtung als auch an den Titanplättchen mit pSBMA-Beschichtung eine FT-IR-Spektroskopie vorgenommen. In Abbildung 8 sind beide Transmissionspektren dargestellt. Die schwarze Kurve zeigt die Analyse der unbeschichteten Titanplättchen (Ti as received), die rote Kurve steht für die Analyse der Titanplättchen mit pSBMA Beschichtung (Ti pSBMA coated). Im Vergleich zur nativen Titanoberfläche zeigt das Spektrum der beschichteten Oberfläche Transmissionsbanden, die charakteristisch für Schwingungen von C=O (1720 cm^{-1}) sowie S=O (1170 und 1090 cm^{-1}) sind. Die Transmissionsbanden bei 3500 und 1640 cm^{-1} sind charakteristisch für physisorbiertes Wasser.

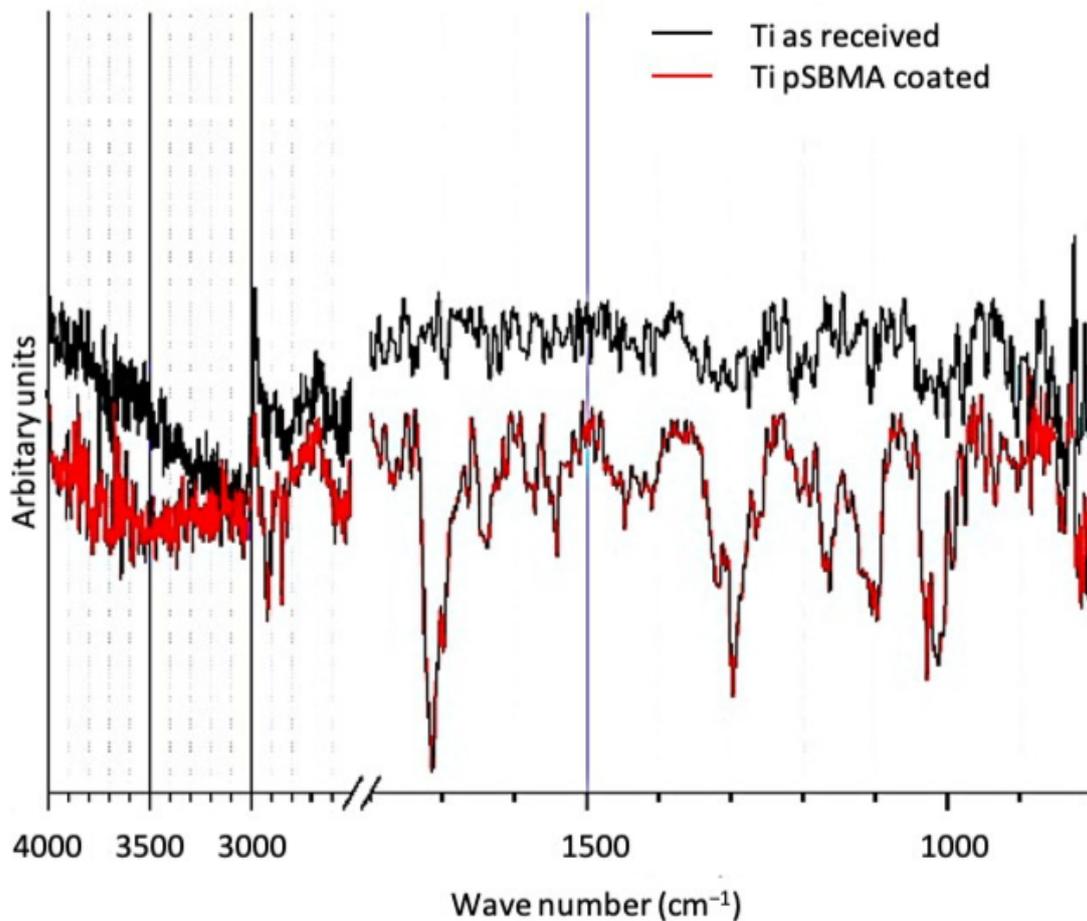


Abbildung 8: Die FT-IR Transmissionsanalyse dient der Analyse der chemischen Zusammensetzung des Oberflächenmaterials. Es wurde sowohl an den Titanplättchen ohne Beschichtung als auch an den Titanplättchen mit pSBMA-Beschichtung eine FT-IR-Spektroskopie vorgenommen; Die schwarze Kurve zeigt die Analyse der unbeschichteten Titanplättchen (Ti as received), die rote Kurve steht für die Analyse der Titanplättchen mit pSBMA Beschichtung (Ti pSBMA coated).

3.2 Auswertung der Proben nach bakterieller Besiedelung

3.2.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die semiquantitative Auswertung des bakteriellen Befalls erfolgte nach der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung. Hierfür wurden die Versuchsproben nach vorangegangener Färbung mikroskopiert und ihrem Bakterienbefall entsprechend semiquantitativ ausgewertet. Der Tabelle 6 sind die Ergebnisse der jeweiligen Auswertungen zu entnehmen. Wie in Abschnitt 2.6.1.2 beschrieben, erfolgte die Einteilung in 4 Grade. Der Keimbefall der Versuchsproben ist in Abbildung 9 zu erkennen. Bildausschnitt a) zeigt die Titanplättchen mit pSBMA Beschichtung. Es sind auf manchen Proben vereinzelte Keime erkennbar, sodass dies einem Grad 2 zuzuweisen wäre. Auf den nativen Titanplättchen ist hingegen ein dichter Keimbefall

zu detektieren, was einem Grad 4 entspricht und in Bildausschnitt b) zu sehen ist. Als positive Kontrollprobe diente ein Thermanox™ Deckglas c) was in Abbildung 10 veranschaulicht ist. Hier waren, wie erwartet, viele Bakterien und Konglomerate zu erkennen (Grad 3). Bildausschnitt d) zeigt zum Vergleich eine beschichtete Titanoberfläche, die keine bakterielle Kontamination erfahren hat und einer bakteriellen Besiedlung Grad 1 entspricht (keine Keime detektierbar). Die Autofluoreszenz des Thermanox™ Deckglases sorgte für eine gleichmäßig grüne Färbung des Materials, was die Auswertung erschwerte. Die Bilder der rasterelektronenmikroskopischen Auswertung dienten zur Bestätigung der Ergebnisse aus der Fluoreszenzmikroskopie.

Versuch	Datum	Titan-beschichtet	Titan-unbeschichtet	Thermanox™
1	2.12.20	Grad 2	Grad 4	Grad 3
2	9.12.20	Grad 1	Grad 4	Grad 3
3	20.01.21	Grad 2	Grad 4	Grad 3
4	27.01.21	Grad 2	Grad 4	Grad 3

Tabelle 6: Auswertung der Fotografien nach Fluoreszenzmikroskopie: Einteilung je nach bakteriellem Befall in die Grade 1-4. Hieraus wird deutlich, dass es einen erkennbaren Unterschied in dem bakteriellen Befall des jeweiligen Materials gab und diese Ergebnisse in allen vier Versuchsdurchläufen reproduziert werden konnten.

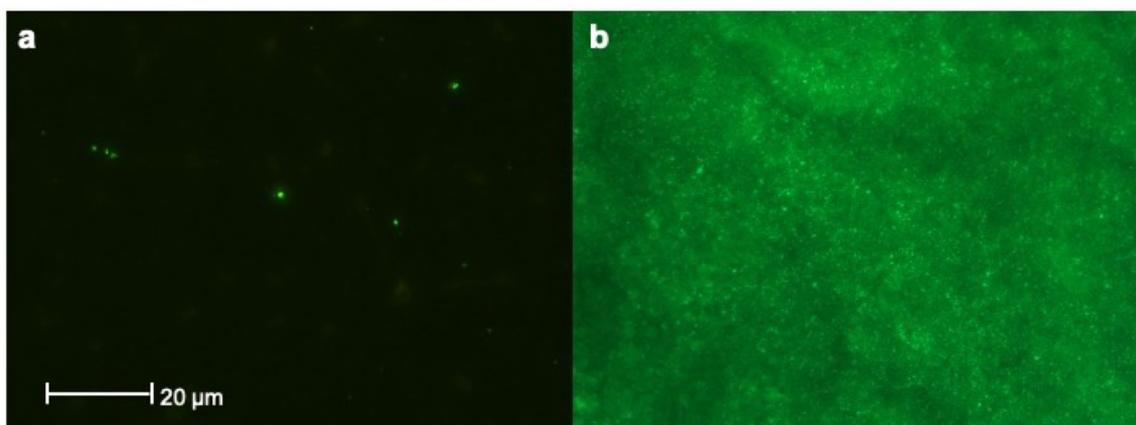


Abbildung 9: Darstellung der bakteriellen Besiedlung der Proben mit anschließender fluoreszierender Färbung (LIVE/DEAD™ BacLight™); a) zeigt vereinzelt Mikroorganismen auf der Titanoberfläche mit pSBMA-Beschichtung (Grad 2); b) die unbeschichtete Titanoberfläche weist einen dichten Keimbefall auf (Grad 4). Der Maßstab aus Bildausschnitt a) bezieht sich auf beide Ausschnitte (a, b)

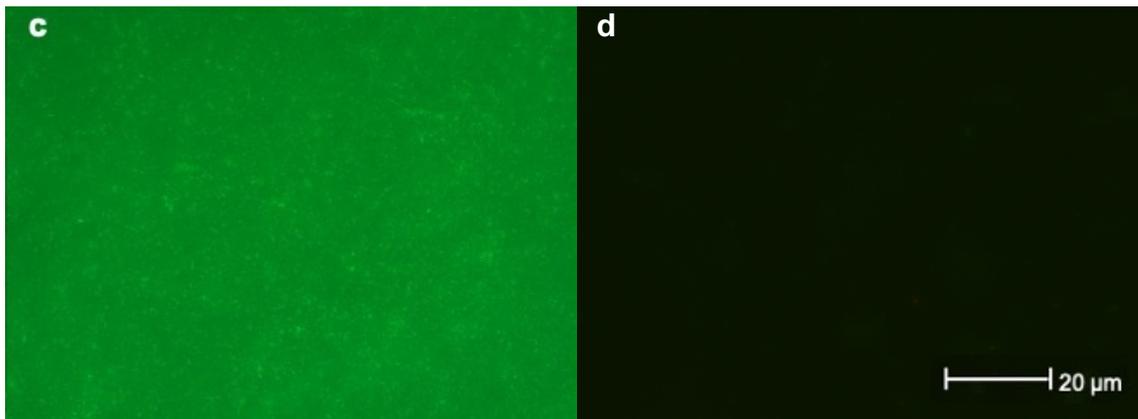


Abbildung 10: Darstellung der bakteriellen Besiedlung der Proben mit anschließender fluoreszierender Färbung (LIVE/DEAD™ BacLight™); c) Kontrollprobe: viele Keime und Konglomerate sind auf dem Thermanox™ Plättchen zu sehen (Grad 3); d) zum Vergleich eine beschichtete Titanoberfläche ohne bakterielle Kontamination, diese entspricht einer Keimbesiedlung Grad 1 (keine Keime detektierbar); Der Maßstab aus Bildausschnitt d) bezieht sich auf beide Ausschnitte (c, d).

3.2.2 Rasterelektronenmikroskopie

Eine weitere semiquantitative Auswertung des bakteriellen Befalls erfolgte nach der rasterelektronenmikroskopischen Darstellung. Abbildung 11 zeigt die bakterielle Besiedlung des a) Titanplättchens mit pSBMA-Beschichtung und b) unbeschichteten Titanplättchens bei 5000-facher Vergrößerung. Bei dem Titanplättchen mit pSBMA-Beschichtung a) zeigt sich ein vereinzelter Keimbefall (Grad 2), wohingegen bei b) ein dichter Keimbefall zu erkennen ist (Grad 4). Dieser Befund wiederholte sich in allen 4 Versuchsdurchläufen. Abbildung 12 zeigt zum Vergleich eine beschichtete Titanoberfläche c) ohne bakterielle Kontamination und d) das Thermanox™-Plättchen als positive Kontrollprobe bei 5000-facher Vergrößerung im REM. In Bildausschnitt c) ist kein bakterieller Befall erkennbar, was Grad 1 entspricht (keine Keime detektierbar). In Bildausschnitt d) ist die Oberfläche eines Thermanox™ Plättchens zu sehen. Hier sind viele Keime und Konglomerate (Kettenbildung) zu erkennen, was als eine bakterielle Besiedlung Grad 3 einzustufen ist.

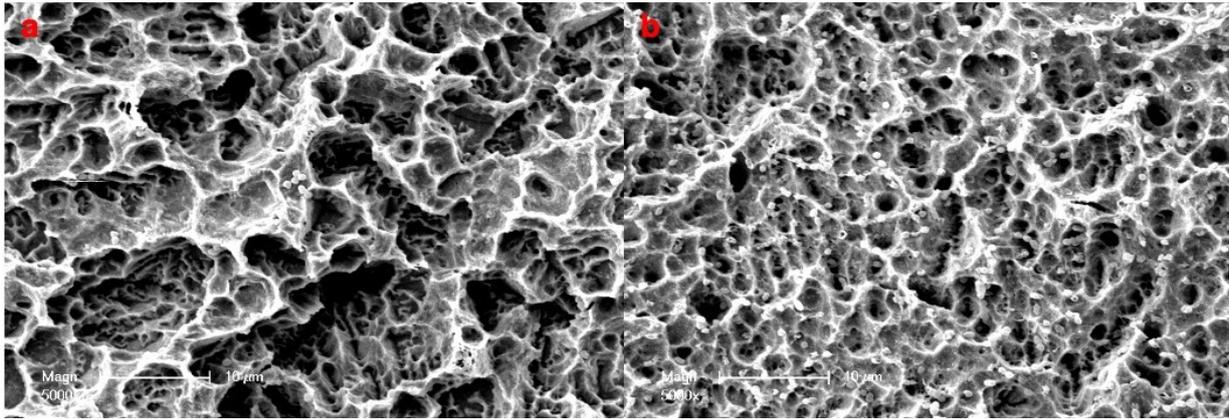


Abbildung 11: Darstellung der bakteriellen Besiedlung der Proben im REM bei 5000-facher Vergrößerung. (a) zeigt die Oberfläche des Titanplättchens mit pSBMA Beschichtung, es ist vereinzelter Keimbefall zu detektieren (Grad 2), (b) hier ist die Oberfläche des unbeschichteten Titanplättchens zu sehen, mit dichtem bakteriellen Keimbefall (Grad 4).

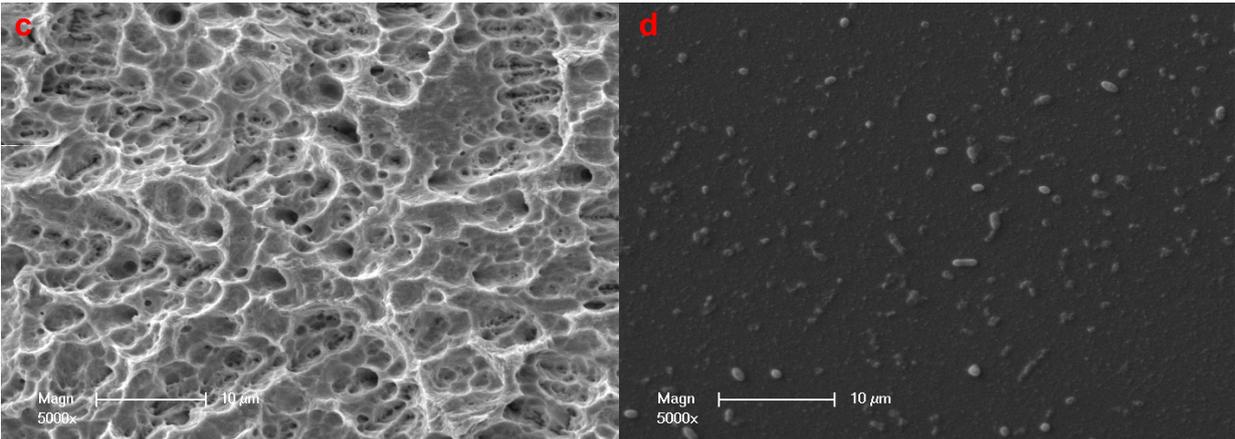


Abbildung 12: REM-Aufnahme bei 5000-facher Vergrößerung: c) beschichtete Titanoberfläche ohne bakterielle Kontamination, entspricht einem Grad 1 (keine Keime detektierbar); d) Thermanox™-Deckglas (positive Kontrollprobe) mit vielen Keimen und Konglomeraten, entspricht einem Grad 3.

Versuch	Datum	Titan-beschichtet	Titan-unbeschichtet	Thermanox™
1	2.12.20	Grad 2	Grad 4	Grad 3
2	9.12.20	Grad 2	Grad 4	Grad 3
3	20.01.21	Grad 2	Grad 4	Grad 3
4	27.01.21	Grad 2	Grad 4	Grad 3

Tabelle 7: Auswertung der REM-Aufnahmen in allen 4 Versuchsdurchläufen, die Einteilung erfolgte entsprechend der 4 Grade. Auch anhand dieser Versuchsauswertung wird deutlich, dass es einen deutlichen Unterschied in dem bakteriellen Befall der verschiedenen Materialien gab und diese Ergebnisse in allen vier Versuchsdurchläufen reproduziert werden konnten.

3.2.3 Koloniebildende Einheiten

Die Auszählung der Koloniebildenden Einheiten erfolgte am Tag nach Beendigung des Versuchsdurchlaufs. Die Gesamtheit aller Probenkörper lag bei 24 ($N=24$), wobei die Hälfte der Proben beschichtet und die andere Hälfte unbeschichtet war. Das Ergebnis der insgesamt 4 Versuchsdurchläufe ist Tabelle 8 zu entnehmen.

Der Mittelwert der beschichteten Proben lag bei $1,21 \cdot 10^4$, der Median bei $3,65 \cdot 10^3$, das Minimum bei $8,1 \cdot 10^2$ und das Maximum bei $1,09 \cdot 10^4$.

Der Mittelwert Koloniebildenden Einheiten der unbeschichteten Proben lag bei $1,81 \cdot 10^5$, der Median bei $2,13 \cdot 10^5$. Das Maximum lag bei $2,9 \cdot 10^5$ und das Minimum bei $1,09 \cdot 10^4$.

Versuch	Datum	Titan-beschichtet	Titan-unbeschichtet
1	3.12.20	$3,65 \cdot 10^4$	$1,45 \cdot 10^5$
2	10.12.20	$1,30 \cdot 10^3$	$2,9 \cdot 10^5$
3	21.01.21	$6,00 \cdot 10^3$	$2,8 \cdot 10^5$
4	28.01.21	$8,10 \cdot 10^2$	$1,09 \cdot 10^4$
Mittelwert		$1,12 \cdot 10^4$	$1,81 \cdot 10^5$
Median		$3,65 \cdot 10^3$	$2,13 \cdot 10^5$

Tabelle 8: Ergebnisse der Auszählung der KBE aller vier Versuchsdurchläufe, $N=24$, wobei 12 Proben beschichtet und 12 Proben unbeschichtet waren. Der Mittelwert der beschichteten Proben lag bei $1,12 \cdot 10^4$, der Median bei $3,65 \cdot 10^3$. Der Mittelwert der unbeschichteten Proben lag bei $1,81 \cdot 10^5$, der Median bei $2,13 \cdot 10^5$.

Der statistische Vergleich der koloniebildenden Einheiten (KBE) zwischen pSBMA-beschichteten Titanplättchen und unbeschichteten Titanplättchen zeigte nach Signifikanzberechnung mittels Zweistichproben t-Test, dass die bakterielle Besiedlung der Titanplättchen ohne Beschichtung signifikant höher war ($p=0,021$) als die bakterielle Besiedlung der Titanplättchen mit Beschichtung. Dieses Ergebnis wiederholte sich in allen 4 Versuchsdurchläufen. Der Graph in Abbildung 13 veranschaulicht erneut die Differenz der bakteriellen Besiedlung beider Proben. Der linke, dunkelgraue Balken präsentiert die Menge an koloniebildenden Einheiten, die auf den unbeschichteten Titanplättchen vorhanden waren. Der rechte, hellgraue Balken stellt die Menge an koloniebildenden Einheiten der pSBMA-beschichteten Plättchen dar. Das Kreuz in der Mitte steht für den Mittelwert, der auch die Ausreißer

miteinbezieht, wohingegen die horizontale Linie im jeweiligen Balken, darstellend für den Median, die Ausreißer nicht berücksichtigt.

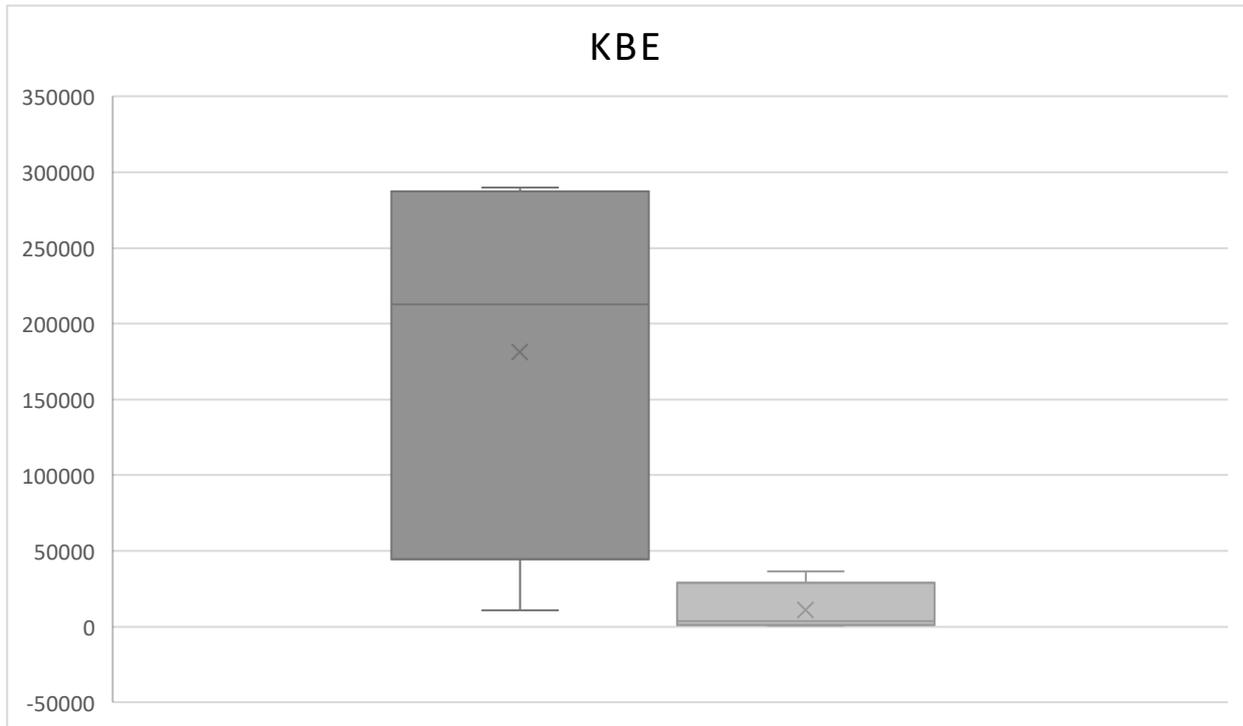


Abbildung 13: Darstellung der koloniebildenden Einheiten. Der dunkelgraue Balken (links) stellt die KBE auf den unbeschichteten Titanplättchen dar. Der hellgraue Balken (rechts) stellt die KBE der Titanplättchen mit pSBMA-Beschichtung dar. Das Kreuz in der Mitte steht für den Mittelwert, der auch die Ausreißer mit einbezieht, wohingegen die horizontale Linie im jeweiligen Balken, darstellend für den Median, die Ausreißer nicht berücksichtigt.

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden in-vitro Untersuchung war es, die bakterielle Adhäsion auf zwei verschiedenen Titanoberflächen zu untersuchen und zu vergleichen: Titan mit einer superhydrophilen Beschichtung aus zwitterionischem pSBMA und Titan ohne zusätzliche Oberflächenmodifikationen. Beide Titanoberflächen wurden zuvor industriell sandgestrahlt und säuregeätzt (TiPure^{Plus}, Firma Bego GmbH, Deutschland). Wenngleich es bereits eine Vielzahl an antimikrobiellen oder Antifouling-Strategien gibt, beschränkt sich die Literatur in Bezug auf Antifouling-Beschichtungen in Form von Polymeren auf dentalen Implantaten weitestgehend auf Polyethylenglykol (PEG) [134]. Das anzustrebende Ziel dieser Studie war es somit, eine neuartige Oberflächenmodifikation aus photopolymerisiertem pSBMA auf Titan zu testen.

4.1. Diskussion der Methoden

4.1.1 Versuchsaufbau

Diese Arbeit stellt eine reproduzierbare in-vitro-Studie dar, die die Biofilmbildung an zwei Titanoberflächen mit unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften prüfen sollte. Die Proben wiesen entweder einen hydrophoben oder einen superhydrophilen Charakter auf, was im Rahmen der Voruntersuchungen durch die Kontaktwinkelmessung bewiesen wurde.

Das experimentelle Vorgehen des Hauptversuches gliederte sich in insgesamt 4 Versuchsdurchläufe, deren Ziel es war, Ergebnisse zu erzielen, die sich in den folgenden Durchläufen bestätigten. Die Gesamtmenge der Proben belief sich auf 24 Titanplättchen, die sich wiederum in 12 beschichtete und 12 unbeschichtete Proben unterteilten. Pro Versuch standen so insgesamt 6 Titanplättchen zur Verfügung, davon eine unbeschichtete und eine beschichtete Kohorte. Für noch aussagekräftigere Ergebnisse wäre eine größere Anzahl von Versuchsproben notwendig gewesen, auf die leider im Rahmen dieser Studie nicht zugegriffen werden konnte.

Um ein standardisiertes, reproduzierbares Versuchsprotokoll einhalten zu können, fand die Studie unter in-vitro Bedingungen statt. Unter in-vivo Bedingungen wäre es bereits aufgrund der individuell abweichenden, bakteriellen Zusammensetzung verschiedener Individuen zu zusätzlichen, nicht beeinflussbaren Parametern gekommen [135]. Die hier entstandenen Ergebnisse sollten in weiteren Versuchen verifiziert werden. Sinnvoll wären Folgestudien unter in-vivo Bedingungen.

Aus Gründen der Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit wurde auch nur eine Bakterienspezies verwendet, wenngleich die Biofilmbildung aus einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Bakterienspezies besteht [36, 40]. Bei der hier verwendeten bakteriellen Spezies handelte es sich um *Enterococcus faecalis*, die auch in anderen Arbeiten verwendet wurde [136]. *E. faecalis* wurde sowohl in parodontalen als auch den Wurzelkanal betreffenden Infektionen nachgewiesen [137-139]. Auch wenn *E. faecalis* nicht die dominante Spezies in periimplantären Infektionen darstellt, kann es ein wichtiger Akteur sein, der mit einigen gängigen Kulturtechniken oft nicht nachgewiesen werden kann [140].

Zur Festlegung der Inkubationszeit gab es vorab eine Reihe von Vorversuchen, bei denen die Biofilmbildung von *E. faecalis* nach drei, fünf und sieben Tagen untersucht wurde. Zur Festlegung der zeitlichen Abstände der Untersuchungen dienten die Ergebnisse verschiedener wissenschaftlicher Arbeiten, die eine Biofilmbildung unterschiedlicher Spezies wie *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterococcus faecalis* untersuchten [141]. *Enterococcus faecalis* zeigt eine Varianz an zeitlichen Abständen, nach der eine bakterielle Kontamination detektierbar war [142]. *S. pyogenes* und *P. aeruginosa* wurden über 7 Tage inkubiert und zeigten nach drei, vier, fünf und sechs Tagen starke Biofilmbildung. Die stärkste Biofilmbildung wurde nach 3 Tagen erreicht [141]. Im Rahmen der Vorversuche zeigte sich für *E. faecalis*, dass der aussagekräftigste Keimbefall nach 5 Tagen zu erkennen war. Die Inkubation über 7 Tage stellte keine Verbesserung dar. Als Messparameter dienten hierfür die Messung der optischen Dichte des Nährmediums, die Bestimmung der KBE sowie die optische Auswertung im Fluoreszenzmikroskop und Rasterelektronenmikroskop.

Neben der Dauer der Inkubation war zu klären, ob der Versuch in einem geschlossenen System wie einer Petrischale stattfinden sollte oder in einem dynamischen System wie einem Fließkammermodell, ähnlich wie es bereits im Zellkulturversuch durchgeführt wurde [143]. Im Rahmen der Vorversuche wurde der Versuchsaufbau im Sinne eines Fließkammermodells ausprobiert, um möglichst physiologische Rahmenbedingungen zu schaffen. Die Umsetzung des Fließkammermodells für die hier benötigten Zwecke gestaltete sich jedoch schwierig und es kam zu Kontaminationen, die nicht auf *E. faecalis* zurückzuführen waren. Für die hier vorliegende Arbeit wurde deshalb aus Gründen der Vergleichbarkeit ein geschlossener Versuchsaufbau in Petrischalen gewählt. Es wäre ein anzustrebendes

Ziel, die hier erhobenen Ergebnisse im Rahmen eines Zweitversuches im Fließmodell zu validieren. Zudem könnte in einer Folgestudie der zeitliche Rahmen der Inkubation verlängert werden, um physiologischere Versuchsbedingungen zu schaffen.

4.1.2 Kontrollproben

Zur Kontrolle der Biofilmbildung wurde sich im Rahmen der Vorversuche für Negativproben aus Polytetrafluorethylen (PTFE) entschieden. Dies ist bekannt für seinen hydrophoben Charakter und findet bereits Gebrauch bei der Anwendung im menschlichen Körper [144, 145]. Bei dem Material handelt es sich jedoch um industriell gefertigte Rundstäbe, die im Nachgang in feine Scheiben geschnitten werden mussten, um der angestrebten Probengröße zu entsprechen. In den Schnittflächen kam es zu Ablagerungen von Partikeln und Bakterien (s. Abb. 14), sodass diese Probe entsprechend der semiquantitativen Auswertung als Grad 2 einzustufen war.

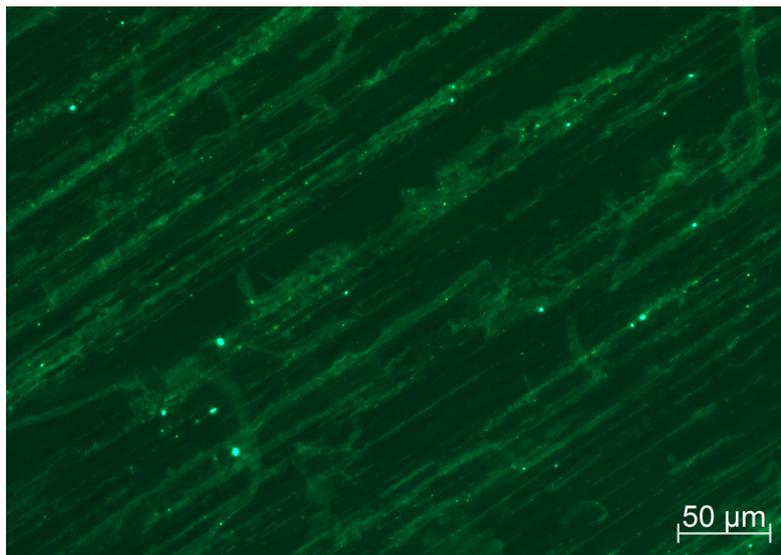


Abbildung 14: Negativkontrolle PTFE-Probe nach 5-tägiger bakterieller Besiedlung im Vorversuch. In den Schnittflächen kam es zu Ablagerungen von Partikeln und Bakterien, sodass dies einer bakteriellen Besiedlung Grad 2 einzuteilen wäre.

Infolgedessen wurden statt Negativkontrollen Thermanox™ Deckgläser als Positivkontrolle verwendet, da diese industriell gefertigt werden und im Vorversuch einen deutlichen Biofilm zeigten (s. Abb. 15). Der hier erkennbare Biofilm ist nach semiquantitativer Auswertung als Grad 3-4 einzustufen. Aufgrund der Autofluoreszenz der Thermanox™ Deckgläser im Bereich von 380 bis 545 nm, sind diese nicht ideal für die Auswertung im Fluoreszenzmikroskop und vom Hersteller nicht hierfür vorgesehen.

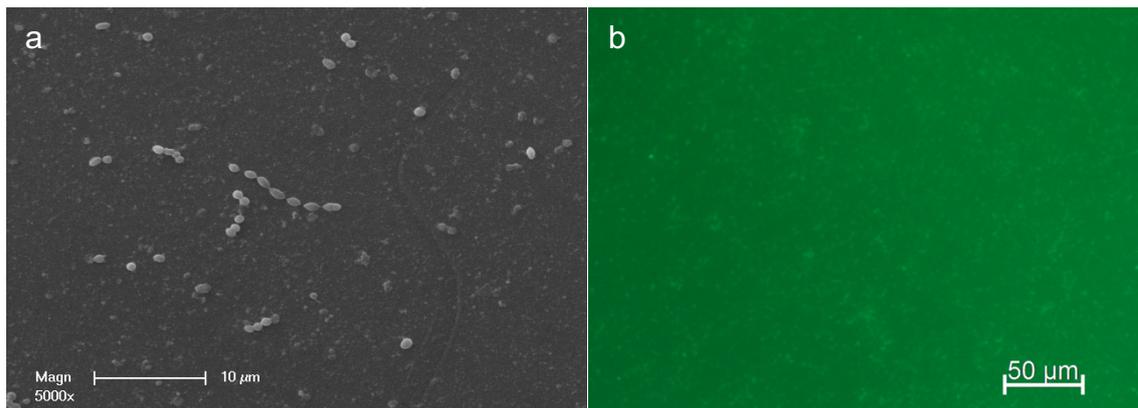


Abbildung 15: Thermanox™ Deckglas im Vorversuch nach 5-tägiger bakterieller Besiedelung: a) Darstellung im REM bei 5000x Vergrößerung, b) Fluoreszenzmikroskopie. Hier ist ein deutlicher bakterieller Befall detektierbar.

4.1.3 Beeinflussung des Biofilms

Die Verwendung von Implantaten ist in mehreren medizinischen Disziplinen zu einer gängigen Behandlung geworden. Am Beispiel der Zahnheilkunde zeigt sich, dass das gestiegene Bewusstsein für die Mundgesundheit und die Verbesserung und Optimierung chirurgischer Eingriffe zu einer stetig steigenden Anzahl solcher Eingriffe geführt haben [146]. Dennoch können mikrobielle Entzündungsreaktionen den Behandlungserfolg gefährden [61, 67, 147]. Die Modifizierung der Oberflächenmorphologie, Benetzbarkeit und Chemie eines Implantats könnten vielversprechende Lösungen im Hinblick auf Biofouling und damit verbundene Entzündungsreaktionen darstellen. Die aktuelle Studie zielte darauf ab, eine neuartige Strategie zur Oberflächenmodifikation zu definieren, um die initiale bakterielle Adhäsion und weitere Besiedelung auf Titan zu verhindern. Bei Titan handelt es sich um eines der am häufigsten verwendeten Materialien für medizinische Implantate [148]. Die Verhinderung der initialen bakteriellen Adhäsion ist ein entscheidender Schritt für die irreversible mikrobielle Anhaftung [55]. Es ist bekannt, dass *E. faecalis* an Zahnwurzelinfektionen beteiligt ist und nach Zahnextraktion im umgebenden Knochen verbleiben und später gesetzte Implantate besiedeln kann [138, 139]. Es wurden bereits verschiedene Strategien entwickelt, einem solchen Biofouling entgegenzuwirken. Diese reichen von der Pfropfung von Mikrobiziden, wie Antibiotika, antimikrobieller Peptide oder Ionen, bis zur Schaffung sogenannter *inert* Beschichtungen [74]. Die Verwendung von Beschichtungen mit Silber-, Kupfer- oder Zink-Ionen ist trotz des antimikrobiellen Effekts [94, 95] als äußerst kritisch anzusehen,

da einige dieser Beschichtungen im Verdacht stehen, einen zellschädigenden Effekt zu haben und in der Leber zu aggregieren [100, 149].

Die Schlüsselvoraussetzung für die Biofilmbildung ist der Schritt der Adhäsion und Wechselwirkung einer bakteriellen Spezies mit der Zieloberfläche [55]. So stellt sich hier auch die Frage, ob Implantate aus moderneren Materialien wie Zirkondioxid einen Vorteil gegenüber Titan und dessen Legierungen darstellen können. Zirkondioxid gilt als bakterienabweisend, was einen Vorteil gegenüber Titan darstellt [150, 151]. Allerdings gibt es auch Studien die zeigen, dass Zirkondioxid keinen Vorteil in Bezug auf die Plaque-Akkumulation im Vergleich zu Titan und dessen Legierungen bietet [152]. Der Vergleich von dentalen Implantaten aus Titan mit einer oberflächlichen Beschichtung aus pSBMA und Implantaten aus Zirkondioxid wäre daher ein interessantes Ziel für eine Folgestudie.

4.1.4 pSBMA als Beschichtungsmaterial

Zusammengefasst steht die vorliegende Arbeit im Einklang mit anderen bereits veröffentlichten Studien auf dem Gebiet der antiadhäsiven, zwitterionischen Beschichtungen. Die Verwendung von biokompatiblen, zwitterionischen Polymerbeschichtungen mit pSBMA stellt eine vielversprechende Antifouling-Strategie dar [153-155].

Es konnte gezeigt werden, dass die zwitterionischen Eigenschaften der Beschichtung in wässrigem Medium, das gelöste Ionen enthält, für eine Hydratationsschicht sorgen. Solche superhydrophilen Oberflächen erscheinen neutral und widerstehen höheren Salzkonzentrationen gut [155].

Es ist allgemein bekannt, dass nicht nur die Oberflächenrauigkeit, sondern auch die Oberflächenbenetzbarkeit die Anhaftung von Bakterien an der Implantatoberfläche beeinflussen können [156]. Der Kontaktwinkel von 3° (WCA), der auf den beschichteten Titanoberflächen gemessen wurde, beweist den superhydrophilen Charakter. Trotz der höheren Rauigkeit zeigen die beschichteten Titanoberflächen, im Vergleich zu unbeschichteten SLA Titanoberflächen eine deutliche Hydrophilie, was bereits von Wenzel 1936 beschrieben wurde [157].

Im Vergleich zu PEG-basierten Antifouling-Beschichtungen ist die Wechselwirkung mit dem umliegenden Wasser stärker und der bakterienabweisende Effekt von zwitterionischen Polymeren wie pSBMA höher [120, 158]. Darüber hinaus könnte die Superhydrophilie von pSBMA beschichteten Titanoberflächen auch der

Wechselwirkung benachbarter Polymerketten zugeschrieben werden [159, 160]. Die hohe Packungsdichte von pSBMA könnte durch das hier beschriebene Photopolymerisationsverfahren zur Bildung einer dichteren Polymerbeschichtung beigetragen und folglich dazu geführt haben, eine bessere Hydrophilie zu erreichen als bisher in der Literatur beschrieben wurde [161]. Auch in Bezug auf seine Toxizität kann pSBMA ein vielversprechendes Material sein. Es zeigte sich in der Fluoreszenzmikroskopie, dass überwiegend lebende Bakterienzellen vorhanden waren. Zudem wurde in einer anderen Arbeit bereits anhand von Zytotoxizitätstests nachgewiesen, dass kein zytotoxischer Effekt auf Fibroblasten vorhanden zu sein scheint [162]. Demnach konnte zwar eine biologische Verträglichkeit des pSBMA in Zytotoxizitätsversuchen nachgewiesen werden, jedoch sollte der Einfluss auf andere umgebende Zellen wie Osteoblasten in weiteren Versuchen kritisch untersucht werden.

4.1.5 Beschichtungsverfahren

Für die Herstellung der Versuchsproben wurde in dieser Arbeit die Photopolymerisation als Beschichtungsverfahren verwendet. Es handelt sich hierbei um ein recht einfaches, schnell durchführbares Beschichtungsverfahren. Neben der Beschichtung von Titan mit pSBMA, können per Photopolymerisation auch andere Substrate beschichtet werden [162]. Es gibt jedoch zur Beschichtung mit zwitterionischen Polymeren eine Vielzahl von Verfahren, die in der Literatur deutlich etablierter sind, als die Photopolymerisation [155, 162]. Ein Beispiel für ein anderes, innovatives Beschichtungsverfahren ist das iCVD-Beschichtungsverfahren (initiierte chemische Gasphasenabscheidung, initiated chemical vapor deposition). Dieses Verfahren ist bereits vielfach in der Literatur beschrieben und könnte auch zur Beschichtung von Substraten in großer Menge dienen [163]. Zudem ist es per iCVD Verfahren möglich, verschiedene Polymere aufzubringen, wodurch die gewünschten Eigenschaften einer Oberfläche erweitert werden können [164]. In diesem Zusammenhang wäre es von Interesse, weitere Beschichtungsverfahren wie das iCVD Verfahren auszutesten, um herauszufinden, ob das Beschichtungsverfahren einen zusätzlichen Einfluss auf die Antifouling-Eigenschaften hat.

4.1.6 Versuchsauswertung

In der vorliegenden Studie wurden kommerzielle, sandgestrahlte und säuregeätzte Titanproben erfolgreich mit pSBMA beschichtet, was durch die FT-IR-Messungen bewiesen wurde. Die Kontaktwinkelmessungen bestätigten den superhydrophilen Charakter der Beschichtung. Die mit pSBMA beschichteten Proben zeigten nach der Inkubation in Gegenwart von *E. faecalis*, im Vergleich zu den unbeschichteten Titanproben deutliche, bakterienabweisende Eigenschaften. Dies konnte sowohl in der qualitativen Auswertung durch Fluoreszenzmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie als auch in der quantitativen Auswertung mittels Auswertung der KBE gezeigt werden. In der Auswertung der REM und Fluoreszenzmikroskopie konnten vereinzelt Bakterien nachgewiesen werden, was vermutlich auf Beschichtungsfehler oder Verletzungen der Beschichtung zurückzuführen ist. Im Vergleich hierzu zeigte sich auf den unbeschichteten Titanproben ein dichter Bakterienfilm. Diese Ergebnisse wurden in der Auswertung der Koloniebildenden Einheiten (KBE) bestätigt. Auf den nativen Titanproben wurde eine signifikant höhere Menge an KBE detektiert als auf den Titanproben ohne Beschichtung. Es ist an dieser Stelle darauf hinzuweisen, dass die inkubierten Proben nur eine oberflächliche Beschichtung erhalten haben, sodass die Seitenwände und die Unterseite unbeschichtet geblieben sind. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die Menge der KBE auf zirkumferent beschichteten Proben deutlich geringer und der Unterschied noch signifikanter gewesen wäre.

Die Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie, die hier zur qualitativen Beurteilung des Biofilms diente, erfolgte durch semiquantitative Analyse, wie es bereits in anderen Arbeiten durchgeführt wurde [133].

4.2 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der aktuellen experimentellen Studie zeigen, dass die pSBMA-Beschichtung von Titanoberflächen eine vielversprechende Strategie zur Verhinderung bakterieller Adhäsion sein könnte. Aus klinischer Sicht stellen Infektionen im Umfeld von Zahnimplantaten keine Seltenheit dar, sodass die Ansammlung von Plaque und die damit einhergehende bakterielle Adhäsion zu Infektionen und Implantatverlust führen können. Die hier beschriebene Vorgehensweise zur Oberflächenmodifikation könnte ein neuer Ansatz zur Verhinderung periimplantärer Infektionen darstellen. Entsprechend der Voruntersuchungen scheinen Titanoberflächen aus Reintitan Grad 4, die vorab industriell sandgestrahlt und säuregeätzt (TiPure^{Plus}, Firma Bego GmbH, Deutschland) und im Nachgang mit der superhydrophilen Beschichtung aus pSBMA versehen wurden, resistent gegen physiologische Salzkonzentrationen zu sein. Zudem zeigt sie im Vergleich zu unbeschichteten Titanoberflächen eine signifikant geringere bakterielle Besiedlung mit *E. faecalis*. Es ist davon auszugehen, dass dieser Effekt auch bei anderen Bakterien zu beobachten wäre. Bezüglich der Zytotoxizität ist zu erwarten, dass pSBMA kein Risiko für umliegende Zellen darstellt. Dies wurde in einer anderen Arbeit am Beispiel von Fibroblasten bewiesen, müsste jedoch auch für andere Zellen wie beispielsweise Osteoblasten nachgewiesen werden. Zur Validierung der hieraus hervorgehenden Ergebnisse wären Folgestudien mit einer größeren Probenanzahl sowie in-vivo Studien sinnvoll.

5 Zusammenfassung

Die aktuelle Forschung im Bereich dentaler Implantate beschäftigt sich mit dem Einfluss von Oberflächenveränderungen, die die biologischen Prozesse verbessern sollen. Im Laufe der Zeit wurden zahlreiche subtraktive sowie additive Verfahren getestet, die Einfluss auf die Interaktion zwischen der Implantatoberfläche und Zellen sowie Bakterien nehmen. Die Einflussnahme auf die Wechselwirkung mit dem umliegenden Medium konnte so im Zusammenhang mit anderen Verfahren positive Ergebnisse erzielen. Während natives Titan aufgrund der natürlichen Kontamination durch Hydrokarbon und Karbonate aus der Umgebungsluft sowie seiner natürlichen Hydrophobizität eine vergleichsweise geringe Oberflächenenergie besitzt, geht man nach aktuellem Wissensstand davon aus, dass eine erhöhte Oberflächenenergie und Hydrophilie einen positiven Effekt auf die Benetzbarkeit, die Affinität von Proteinen und die erhöhte Adhäsion von Osteoblasten haben können.

Beschichtungsverfahren mit Polymeren wie Polyethylenglykol zeigten bereits gute biologische Eigenschaften und ein antiadhäsives Verhalten gegenüber Bakterien. Während die Wechselwirkung der Polyethylenglykol-Ketten auf Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen ist, kommt es bei zwitterionischen Polymeren wie Polysulfobetain-Methacrylat durch elektrostatische Kräfte zu einer Hydratation, die deutlich stärker ist. So konnte in einer kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt werden, dass zwitterionisches Polysulfobetain-Methacrylat aufgrund seiner superhydrophilen und antiadhäsiven Eigenschaften ein vielversprechendes Material zur Antifouling-Beschichtung darstellt und verbesserte Eigenschaften im Vergleich zu bereits etablierteren Materialien wie Polyethylenglykol besitzt.

Ziel dieser Arbeit war es, die bakterienabweisenden Eigenschaften des pSBMA zu untersuchen, indem Proben aus sandgestrahltem und säuregeätztem Titan (TiPure^{Plus}, Firma Bego GmbH, Deutschland) per Photopolymerisation mit pSBMA beschichtet und anschließend in einer Bakteriensuspension aus einem Nährmedium und *Enterococcus faecalis* bakteriell besiedelt wurden.

Die qualitative Auswertung erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie, die Auswertung der koloniebildenden Einheiten diente der quantitativen Bewertung.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die Beschichtung mit pSBMA eine vielversprechende Strategie zur Verhinderung von bakterieller Adhäsion darstellen kann. Kommerzielle Titan-Substrate mit der superhydrophilen Beschichtung aus

pSBMA scheinen resistent gegenüber physiologischen Salzkonzentrationen zu sein und zeigen im Vergleich mit unbeschichtetem Titan eine signifikant geringfügigere bakterielle Besiedlung mit *Enterococcus faecalis*. Es ist davon auszugehen, dass dieser Effekt auch bei anderen Bakterien zu beobachten ist.

Aspekte wie in-situ Biodegradation und Osseointegration müssen hierbei berücksichtigt werden.

5.1 Abstract

Recent investigations on the anti-adhesive properties of polysulfobetaine methacrylate (pSBMA) coatings have shown promising potential as antifouling surfaces and have given the impetus for the present paper, where a pSBMA coating is applied via photopolymerization on a macro-roughened, sandblasted, and acid-etched titanium implant surface in order to assess its antifouling properties. Current emphasis is placed on how the coating is efficient against the adhesion of *Enterococcus faecalis* by quantitative assessment of colony forming units and qualitative investigation of fluorescence imaging and scanning electron microscopy. pSBMA coatings via photopolymerization of titanium surfaces seems to be a promising antiadhesion strategy, which should bring substantial benefits once certain aspects such as biodegradation and osseointegration were addressed. Additionally, commercial SLA-titanium substrates may be coated with the super-hydrophilic coating, appearing resistant to physiological salt concentrations and most importantly lowering *E. faecalis* colonization significantly, compared to titanium substrates in the as-received state. It is very likely that pSBMA coatings may also prevent the adhesion of other germs.

6 Literaturverzeichnis

1. Arens, S., et al., *Influence of materials for fixation implants on local infection. An experimental study of steel versus titanium DCP in rabbits.* J Bone Joint Surg Br, 1996. 78(4): p. 647-51.
2. Gerber, H., *Evaluation of tissue compatibility of in vitro cultures of embryonic bone.* Evaluation of Biomaterials, 1980.
3. Branemark, P.I., et al., *Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies.* Scand J Plast Reconstr Surg, 1969. 3(2): p. 81-100.
4. Williams, D.F. and European Society for Biomaterials., *Definitions in biomaterials : proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986.* Progress in biomedical engineering. 1987, Amsterdam ; New York: Elsevier. vii, 72 p.
5. Dinkelacker, W., et al., *Einleitung,* in *Implantatprothetik,* W. Dinkelacker, J.S. Hermann, and H. Zipprich, Editors. 2014, Georg Thieme Verlag.
6. Wiltfang, J., *Osteosynthesesysteme in der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie.* HNO, 2002. 50(9): p. 800-811.
7. Kasemo, B., *Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects.* J Prosthet Dent, 1983. 49(6): p. 832-7.
8. Prof. Größner-Schreiber, B. and H. Terheyden, *Implantatdesign – Form-und Oberflächengestaltung enossaler Implantate.* 2004.
9. Brånemark, P.I., et al., *Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period.* Scand J Plast Reconstr Surg Suppl, 1977. 16: p. 1-132.
10. Heimke, G. and C.G. Wittal, *Osseointegrated Dental Implants,* in *Biomaterials Engineering and Devices: Human Applications: Volume 2. Orthopedic, Dental, and Bone Graft Applications,* D.L. Wise, et al., Editors. 2000, Humana Press: Totowa, NJ. p. 67-92.
11. Osborn, J., *Dynamic aspects of the implant-bone-interface,* Heimke, G. *Dental implants. Materials and systems.* Carl Hanser Verlag, Munchen, 1980: p. 111-123.
12. Vaidya, P., et al., *Osseointegration- A Review.* IOSR Journal of Dental and Medical Sciences, 2017. 16: p. 45-48.

13. Heyland, M., et al., *Stahl oder Titan bei der Osteosynthese*. Der Unfallchirurg, 2017. 120(2): p. 103-109.
14. Thomsen, M. and P. Thomas, *Verträglichkeit und Allergie von Osteosynthesematerialien*. Der Unfallchirurg, 2017. 120(2): p. 116-121.
15. Haug, R.H., *Retention of asymptomatic bone plates used for orthognathic surgery and facial fractures*. J Oral Maxillofac Surg, 1996. 54(5): p. 611-7.
16. Liu, Z., X. Liu, and S. Ramakrishna, *Surface engineering of biomaterials in orthopedic and dental implants: Strategies to improve osteointegration, bacteriostatic and bactericidal activities*. Biotechnol J, 2021: p. e2000116.
17. Albrektsson, T. and M. Jacobsson, *Bone-metal interface in osseointegration*. The Journal of Prosthetic Dentistry, 1987. 57(5): p. 597-607.
18. Brånemark, P.I., G. Zarb, and T. Albrektsson, *Tissue-Integrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry*. Plast. Reconstr. Surg., 1985. 77: p. 496-497.
19. Albrektsson, T., et al., *Osseointegration of implants: a biological and clinical overview*. JSM Dental Surgery, 2017. 2(3).
20. Smeets, R., et al., *Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration*. Biomed Res Int, 2016. 2016: p. 6285620.
21. Sagheb, K., et al., *Clinical outcome of alveolar ridge augmentation with individualized CAD-CAM-produced titanium mesh*. Int J Implant Dent, 2017. 3(1): p. 36.
22. Troeltzsch, M., et al., *Clinical efficacy of grafting materials in alveolar ridge augmentation: A systematic review*. J Craniomaxillofac Surg, 2016. 44(10): p. 1618-1629.
23. Mommaerts, M.Y., *Additively manufactured sub-periosteal jaw implants*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2017. 46(7): p. 938-940.
24. Wohlfahrt, J.C., et al., *Porous titanium granules in the surgical treatment of peri-implant osseous defects: a randomized clinical trial*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2012. 27(2): p. 401-10.
25. Adell, R., et al., *A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw*. Int J Oral Surg, 1981. 10(6): p. 387-416.
26. Buser, D., et al., *10-year survival and success rates of 511 titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a retrospective study in 303*

- partially edentulous patients*. Clin Implant Dent Relat Res, 2012. 14(6): p. 839-51.
27. Scully, C., J. Hobkirk, and P.D. Dios, *Dental endosseous implants in the medically compromised patient*. J Oral Rehabil, 2007. 34(8): p. 590-9.
 28. Gómez-de Diego, R., et al., *Indications and contraindications of dental implants in medically compromised patients: update*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2014. 19(5): p. e483-9.
 29. Rocuzzo, M., et al., *Ten-year results of a three arms prospective cohort study on implants in periodontally compromised patients. Part 2: clinical results*. Clin Oral Implants Res, 2012. 23(4): p. 389-95.
 30. Rocuzzo, M., et al., *Ten-year results of a three-arm prospective cohort study on implants in periodontally compromised patients. Part 1: implant loss and radiographic bone loss*. Clin Oral Implants Res, 2010. 21(5): p. 490-6.
 31. Ferreira, S.D., et al., *Periodontitis as a risk factor for peri-implantitis: Systematic review and meta-analysis of observational studies*. J Dent, 2018. 79: p. 1-10.
 32. Klinge, B., M. Hultin, and T. Berglundh, *Peri-implantitis*. Dent Clin North Am, 2005. 49(3): p. 661-76, vii-viii.
 33. Smith, M.M., et al., *Chronic periodontitis and implant dentistry*. Periodontol 2000, 2017. 74(1): p. 63-73.
 34. Bosch, G., et al., *[Hydrophilic implant surfaces – a clinical and scientific update (in German)]*. Swiss Dent J, 2018. 128(1): p. 33-39.
 35. Donlan, R.M. and J.W. Costerton, *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. Clinical microbiology reviews, 2002. 15(2): p. 167-193.
 36. Costerton, J.W., et al., *Microbial biofilms*. Annu Rev Microbiol, 1995. 49: p. 711-45.
 37. Costerton, J.W., et al., *Biofilms, the customized microniche*. J Bacteriol, 1994. 176(8): p. 2137-42.
 38. Wimpenny, J., W. Manz, and U. Szewzyk, *Heterogeneity in biofilms*. FEMS Microbiol Rev, 2000. 24(5): p. 661-71.
 39. Stoodley, P., et al., *Oscillation characteristics of biofilm streamers in turbulent flowing water as related to drag and pressure drop*. Biotechnol Bioeng, 1998. 57(5): p. 536-44.

40. Kolenbrander, P.E., et al., *Communication among oral bacteria*. Microbiol Mol Biol Rev, 2002. 66(3): p. 486-505, table of contents.
41. Aas, J.A., et al., *Defining the normal bacterial flora of the oral cavity*. J Clin Microbiol, 2005. 43(11): p. 5721-32.
42. Gilbert, P., J. Das, and I. Foley, *Biofilm susceptibility to antimicrobials*. Adv Dent Res, 1997. 11(1): p. 160-7.
43. Miller, M.B. and B.L. Bassler, *Quorum sensing in bacteria*. Annu Rev Microbiol, 2001. 55: p. 165-99.
44. Turovskiy, Y., et al., *Quorum sensing: fact, fiction, and everything in between*. Adv Appl Microbiol, 2007. 62: p. 191-234.
45. Fuqua, W.C., S.C. Winans, and E.P. Greenberg, *Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators*. J Bacteriol, 1994. 176(2): p. 269-75.
46. Nealson, K.H., T. Platt, and J.W. Hastings, *Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system*. J Bacteriol, 1970. 104(1): p. 313-22.
47. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science, 1999. 284(5418): p. 1318-22.
48. Darveau, R.P., A. Tanner, and R.C. Page, *The microbial challenge in periodontitis*. Periodontol 2000, 1997. 14: p. 12-32.
49. Keijser, B.J., et al., *Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults*. J Dent Res, 2008. 87(11): p. 1016-20.
50. Hannig, M., *Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials*. Eur J Oral Sci, 1997. 105(5 Pt 1): p. 422-33.
51. Wimpenny, J.W.T. and R. Colasanti, *A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models*. FEMS Microbiology Ecology, 1997. 22(1): p. 1-16.
52. Wolf, H.F., E.M. Rateitschak, and K.H. Rateitschak, *Parodontologie*. Vol. 1. 2004: Georg Thieme Verlag.
53. Hannig, C. and M. Hannig, *The oral cavity--a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man*. Clin Oral Investig, 2009. 13(2): p. 123-39.
54. Rupf, S., et al., *Biofilm inhibition by an experimental dental resin composite containing octenidine dihydrochloride*. Dent Mater, 2012. 28(9): p. 974-84.

55. Groessner-Schreiber, B., et al., *Do different implant surfaces exposed in the oral cavity of humans show different biofilm compositions and activities?* European Journal of Oral Sciences, 2004. 112(6): p. 516-522.
56. Palmer, R.J., Jr., et al., *Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque.* J Bacteriol, 2003. 185(11): p. 3400-9.
57. Stoodley, P., et al., *Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms.* Applied and environmental microbiology, 2001. 67(12): p. 5608-5613.
58. Stoodley, P., et al., *Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure.* 1999. 19S-28S.
59. Lindhe, J. and J. Meyle, *Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology.* J Clin Periodontol, 2008. 35(8 Suppl): p. 282-5.
60. Wilson, V., *An insight into peri-implantitis: a systematic literature review.* Prim Dent J, 2013. 2(2): p. 69-73.
61. Lang, N.P. and T. Berglundh, *Periimplant diseases: where are we now?-- Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology.* J Clin Periodontol, 2011. 38 Suppl 11: p. 178-81.
62. Derks, J. and C. Tomasi, *Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology.* J Clin Periodontol, 2015. 42 Suppl 16: p. S158-71.
63. Schwarz, F.B., J. *S3-Leitlinie (Langversion) Die Behandlung periimplantärer Infektionen an Zahnimplantaten.* 2016 [cited 2016 Mai]; Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/083-023I_S3_Periimplantäre_Infektionen_2016-08-abgelaufen.pdf.
64. Berglundh, T., et al., *Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions.* J Clin Periodontol, 2018. 45 Suppl 20: p. S286-s291.
65. Sanz, M. and I.L. Chapple, *Clinical research on peri-implant diseases: consensus report of Working Group 4.* J Clin Periodontol, 2012. 39 Suppl 12: p. 202-6.

66. Misch, C.E., et al., *Implant success, survival, and failure: the International Congress of Oral Implantologists (ICOI) Pisa Consensus Conference*. *Implant Dent*, 2008. 17(1): p. 5-15.
67. Schwarz, F., et al., *Peri-implantitis*. *J Clin Periodontol*, 2018. 45 Suppl 20: p. S246-S266.
68. Jepsen, S., et al., *Primary prevention of peri-implantitis: managing peri-implant mucositis*. *J Clin Periodontol*, 2015. 42 Suppl 16: p. S152-7.
69. Meyer, M.S., et al., *A review of the relationship between tooth loss, periodontal disease, and cancer*. *Cancer Causes Control*, 2008. 19(9): p. 895-907.
70. Papapanou, P.N., *Periodontal diseases: epidemiology*. *Ann Periodontol*, 1996. 1(1): p. 1-36.
71. Quirynen, M., et al., *Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets*. *Clin Oral Implants Res*, 2006. 17(1): p. 25-37.
72. Heuer, W., et al., *Analysis of early biofilm formation on oral implants in man*. *J Oral Rehabil*, 2007. 34(5): p. 377-82.
73. Quirynen, M., M. De Soete, and D. van Steenberghe, *Infectious risks for oral implants: a review of the literature*. *Clin Oral Implants Res*, 2002. 13(1): p. 1-19.
74. Norowski, P.A., Jr. and J.D. Bumgardner, *Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: a review*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009. 88(2): p. 530-43.
75. Brogгинi, N., et al., *Peri-implant inflammation defined by the implant-abutment interface*. *J Dent Res*, 2006. 85(5): p. 473-8.
76. Yu, P., et al., *Effect of sealing gel on the microleakage resistance and mechanical behavior during dynamic loading of 3 implant systems*. *J Prosthet Dent*, 2022. 127(2): p. 308-317.
77. Zekiy, A.O., et al., *Antiseptic sealant and a nanocoated implant-abutment interface improve the results of dental implantation*. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2019. 21(5): p. 938-945.
78. Leonhardt, A., et al., *A longitudinal microbiological study on osseointegrated titanium implants in partially edentulous patients*. *Clin Oral Implants Res*, 1993. 4(3): p. 113-20.
79. Quirynen, M. and M.A. Listgarten, *Distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Brånemark*. *Clin Oral Implants Res*, 1990. 1(1): p. 8-12.

80. Becker, S.T., et al., *Peri-implantitis versus periodontitis: functional differences indicated by transcriptome profiling*. Clin Implant Dent Relat Res, 2014. 16(3): p. 401-11.
81. Dohan Ehrenfest, D.M., et al., *Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography*. Trends Biotechnol, 2010. 28(4): p. 198-206.
82. Le Guéhennec, L., et al., *Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration*. Dent Mater, 2007. 23(7): p. 844-54.
83. Baumhammers, A., I. Baumhammers, and J.C. Conway, *Scanning electron microscopy of bladevent implants*. Oral Implantol, 1971. 2(1): p. 25-40.
84. Östman, P.O., M. Hellman, and L. Sennerby, *Ten years later. Results from a prospective single-centre clinical study on 121 oxidized (TiUnite™) Brånemark implants in 46 patients*. Clin Implant Dent Relat Res, 2012. 14(6): p. 852-60.
85. Willmann, G., *Beschichtung von Implantaten mit Hydroxylapatit: Die Option auf eine stoffschlüssige Verbindung zwischen Knochen und Metall*. Materialwissenschaft und Werkstofftechnik, 1999. 30(6): p. 317-325.
86. Jung, J.H., et al., *Hydroxyapatite-coated implant: Clinical prognosis assessment via a retrospective follow-up study for the average of 3 years*. J Adv Prosthodont, 2018. 10(2): p. 85-92.
87. Lee, J.J., L. Rouhfar, and O.R. Beirne, *Survival of hydroxyapatite-coated implants: a meta-analytic review*. J Oral Maxillofac Surg, 2000. 58(12): p. 1372-9; discussion 1379-80.
88. Buser, D., et al., *Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs*. J Biomed Mater Res, 1991. 25(7): p. 889-902.
89. Pham, M.H., H.J. Haugen, and J.E. Reseland, *Fluoride Modification of Titanium Surfaces Enhance Complement Activation*. Materials, 2020. 13(3): p. 684.
90. Gurzawska, K., et al., *Nanocoating of titanium implant surfaces with organic molecules. Polysaccharides including glycosaminoglycans*. J Biomed Nanotechnol, 2012. 8(6): p. 1012-24.
91. Cai, K., et al., *Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: characterization and cell behaviour aspects*. Biomaterials, 2005. 26(30): p. 5960-71.

92. Abtahi, J., G. Henefalk, and P. Aspenberg, *Randomised trial of bisphosphonate-coated dental implants: Radiographic follow-up after five years of loading*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2016. 45(12): p. 1564-1569.
93. Kalantzis, S., et al., *Early osteoblastic activity on TiO₂ thin films decorated with flower-like hierarchical Au structures*. RSC Advances, 2020. 10(48): p. 28935-28940.
94. Ewald, A., et al., *Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium*. Biomed Eng Online, 2006. 5: p. 22.
95. Chen, W., et al., *In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating*. Biomaterials, 2006. 27(32): p. 5512-7.
96. Liedberg, H. and T. Lundeborg, *Silver coating of urinary catheters prevents adherence and growth of Pseudomonas aeruginosa*. Urol Res, 1989. 17(6): p. 357-8.
97. Multanen, M., et al., *Bacterial adherence to silver nitrate coated poly-L -lactic acid urological stents in vitro*. Urological Research, 2000. 28: p. 327-331.
98. Choi, S.H., et al., *Enhanced antibacterial activity of titanium by surface modification with polydopamine and silver for dental implant application*. J Appl Biomater Funct Mater, 2019. 17(3): p. 2280800019847067.
99. Scarano, A., et al., *Titanium Implants Coated with a Bifunctional Molecule with Antimicrobial Activity: A Rabbit Study*. Materials, 2020. 13(16): p. 3613.
100. Grade, S., et al., *Serum albumin reduces the antibacterial and cytotoxic effects of hydrogel-embedded colloidal silver nanoparticles*. RSC Advances, 2012. 2(18): p. 7190-7196.
101. Flemming, H.-C., *Was ist Biofouling?* 1995. p. 6-10.
102. Francolini, I., et al., *Antifouling and antimicrobial biomaterials: an overview*. Apmis, 2017. 125(4): p. 392-417.
103. Banerjee, I., R.C. Pangule, and R.S. Kane, *Antifouling coatings: recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms*. Adv Mater, 2011. 23(6): p. 690-718.
104. Lloyd, A.W., R.G. Faragher, and S.P. Denyer, *Ocular biomaterials and implants*. Biomaterials, 2001. 22(8): p. 769-85.

105. Liu, Y., et al., *The antimicrobial and osteoinductive properties of silver nanoparticle/poly (DL-lactic-co-glycolic acid)-coated stainless steel*. Biomaterials, 2012. 33(34): p. 8745-56.
106. Elbourne, A., R.J. Crawford, and E.P. Ivanova, *Nano-structured antimicrobial surfaces: From nature to synthetic analogues*. J Colloid Interface Sci, 2017. 508: p. 603-616.
107. Peng, Z., et al., *Dual effects and mechanism of TiO₂ nanotube arrays in reducing bacterial colonization and enhancing C3H10T1/2 cell adhesion*. Int J Nanomedicine, 2013. 8: p. 3093-105.
108. Neut, D., et al., *A biodegradable gentamicin-hydroxyapatite-coating for infection prophylaxis in cementless hip prostheses*. Eur Cell Mater, 2015. 29: p. 42-55; discussion 55-6.
109. Li, T., et al., *Antibacterial activity and cytocompatibility of an implant coating consisting of TiO₂ nanotubes combined with a GL13K antimicrobial peptide*. Int J Nanomedicine, 2017. 12: p. 2995-3007.
110. Caro, A., et al., *Grafting of lysozyme and/or poly(ethylene glycol) to prevent biofilm growth on stainless steel surfaces*. J Phys Chem B, 2009. 113(7): p. 2101-9.
111. Sadzuka, Y., *Polyethyleneglycol: a classical but innovative material. Foreword*. Biol Pharm Bull, 2013. 36(6): p. 877.
112. Jeon, S.I., et al., *Protein—surface interactions in the presence of polyethylene oxide: I. Simplified theory*. Journal of Colloid and Interface Science, 1991. 142(1): p. 149-158.
113. Jeon, S.I. and J.D. Andrade, *Protein—surface interactions in the presence of polyethylene oxide: II. Effect of protein size*. Journal of Colloid and Interface Science, 1991. 142(1): p. 159-166.
114. Prime, K.L. and G.M. Whitesides, *Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces*. Science, 1991. 252(5009): p. 1164-7.
115. Moussy, F., D.J. Harrison, and R.V. Rajotte, *A miniaturized Nafion-based glucose sensor: in vitro and in vivo evaluation in dogs*. Int J Artif Organs, 1994. 17(2): p. 88-94.

116. Moussy, F., et al., *In vitro and in vivo performance and lifetime of perfluorinated ionomer-coated glucose sensors after high-temperature curing*. *Anal Chem*, 1994. 66(22): p. 3882-8.
117. Joh, D.Y., et al., *Poly(oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate) Brushes on High-κ Metal Oxide Dielectric Surfaces for Bioelectrical Environments*. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017. 9(6): p. 5522-5529.
118. Es-Souni, M., et al., *Processing of nanotubes on NiTi-shape memory alloys and their modification with photografted anti-adhesive polymer brushes. Towards smart implant surfaces*. *Materials & Design*, 2019. 182: p. 108031.
119. Wassel, E., et al., *Data supporting polymerization of anti-fouling polymer brushes polymerized on the pore walls of porous aluminium and titanium oxides*. *Data in Brief*, 2019. 23: p. 103702.
120. Wu, J., et al., *Investigation of the Hydration of Nonfouling Material Poly(sulfobetaine methacrylate) by Low-Field Nuclear Magnetic Resonance*. *Langmuir*, 2012. 28(19): p. 7436-7441.
121. Zhao, G., et al., *High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure*. *J Biomed Mater Res A*, 2005. 74(1): p. 49-58.
122. Klein, M.O., et al., *Submicron scale-structured hydrophilic titanium surfaces promote early osteogenic gene response for cell adhesion and cell differentiation*. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2013. 15(2): p. 166-75.
123. Schwarz, F., et al., *Potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009. 88(2): p. 544-57.
124. Terheyden, H., et al., *Osseointegration--communication of cells*. *Clin Oral Implants Res*, 2012. 23(10): p. 1127-35.
125. Chien, H.-W., et al., *Superhydrophilic Coating with Antibacterial and Oil-Repellent Properties via NaIO₄-Triggered Polydopamine/Sulfobetaine Methacrylate Polymerization*. *Polymers*, 2020. 12(9): p. 2008.
126. Rupp, F., et al., *Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces*. *J Biomed Mater Res A*, 2006. 76(2): p. 323-34.
127. Ogawa, T., *Ultraviolet photofunctionalization of titanium implants*. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2014. 29(1): p. e95-102.

128. Henningsen, A., et al., *Changes in surface characteristics of titanium and zirconia after surface treatment with ultraviolet light or non-thermal plasma*. Eur J Oral Sci, 2018. 126(2): p. 126-134.
129. Henningsen, A., et al., *Photofunctionalization and non-thermal plasma activation of titanium surfaces*. Clin Oral Investig, 2018. 22(2): p. 1045-1054.
130. Duan, Y., C. Huang, and Q.S. Yu, *Cold plasma brush generated at atmospheric pressure*. Rev Sci Instrum, 2007. 78(1): p. 015104.
131. Rupf, S., et al., *Killing of adherent oral microbes by a non-thermal atmospheric plasma jet*. J Med Microbiol, 2010. 59(Pt 2): p. 206-212.
132. Naujokat, H., et al., *Surface conditioning with cold argon plasma and its effect on the osseointegration of dental implants in miniature pigs*. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, 2019. 47(3): p. 484-490.
133. Açil, Y., et al., *The correlation between periodontal health status and susceptibility to infections associated with craniomaxillofacial osteosynthesis plates*. J Craniomaxillofac Surg, 2017. 45(11): p. 1868-1874.
134. Chen, Z., et al., *Overview of Antibacterial Strategies of Dental Implant Materials for the Prevention of Peri-Implantitis*. Bioconjugate Chemistry, 2021. 32(4): p. 627-638.
135. Takeshita, T., et al., *Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the Hisayama Study*. Scientific Reports, 2016. 6(1): p. 22164.
136. Flörke, C., et al., *In-vitro assessment of the efficiency of cold atmospheric plasma on decontamination of titanium dental implants*. Int J Implant Dent, 2022. 8(1): p. 12.
137. Kim, M.-A., V. Rosa, and K.-S. Min, *Characterization of Enterococcus faecalis in different culture conditions*. Scientific Reports, 2020. 10(1): p. 21867.
138. Flanagan, D., *Implant Placement in Failed Endodontic Sites: A Review*. J Oral Implantol, 2016. 42(2): p. 224-30.
139. Arciola, C.R., et al., *The role of Enterococcus faecalis in orthopaedic peri-implant infections demonstrated by automated ribotyping and cluster analysis*. Biomaterials, 2007. 28(27): p. 3987-95.
140. Flanagan, D., *Enterococcus faecalis and Dental Implants*. J Oral Implantol, 2017. 43(1): p. 8-11.

141. Al-kafaween, M.A., et al., *Determination of optimum incubation time for formation of Pseudomonas aeruginosa and Streptococcus pyogenes biofilms in microtiter plate*. Bulletin of the National Research Centre, 2019. 43(1): p. 100.
142. Distel, J.W., J.F. Hatton, and M.J. Gillespie, *Biofilm formation in medicated root canals*. J Endod, 2002. 28(10): p. 689-93.
143. Hung, P.J., et al., *Continuous perfusion microfluidic cell culture array for high-throughput cell-based assays*. Biotechnology and Bioengineering, 2005. 89(1): p. 1-8.
144. Dhanumalayan, E. and G.M. Joshi, *Performance properties and applications of polytetrafluoroethylene (PTFE)—a review*. Advanced Composites and Hybrid Materials, 2018. 1(2): p. 247-268.
145. Radulovic, L.L. and Z.W. Wojcinski, *PTFE (Polytetrafluoroethylene; Teflon®)*, in *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, P. Wexler, Editor. 2014, Academic Press: Oxford. p. 1133-1136.
146. Elani, H.W., et al., *Trends in Dental Implant Use in the U.S., 1999-2016, and Projections to 2026*. J Dent Res, 2018. 97(13): p. 1424-1430.
147. Kordbacheh Changi, K., J. Finkelstein, and P.N. Papapanou, *Peri-implantitis prevalence, incidence rate, and risk factors: A study of electronic health records at a U.S. dental school*. Clin Oral Implants Res, 2019. 30(4): p. 306-314.
148. Zhang, L. and L. Chen, *A Review on Biomedical Titanium Alloys: Recent Progress and Prospect*. Advanced Engineering Materials, 2019. 21.
149. Jia, J., et al., *Oral Exposure to Silver Nanoparticles or Silver Ions May Aggravate Fatty Liver Disease in Overweight Mice*. Environ Sci Technol, 2017. 51(16): p. 9334-9343.
150. Nakamura, K., et al., *Zirconia as a dental implant abutment material: a systematic review*. International Journal of Prosthodontics, 2010. 23(4).
151. Roehling, S., et al., *In Vitro Biofilm Formation on Titanium and Zirconia Implant Surfaces*. Journal of Periodontology, 2017. 88(3): p. 298-307.
152. Yoshinari, M., *Future prospects of zirconia for oral implants —A review*. Dental Materials Journal, 2020. 39(1): p. 37-45.
153. Lin, W., et al., *Development of robust biocompatible silicone with high resistance to protein adsorption and bacterial adhesion*. Acta Biomaterialia, 2011. 7(5): p. 2053-2059.

154. Wang, S.-Y., L.-F. Fang, and H. Matsuyama, *Electrostatic Adsorption Behavior of Zwitterionic Copolymers on Negatively Charged Surfaces*. Langmuir, 2019. 35(28): p. 9152-9160.
155. Schlenoff, J.B., *Zwitteration: Coating Surfaces with Zwitterionic Functionality to Reduce Nonspecific Adsorption*. Langmuir, 2014. 30(32): p. 9625-9636.
156. Dou, X.Q., et al., *Bioinspired Hierarchical Surface Structures with Tunable Wettability for Regulating Bacteria Adhesion*. ACS Nano, 2015. 9(11): p. 10664-72.
157. Wenzel, R.N., *RESISTANCE OF SOLID SURFACES TO WETTING BY WATER*. Industrial & Engineering Chemistry, 1936. 28(8): p. 988-994.
158. Liu, Y., et al., *Molecular simulations and understanding of antifouling zwitterionic polymer brushes*. Journal of Materials Chemistry B, 2020. 8(17): p. 3814-3828.
159. Hu, Y., et al., *The fabrication of superlow protein absorption zwitterionic coating by electrochemically mediated atom transfer radical polymerization and its application*. Acta Biomater, 2015. 13: p. 142-9.
160. Ostuni, E., et al., *A Survey of Structure-Property Relationships of Surfaces that Resist the Adsorption of Proteins*. Langmuir, 2001. 17: p. 5605-5620.
161. Huang, C.J., et al., *Internal architecture of zwitterionic polymer brushes regulates nonfouling properties*. Macromol Rapid Commun, 2012. 33(11): p. 1003-7.
162. Es-Souni, M., et al., *A Bacteria and Cell Repellent Zwitterionic Polymer Coating on Titanium Base Substrates towards Smart Implant Devices*. Polymers (Basel), 2021. 13(15).
163. Park, S.W., et al., *Generation of functionalized polymer nanolayer on implant surface via initiated chemical vapor deposition (iCVD)*. Journal of Colloid and Interface Science, 2015. 439: p. 34-41.
164. Lee, S.J., et al., *Biofunctionalized titanium with anti-fouling resistance by grafting thermo-responsive polymer brushes for the prevention of peri-implantitis*. Journal of Materials Chemistry B, 2015. 3(26): p. 5161-5165.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Foto eines subperiostalen patientenspezifischen Kieferimplantates.....</i>	<i>3</i>
<i>Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Biofilms in der Mundhöhle</i>	<i>6</i>
<i>Abbildung 3: Schematische Darstellung einer PEG-Beschichtung.....</i>	<i>13</i>
<i>Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.....</i>	<i>21</i>
<i>Abbildung 5: Schematische Darstellung der Versuchsproben in den Petrischalen ...</i>	<i>22</i>
<i>Abbildung 6: visuelle Darstellung der EDX Analyse der Titanoberflächen.....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 7 Kontaktwinkelmessung der beiden Proben.....</i>	<i>29</i>
<i>Abbildung 8: Die FT-IR Transmissionsanalyse</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 9: Darstellung der bakteriellen Besiedlung der Proben.....</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 10: Darstellung der bakteriellen Besiedlung der Proben</i>	<i>32</i>
<i>Abbildung 11: Darstellung der bakteriellen Besiedlung der Proben im REM.....</i>	<i>33</i>
<i>Abbildung 12: REM-Aufnahme bei 5000-facher Vergrößerung.</i>	<i>33</i>
<i>Abbildung 13: Darstellung der koloniebildenden Einheiten.....</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 14: Negativkontrolle PTFE-Probe nach 5-tägiger bakterieller Besiedlung</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 15: Thermanox™ Deckglas im Vorversuch.....</i>	<i>39</i>

7.2 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Zusammenstellung verwendeter Materialien.....</i>	<i>17</i>
<i>Tabelle 2: Zusammenstellung verwendeter Geräte</i>	<i>18</i>
<i>Tabelle 3: Darstellung der 4 Grade des bakteriellen Befalls.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 4: Semiquantitative Auswertung der Proben.....</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 5: EDX Analyse der Proben</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 6: Auswertung der Fotografien nach Fluoreszenzmikroskopie</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 7: Auswertung der REM-Aufnahmen in allen 4 Versuchsdurchläufen</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 8: Ergebnisse der Auszählung der KBE aller vier Versuchsdurchläufe.....</i>	<i>34</i>

7.3 Abkürzungsverzeichnis

®	Registered Trademark
Abb.	Abbildung
Ag	Silber (lat.: Argentum)
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion (engl. attenuated total reflection)
Au	Gold (lat. Aurum)
BHI	Hirn-Herz-Glucose-Bouillon (engl.: Brain Heart Infusion Broth)
CAD/CAM	Computer-aided design/ Computer-aided manufacturing
CFU	s. KBE (engl.: Colony forming units)
cm ⁻¹	Wellenzahl
CPD	Kritische-Punkt-Trocknung (engl. critical point drying)
Cu	Kupfer (lat. Cuprum)
E. faecalis	Enterococcus faecalis
FI-TR	Fourier-Transform-Infrarotspektrometer
HMDS	Hexamethyldisilazan
KBE	Koloniebildende Einheiten
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatpufferlösung (engl.: Phosphate buffered saline)
PEG	Polyethylenglykol
pSBMA	Polysulfobetain-Methacrylat
REM	Rasterelektronenmikroskopie
S	Schwefel
SLA	sandgestrahlt und säuregeätzt (engl.: sandblasted and acid-etched)
Ti	Titan
TiO ₂	Titandioxid
™	Trademark
UV	Ultraviolettstrahlung
WCA	Kontaktwinkel (engl.: water contact angle)
Zn	Zink (lat. Zincum)
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

8 Publikationen

Englischsprachige wissenschaftliche Veröffentlichung (peer-reviewed)

Materials (Journal)

Gülses, A.*; **Lopar, A.***; Es-Souni, M.; Emmert, M.; Es-Souni, M.; Behrens, E.; Naujokat, H.; Liedtke, K.R.; Acil, Y.; Wiltfang, J.; Flörke, C. A Novel Surface Modification Strategy via Photopolymerized Poly-Sulfobetaine Methacrylate Coating to Prevent Bacterial Adhesion on Titanium Surfaces. *Materials* 2021, 14, 3303. <https://doi.org/10.3390/ma14123303>

*geteilte Erstautorenschaft

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Antonia Jela Lopar, geb. am 10.10.1991 in Reinbek, versichere hiermit an Eides Statt, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meines Betreuers 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.

Datum, Unterschrift Doktorand*in