

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

Desinfektion periimplantärer Läsionen mit kaltem Plasma. Eine in-vitro Studie.

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Josephine Janning
aus Ankum

Kiel 2022

1. Berichterstatter:	PD Dr. med. dent. Aydin Gülses
2. Berichterstatter:	PD Dr. med. Tim Klüter
Tag der mündlichen Prüfung:	26.04.2024
Zum Druck genehmigt:	Kiel, den 17.11.2023

gez. PD Dr. med. dent. Aydin Gülses
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Übersicht über verschiedene Implantatmaterialien	2
1.1.1 Titan als Werkstoff für Implantate.....	2
1.1.2 Keramik als Werkstoff für Implantate	3
1.2 Periimplantitis.....	3
1.2.1 Ätiologie der Periimplantitis	4
1.2.2 Risikofaktoren und Früherkennung der Periimplantitis.....	5
1.2.3 Therapie der Periimplantitis	6
1.2.3.1 Mechanische Therapien der Periimplantitis	6
1.2.3.2 Alternative bzw. adjuvante Therapien der Periimplantitis.....	7
1.2.3.3 Nichtchirurgische und chirurgische Therapie	10
1.2.3.4 Zusammenfassung der Periimplantitistherapien	10
1.3 Plasma als Alternative zu gängigen Therapieformen	11
1.4 Fragestellung.....	13
2 Material and Methoden.....	14
2.1 Versuchsgruppenplan	14
2.2 Herstellung der in vitro Modelle.....	14
2.3 Biofilmbesiedlung	15
2.4 Therapiedurchführung.....	17
2.4.1 Positiv-Kontrolle	17
2.4.2 Gruppe 1: Plasma	17
2.4.3 Gruppe 2: Phosphorsäure	18
2.4.4 Gruppe 3: PDT	19
2.4.5 Negativ-Kontrolle.....	19
2.5 Methoden der Laboruntersuchungen.....	20
2.5.1 Gramfärbung.....	20
2.5.2 CFU-Bestimmung.....	21
2.5.3 Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung.....	21
2.5.3.1 Herstellen der Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung.....	21

2.5.3.2	Zentrifugieren.....	21
2.5.3.3	Fluoreszenzmikroskopie	22
2.5.4	Rasterelektronenmikroskopie.....	23
2.6	Versuchsauswertung	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Gramfärbung.....	25
3.2	CFU	25
3.3	Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung.....	28
3.3.1	Tote Keime.....	28
3.3.2	Lebende Keime	30
3.3.3	Gesamtanzahl Keime.....	32
3.3.4	Rot-Grün-Quotient.....	32
3.4	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	34
3.4.1	REM der Positiv-Kontrollen	34
3.4.2	REM der mit Plasma behandelten Implantate	35
3.4.3	REM der mit Phosphorsäure behandelten Implantate.....	36
3.4.4	REM der mit der PDT behandelten Implantate	37
3.4.5	REM der Negativ-Kontrolle.....	38
3.4.6	Semiquantitative Auswertung der REM-Aufnahmen	39
4	Diskussion	41
4.1	Diskussion der Methode	42
4.2	Diskussion der Ergebnisse	48
4.2.1	Die Wirksamkeit der Plasmabehandlung	48
4.2.2	Die Wirksamkeit der Phosphorsäurebehandlung	49
4.2.3	Die Wirksamkeit der PDT	51
4.2.4	Vergleich	54
4.3	Ausblick	54
5	Zusammenfassung.....	55
6	Literaturverzeichnis	57
	Publikationen	VI
	Danksagung.....	VII
	Eidesstattliche Versicherung	VIII

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
aPDT	Antibakterielle photodynamische Therapie
BHI	Brain heart infusion
BOP	Bleeding on Probing
CAP	Cold Atmospheric Plasma
CFU	Colony Forming Units
CHX	Chlorhexidin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
KBE	Koloniebildende Einheiten
LPS	Lipopolysaccharide
OD600	Optische Dichte bei 600 nm
PDT	Photodynamische Therapie
PI	Propidiumiodid
REM	Rasterelektronenmikroskop
RZB	relative Zentrifugalbeschleunigung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Herstellung der in-vitro Modelle	14
Abbildung 2: Positionierung der Kiefermodelle	15
Abbildung 3: Kiefermodelle mit Bakteriensuspension	16
Abbildung 4: Behandlung eines Implantates mit dem kINPen® MED	17
Abbildung 5: Behandlung eines Implantates mit Phosphorsäure.....	18
Abbildung 6: Behandlung eines Implantates mit der PDT.	19
Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme mit dem Emissionsfilter 470/40	23
Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme mit dem Emissionsfilter 546/12	23
Abbildung 9: Boxplot-Darstellung der Anzahl von toten Keimen pro Bildausschnitt bei der Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung und signifikante Differenzen ($*** p \leq 0,001$)	28
Abbildung 10: Boxplot-Darstellung der Anzahl von lebenden Keimen pro Bildausschnitt bei der Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung und signifikante Differenzen ($*** p \leq 0,001$).....	30
Abbildung 11: Mittelwerte der Rot-Grün-Quotienten (Lebend-Tot- Fluoreszenzfärbung).....	33
Abbildung 12: REM-Aufnahmen von Implantatoberflächen der Positiv-Kontrollen mit E. faecalis.....	34
Abbildung 13: REM-Aufnahmen von plasmabehandelte Implantatoberflächen	35
Abbildung 14: REM-Aufnahmen von phosphorsäurebehandelte Implantatoberflächen	36
Abbildung 15: REM-Aufnahmen von PDT-behandelten Implantatoberflächen	37
Abbildung 16: REM-Aufnahme der sandgestrahlten und säuregeätzten TiPure ^{Plus} - Oberfläche der im Versuch verwendeten Implantate.....	38
Abbildung 17: Mittelwerte der Anzahl von REM-Bildausschnitten der semiquantitativen Auswertungsstufen für jede Untersuchungsgruppe	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Therapiedurchführung.....	20
Tabelle 2: Deskriptive Statistik der CFU-Werte	25
Tabelle 3: Paarweise Vergleiche der Experimentalgruppen hinsichtlich der CFU- Werte.....	26
Tabelle 4: Vergleich der CFU-Mittelwerte der einzelnen Versuchsreihen.....	27
Tabelle 5: Deskriptive Statistik der toten Keime pro Bildausschnitt bei der Lebend- Tot-Fluoreszenzfärbung	29
Tabelle 6: Deskriptive Statistik der lebenden Keime pro Bildausschnitt bei der Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung	31
Tabelle 7: Deskriptive Statistik der Gesamtanzahl von Keimen pro Bildausschnitt bei der Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung	32
Tabelle 8: Beispiel-REM-Aufnahmen für die drei semiquantitativen Auswertungsstufen - / + / ++ in 5000facher und 8000facher Vergrößerung.	39
Tabelle 9: absolute und relative Werte der semiquantitativen Auswertung der REM- Aufnahmen	40

1 Einleitung

In Deutschland werden laut Angaben der Deutschen Gesellschaft für Implantologie e.V. (DGI) jährlich mehr als eine Million dentale Implantate gesetzt (Stand 2022), Tendenz steigend. Diese Technik bietet den PatientInnen viele Vorteile gegenüber herkömmlichen zahnärztlichen Versorgungen wie zum Beispiel dental abgestützte Brücken oder rein tegumental gelagerte Prothesen.

Sowohl festsitzender als auch herausnehmbarer Zahnersatz kann mit Hilfe von Implantaten verankert werden. Beispielsweise kann eine Schalllücke durch den Einsatz eines Implantates geschlossen werden, ohne dass die Nachbarzähne beschliffen werden müssen. PatientInnen, die nur noch einen geringen Restzahnbestand aufweisen oder gänzlich zahnlos sind, können von einer Implantatinserterion profitieren. So ist es möglich, dass PatientInnen auch festsitzende Lösungen in Anspruch nehmen können, die auf konventionellem Wege nur noch mit herausnehmbarem Zahnersatz versorgt werden könnten. Ebenso kann der Halt von herausnehmbarem Zahnersatz mit Hilfe von Implantaten deutlich verbessert werden. Implantate tragen so nicht nur zu einer Optimierung der Kaufunktion und Ästhetik bei, sondern ermöglichen gleichermaßen eine Verbesserung an Lebensqualität (Kuboki et al. 1999; Oh et al. 2016).

Die Kosten für ein Implantat betragen in Deutschland zwischen 1500 und 3000 Euro. Diese vergleichsweise hohen Kosten kommen aufgrund der hochwertigen Materialien und des großen zeitlichen Aufwands zustande. Trotz hoher Erfolgsraten von Implantaten (Hjalmarsson et al. 2016; Jung et al. 2012; Pjetursson et al. 2012) kommt es immer wieder zu Misserfolgen, die in letzter Konsequenz eine Explantation des Implantates notwendig machen. Studien zufolge liegt die Misserfolgsrate nach fünf Jahren bei etwa 10 % (Lee et al. 2016). Neben technischen Komplikationen stellen vor allem biologische Komplikationen wie die Periimplantitis mögliche Ursachen für Misserfolge dar. Für die PatientInnen kann eine Periimplantitis schlussendlich nicht nur weitere operative Eingriffe, sondern ebenfalls einen großen ökonomischen Schaden bedeuten. Die hohen Kosten in Verbindung mit einer zehnprozentigen Misserfolgswahrscheinlichkeit verdeutlichen daher, wie wichtig es ist, geeignete Lösungen für die Prävention und die Behandlung von Periimplantitis zu finden.

1.1 Übersicht über verschiedene Implantatmaterialien

Die primäre Voraussetzung für einen langfristigen Implantaterfolg ist zunächst eine hohe Langzeitstabilität des Implantats, die unter anderem abhängig vom verwendeten Implantatmaterial ist.

1.1.1 Titan als Werkstoff für Implantate

Vor allem Titan und Titanlegierungen sind die heute am weitesten verbreiteten Implantatmaterialien und gelten als „Goldstandard“, da sie gute physikalische Eigenschaften aufweisen. Titanoxide bilden eine protektive Oxidschicht auf der Oberfläche aus, die das Metall korrosionsfest und biokompatibel macht (Saini et al. 2015). Zahlreiche Langzeitstudien zeigen eine hohe Überlebens- und Erfolgsrate der Titanimplantate über mehrere Jahrzehnte hinweg (Chappuis et al. 2013, Buser et al. 2012; Adell et al. 1990; Adell et al. 1981). Chappuis et al. (2013) konnten eine 20-Jahres-Erfolgsrate von bis zu 89,5 % nachweisen. In den Untersuchungen von Buser et al. (2012) lag die 10-Jahres-Erfolgsrate bei 97,0 %. Für kein anderes Implantatmaterial liegen Daten vor, die über einen so langen Zeitraum gesammelt wurden.

Doch nicht nur das Material an sich, auch die Oberflächenmorphologie ist für den Erfolg eines Implantates von Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass raue Titanoberflächen zu einer besseren Osseointegration führen als glatte Titanoberflächen (Buser et al. 1991). Um diese Oberflächenrauigkeiten zu erzeugen, wurden zahlreiche, unterschiedliche Methoden entwickelt. Dazu gehören u.a. die Titanplasmabeschichtung (TPS), die Bestrahlung mit Keramik-Partikeln, die Säure-Ätz-Technik, die Anodisierung oder die Oberflächenbeschichtung mit Hydroxylapatit (Le Guéhennec et al. 2007).

Bei PatientInnen mit dünnem gingivalem Biotyp können die dunklen Titanimplantate jedoch durchscheinen und besonders im Frontzahnbereich zu ästhetischen Einschränkungen führen. Durch Rezessionen des Weichgewebes rund um das Implantat kann das graue Metall direkt sichtbar und somit zu einem ästhetischen Störfaktor werden. Eine Alternative zu Titan stellt Keramik dar, welches im Gegensatz zu Titan aufgrund der zahnähnlichen Farbe bessere optische Eigenschaften aufweist.

1.1.2 Keramik als Werkstoff für Implantate

Neben den ästhetischen Vorteilen konnte gezeigt werden, dass keramische Materialien eine geringere Fähigkeit zur Bakterienadhäsion als Titan (Roehling et al. 2017) sowie eine mit Titan vergleichbare Gewebeverträglichkeit besitzen (Möller et al. 2012).

Lange Zeit jedoch zeigten Keramikimplantate aufgrund der höheren Frakturanfälligkeit schlechtere Überlebensraten als Titanimplantate. Erst mit der Entwicklung von Zirkoniumdioxidkeramik als Implantatmaterial erlangten die Keramikimplantate wieder größere Aufmerksamkeit, da die Zirkoniumdioxidkeramik im Vergleich zur früher verwendeten Aluminiumoxidkeramik deutlich bessere physikalische Eigenschaften aufweist (Andreiotelli et al. 2009).

In vielen klinischen Studien wird deutlich, dass Zirkoniumdioxidkeramikimplantate eine potenzielle Alternative zu Titanimplantaten darstellen (Andreiotelli et al. 2009; Wenz et al. 2008; Roehling et al. 2018). Allerdings liegen derzeit noch keine ausreichenden Langzeitdaten vor und so kann der routinemäßige Einsatz noch nicht uneingeschränkt empfohlen werden. Titan gilt daher weiterhin als Implantatwerkstoff der Wahl, weshalb es zunächst sinnvoll ist, die Periimplantitistherapie anhand von Titanimplantaten, statt Keramikimplantaten zu untersuchen.

1.2 Periimplantitis

Die Osseointegration stellt den ersten Schritt zum Erfolg eines Implantates dar. Dieser von Per-Ingvar Brånemark eingeführte Begriff bezeichnet den im lichtmikroskopischen Bereich sichtbaren, direkten strukturellen und funktionellen Verbund zwischen dem organisierten, lebenden Knochen und der Oberfläche eines belasteten Implantats (Brånemark 1986). Im weiteren Verlauf kann es jedoch als Folge der Periimplantitis zum Verlust des festen Verbundes zwischen Implantat und Knochen kommen.

Die Periimplantitis wird definiert als Entzündung der Mukosa kombiniert mit Verlust des unterstützenden Knochens (Lindhe & Meyle 2008). Im Unterschied dazu handelt es sich bei der periimplantären Mukositis um eine reine Entzündung der Weichgewebe, die reversibel ist, sich jedoch im weiteren Verlauf bei Nichtbehandlung zu einer Periimplantitis entwickeln kann. Der Knochenverlust durch Periimplantitis gilt als

irreversibel und kann als Analogie zur Parodontitis, die an natürlichen Zähnen auftritt, bezeichnet werden (Belibasakis 2014).

Neben einer fehlenden Osseointegration, die in der initialen Einheilphase von Bedeutung ist, wird die Periimplantitis als limitierender Faktor für einen langfristigen Implantaterfolg angesehen, da sie derzeit die häufigste Ursache für einen späten Implantatverlust ist. Die Prävalenz der Periimplantitis liegt nach Angaben von Zitzmann und Berglundh (2008) bei bis zu 56 %. Demzufolge leiden bei steigender Anzahl von Implantatinserktionen immer mehr PatientInnen unter Periimplantitis und ihren Folgen, wie zum Beispiel dem Implantatverlust.

1.2.1 Ätiologie der Periimplantitis

Der wichtigste ätiologische Faktor für die Entzündung stellt, wie bei der Parodontitis auch, eine bakterielle Biofilmbesiedlung der Implantat- bzw. Wurzeloberfläche dar (Heitz-Mayfield und Lang 2010). Ein Biofilm wiederum besteht aus einem komplexen Zusammenspiel von Mikroorganismen, die in einer extrazellulären Matrix eingebettet sind, was sie besonders widerstandsfähig macht (Donlan und Costerton 2002). Kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen bakterieller Belastung und Wirtsabwehr, führt dies zum klinischen Bild der Periimplantitis (Tonetti und Schmid 1994).

Darüber hinaus wird auch eine überschießende Fremdkörperreaktion als möglicher Auslöser einer Periimplantitis in Betracht gezogen (Albrektsson et al. 2014). Als Fremdkörper gelten unter anderem feinste Titanpartikel, die auf unterschiedliche Weise in das periimplantäre Gewebe gelangen. Ein Abrieb von Metallpartikeln kann beispielsweise durch mechanische Belastung der Implantat-Abutment-Verbindung ausgelöst werden (Stimmelmayer et al. 2012). Auch korrosive Prozesse führen zu einer Ablösung von Titanpartikeln. Ursächlich dafür können zum Beispiel eine hohe Fluoridkonzentration im Speichel (Souza et al. 2015) oder Bakterien sein, die Lipopolysaccharide produzieren (Mathew et al. 2012). Die Kombination aus Korrosion und Verschleiß, die für den Titanabbau der Implantate verantwortlich ist, wird unter dem Begriff Tribokorrosion zusammengefasst (Mombelli et al. 2018). Auch die Implantoplastik, bei der freiliegende Schraubenwindungen entfernt und die Oberfläche zugunsten einer geringeren Bakterienanhaftung poliert werden, führt zu einer Freisetzung von Titanpartikeln in das umliegende Gewebe (Schwarz et al. 2011). Diese feinen Partikel aktivieren aufgrund ihrer Zytotoxizität Entzündungszellen

(Kumazawa et al. 2002), die wiederum das klinische Bild einer Periimplantitis hervorrufen können. Neben Titanpartikeln konnten bei einer Untersuchung von menschlichen Periimplantitis-Biopsien auch Zementreste identifiziert werden, die eine Fremdkörperreaktion auslösten (Wilson et al. 2015). Es besteht daher die Notwendigkeit der sorgfältigen Entfernung von Zementüberschüssen bei zementierten Suprakonstruktionen.

1.2.2 Risikofaktoren und Früherkennung der Periimplantitis

Bereits vor der Implantation ist es wichtig Risikofaktoren zu erfassen und eine Implantation sorgfältig abzuwägen. Sowohl lokale als auch systemische Faktoren können die Entstehung einer Periimplantitis begünstigen. Als systemischer Faktor mit hohem Evidenzgrad gelten vorausgegangene Parodontitiden. PatientInnen, die bereits eine Parodontitis entwickelt haben, erkranken häufiger an einer Periimplantitis (Renvert und Quirynen 2015). Rauchen und Diabetes werden ebenfalls als Risikofaktoren diskutiert (Renvert und Quirynen 2015).

Zu der Gruppe der lokalen Risikofaktoren gehört beispielsweise das Fehlen von keratinisierter Gingiva. Dazu zählen auch Implantatpositionen und Suprakonstruktionen, die zu einer eingeschränkten Biofilmentfernung führen, sowie im Allgemeinen auch eine mangelnde Mundhygiene (Heitz-Mayfield 2008).

Eine ebenso große Bedeutung wie das Erkennen und Abwägen von Risikofaktoren kommt der regelmäßigen Nachsorge der ImplantatpatientInnen zu, bei der neben einer Mundhygieneinstruktion und -motivation eine klinische Untersuchung mit periimplantärer Sondierung durchgeführt werden sollte, die eine Früherkennung der Periimplantitis ermöglicht (Chen und Darby 2003).

Bei der Nachsorgeuntersuchung können der Verlust von Osseointegration im koronalen Anteil des Implantats (radiologisch), erhöhte Sondierungstiefen sowie Blutung und/oder Suppuration beim Sondieren (klinisch) auf eine Periimplantitis hinweisen (Chen und Darby 2003).

1.2.3 Therapie der Periimplantitis

Sobald Anzeichen einer Periimplantitis bestehen, sollten umgehend Therapiemaßnahmen eingeleitet werden, deren primäres Ziel eine Dekontamination des Implantates ist. Damit soll ein Fortschreiten der Entzündung und die damit einhergehende Gewebedestruktion verhindert werden (Mombelli und Lang 1998).

1.2.3.1 Mechanische Therapien der Periimplantitis

Ziel der mechanischen Vorgehensweisen ist eine Reduktion des Biofilms. Dies kann auf einer reinen Reinigung der Oberflächen beruhen oder mit strukturellen Veränderungen einhergehen. Zu den mechanischen Reinigungsinstrumenten zählen in erster Linie die Kunststoff- und Titanküretten, da sie schonender als herkömmliche Stahlküretten sind (Augthun et al. 1998). Diese können die Titanoberfläche beschädigen (Louropoulou et al. 2012; Fox et al. 1990; Mengel et al. 2004). Insbesondere der Implantathals, der eine glatte Oberfläche aufweist, um eine gute Weichgewebsadaption zu gewährleisten, kann verkratzen (Matarasso et al. 1996). Die makroskopischen Veränderungen begünstigen wiederum die Plaqueretention. Nachteilig ist allerdings, dass mit Küretten alleine keine vollständige Dekontamination aufgrund der texturierten und durch die Schraubenwindungen verwinkelten Oberfläche erreicht werden kann (Karring et al. 2005).

Weiterhin werden speziell modifizierte Arbeitsenden für Ultraschallsysteme sowie Pulverstrahlgeräte für die mechanische Dekontamination verwendet. Die Reinigung mit Ultraschallsystemen scheint der Reinigung mit Handküretten jedoch kaum überlegen (Renvert et al. 2009; Karring et al. 2005) und die Verwendung von Pulverstrahlgeräten birgt Risiken, da die Gefahr einer Emphysembildung besteht, wenn der Pulverstrahl direkt auf die Zahnfleischtasche gerichtet wird (Alonso et al. 2017; Davies und Campbell 1990). Ebenso können nach der Behandlung Pulverrückstände auf dem Implantat verbleiben, welche möglicherweise zu einer schlechteren Reosseointegration der Implantate führen (Schwarz et al. 2009).

Die oben genannten Verfahren verfolgen das Ziel die Implantatoberfläche so wenig wie möglich zu verändern. Bei der invasiveren Methode der Implantoplastik wird die Implantatoberfläche mit rotierenden Instrumenten so lange geglättet, bis die Schraubenwindungen komplett entfernt sind. Diese Technik ermöglicht eine

vollständige Entfernung des Biofilms. Zudem erleichtert die glatte Oberfläche die Mundhygiene. Sie wird aber nur dann empfohlen, wenn aufgrund des Knochendefektes keine Reosseointegration erwartet werden kann, wie beispielsweise bei suprakrestalen Defekten, da die für die Osseointegration notwendige mikrostrukturierte Oberfläche entfernt wird (Stavropoulos et al. 2019). Ebenfalls nachteilig ist die Abnahme der absoluten Bruchhärte bei dünnen Implantatypen (Gehrke et al. 2016) sowie die bereits oben erwähnte Fremdkörperreaktion durch impaktierte Titanpartikel im periimplantären Gewebe.

1.2.3.2 Alternative bzw. adjuvante Therapien der Periimplantitis

Neben den mechanischen Reinigungsmethoden existieren noch zahlreiche weitere antimikrobielle Dekontaminationsmethoden, die neben einer Reduktion auch zu einer Inaktivierung des Biofilms führen sollen. Diese Therapiemethoden haben eine besondere Bedeutung bei der Behandlung der Implantate, da eine mechanische Reinigung durch die mikrostrukturierte Oberfläche der Implantate erschwert wird. Einerseits ermöglicht sie die rasche Osseointegration der Implantate (s.o.), andererseits bietet sie auch mit ihren Irregularitäten und Unterschnitten Bakterien einen optimalen Lebensraum an (Bürgers et al. 2010). Daher wird empfohlen neben dem manuellen Debridement auch weitere Hilfsmittel als adjuvante Maßnahmen zur Behandlung der Periimplantitis in Anspruch zu nehmen um die schwer zu erreichenden Bereiche der Implantatoberfläche zu dekontaminieren (Schwarz et al. 2015; Faggion et al. 2014).

Neben chemischen Agenzien spielen auch Laseranwendungen sowie die antibakterielle photodynamische Therapie, kurz aPDT, eine wichtige Rolle in der Periimplantitistherapie.

Chemische Agenzien

Die Anwendung von unterschiedlichen chemischen Agenzien zur Desinfektion von Implantatoberflächen wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht.

Dazu zählt u.a. Chlorhexidin, kurz CHX. Levin et al. (2015) konnten in ihrer klinischen Studie eine Reduktion des BOPs sowie der Sondierungstiefen nach Behandlung mit CHX feststellen. Allerdings gab es keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Kontroll-Gruppen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Zablotsky et al. (1992).

Sie konnten zeigen, dass 0.12 %iges CHX keine signifikante Reduktion der schädlichen bakteriellen Lipopolysaccharide (LPS) auf kontaminierten Titanoberflächen im Vergleich zu unbehandelten Proben erreichen konnte. Auch bei Kotsakis et al. (2016) wurde nur ein milder, nicht-signifikanter antimikrobieller Effekt des CHX nachgewiesen. Anhand ihrer Ergebnisse sollte eine Reinigung von Implantatoberflächen mit CHX nicht empfohlen werden, da CHX die Biokompatibilität der Titanoberflächen aufgrund seines zytotoxischen Effektes beeinträchtigen kann.

Neben CHX wird auch die antibakterielle Wirkung von ätzenden Agenzien erforscht. In der Studie von Zablotzky et al. (1992) konnte Zitronensäure die LPS von Titanoberflächen erfolgreich entfernen. Im Vergleich zu Wasser oder Kochsalzlösung konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Auch Gosau et al. (2010) berichten von einer Bakterienabnahme auf Titanoberflächen nach Behandlung mit Zitronensäure, die nicht signifikant war. In den Untersuchungen von Ntrouka et al. (2011) wiederum stellte sich Zitronensäure als wirksamstes Chemotherapeutikum im Vergleich zu anderen Stoffen wie CHX, H₂O₂ oder EDTA heraus. Zitronensäure zeigte die größte Wirksamkeit in Bezug auf Biofilmzerstörung und Biofilmentfernung von *S. mutans* auf Titandiscs.

Neben Zitronensäure wird in der Literatur auch die Behandlung mit Phosphorsäure zur Implantatdekontamination beschrieben. Phosphorsäure ist als Gel erhältlich, welches auch für die Säure-Ätz-Technik in der konservativen Zahnheilkunde angewandt wird. Es kann durch seine Gelform präzise auch in nicht einsehbare Bereiche appliziert werden, ohne dabei Knochen oder umliegendes Gewebe zu benetzen. Wiltfang et al. (2012) konnten zeigen, dass die Reinigung der Implantatoberfläche mit 20 %iger Phosphorsäure eine verlässliche Methode zur Behandlung der Periimplantitis darstellt. Innerhalb eines Jahres konnte bei den untersuchten PatientInnen eine Taschenreduktion von durchschnittlich 4 mm erzielt werden. Strooker et al. (1998) konnten in ihrer klinischen Kurzzeitstudie positive Effekte der Phosphorsäure nachweisen, da durch die Behandlung mit 35 %igem Phosphorsäuregel eine Reduktion der Colony Forming Units, kurz CFU, erreicht werden konnte. Auch Hentenaar et al. (2017) erreichten mit Hilfe von 35 %iger Phosphorsäure eine größere sofortige Bakterienreduktion auf ihren untersuchten Implantaten im Vergleich zur Kontrollgruppe, die nur mit steriler Kochsalzlösung abgespült wurden. In Tierversuchen konnte eine Reosseointegration mit direktem Knochen-Implantat-Kontakt der mit Säuren behandelten Implantate bestätigt werden (Kolonidis et al. 2003;

Alhag et al. 2008). Die Biokompatibilität der Titanoberfläche wird durch die Behandlung mit Säuren demnach nicht beeinflusst.

Laser

Auch zahlreiche Laseranwendungen wurden bereits in klinischen Studien untersucht. Dazu gehören beispielsweise der Diodenlaser (Roncati et al. 2013), der Nd:YAG-Laser (Abduljabbar et al. 2017), der Er:YAG-Laser sowie der CO₂-Laser (Romanos et al. 2009). Jedoch konnte festgestellt werden, dass die Behandlungen mit hochenergetischen Laserlichtanwendungen zu Veränderungen an der Implantatoberfläche führen können (Kreisler et al. 2002a). Der Nd:YAG-Laser scheint aufgrund von Studienergebnissen nicht geeignet für die Dekontamination von Implantaten. Beim Einsatz des Er:YAG- sowie des CO₂-Lasers sollte auf eine reduzierte Energieleistung geachtet werden, um Beschädigungen zu vermeiden.

aPDT

Bei der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie, kurz aPDT, bindet ein spezieller Farbstoff, der Photosensibilisator, an die Zielzelle und wird mit Hilfe von Lichtenergie in Anwesenheit von Sauerstoff aktiviert. Dadurch entsteht Singulett-Sauerstoff, der in der Lage ist, Zellmembranen zu zerstören (Konopka und Goslinski 2007; Cieplik et al. 2014). Weder der Photosensibilisator noch das Licht alleine können den Effekt auslösen (Takasaki et al. 2009). Erst bei Lichtzufuhr mit geeigneter Wellenlänge sowie der Anwesenheit von Sauerstoff wird die Reaktion initiiert. Ein Vorteil besteht darin, dass die Bakterien, anders als beim unkritischen Einsatz von Antibiotika (van Winkelhoff et al. 1996), keine Resistenzen entwickeln (Fernandes et al. 2009). Auch die physiologische Mundflora, die bei Antibiotikagabe mit beeinflusst wird, bleibt unbeeinträchtigt (Gursoy et al. 2013). Außerdem kann beim Vorliegen von komplexen anatomischen Situationen, bei denen ein mechanisches Instrumentieren des Implantates nur eingeschränkt möglich ist, die photodynamische Therapie problemlos angewandt werden (Takasaki et al. 2009). Doch obwohl bereits viele in-vivo und in-vitro Studien (Dörtbudak et al. 2001; Shibli et al. 2003; Hayek et al. 2005) zeigen konnten, dass die aPDT großes Potenzial im Bereich der Periimplantitisbehandlung besitzt, liegen derzeit noch keine ausreichenden Belege dafür vor, dass die aPDT als alleinige antimikrobielle Therapie eingesetzt werden kann. Vielmehr kann sie als zusätzliches Hilfsmittel für die Behandlung dienen (Gursoy et al. 2013).

1.2.3.3 Nichtchirurgische und chirurgische Therapie

Im Allgemeinen können die Therapiemaßnahmen nicht-chirurgisch oder chirurgisch angewandt werden. Anhand von Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass nicht-chirurgische Therapiemaßnahmen allein nicht effektiv genug sind, um die Periimplantitis erfolgreich zu behandeln. Sie führten nur zu eingeschränkten Verbesserungen der klinischen Parameter und wiesen eine hohe Rezidivrate auf (Renvert et al. 2008; Meyle 2012). Ab 7 mm Sondierungstiefen sollten bereits frühzeitig chirurgische Therapien eingesetzt werden (Schwarz et al. 2006). In der chirurgischen Herangehensweise erfolgt der Zugang zum Implantat mit Hilfe einer Lappenoperation um anschließend das Granulationsgewebe zu entfernen und die Oberfläche zu reinigen und zu desinfizieren (Lindhe und Meyle 2008).

1.2.3.4 Zusammenfassung der Periimplantitistherapien

Zusammenfassend betrachtet gibt es eine große Anzahl von vielversprechenden Maßnahmen für die Behandlung der Periimplantitis. Angestrebt werden sollte eine Reinigung der Implantatoberfläche mit Entfernung und Zerstörung des Biofilms. Ebenfalls herrscht Konsens darüber, dass bei periimplantären Läsionen ein chirurgischer Zugang zum Implantat gewählt werden sollte. Aufgrund der aktuellen Studienlage kann derzeit jedoch keine überlegene Dekontaminationsmethode beschrieben werden. Zur Etablierung eines „Goldstandard“-Verfahrens sind weitere Studien notwendig (Claffey et al. 2008; Heitz-Mayfield und Mombelli 2014; Smeets et al. 2014; Kotsovilis et al. 2008). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt scheint die Kombination aus mechanischer und chemischer Dekontamination zur Therapie der Periimplantitis am erfolgversprechendsten zu sein (Schwarz et al. 2015).

1.3 Plasma als Alternative zu gängigen Therapieformen

Eine verhältnismäßig neue Desinfektionsmethode ist die Verwendung von physikalischem Plasma. Plasma entsteht, indem einem Gas (z.B. Argon) so viel Energie zugeführt wird, dass eine kritische Anzahl von Elektronen die Atomhülle verlässt. Neben fest, flüssig und gasförmig stellen Plasmen den vierten Aggregatzustand dar.

Seit Ende des 20. Jahrhunderts gelingt es Plasmen zu erzeugen, deren Temperatur 40 °C nicht übersteigen (Woedtke et al. 2013). Trotz geringer Temperaturen sind die sogenannten „cold atmospheric plasmas“, kurz CAP, ebenfalls in der Lage viele Arten von Mikroorganismen zu inaktivieren (Klämpfl et al. 2012; Maisch et al. 2012; Zimmermann et al. 2011). Zu den wichtigsten Wirkkomponenten des kalten Plasmas gehören reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies, UV-Strahlung und elektrische Felder (Woedtke et al. 2013). Als Desinfektionsmethode für Medizinprodukte konnten die atmosphärischen Niedrigtemperaturplasmen bereits gute Erfolge erzielen (Ayliffe 2000). Aufgrund der geringen Temperaturen konnte das Anwendungsgebiet des Plasmas in der Medizin deutlich ausgeweitet werden, da es mit menschlichem Gewebe in Kontakt kommen kann ohne Hitzeschäden zuzufügen. Beispielsweise kann Plasma die natürliche Wundheilung durch schmerz- und kontaktfreie Elimination der Wundkeime (Isbary et al. 2010) und durch Stimulation der Gewebeneubildung unterstützen, ohne dabei gesundes Gewebe zu zerstören (Heinlin et al. 2010; Fluhr et al. 2012). Ebenso wird Plasma die Fähigkeit zugeschrieben eine mögliche Inaktivierung von Tumorzellen zu bewirken, indem spezielle apoptotische Prozesse eingeleitet werden (Fridman et al. 2007).

Auch für die Zahnmedizin erscheint die Anwendung von Niedrigtemperaturenplasmen außerordentlich vielversprechend. Einige Studien weisen bereits auf das Potenzial des Plasmas in Bezug auf die Desinfektion von Wurzelkanälen hin (Jablonowski et al. 2013; Herbst et al. 2015). Ebenso gibt es Ansätze, die zeigen, dass mit Hilfe des Plasmas eine Verbesserung im Bereich der Periimplantitistherapie erzielt werden kann. Neben der Fähigkeit zur Dekontamination von Titanoberflächen (Idlibi et al. 2013; Rupf et al. 2011; Yang et al. 2018) scheint Plasma auch die Eigenschaft zu besitzen, die Reosseointegration von Implantaten zu verbessern (Duske et al. 2015; Coelho et al. 2012). Duske et al. (2012) stellten beispielsweise fest, dass eine

Plasmabehandlung zu einer erhöhten Hydrophilie bzw. Benetzbarkeit und somit zu einer besseren Verteilung von Osteoblasten führt.

Anhand von Ligaturen-induzierter Periimplantitis an Beagle-Hunden konnte gezeigt werden, dass der Gebrauch von Plasma zusätzlich zur mechanischen Dekontamination zu einer besseren Knochenneubildung am Implantat sowie einer Verminderung der Entzündungsreaktion im Vergleich zur Kontroll-Gruppe führt (Zhou et al. 2020). In einem ähnlichen Versuchsaufbau mit Ligaturen-induzierter Periimplantitis an Beagle-Hunden konnte sogar ein antimikrobieller Langzeiteffekt der Plasmabehandlung herausgestellt werden (Shi et al. 2015).

In der in-vitro Studie von Ulu et al. (2018) wurde die antimikrobielle Wirksamkeit von Plasma mit der von Er:YAG-Lasern verglichen. Plasma zeigte eine bessere Dekontaminationsleistung gegenüber des *S. aureus*-Biofilms, der 7 Tage lang auf den untersuchten Titandiscs herangezüchtet wurde. Ebenso konnten keine Beschädigungen auf der Titanoberfläche erfasst werden. Ein weiterer Parameter, der in der Studie untersucht wurde, war die Temperatur. Während der Laserbehandlung wurden Temperaturspitzen von bis zu 58 °C gemessen, wohingegen die Plasmabehandlung zu einer gleichmäßigen Temperaturverteilung von maximal 31,6 °C führte. Eriksson und Albrektsson (1983) gaben jedoch eine Temperatur von 47 °C als Grenzwert für eine mögliche thermische Schädigung des Knochens an. Höhere Temperaturen können demnach zu einer Hitze-induzierten Nekrose des Knochens führen.

Insgesamt betrachtet kann die Plasmaverwendung als außerordentlich vielversprechende Methode zur Periimplantitistherapie angesehen werden. Gleichwohl befindet sich die Forschung zu diesem Themengebiet noch im Anfangsstadium und weitere Studien werden benötigt, um die Eignung als geeignete Periimplantitistherapie endgültig beurteilen zu können.

1.4 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit stellt die Beantwortung der Frage dar, welche Therapieverfahren eine effektive Oberflächendekontamination von Titanimplantaten zur Behandlung einer Periimplantitis erreichen. Dazu soll Plasma als neue Reinigungsmethode mit zwei weiteren, bereits etablierten Therapiemethoden verglichen werden. Hierfür wurde einerseits die aPDT und andererseits die Phosphorsäurereinigung ausgewählt. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, die weitestgehend unabhängig von äußeren Einflussfaktoren sind, soll ein Versuchsmodell entwickelt werden, welches eine klinische Periimplantitissituation imitiert. Dazu wird zunächst ein Biofilm aus *E. faecalis* auf Titanimplantaten herangezüchtet, die sich in Kiefermodellen mit periimplantären Knochendefekten befinden. Anschließend erfolgt die Behandlung mit kaltem Atmosphärenplasma, kurz CAP (cold atmospheric plasma), der aPDT sowie Phosphorsäure. Daraufhin soll mit Hilfe der CFU, der Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung und dem Rasterelektronenmikroskop die Effektivität der Bakterienelimination beurteilt und im letzten Schritt miteinander verglichen werden.

2 Material and Methoden

2.1 Versuchsgruppenplan

Insgesamt wurden 47 Titanimplantate mit sandgestrahlter und geätzter TiPurePlus-Oberfläche (BEGO Semados® SC-Implantate, Durchmesser: 3,75 mm, Länge: 8,5 mm, von BEGO GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland) untersucht. Zwei der 47 Implantate wurden weder mit Bakterien kontaminiert noch therapiert und stellten somit die Negativ-Kontrolle dar. Die restlichen 45 Implantate wurden in drei Untersuchungsgruppen eingeteilt. Jede Gruppe bestand aus fünf Unterkieferkunststoffmodellen (Modell „Lower jaw“ Artikelnummer 57464, BEGO GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland) und 15 Implantaten. Bis auf die Positiv-Kontrollen wurden alle Implantate einer Gruppe derselben Therapieform unterzogen. Pro Kiefer diente ein Implantat als Positiv-Kontrolle und wurde vor der Therapiedurchführung aus dem Kiefer entfernt.

2.2 Herstellung der in vitro Modelle

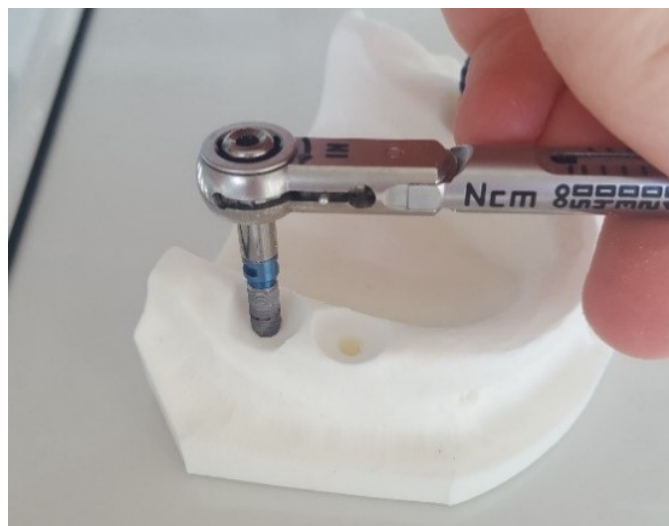


Abbildung 1: Herstellung der in-vitro Modelle: Die Implantatbohrungen und die Ausgestaltung der schüsselförmigen Knochendefekte sind bereits erfolgt. Das erste Implantat wird mit Hilfe eines Drehmomentschlüssels bis zur Markierung in die vorbereitete Implantatbohrung eingedreht.

Im gesamten Versuch wurden 15 Unterkiefermodelle und 47 Implantate verwendet. Pro Modell wurden drei Implantate eingesetzt.

Um unter dem Rasterelektronenmikroskop die exakte Grenze zwischen sich im Modell befindlicher sowie therapierter Implantatoberfläche zu erkennen, wurden die Implantate mit Hilfe von Nagellack (Manhattan Quick Dry 60 Seconds Farbe 58 U von Manhattan, New York, USA) und einer zahnärztlichen Sonde markiert.

Anschließend wurden die Bohrungen für die Implantate gemäß Herstellerprotokoll mit dem chirurgischen Tray „BEGO Semados® S-Line TrayPlus“ mit einer Tiefe von 8 mm durchgeführt. Um eine möglichst patientengetreue Situation zu schaffen, wurde eine 4 mm tiefe Mulde, die einen schüsselförmigen Knochendefekt simuliert, mittels einer großen Kugelfräse ausgearbeitet. Pro Kiefer wurden je zwei Implantate in den vierten Quadranten und ein Implantat in den dritten Quadranten inseriert, um die Form der Unterkiefermodelle optimal zu nutzen (siehe Abbildung 1).

2.3 Biofilmbesiedlung



Abbildung 2: Positionierung der Kiefermodelle: Kiefermodelle mit eingeschraubten Implantaten in einer Box. Die Modelle werden vor dem Desinfizieren umgedreht in der Box platziert.



Abbildung 3: Kiefermodelle mit Bakteriensuspension: Kiefermodelle mit Implantaten umgedreht in der Box mit Bakteriensuspension, wodurch eine kontinuierliche Benetzung gewährleistet wird.

Die Kiefermodelle mit den Implantaten wurden zur Biofilmbesiedlung in Boxen (Eppendorf-Pipettenspitzen-Mehrwegboxen, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) platziert. Einen Tag vor Versuchsstart wurde eine Übernachtskultur aus 10 ml steriler Nährstofflösung (BHI, Brain-Heart-Infusion Broth, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und 100 µl Bakterienkultur mit *E. faecalis* (ATCC 29212) angesetzt. Diese verblieb 16 Stunden lang bei 37 °C im Brutschrank (Heraeus B6060, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland). Die Boxen mit den darin befindlichen Modellen wurden bei 121 °C im Schonprogramm thermisch desinfiziert (Autoklav Melag Vacuklav 24, MELAG Medizintechnik oHG, Berlin, Deutschland). Vor der thermischen Desinfektion wurden die Modelle umgedreht, d.h. mit den Implantaten in Richtung Boxenboden, in die Boxen platziert, um eine kontinuierliche Benetzung mit Bakteriensuspension zu ermöglichen (siehe Abbildung 2). Am Tag des Versuchstarts wurden die Boxen mit 200 ml steriler BHI und 100 µl der Übernachtskultur infiziert (siehe Abbildung 3) und anschließend bei 37 °C im Inkubator inkubiert (Scientific C24 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA). Nach 4 Stunden wurde die optische Dichte im Spektralphotometer (BioPhotometer 6131, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 600 nm (OD600) überprüft. Lag die OD600 bei $\geq 0,8$, konnte das Medium gegen 200 ml neue, sterile BHI ausgetauscht werden. War dies nicht der Fall, wurde die OD600 im 5-Minuten-Takt ermittelt, bis diese bei \geq

0,8 lag. Im Folgenden wurde die Nährstofflösung täglich weitere sechs Tage lang durch 200 ml sterile BHI erneuert, um den Bakterien neue Nährstoffe zur Verfügung zu stellen und Stoffwechselprodukte der Bakterien zu entfernen. damit optimale Konditionen für eine Biofilmbildung gewährleistet wurden. Dabei lagerten die Boxen bei 37 °C und die Implantate waren durchgehend mit Bakteriensuspension in Kontakt.

2.4 Therapiedurchführung

2.4.1 Positiv-Kontrolle

Um Verfälschungen der Ergebnisse auszuschließen, wurden die Positiv-Proben vor Beginn der Therapie aus den Kiefern entfernt. Hierfür wurde ein Implantat jedes Kiefermodells mit Hilfe steriler Instrumente des „Semados® S-Line TrayPlus“ aus dem Kiefer geschraubt. Erst dann konnten die verschiedenen Therapieformen an den verbliebenen zwei Implantaten pro Kiefer angewandt werden.

2.4.2 Gruppe 1: Plasma

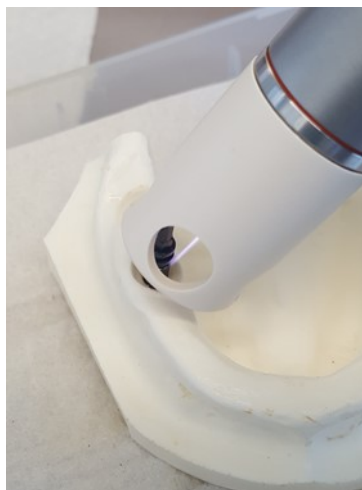


Abbildung 4: Behandlung eines Implantates mit dem kinPen® MED; der weiße Abstandshalter gewährleistet den korrekten Abstand.

Die Implantate der Gruppe 1 wurden zunächst jeweils 15 Sekunden mit einer Kunststoffkürette (Implacare II-Spitzen, Hu-Friedy, Frankfurt am Main, Deutschland), welche im empfohlenen Arbeitswinkel angesetzt wurde, mit sich überlappenden Arbeitszügen bearbeitet. Im Anschluss erfolgte die Behandlung mit kaltem Plasma für

3 Minuten pro Implantat. Hierfür wurde der kINPen® MED (neoplas tools GmbH, Greifswald, Deutschland) mit einer Leistung von 5 Watt und Argon-Gas verwendet, welcher als CE-zertifiziertes Medizinprodukt (Klasse IIa) zugelassen ist. Der Abstandshalter gewährleistete dabei die Einhaltung des korrekten Abstandes (siehe Abbildung 4).

2.4.3 Gruppe 2: Phosphorsäure

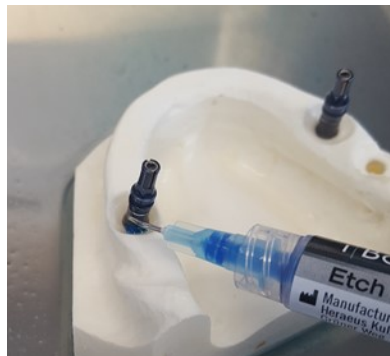


Abbildung 5: Behandlung eines Implantates mit Phosphorsäure

Auch die Implantate der Gruppe 2 wurden erst jeweils 15 Sekunden in analoger Weise mit einer Kunststoffkürette (Implacare II-Spitzen, Hu-Friedy, Frankfurt am Main, Deutschland) bearbeitet, bevor 35 %ige Phosphorsäure (iBond etch 35 gel, Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland) auf die freiliegenden Implantatoberflächen aufgetragen wurden (siehe Abbildung 5). Die Säure wurde nach 45 Sekunden Einwirkzeit mit 5 ml steriler NaCl-Lösung abgespült, sodass keine Rückstände mehr verblieben.

2.4.4 Gruppe 3: PDT

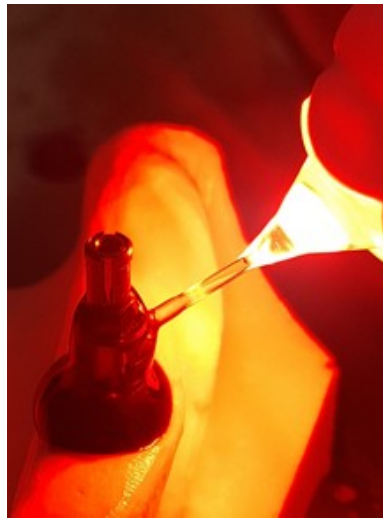


Abbildung 6: Behandlung eines Implantates mit der PDT: Der LED-Lichtpen FotoSan 630 belichtet den Photosensibilisator Toluidinblau auf einem Implantat.

Die Implantate der Gruppe 3 wurden ebenfalls jeweils 15 Sekunden in analoger Weise mit einer Kunststoffkürette (Implacare II-Spitzen, Hu-Friedy, Frankfurt am Main, Deutschland), bearbeitet. Danach wurden die freiliegenden Implantatoberflächen mit Photosensibilisator Toluidinblau (FotoSan®Agent MEDIUM, LOSER & CO GmbH, Leverkusen, Deutschland) benetzt und mit dem LED-Lichtpen FotoSan 630 (LOSER & CO GmbH, Leverkusen, Deutschland) 10 Sekunden pro Fläche (mesial, distal, lingual, vestibulär) mit einer Wellenlänge von 630 nm belichtet (siehe Abbildung 6). Bei den Aufsätzen des LED-Lichtpens handelte es sich um die kurzen Perio-Tips (LOSER & CO GmbH, Leverkusen, Deutschland). Um den Farbstoff nach der Belichtung vollständig von der Implantatoberfläche zu entfernen, wurde er mit 5 ml steriler NaCl-Lösung abgespült.

2.4.5 Negativ-Kontrolle

Zwei Implantate dienten als Negativ-Kontrolle. Sie wurden daher weder beimpft noch einer Therapieform unterzogen.

Nach der Therapiedurchführung wurden die Implantate mit Hilfe steriler Instrumente aus dem Semados® S-Line TrayPlus herausgeschraubt und ohne Zeitverzug den Laboruntersuchungen zugeführt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht über die Therapiedurchführung: Die Tabelle zeigt, welche Anzahl von Implantaten bakteriell besiedelt und welcher Therapie sie anschließend unterzogen wurde (a: cold atmospheric plasma, b: Phosphorsäure, c: photodynamische Therapie, d: keine).

Gruppe	Anzahl Implantate	Bakt. Besiedlung	Behandlung
1 (Plasma)	10	✓	Kürettage & CAP ^a
	5 (Positiv-Kontrolle)	✓	- ^d
2 (Phosphorsäure)	10	✓	Kürettage & Phos. ^b
	5 (Positiv-Kontrolle)	✓	- ^d
3 (PDT ^c)	10	✓	Kürettage & PDT ^c
	5 (Positiv-Kontrolle)	✓	- ^d
Negativ-Kontrolle	2	- ^d	- ^d

2.5 Methoden der Laboruntersuchungen

2.5.1 Gramfärbung

Um sicherzustellen, dass keine Kontamination mit fremden Bakterien stattgefunden hat, wurde von jeder Bakteriensuspension zunächst eine Gramfärbung durchgeführt. Dazu wurden 5 µl Suspension aus jeder Box auf einen Objektträger aufgetragen, ausgestrichen, luft- und dann hitzegetrocknet, indem sie durch die Bunsenbrennerflamme gezogen wurden. Im Anschluss daran wurde der Farbstoff Karbolkristallviolett (Grams Karbol-Gentianaviolett-Lösung, Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen. Nach 2 Minuten Einwirkzeit wurde der Farbstoff mit Lugols Lösung abgespült, welche wiederum 2 Minuten auf dem Ausstrich verblieb. Nun erfolgte die Entfärbung. Dazu wurde das Präparat über drei Passagen in 100 %igen Ethanol getaucht, bis kein Farbstoff mehr ausgewaschen wurde. Die Gegenfärbung erfolgte mit verdünntem Safranin (0,1 %ig), welches ebenfalls 2 Minuten einwirken musste. Das Präparat wurde mit Leitungswasser und anschließend mit destilliertem Wasser gespült und an der Luft getrocknet, bevor es mit Immersionsöl und ohne Deckglas auf Fremdkontamination unter dem Mikroskop (Axioplan 2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) untersucht wurde.

2.5.2 CFU-Bestimmung

Für die Bestimmung der CFU wurden die Implantate nach dem Entfernen aus dem Kiefer in je ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml steriler NaCl-Lösung gelegt. Hier verblieben sie eine Minute bevor sie mit einer sterilen anatomischen Pinzette in ein zweites Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml steriler NaCl-Lösung umgesetzt wurden, damit überschüssige Nährstofflösung und Bakterien ausgewaschen wurden. Um die Bakterien von der Implantatoberfläche zu lösen, wurden die Implantate im Eppendorf-Reaktionsgefäß 20 Minuten lang im Ultraschallbad (Ultraschallbad Branson 2210R-MT Ultrasonic Cleaner, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury/CT, USA) ausgeschüttelt. Nun erfolgte die Verdünnung der Bakteriensuspension auf 10^{-2} und 10^{-4} . Die verschiedenen Verdünnungsstufen wurden auf Caso-Agarplatten (CASO-Agar Ph.Eur., Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) aufgetragen und bei 37°C im Brutschrank (Brutschrank Heraeus B6060, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Auszählung der koloniebildenden Einheiten mit dem Keimzählgerät (Keimzählgerät BZG 25 von WTW, Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland).

2.5.3 Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung

2.5.3.1 Herstellen der Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung

Für die Herstellung der LIVE/DEAD BacLight Fluoreszenzfärbelösung wurden 3 µl Propidium Iodide und 3 µl STYTO™ aus dem LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit L7007 (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, USA) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, vorsichtig mit der Pipette vermischt und mit 2 ml steriler NaCl-Lösung aufgefüllt. Diese Lösung wurde zum Schutz vor Lichteinfall in Aluminiumfolie gewickelt und im Dunkeln gelagert.

2.5.3.2 Zentrifugieren

Aus den Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit den Implantaten, die bereits im Ultraschallbad waren, wurden die Implantate vorsichtig mit einer sterilen anatomischen Pinzette entfernt. Die Suspensionen wurden 10 Minuten lang mit einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (RZB) von 3000 und einer Temperatur von 20 °C

zentrifugiert (Zentrifuge Sigma 3K30, Rotor 12154, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland). Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert, sodass 50 µl im Reaktionsgefäß verblieben.

2.5.3.3 Fluoreszenzmikroskopie

In jedes Eppendorf-Reaktionsgefäß mit zentrifugierten Bakterien wurden 50 µl der oben hergestellten LIVE/DEAD BacLight Färbelösung hinzugefügt. Daraufhin wurden die Reaktionsgefäße 10 Sekunden auf dem Vortexmischer (Vortexmischer K-550-GE, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) geschüttelt und nachfolgend 15 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden aus jedem Reaktionsgefäß 5 µl auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem Deckgläschen sowie Immersionsöl bedeckt. Um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern, wurde der jeweilige Objektträger erst direkt vor der mikroskopischen Untersuchung vorbereitet. In der Zwischenzeit lagerten die Reaktionsgefäße bei Dunkelheit. Für die Auswertung wurde das Axioplan 2 Mikroskop mit der Digitalkamera AxioCam MRc und dem Softwarepaket AxioVision (alles Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) zu Hilfe genommen. Dafür wurden von jedem Implantat jeweils 10 zufällige Bildausschnitte gewählt, die einmal mit dem Emissionsfilter 470/40 für grüne Bakterien (siehe Abbildung 8) und einmal mit dem Emissionsfilter 546/12 für rote Bakterien (siehe Abbildung 7) aufgenommen wurden, um grüne und rote Bakterien optimal erkennbar zu machen. Dies geschah mit einer 100fachen Vergrößerung. Anschließend erfolgte die Auswertung. Dazu wurden sowohl die grünen also als auch roten Keime ausgezählt.

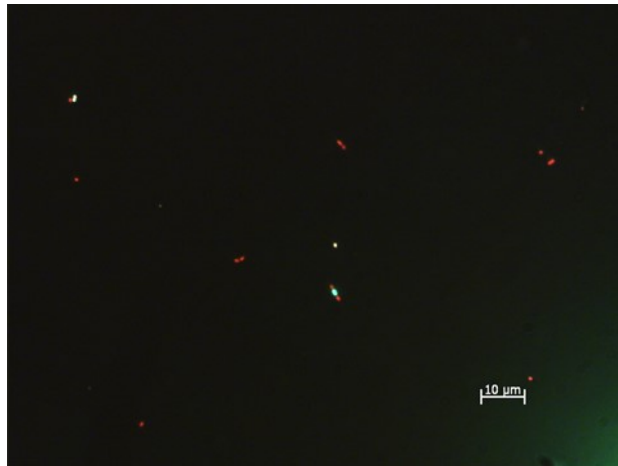


Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme mit dem Emissionsfilter 546/12:
Rote/ tote Bakterien können in einer 100fachen Vergrößerung voneinander abgegrenzt und ausgezählt werden.

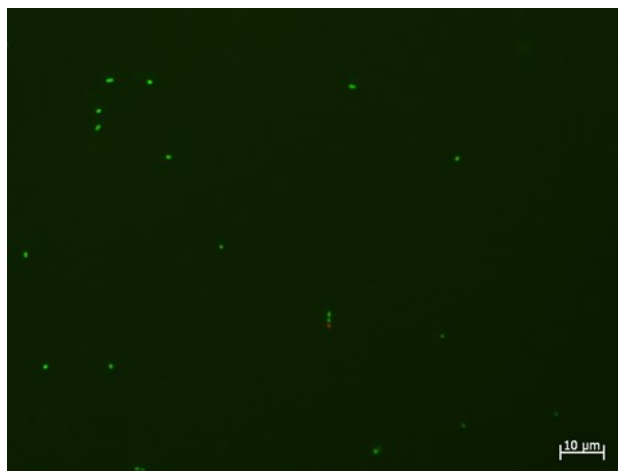


Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme mit dem Emissionsfilter 470/40:
Grüne/ lebende Bakterien können mit einer 100fachen Vergrößerung voneinander abgegrenzt und ausgezählt werden.

2.5.4 Rasterelektronenmikroskopie

Die Implantate, die unter dem Rasterelektronenmikroskop untersucht werden sollten, wurden nach dem Entfernen aus dem Unterkieferkunststoffmodell 1 Minute lang mit PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung, Dulbeco, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) gewaschen, bevor sie 2 Stunden lang mit 1 ml 4 %igem Glutaraldehyd im Kühlschrank fixiert wurden. Nach Ablauf der Zeit wurden die Implantate dreimal je 5 Minuten mit PBS gewaschen. Es erfolgte die Dehydrierung mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe. Dafür wurden die Implantate zweimal je 5 Minuten in 30 %igem, 50 %igem, 70 %igem, 90 %igem und 100 %igem Ethanol gelagert. Anschließend wurden die Implantate so lange luftgetrocknet, bis das 100 %ige Ethanol vollständig

verflogen war. Nachfolgend wurden die Implantate auf REM-Probentellern (Agar Scientific Ltd, Stansted, Essex, Vereinigtes Königreich) befestigt und über Nacht in einem Exsikkator (Erich Eydam KG, Kiel, Deutschland) gelagert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Sputterung mit 5 nm Gold (BAL-TEC SCD 500, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) und die Untersuchung am Rasterelektronenmikroskop (Philips XL 30 ESEM, Philips GmbH Market DACH, Hamburg, Deutschland). Pro Implantat wurden fünf Sichtfelder in 5000facher und fünf Sichtfelder in 8000facher Vergrößerung aufgenommen. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die Aufnahmen an festen Lokalisationen, welche sich an den Implantatwindungen und an der Nagellackmarkierung orientierte, gemacht. Im Anschluss daran erfolgte eine semiquantitative Auswertung in 3 Stufen: - (keine Bakterien) / + (vereinzelte/wenige Bakterien) / ++ (viele Bakterien).

2.6 Versuchsauswertung

Die Daten wurden mittels Microsoft Excel 2016 aufbereitet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (IBM SPSS Statistics Version 27, Chicago, IL, USA). Mit diesem Programm wurden neben der statistischen Auswertung auch die graphischen Darstellungen erstellt. Zur Analyse der CFU-Werte, der Rot-Grün-Quotienten, der Gesamtanzahl von Keimen sowie der semiquantitativen Auswertung der REM-Aufnahmen wurde der non-parametrische Kruskal-Wallis-Test herangezogen, da die Voraussetzungen für ein parametrisches Verfahren nicht gegeben waren (keine Normalverteilung). Anschließend wurden Post-hoc-Tests durchgeführt.

Für den Vergleich der restlichen fluoreszenzmikroskopischen Daten wurden die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) sowie anschließende Post-hoc-Tests durchgeführt.

Als statistische Signifikanzgrenze wurde $p \leq 0.05$ ($\alpha=5\%$) angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Gramfärbung

In den untersuchten Bakteriensuspensionen aus den insgesamt neun verwendeten Boxen konnte mit Hilfe der Gramfärbung keine Fremdkontamination festgestellt werden. Es konnten lediglich grampositive Kokken identifiziert werden, die sich für Enterokokken charakteristisch paarweise oder zu Ketten angeordnet hatten.

3.2 CFU

Die Plasmareinigung der Implantate hinterließ mit durchschnittlich $1,24 \times 10^5$ CFU/ml mit Abstand am wenigsten vermehrungsfähige Mikroorganismen. Die mit durchschnittlich $8,28 \times 10^6$ CFU/ml höchste Anzahl von koloniebildenden Einheiten wurde hingegen auf den Agarplatten der mit der PDT therapierten Implantate gefunden. Bei den Implantaten, die mit Phosphorsäure bearbeitet wurden, konnten im Durchschnitt $3,14 \times 10^6$ CFU/ml gezählt werden (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Deskriptive Statistik der CFU-Werte der 5 Untersuchungsgruppen mit den statistischen Größen Mittelwert (M), Median (Md), Minimum (Min), Maximum (Max) und Standardabweichung (SD); a: Photodynamische Therapie (Einheit CFU/ml: Colony Forming Units pro ml).

Gruppe	M [CFU/ml]	Md [CFU/ml]	Min [CFU/ml]	Max [CFU/ml]	SD [CFU/ml]
Positiv-Kontrolle	$7,12 \times 10^6$	$4,7 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$	$4,7 \times 10^6$
Plasma	$1,24 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$3,36 \times 10^4$
Phosphorsäure	$3,14 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$6,3 \times 10^6$	2×10^6
PDT ^a	$8,28 \times 10^6$	$7,1 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$	$4,9 \times 10^6$
Negativ-Kontrolle	0	0	0	0	0

Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests und anschließenden Post-hoc-Tests (Dunn-Bonferroni-Tests) wurde bestimmt, welche Gruppen sich signifikant voneinander unterscheiden (siehe Tabelle 3). Es konnte gezeigt werden, dass sich auf den

Agarplatten der mit Plasma behandelten Implantate signifikant weniger koloniebildende Einheiten entwickeln konnten als auf den Positiv-Kontrollen ($p = 0,006$).

Die mit der PDT ($p = 1,000$) und die mit Phosphorsäure ($p = 0,874$) behandelten Implantate hingegen zeigten keinen signifikanten Unterschied zu den Positiv-Kontrollen.

Im Vergleich der Gruppen untereinander unterschieden sich nur die Plasma-Gruppe und die PDT-Gruppe signifikant voneinander ($p = 0,005$). Alle anderen Gruppen wiesen jedoch keinen signifikanten Unterschied zueinander auf.

Tabelle 3: Paarweise Vergleiche der Experimentalgruppen hinsichtlich der Colony Forming Unit-Werte; Anmerkung: Angepasste Signifikanzwerte mittels der Bonferroni-Korrektur für mehrere (6) Tests; a: Photodynamische Therapie, b: Positiv-Kontrolle, **: $p \leq 0,05$.

	Plasma	Phosphorsäure	PDT ^a	Positiv ^b
Plasma		0.643	0.005**	0.006**
Phosphorsäure	0.643		0.486	0.874
PDT ^a	0.005**	0.486		1.000
Positiv ^b	0,006**	0.874	1.000	

Bei der Betrachtung der CFU-Werte fällt allerdings auf, dass im Mittel statt einer Keimreduktion eine Keimvermehrung nach PDT-Behandlung im Vergleich zu den Positiv-Kontrollen, die nicht behandelt wurden, zu verzeichnen ist. Hier muss berücksichtigt werden, dass es sich bei dem CFU-Wert der Positiv-Kontrollen um den Mittelwert der gesamten Positiv-Kontrollen aus allen drei Untersuchungsgruppen handelt. Insgesamt wurden pro Versuchsreihe nur drei Implantate als Positiv-Kontrolle für die CFU-Bestimmung herangezogen. Durch Mittelwertbildung aller Positiv-Kontrollen aus allen Untersuchungsgruppen konnte daher eine größere Datenmenge zum Vergleich geschaffen werden. In der Versuchsreihe der PDT konnten auf den Implantaten insgesamt mehr Keime angezüchtet werden als in den anderen beiden Gruppen, wie die einzeln betrachteten CFU-Werte zeigen (siehe Tabelle 4). Wenn nur die CFU-Werte der Positiv-Kontrollen aus der PDT-Gruppe für sich untersucht werden,

kann auch nach PDT-Therapie eine leichte Bakterienreduktion um den Faktor 10^1 festgestellt werden.

Tabelle 4: Vergleich der CFU-Mittelwerte der einzelnen Versuchsreihen (Einheit CFU/ml: Colony Forming Units pro ml); a: Photodynamische Therapie.

Gruppen	CFU-Mittelwerte der Positiv-Kontrollen [CFU/ml]	CFU-Mittelwerte nach Therapie [CFU/ml]
Plasma	$3,76 \times 10^6$	$1,24 \times 10^5$
Phosphorsäure	$5,13 \times 10^6$	$3,14 \times 10^6$
PDT ^a	$1,25 \times 10^7$	$8,28 \times 10^6$

3.3 Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung

3.3.1 Tote Keime

Das folgende Boxplot-Diagramm (Abbildung 9) gibt einen Überblick über die Anzahl von toten Keimen pro Bildausschnitt der verschiedenen Gruppen nach der LIVE/DEAD BacLight Färbung. Es werden der Median, das obere und das untere Quartil, die Extremwerte sowie die signifikanten Unterschiede dargestellt.

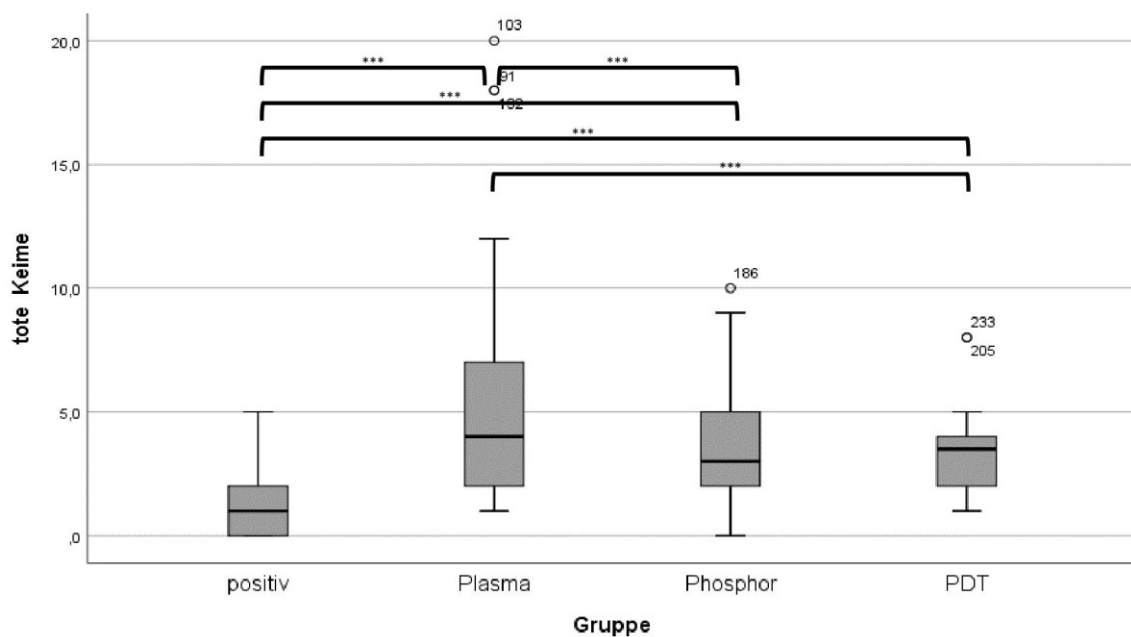


Abbildung 9: Boxplot-Darstellung der Anzahl von toten Keimen pro Bildausschnitt bei der Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung und signifikante Differenzen (***) $p \leq 0,001$; positiv: Positiv-Kontrolle, Phosphor: Phosphorsäure, PDT: Photodynamische Therapie, O & Fallnummer: leichte Ausreißer (mehr als 1,5 Standardabweichungen vom Mittelwert entfernt).

Tabelle 5: Deskriptive Statistik der toten Keime pro Bildausschnitt bei der Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung mit den statistischen Größen Mittelwert (M), Median (Md), Minimum (Min), Maximum (Max) und Standardabweichung (SD) (Einheit: Anzahl toter Keime pro Bildausschnitt); a: Positiv-Kontrolle, b: Photodynamische Therapie, c: Negativ-Kontrolle.

	M	Md	Min	Max	SD
Positiv ^a	1,29	1,00	1,00	5,00	1,21
Plasma	5,32	4,00	1,00	20,00	4,47
Phosphorsäure	3,30	3,00	0,00	10,00	2,24
PDT ^b	3,40	3,50	1,00	8,00	1,6
Negativ ^c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bei Betrachtung der deskriptiven Statistik der toten Keime fällt folgendes auf (siehe Tabelle 5): Mit durchschnittlich 5,32 roten Keimen pro Bildausschnitt wurde mit der Plasmabehandlung die größte Anzahl von toten Keimen erzielt. Für die Behandlung mit Phosphorsäure betrug sie im Mittel 3,30 rote Keime pro Bildausschnitt und für die PDT 3,40 rote Keime pro Bildausschnitt.

Mit Hilfe der einfaktoriellen ANOVA sowie anschließenden Post-Hoc-Tests (Tukey-Tests) konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen Menge der toten Keime nach Plasmabehandlung im Vergleich zu den Implantaten, welche mit Phosphorsäure ($p < 0,001$) und der PDT ($p = 0,001$) behandelt wurden, bestand.

Die mittlere Anzahl an toten Keimen bei der Phosphorsäure-Therapie sowie bei der PDT unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($p = 0,997$).

Im Vergleich zu den Positiv-Kontrollen bestand jedoch zu allen drei Therapieoptionen ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$).

3.3.2 Lebende Keime

Das folgende Boxplot-Diagramm (Abbildung 10) gibt einen Überblick über die Anzahl von lebenden Keimen pro Bildausschnitt der verschiedenen Gruppen nach der LIVE/DEAD BacLight Färbung. Es werden der Median, das obere und das untere Quartil, die Extremwerte sowie die signifikanten Unterschiede dargestellt.

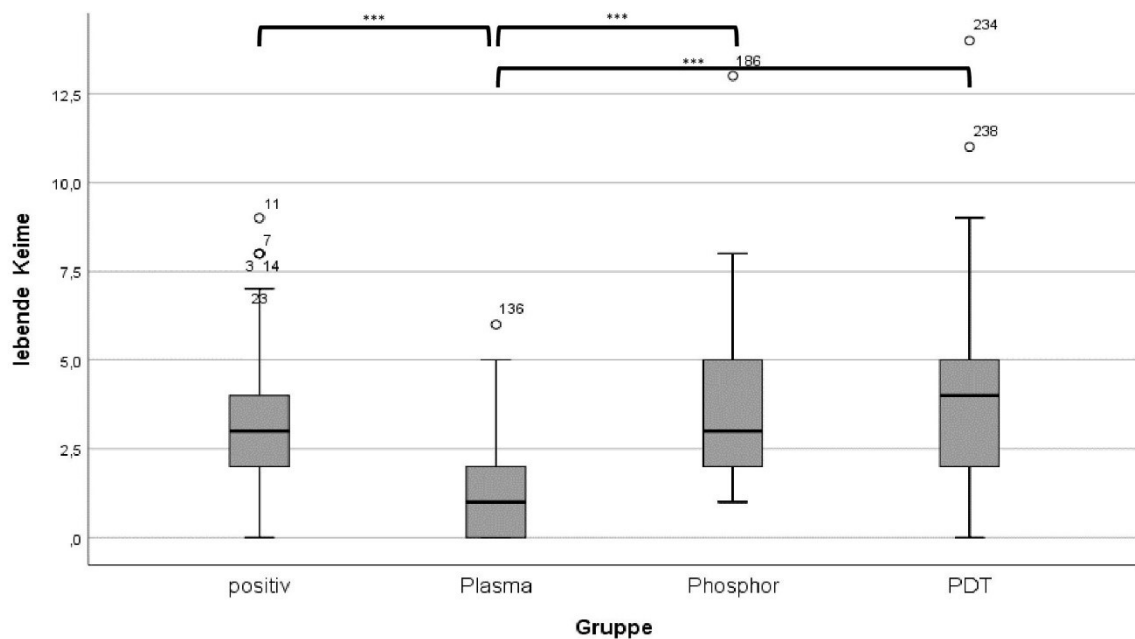


Abbildung 10: Boxplot-Darstellung der Anzahl von lebenden Keimen pro Bildausschnitt bei der Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung und signifikante Differenzen (***) $p \leq 0,001$; positiv: Positiv-Kontrolle, Phosphor: Phosphorsäure, PDT: Photodynamische Therapie, ○ & Fallnummer: leichte Ausreißer (mehr als 1,5 Standardabweichungen vom Mittelwert entfernt).

Tabelle 6: Deskriptive Statistik der lebenden Keime pro Bildausschnitt bei der Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung mit den statistischen Größen Mittelwert (M), Median (Md), Minimum (Min), Maximum (Max) und Standardabweichung (SD) (Einheit: Anzahl lebender Keime pro Bildausschnitt); a: Positiv-Kontrolle, b: Photodynamische Therapie, c: Negativ-Kontrolle.

	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	SD
Positiv ^a	3,54	3,00	0,00	13,00	2,38
Plasma	1,28	1,00	0,00	6,00	1,6
Phosphorsäure	3,74	3,00	1,00	13,00	2,35
PDT ^b	4,24	4,00	14,00	8,00	2,68
Negativ ^c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Die Tabelle 6 zeigt, dass nach Plasmatherapie im Durchschnitt nur 1,28 Keime pro Bildausschnitt die Behandlung überlebten. Phosphorsäure und die PDT wiederum hinterließen durchschnittlich 3,74 sowie 4,24 lebende Keime nach der Therapie. Nach Anwendung der einfaktoriellen ANOVA sowie anschließenden Post-Hoc-Tests (Tukey-Tests) lässt sich damit bei der Plasmagruppe ein signifikanter Unterschied zu den anderen beiden Therapieoptionen feststellen ($p < 0,001$), wohingegen die Phosphorsäuregruppe und die PDT-Gruppe keinen signifikanten Unterschied zueinander aufwiesen ($p = 0,699$).

Bei Mitbeurteilung der Positiv-Kontrollen kann konstatiert werden, dass nach Plasmatherapie signifikant weniger lebende Keime vorhanden waren als bei Nichtbehandlung ($p < 0,001$). Bei der Phosphorsäuretherapie und der PDT hingegen waren im Mittel sogar mehr lebende Keime zu finden als bei der Positiv-Kontrolle. Ein statistisch signifikanter Unterschied bestand nicht.

3.3.3 Gesamtanzahl Keime

Tabelle 7: Deskriptive Statistik der Gesamtanzahl von Keimen pro Bildausschnitt bei der Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung mit den statistischen Größen Mittelwert (M), Median (Md), Minimum (Min), Maximum (Max) und Standardabweichung (SD). (Einheit: Gesamtanzahl Keime pro Bildausschnitt); a: Positiv-Kontrolle, b: Photodynamische Therapie, c: Negativ-Kontrolle.

	M	Md	Min	Max	SD
Positiv ^a	4,83	4,00	1,00	15,00	2,80
Plasma	6,60	5,00	1,00	22,00	5,05
Phosphorsäure	7,04	5,50	2,00	23,00	4,01
PDT ^b	7,64	7,00	3,00	19,00	3,14
Negativ ^c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Der Mittelwert der Gesamtanzahl der Keime pro Bildausschnitt ist relevant, um den Zusammenhang zu erklären, dass nach Phosphorsäuretherapie und PDT im Durchschnitt mehr lebende Keime in absoluten Zahlen vorhanden waren als bei den Positiv-Kontrollen. Der Mittelwert der Gesamtanzahl lebender und toter Keime der Positiv-Kontrollen betrug nur 4,83 Keime (siehe Tabelle 7), wohingegen die durchschnittliche Gesamtzahl der Keime in den Untersuchungsgruppen der Phosphorsäure und der PDT bei 7,04 und 7,64 Keimen lag. Sie wiesen damit sogar einen signifikanten Unterschied zu der Gesamtanzahl der Keime pro Bildausschnitt der Positiv-Kontrollen auf (Phosphorsäure $p = 0,005$, PDT $p = 0,000$).

3.3.4 Rot-Grün-Quotient

Die toten Keime stellen sich bei der Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung rot dar, die lebenden Keime wiederum grün. Teilt man die Anzahl roter Keime durch die Anzahl grüner Keime, so erhält man den Rot-Grün-Quotienten. Je höher dieser Wert, desto größer ist der Anteil an toten Keimen, desto besser war folglich die Dekontaminationsleistung der jeweiligen Therapieoption.

In der Abbildung 11 wird deutlich, dass der höchste durchschnittliche Rot-Grün-Quotient von 4,2 der Plasmabehandlung zuzuordnen ist. Das bedeutet, dass nach Plasmatherapie verhältnismäßig viele Keime abgetötet wurden. Die Phosphorsäure-Therapie wies mit einem durchschnittlichen Rot-Grün-Quotienten von 0,9 einen

deutlich niedrigeren Wert auf, ebenso wie die PDT mit einem durchschnittlichen Rot-Grün-Quotienten von 0,8. Die Phosphorsäuretherapie und die PDT haben damit im Verhältnis weniger tote Keime produziert als die Plasmatherapie. Ein signifikanter Unterschied zueinander bestand allerdings nicht.

Die Positiv-Kontrollen zeigten mit einem kleinen durchschnittlichen Rot-Grün-Quotienten von 0,4, dass im Verhältnis wenig rote und viele grüne Keime gezählt worden sind. Ebenfalls wurde deutlich, dass sich sowohl der Rot-Grün-Quotient der Phosphorsäure-Therapie ($p = 0,139$) als auch der Rot-Grün-Quotient der PDT ($p = 0,205$) nicht signifikant von den Positiv-Kontrollen unterscheiden ganz im Gegensatz zum Rot-Grün-Quotienten der Plasmabehandlung. Dieser unterscheidet sich wiederum signifikant von dem Quotienten der Positiv-Kontrollen ($p = 0,000$).

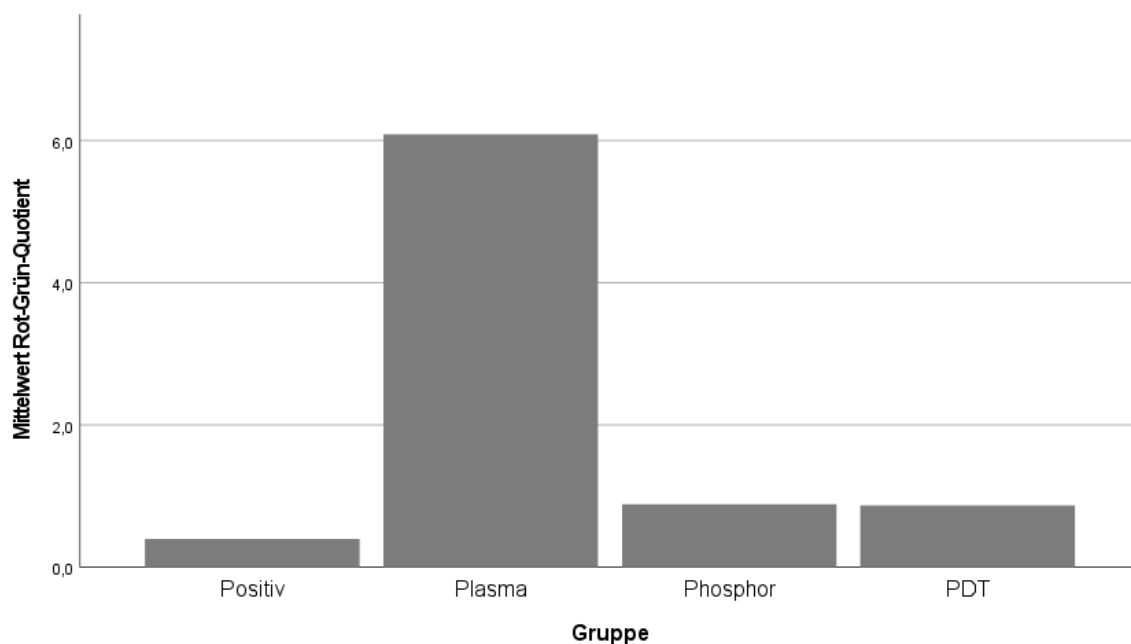


Abbildung 11: Mittelwerte der Rot-Grün-Quotienten (Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung) errechnet aus durchschnittlicher Anzahl roter Keime geteilt durch durchschnittliche Anzahl grüner Keime; je höher der Wert, desto größer der Anteil an toten Keimen; Positiv: Positiv-Kontrolle, Phosphor: Phosphorsäure, PDT: Photodynamische Therapie.

3.4 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

3.4.1 REM der Positiv-Kontrollen

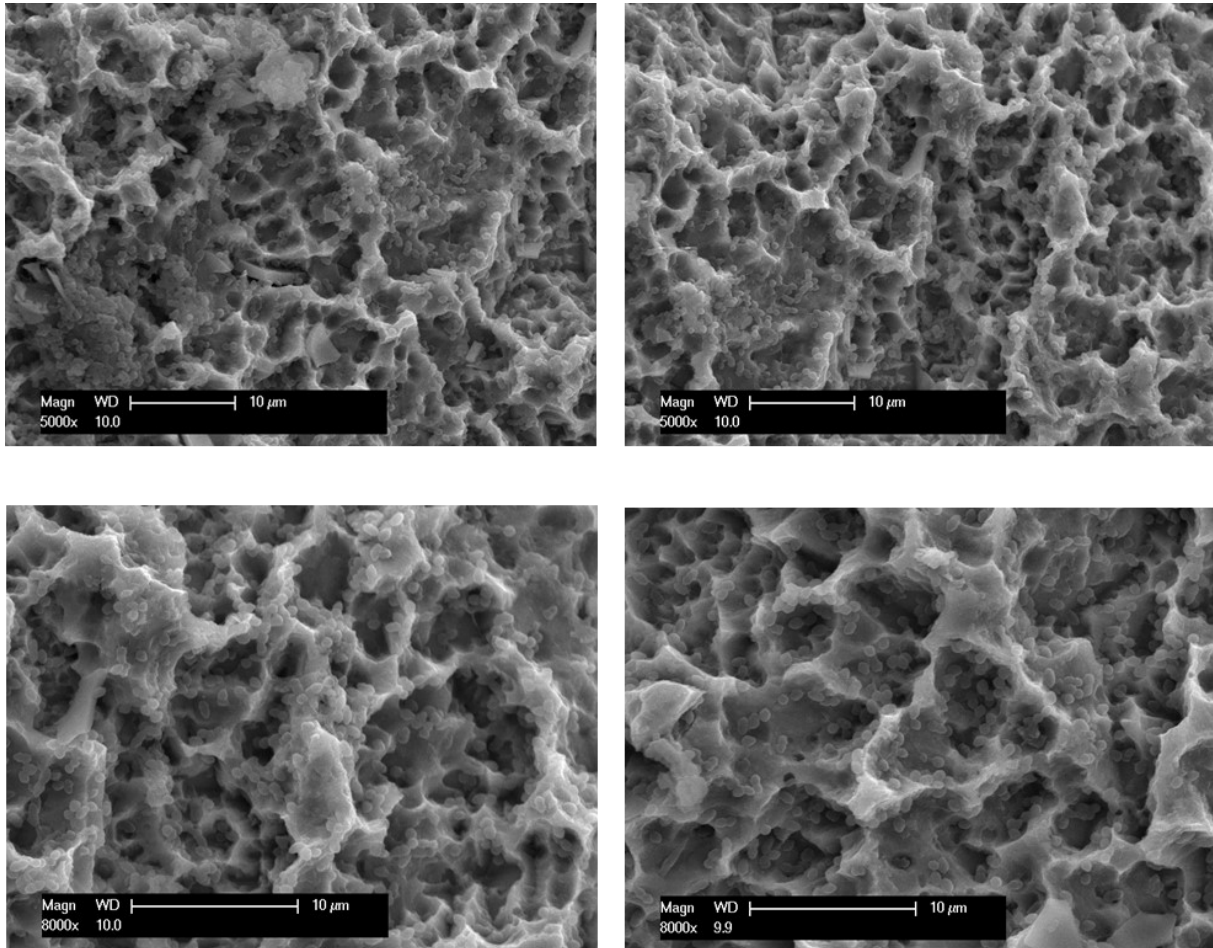


Abbildung 12: REM-Aufnahmen von Implantatoberflächen der Positiv-Kontrollen mit *E. faecalis*; oben links und oben rechts: 5000fache Vergrößerung; unten links und unten rechts: 8000fache Vergrößerung.

Alle nicht therapierten Proben zeigten unter dem Rasterelektronenmikroskop deutliches mikrobielles Wachstum auf der sandgestrahlten und säuregeätzten Implantatoberfläche (siehe Abbildung 12). Ebenso konnte die spezifische Form von *E. faecalis* identifiziert werden.

3.4.2 REM der mit Plasma behandelten Implantate

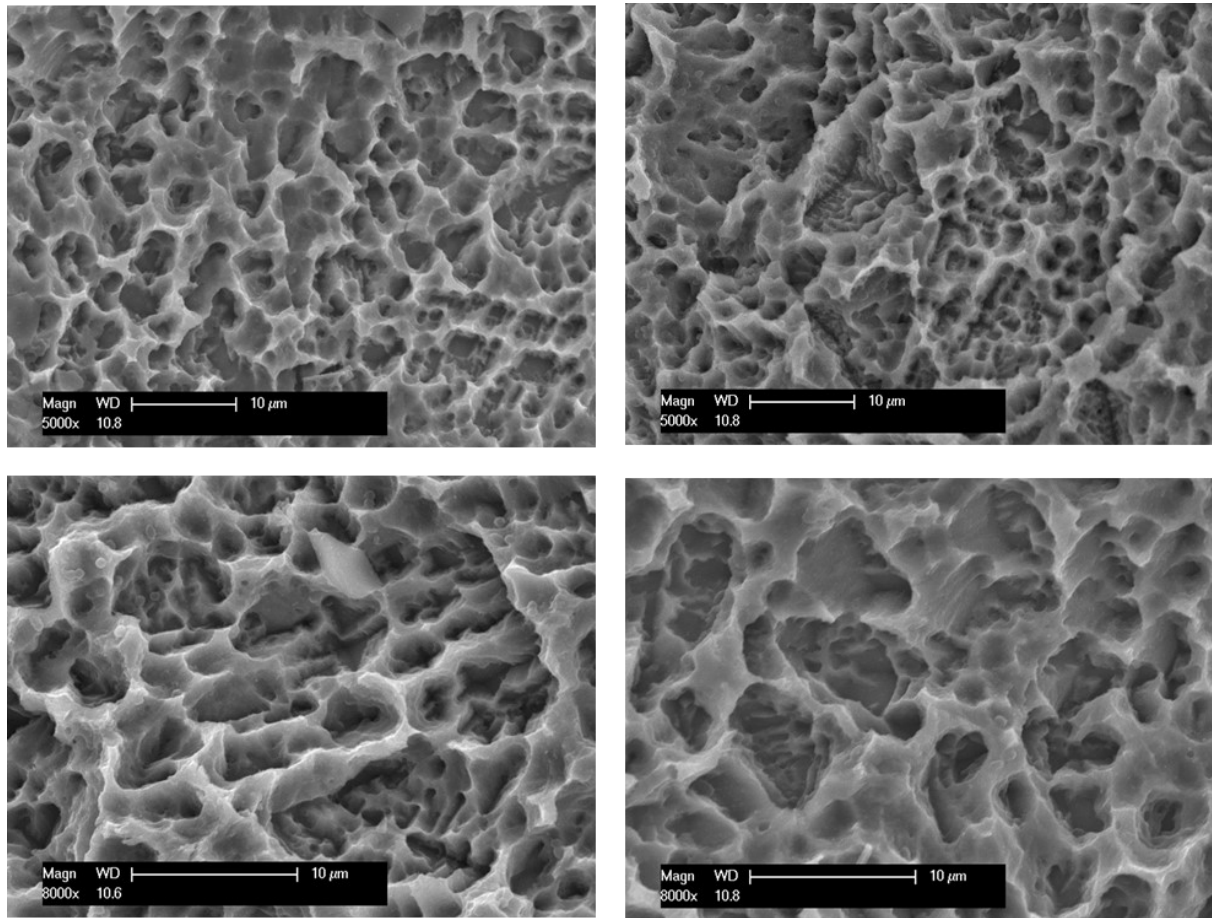


Abbildung 13: REM-Aufnahmen von plasmabehandelte Implantatoberflächen; oben links und oben rechts: 5000fache Vergrößerung; unten links und unten rechts: 8000fache Vergrößerung

Unter dem Rasterelektronenmikroskop konnte auf den mit Plasma behandelten Implantaten eine deutlich reduzierte Anzahl von Bakterien im Vergleich zu den Positiv-Kontrollen festgestellt werden (siehe Abbildung 13). Diese waren überwiegend in den Vertiefungen der Titanoberfläche zu finden. Verglichen mit den Positiv-Kontrollen konnte keine Veränderung oder Beschädigung der Struktur durch die Kunststoffkürette oder die Plasmabestrahlung festgestellt werden. Kleine Titanfragmente konnten sowohl bei den Positiv-Kontrollen als auch bei den Implantaten der mit Plasma behandelten Implantate beobachtet werden. Auf sehr wenigen Bildausschnitten konnte eine vollständige Dekontamination der Titanoberfläche ausgemacht werden.

3.4.3 REM der mit Phosphorsäure behandelten Implantate

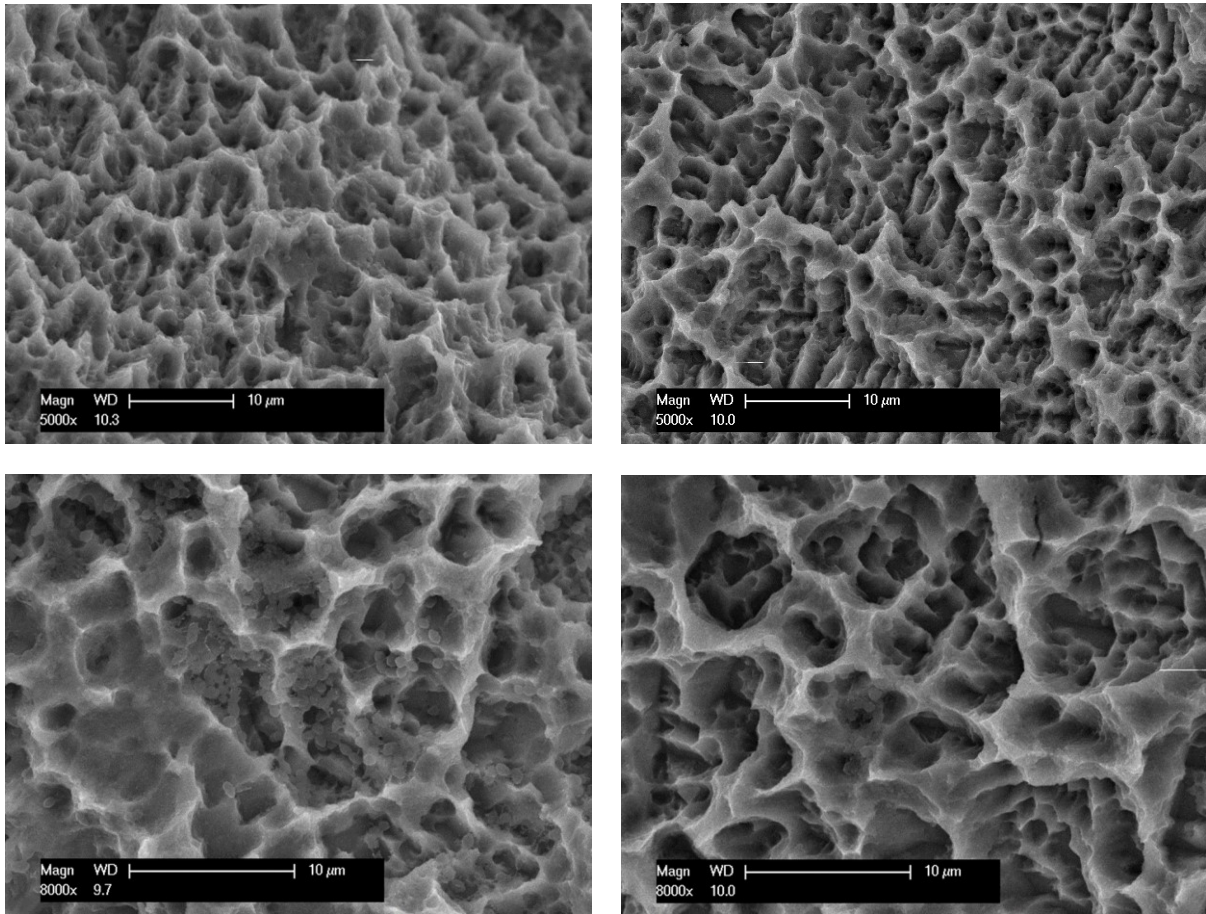


Abbildung 14: REM-Aufnahmen von phosphorsäurebehandelte Implantatoberflächen; oben links und oben rechts: 5000fache Vergrößerung; unten links und unten rechts: 8000fache Vergrößerung.

Auch die Implantate, die mit Kunststoffkürette und Phosphorsäure bearbeitet wurden, wiesen unter dem REM eine sichtliche Abnahme der Bakterienanzahl in Bezug auf die Positiv-Kontrollen auf (siehe Abbildung 14). Gleichwohl war stellenweise ein hohes Keimaufkommen zu beobachten. Diese Anhäufungen an Bakterien verblieben besonders in den Einkerbungen und Furchen der Titanoberfläche. Die Oberfläche wurde weder beschädigt noch verändert. Die Anzahl an Titanfragmenten war mit der auf den Positiv-Kontrollen vergleichbar. Ebenso konnte auf wenigen einzelnen Sichtfeldern eine vollständig bakterienfreie Oberfläche festgestellt werden.

3.4.4 REM der mit der PDT behandelten Implantate

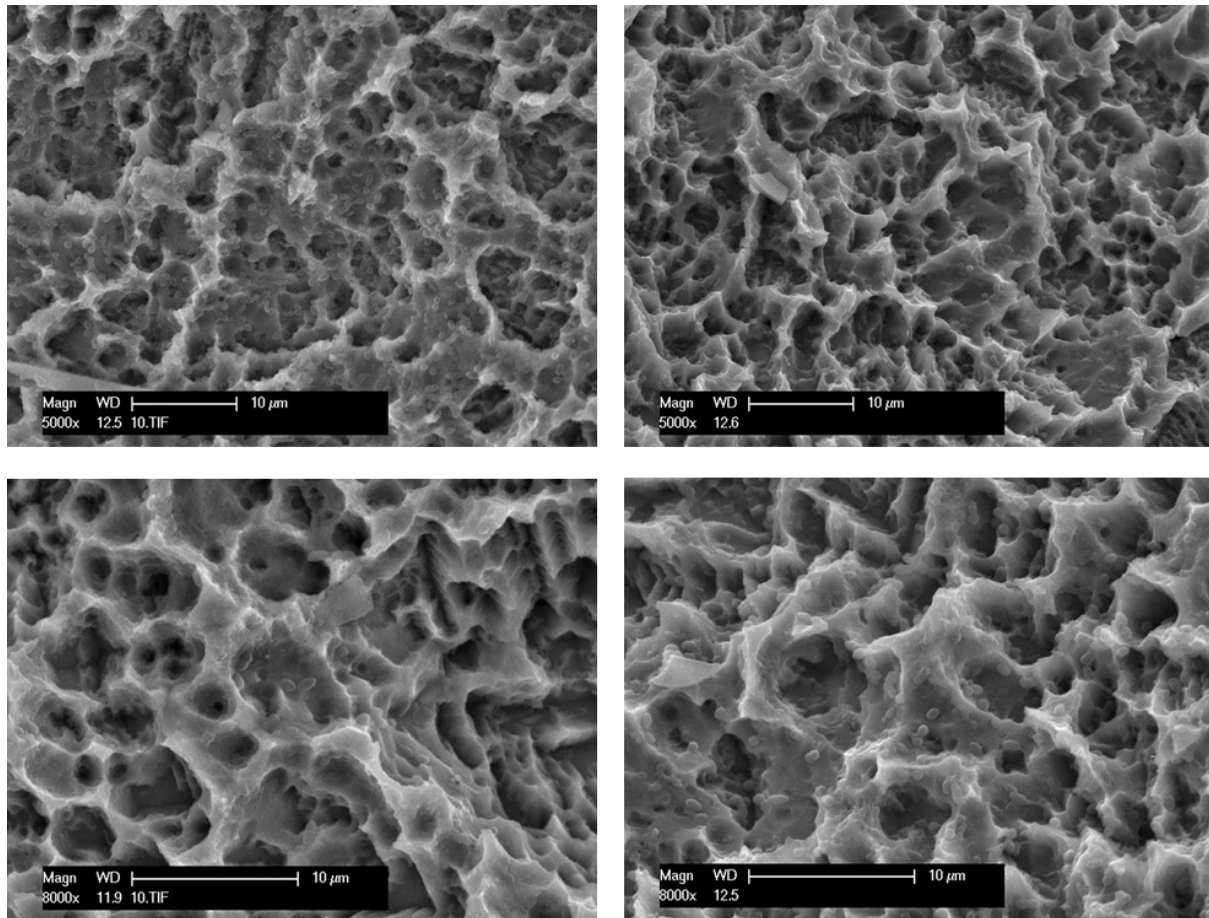


Abbildung 15: REM-Aufnahmen von PDT-behandelten Implantatoberflächen; oben links und oben rechts: 5000fache Vergrößerung; unten links und unten rechts: 8000fache Vergrößerung.

Die Anzahl an Bakterien wurde durch die Therapie mit Kunststoffkürette und PDT verglichen mit den Positiv-Kontrollen verringert (siehe Abbildung 15).

Jedoch konnten auf manchen Bildausschnitten große Mengen an Keimen gefunden werden, die sich nicht nur in den Unterschnitten und Vertiefungen der Implantatoberfläche sammelten, sondern überall zu finden waren. Ebenfalls gab es Bildausschnitte, auf denen nur vereinzelte bzw. gar keine Bakterien aufzufinden waren. Die Struktur und Beschaffenheit des Titans wurde im Vergleich zu den Positiv-Kontrollen nicht beschädigt und wies keine Veränderungen auf.

3.4.5 REM der Negativ-Kontrolle

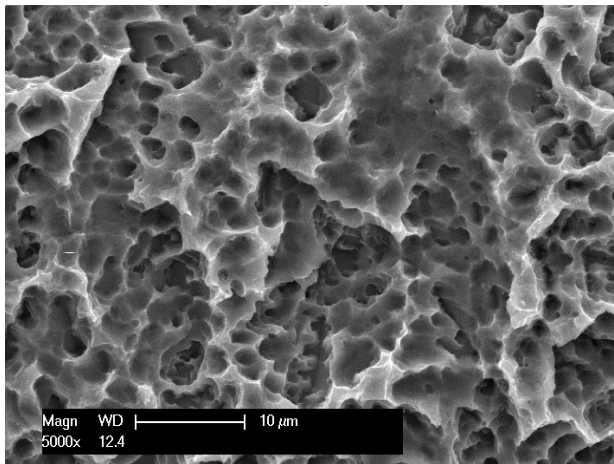


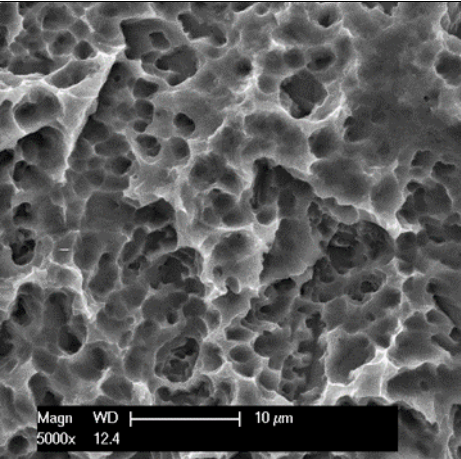
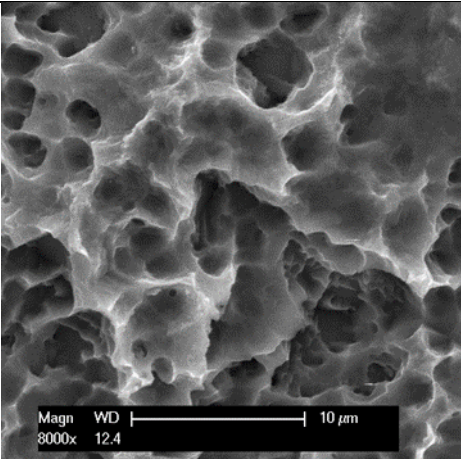
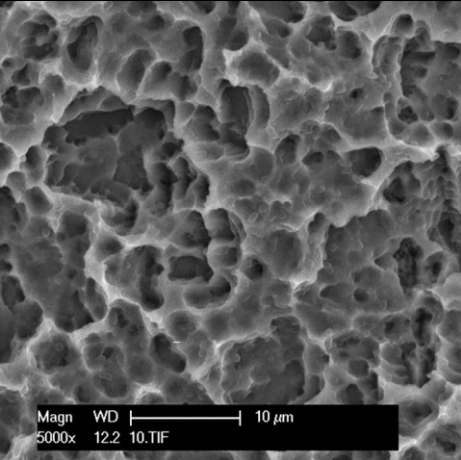
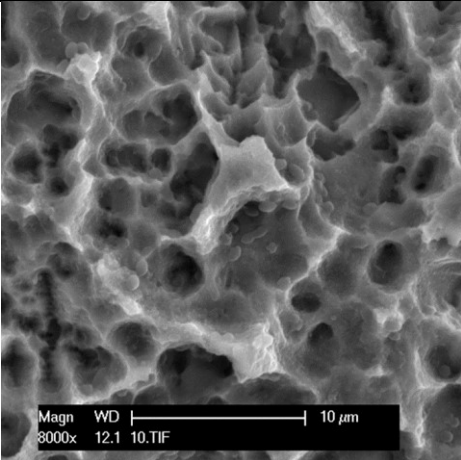
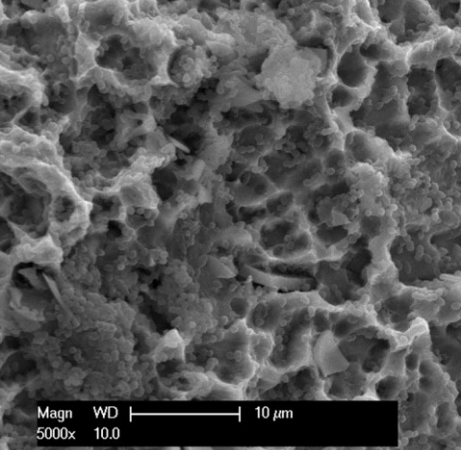
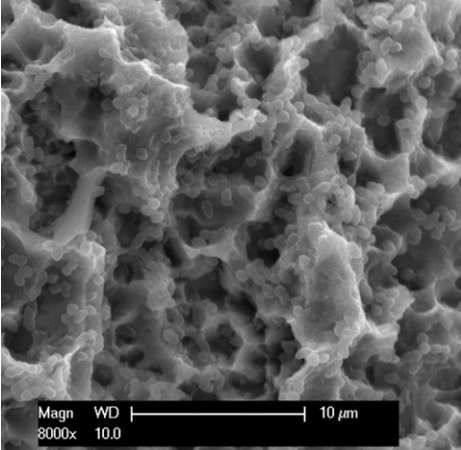
Abbildung 16: REM-Aufnahme der sandgestrahlten und säuregeätzten TiPure^{Plus}-Oberfläche der im Versuch verwendeten Implantate in 5000facher Vergrößerung.

Auf der Negativ-Kontrolle konnte die typische sandgestrahlte und säuregeätzte TiPure^{Plus}-Oberfläche mit ihren Mikroporositäten nachgewiesen werden. Bakterien waren nicht vorhanden (siehe Abbildung 16).

3.4.6 Semiquantitative Auswertung der REM-Aufnahmen

Die folgende Tabelle (Tabelle 8) zeigt beispielhaft REM-Aufnahmen für die unterschiedlichen Auswertungsstufen der semiquantitativen Auswertung.

Tabelle 8: Beispiel-REM-Aufnahmen für die drei semiquantitativen Auswertungsstufen - / + / ++ in 5000facher und 8000facher Vergrößerung.

Auswertungs- stufe	5000fache Vergrößerung	8000fache Vergrößerung
- (keine Bakterien)	 Magn 5000x WD 12.4 10 µm	 Magn 8000x WD 12.4 10 µm
+ (vereinzelte/ wenige Bakterien)	 Magn 5000x WD 12.2 10. TIF 10 µm	 Magn 8000x WD 12.1 10. TIF 10 µm
++ (viele Bakterien)	 Magn 5000x WD 10.0 10 µm	 Magn 8000x WD 10.0 10 µm

Die semiquantitative Auswertung der Positiv-Kontrollen konnte zeigen, dass eine Keimbesiedlung mit *E. faecalis* stattgefunden hat, da 67% der Bildausschnitte der Stufe ++ mit dem höchsten mikrobiellen Wachstum und 33% der Stufe + zugeordnet werden konnten (siehe Tabelle 9 und Abbildung 17). Kein Bildausschnitt wies vollkommen bakterienfreie Bereiche auf.

Insgesamt betrachtet konnte keine der drei Therapieverfahren eine vollständige Bakterienbeseitigung der gesamten Implantatoberfläche erreichen. Der Anteil an Bildausschnitten, auf denen sich gar keine Bakterien befanden (-), war bei allen drei Gruppen vergleichbar gering. Jedoch zeigte die Gruppe 3 (PDT) einen besonders hohen Anteil an Sichtfeldern, auf denen trotz Therapie noch viele Bakterien zu erkennen waren. Etwa halb so viele Ausschnitte, die mit ++ bewertet wurden, wies die Gruppe 2 (Phosphorsäure) auf. Die wenigsten Felder mit sehr vielen Bakterien verzeichnete die Plasmagruppe. Sie unterschied sich auch signifikant von der Positiv-Kontroll-Gruppe in Bezug auf die Gruppen ++ ($p = 0,016$) sowie + ($p = 0,009$). Die Phosphorsäure-Gruppe sowie die PDT-Gruppe wiesen keinen signifikanten Unterschied zur Positiv-Kontrolle auf.

Die Negativ-Kontrollen zeigten auf keinem der REM-Aufnahmen bakterielles Wachstum.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass keine der drei Therapieansätze zu Veränderungen oder Beschädigungen an der Titanoberfläche geführt haben.

Tabelle 9: Absolute und relative Werte der semiquantitativen Auswertung der REM-Aufnahmen eingeteilt in die Stufen: - (keine Bakterien), + (vereinzelte/ wenige Bakterien), ++ (viele Bakterien); a: Positiv-Kontrolle, b: Photodynamische Therapie, c: Negativ-Kontrolle.

Gruppe	-		+		++	
Positiv ^a	0	0%	20	33%	40	67%
Plasma	1	2%	47	94%	2	4%
Phosphorsäure	2	4%	42	84%	6	12%
PDT ^b	2	4%	35	70%	13	26%
Negativ ^c	3	100%	0%	0%	0%	0%

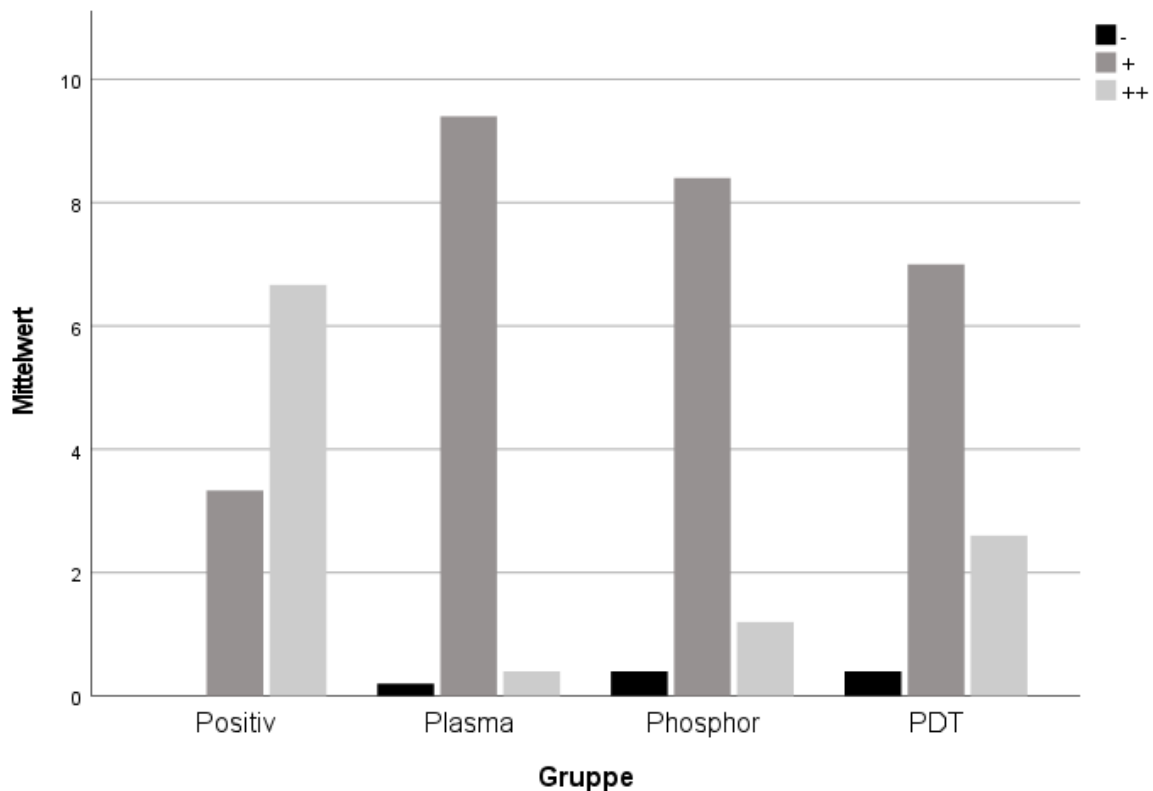


Abbildung 17: Mittelwerte der Anzahl von REM-Bildausschnitten der semiquantitativen Auswertungsstufen für jede Untersuchungsgruppe; - (keine Bakterien), + (vereinzelte/wenige Bakterien), ++ (viele Bakterien); Positiv: Positiv-Kontrolle, Phosphor: Phosphorsäure, PDT: Photodynamische Therapie.

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effektivität unterschiedlicher Therapieverfahren zur Oberflächendekontamination von Titanimplantaten zur Behandlung einer Periimplantitis zu untersuchen. Dazu wurde Plasma als neuartige Reinigungsmethode mit den beiden etablierten Methoden der PDT und der Phosphorsäurebehandlung verglichen. Die Fragestellung wurde anhand eines Versuchsmodells, welches eine Periimplantitissituation am Patienten imitiert, untersucht. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Plasma eine aussichtsreiche Methode zur Reinigung von Titanimplantaten darstellt. Zudem war die Etablierung eines Versuchsmodells mit *E. faecalis* erfolgreich.

4.1 Diskussion der Methode

Die Etablierung eines in-vitro Modells konnte erfolgreich umgesetzt werden. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass die Anzüchtung von *E. faecalis* auf einer sandgestrahlten und säuregeätzten Titanoberfläche in der hier angewendeten Methode durchführbar ist. Ebenso konnte sowohl anhand der REM-Aufnahmen als auch der Gramfärbung eine Fremdkontamination mit anderen Keimen ausgeschlossen werden, da lediglich grampositive Kokken identifiziert wurden, die sich für Enterokokken charakteristisch paarweise oder zu Ketten angeordnet hatten.

Viele zuvor durchgeführte Studien, die ebenfalls die Effektivität unterschiedlicher Therapieverfahren auf Titanoberflächen untersuchten, verwendeten statt schraubenförmiger Implantate flache Titandiscs (Dostie et al. 2017; Idlibi et al. 2013; Schmage et al. 2014; Koban et al. 2011). Diese bieten den Vorteil, dass sogar eine in-vivo Bakterienkontamination möglich ist. Die Titanscheiben können direkt auf Schienen im Mund getragen werden, um so einen natürlichen oralen Biofilm anzuzüchten (do Nascimento et al. 2013). Auch eine Untersuchung der Plättchen gestaltet sich deutlich einfacher, da die flachen Scheiben direkt unter dem Mikroskop betrachtet werden können. Dennoch gibt es große Nachteile der Titandiscs, die anhand dieses Versuchsaufbaus umgangen werden sollten. Eine Reinigung flacher Scheiben entspricht keineswegs den Anforderungen, die an eine Reinigung der komplexen Implantatoberfläche gestellt werden müssen. Durch das Implantatdesign mit seinen Schraubenwindungen und Einkerbungen wird eine effektive Bakterienentfernung erheblich erschwert. Aussagen, die anhand von Versuchsmodellen mit flachen Titandiscs ohne Kiefermodell getroffen wurden, müssen daher kritisch interpretiert werden. Aus diesem Grund gibt es Studien, die stattdessen mit Implantaten arbeiten (Preissner et al. 2016; Azizi et al. 2018). Hier berücksichtigt das Versuchsmodell zwar das dentale Implantatdesign mit seiner schraubenartigen Oberfläche, die Umgebung des Implantates bleibt jedoch unberücksichtigt. Dazu gehört auch die Fassung in einen für die Periimplantitis charakteristischen schüsselförmigen Knochendefekt. Dieser entsteht klinisch durch eine entzündungsbedingte Resorption des Knochens, welche die zuvor im Knochen verankerten Schraubenwindungen des Implantates freilegt und sie damit den oralen Bakterien zugänglich macht. Durch diese anatomische Gegebenheit entstehen große

Einschränkungen bezüglich der räumlichen Erreichbarkeit der Titanoberfläche, da beispielsweise die Reinigungsinstrumente nicht in jedem beliebigen Winkel an das Implantat angesetzt werden können. Durch eine Fassung der Implantate in Modellen mit kraterförmigen Periimplantitisdefekten kann eine zumindest teilweise patientengetreue Situation imitiert werden, die zu Ergebnissen führt, die besser auf klinische Situationen übertragen werden kann. Auch Sahrman et al. (2015) sowie Ronay et al. (2017) versuchten die periimplantäre Defektsituation auf ein in vitro-Modell zu übertragen, um so unterschiedliche Therapieoptionen zu untersuchen. Allerdings verzichteten sie auf eine Biofilmbesiedlung mit Bakterien, sondern imitierten den Biofilmbelag mit Hilfe einer Farbschicht, die wiederum vollkommen andere Eigenschaften als ein reifer Bakterienbiofilm aufweist.

Der Versuchsaufbau von Kubasiewicz-Ross et al. (2020) ähnelt stark dem Aufbau dieses Versuches. Jedoch wurden die Implantate zunächst bakteriell besiedelt und anschließend vor Anwendung der Dekontaminationsmethoden in die Kiefermodelle eingeschraubt. Dies könnte jedoch zu Veränderungen am Biofilm geführt haben, die nicht auf die jeweiligen Dekontaminationsmethoden, sondern auf die mechanischen Irritationen bei der Insertion zurückzuführen sind.

In der Studie von Kuo et al. (2017) wurden ebenfalls keine einfachen Blöcke zur Fassung der Implantate verwendet, sondern wie in dieser Studie anatomische Kiefermodelle. Diese Modelle wurden mit Hilfe von 3D-Druckern hergestellt. Die Implantate konnten außerhalb des Kunststoffkiefers inkubiert werden, indem eine spezielle Hülse gedruckt wurde, mit der die Implantate ohne Beschädigungen am Implantat in die Kiefer montiert werden konnten. Das wiederum brachte den Vorteil mit sich, dass keine mechanische Belastung beim Herausnehmen auf die Implantate ausgeübt wurde. In der hier vorliegenden Untersuchung liegt die Vermutung nahe, dass dies der Grund für die Titanfragmente auf den REM-Aufnahmen ist, die sowohl bei den Positiv-Kontrollen als auch bei den therapierten Implantaten, nicht jedoch auf der Negativ-Kontrolle, welche weder in ein Modell hinein- noch hinausgeschraubt wurde, zu finden waren. Als Nachteil muss jedoch die notwendige Verfügbarkeit eines 3D-Druckers angesehen werden. Der Versuchsaufbau dieser Studie kommt mit deutlich weniger technischen Hilfsmitteln aus und kann mit Hilfe einer Standard-Laboraausstattung durchgeführt und somit reproduziert werden.

Das in diesen Untersuchungen verwendete Modell kann jedoch nicht alle anatomischen Einschränkungen berücksichtigen, die zu einer limitierten Erreichbarkeit führen. Dazu gehört z.B. die eingeschränkte Mundöffnung, das Vorhandensein von Weichgewebe wie Zunge und Mukosa sowie Blutungen, welche die Desinfektion erschweren. Der Zugang zum Implantat kann insbesondere durch nicht oder nur unter erhöhtem Aufwand abnehmbare prothetische Versorgungen sowie Nachbarzähne weiter erschwert werden. Ferner limitiert auch die Position des Implantates im Kiefer die Zugänglichkeit. Es handelt sich bei diesem Versuch dementsprechend um ein idealisiertes Modell, welches viele Störeinflüsse nicht berücksichtigt.

Letztendlich kann nur ein in-vivo Modell all diese Aspekte berücksichtigen. Allerdings gestaltet es sich sehr schwierig ein handelsübliches dentales Implantat für eine gleichmäßige natürliche Biofilmbesiedlung intraoral zu fixieren, ohne den Probanden der Gefahr einer Aspiration der Probekörper auszusetzen. Die Anzüchtung von Biofilm auf Probekörpern in der Mundhöhle birgt folglich auch Nachteile.

Ein weiterer kritisch zu hinterfragender Punkt ist die Wahl der Bakterienspezies für den Biofilm. Intraoral besteht der periimplantitis-assoziierte Biofilm aus sehr vielen verschiedenen Bakterienspezies und wird von gram-negativen anaeroben Bakterien dominiert (Mombelli 2002). Die in-vitro Anzucht eines solchen Biofilms ist jedoch sehr anspruchsvoll. *E. faecalis* als gram-positives und anspruchsloses Bakterium weist einen sowohl aeroben als auch anaeroben/ fakultativ anaeroben Stoffwechsel auf und kann somit zuverlässig auf den Modellen bzw. Implantaten angezüchtet werden. Die Verwendung von *E. faecalis* als Biofilmbildner ist bereits in der Endodontologieforschung etabliert (Herbst et al. 2015; Jablonowski et al. 2013).

Für folgende Versuche könnte jedoch auf eine Mischpopulation aus Bakterien zurückgegriffen werden, da sich dieser Biofilm durch andere Eigenschaften auszeichnet als ein Biofilm aus nur einer Bakterienspezies (Hojo et al. 2009). Es gibt Unterschiede im Resistenzverhalten zwischen Biofilmen aus Monokulturen im Vergleich zu Biofilmen aus Mischkulturen, beispielsweise in Bezug auf Desinfektionsmittel (van der Veen und Abee 2011). Jedoch ist es derzeit noch nicht möglich der Periimplantitis ein eindeutiges mikrobielles Profil zuzuordnen (Sahrman et al. 2020). Es handelt sich um eine heterogene Infektion, zu der teilweise auch nicht-kultivierbare Keime gehören (Lafaurie et al. 2017), die demnach auch nicht auf Implantaten angezüchtet werden können.

Für die Dauer der Beimpfung wurde mit sieben Tagen ein Mittelweg gewählt. In der Literatur sind Beimpfungszeiten zwischen 24 Stunden (Dunavant et al. 2006), 72 Stunden (Gorynia et al. 2013) und bis zu 30 Tagen (Bulacio et al. 2015) angegeben, die zu einer Biofilmbildung führen.

Für folgende Untersuchungen sollte der Versuchsaufbau in Hinblick auf die Biofilmbesiedlung jedoch noch einmal kritisch hinterfragt werden. Auch wenn sämtliche Schritte der Bakterienkultivierung in allen Versuchsgruppen gleichermaßen durchgeführt wurden, konnten deutliche Unterschiede beim Erfolg der Biofilmbesiedlung in den einzelnen Untersuchungsgruppen festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen sich sowohl anhand der CFU-Bestimmung als auch anhand der Auswertung der Live/Dead-Fluoreszenzfärbung feststellen. Für die Positiv-Kontrollen wurde bei allen Untersuchungen der Mittelwert aller Positiv-Kontrollen aus den drei Untersuchungsgruppen gebildet. Das bedeutet, dass nicht nur die Positiv-Kontrollen einer Gruppe mit den therapierten Implantaten, sondern stattdessen die Gesamtmenge aller Positiv-Kontrollen mit den Implantaten der jeweiligen Therapie verglichen wurde. Diese Mittelwertbildung wurde durchgeführt, um eine größere Datenmenge zum Vergleich zu schaffen.

Dadurch lassen sich auch folgende, zunächst schwer zu verstehende Ergebnisse erklären:

Die Auswertung der CFU-Ergebnisse ergab, dass nach PDT-Behandlung im Mittel eine Keimvermehrung statt einer Keimreduktion im Vergleich zu den Positiv-Kontrollen stattgefunden hat. Bei Betrachtung der Positiv-Kontrollen der einzelnen Untersuchungsgruppen konnte festgestellt werden, dass auf den Positiv-Kontrollen der PDT-Gruppe mit $1,25 \times 10^7$ CFU/ml deutlich mehr Keime kultiviert werden konnten als auf den Positiv-Kontrollen der Plasma-Gruppe ($3,76 \times 10^6$ CFU/ml) und der Phosphorsäure-Gruppe ($5,13 \times 10^6$ CFU/ml).

Auch bei der Auswertung der Live/Dead-Fluoreszenzfärbung gab es Ergebnisse, die bei anfänglicher Betrachtung schwer nachvollziehbar erscheinen. Nach der Therapie mit Phosphorsäure und der PDT konnten im Durchschnitt mehr lebende Keime als bei den Positiv-Kontrollen gezählt werden. Bei Betrachtung der Gesamtanzahl der Keime pro Bildausschnitt fiel auf, dass auf den Positiv-Kontrollen nur 4,83 Keime pro Bildausschnitt vorzufinden waren. Im Gegensatz dazu lag die durchschnittliche Gesamtzahl der Keime in den Untersuchungsgruppen der Phosphorsäure und der

PDT bei 7,04 und 7,64 Keimen pro Bildausschnitt. Damit zeigten sie sogar einen signifikanten Unterschied zu der Gesamtanzahl der Keime pro Bildausschnitt der Positiv-Kontrollen (Phosphorsäure $p = 0,005$, PDT $p = 0,000$). Für die Gesamtanzahl der Keime der Positiv-Kontrollen wurde ebenfalls ein Mittelwert aus allen Positiv-Kontrollen jeder Untersuchungsgruppe gebildet.

Der hier durchgeführte Versuchsaufbau mit kleinen Einheiten bei der Biofilmanzüchtung führte demnach zu starken Schwankungen der initialen Bakterienanzahl auf den Implantaten in Bezug auf die unterschiedlichen Untersuchungsgruppen. In dieser Studie erfolgte die bakterielle Besiedlung der Implantate in Gruppen von 2 Modellen mit nur 6 Implantaten pro Box. In jeder Box kam es zu unterschiedlich erfolgreicher Bakterienbesiedlung der Implantate. Für zukünftige Untersuchungen wäre es demnach sinnvoll mehrere Implantate gleichzeitig in ein und demselben Nährstoffmedium zu beimpfen. Beispielsweise könnten dafür mehr als 3 Implantate in einen Kiefer eingeschraubt werden. Oder es wird gänzlich auf die Kiefermodellform verzichtet, da die Hauptlimitation für die Erreichbarkeit des Implantates bei der Reinigung die direkt das Implantat umgebene Struktur ist. Stattdessen könnten mehrere Implantate mit schüsselförmigen Defekten in einen Block inseriert werden, um möglichst viele Implantate mit dem gleichen Nährstoffmedium zu benetzen und dadurch einheitlichere Ergebnisse der Positiv-Kontrollen zu erreichen.

Neben Modellaufbau und Biofilmbildung müssen auch die Laboruntersuchungsmethoden evaluiert werden: Die CFU-Bestimmung erfasst Bakterien, die lebensfähig und in der Lage sind, sich zu vermehren und folglich Kolonien zu bilden. Bei der Interpretation der Ergebnisse darf aber nicht angenommen werden, dass jede koloniebildende Einheit einen lebensfähigen Keim darstellt. Beispielsweise können zwei Bakterien so dicht beieinander liegen, dass sich nur eine Kolonie aus ihnen entwickelt. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die Anzahl der einzelnen Bakterien in einer Probe höher ist als die Anzahl an koloniebildenden Einheiten.

Als ergänzende Untersuchung erfolgte daher die Live/Dead-Fluoreszenzfärbung, die es erlaubt, einzelne Bakterien mit geschädigter oder intakter Membran qualitativ und quantitativ voneinander zu unterscheiden. Die beiden Farbstoffe Propidiumiodide (PI)

und SYTO9 sind in der Lage Nukleinsäuren zu färben. Das grün fluoreszierende SYTO9 kann in alle Zellen eindringen, wohingegen das rot fluoreszierende PI nur Zellen mit geschädigter Zellmembran penetrieren kann. Da PI jedoch stärkere Affinität zu Nukleinsäuren besitzt, verdrängt es SYTO9, sodass die Zelle mit geschädigter Membran rotes Licht fluoresziert (Stocks 2004). Gramnegative Bakterien zeigen jedoch teilweise intermediäre Zustände, da sie eine äußere und innere Zellmembran besitzen. Das erschwert die Interpretation, da gramnegative Bakterien grün erscheinen können, obwohl sie nicht lebensfähig und kultivierbar sind. *E. faecalis* als grampositives Bakterium mit nur einer Membran zeigt dieses Phänomen nicht, weshalb es gut geeignet für die Analyse mittels Live/Dead-Fluoreszenzfärbung ist (Berney et al. 2007).

Eine direkte Auszählung der gefärbten Bakterien auf den Implantaten war in diesem Versuchsaufbau nicht möglich, da sich die Fluoreszenz der Bakterien überlagerten, weil diese in dichten Anhäufungen akkumuliert waren. Hinzu kamen die Irregularitäten der Titanoberfläche, die das Fokussieren einer Ebene mit dem Mikroskop nicht realisierbar machten. Aus diesem Grund wurden die Bakterien mittels Ultraschalls von den Implantaten gelöst. Dieses Vorgehen wurde bereits für *Candida albicans* (Matthes et al. 2015) sowie die Biofilme von *P. aeruginosa* und *S. epidermidis* (Matthes et al. 2013) etabliert, die ebenfalls mittels 20-minütiger Behandlung im Ultraschallbad von Kunststoffscheiben entfernt wurden. Mit Hilfe dieses Schrittes war es möglich die Bakterien auf einem planen Objektträger unter dem Mikroskop zu betrachten und dann einzeln auszuzählen.

Anhand der REM-Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass die Anzüchtung von *E. faecalis* auf einer sandgestrahlten und säuregeätzten Titanoberfläche in der hier angewendeten Methode durchführbar ist. Ebenso waren die REM-Aufnahmen neben der Gramfärbung eine Kontrolle dafür, dass keine Fremdkontamination stattgefunden hat. Zudem wiesen sowohl Positiv-Kontroll-Implantate als auch behandelte Implantate kleine Titanfragmente auf der Implantatoberfläche auf. Diese sind möglicherweise auf die mechanische Belastung beim Ein- und Ausschrauben der Implantate zurückzuführen und nicht allein auf die jeweiligen Therapieoptionen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Die Wirksamkeit der Plasmabehandlung

Die Behandlung mit kaltem Plasma für 3 Minuten pro Implantat und einer Leistung von 5 Watt stellte sich in diesem Versuch als die effektivste Methode zur Dekontamination von Titanimplantaten heraus.

Sowohl anhand der CFU als auch der Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Plasma- und den Positiv-Kontrollen festgestellt werden.

Auf den plasmabehandelten Proben konnten $1,24 \times 10^5$ CFU/ml nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu wiesen die unbehandelten Positiv-Proben mit $7,12 \times 10^6$ CFU/ml signifikant mehr koloniebildende Einheiten pro ml auf.

Die Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung zeigte, dass mit durchschnittlich 5,32 roten Keimen pro Bildausschnitt die größte Anzahl von toten Keimen durch Plasmabehandlung erzielt werden konnte. Keine Behandlung (Positiv-Kontrolle) führte zu durchschnittlich 1,29 roten Keimen pro Bildausschnitt.

Auch in Hinblick auf den hohen Rot-Grün-Quotienten von 4,2 wird deutlich, dass Plasma in dieser Studie die beste Kontaminationsleistung erbracht hat.

Die semiquantitative Auswertung der REM-Bilder führte ebenso zu dem Ergebnis, dass die Plasmatherapie im Verhältnis zu den anderen beiden untersuchten Verfahren zu der größten Bakterienreduktion führte. Die Plasma-Gruppe unterschied sich im Gegensatz zur Phosphorsäure- und zur PDT-Gruppe als einzige Gruppe signifikant in den Stufen ++ und + von der Positiv-Kontrolle.

Diese antibakterielle Wirkung des Plasmas konnte bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen werden (Moisan et al. 2001, 2001; Yu et al. 2007; Lee et al. 2006; Rupf et al. 2010). Preissner et al. (2016) zeigten, dass Plasma auch auf der mikrostrukturierten Oberfläche von dentalen Titanimplantaten in der Lage ist, zu einer Reduktion der Anzahl von lebenden Bakterien zu führen. Plasma besaß im Vergleich zum Diodenlaser die Fähigkeit auch in poröse Strukturen einzudringen und so die komplexe dreidimensionale Oberfläche effektiv zu desinfizieren. Rupf et al. (2011) bestätigten ebenfalls, dass Biofilm, der sich auf mikrostrukturierten Titandiscs befand, mittels Plasma inaktiviert werden konnte, ohne dass es zu einer Veränderung der

Oberfläche kam. Allerdings konnte eine vollständige Entfernung des Biofilms nur mit zusätzlicher Anwendung von Luft-Wasser-Spray erreicht werden.

In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass gramnegative Bakterien aufgrund ihrer dünneren Zellwand schneller durch Plasma deaktiviert werden als grampositive Bakterien mit dickerer Zellwand. Als Mischkultur mit grampositiven Bakterien konnte ein ähnliches Ansprechen wie das des grampositiven Keims allein auf die Plasmatherapie beobachtet werden (Mai-Prochnow et al. 2016). Diese Beobachtungen führen dazu, dass die hier vorgestellten Ergebnisse einer Monokultur aus dem grampositiven *E. faecalis* den Ergebnissen einer Mischkultur, wie sie bei einer Periimplantitis klinisch vorkommt, durchaus ähnlich zu interpretieren sind.

Die effektive antibakterielle Wirkung von Plasma auf *E. faecalis* als grampositives Bakterium wurde auch von anderen Studiengruppen untersucht. Jablonowski et al. (Jablonowski et al. 2013) gelang es, eine deutliche Reduktion der CFU von *E. faecalis* in künstlichen Wurzelkanälen durch Plasma, welches ebenfalls durch den kINPen® MED (neoplas tools GmbH, Greifswald, Deutschland) erzeugt wurde, zu erzielen. Pei et al. (2012) wiesen anhand der Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung nach, dass ein 25,5 µm dicker Biofilm aus *E. faecalis* in sämtlichen Schichten durch kaltes Plasma inaktiviert werden konnte. Damit wird das gute Ansprechen der Plasmatherapie in dieser Studie auch in anderen Untersuchungen bestätigt.

4.2.2 Die Wirksamkeit der Phosphorsäurebehandlung

Die Reinigung mit Phosphorsäure zeigte im Vergleich zur Plasmabehandlung eine deutlich geringere bakterizide Wirkung.

Mit $3,14 \times 10^6$ CFU/ml lag sie zwar deutlich unter den $8,28 \times 10^6$ CFU/ml der PDT. Folglich konnten mehr teilungsfähige Bakterien durch die Phosphorsäurebehandlung eliminiert werden als durch die PDT. Jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zu den Positiv-Kontrollen festgestellt werden. Auch der Rot-Grün-Quotient von 0,9 verweist auf eine relativ geringe bakterizide Wirkung der Phosphorsäure. Anhand der REM-Bilder wurde deutlich, dass die Phosphorsäure eine bessere Dekontaminationsleistung als die PDT aufwies, da im Vergleich zu der PDT weniger als halb so viele Bildausschnitte mit sehr vielen Bakterien (++) gezählt wurden. Im Vergleich zu der Plasmabehandlung, bei der lediglich 4 % der Bildausschnitte mit sehr

vielen Bakterien zu erkennen waren, zeigte die Phosphorsäurereinigung mit einem Anteil von 12 % verhältnismäßig viele Bildausschnitte mit sehr vielen Bakterien.

Die Effektivität von Phosphorsäure zur bakteriellen Dekontamination von mikrostrukturierten Titandiscs wurde bereits von Dostie et al. (2017) untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass nach Behandlung mit Phosphorsäure lebende Bakterien in den Vertiefungen der Titanoberfläche verblieben und eine vergleichbare Reinigung durch einfaches Abspülen mit steriler Kochsalzlösung erreicht werden konnte. Die Fähigkeit zur Bakterienentfernung schien daher allein auf der mechanischen Wirkung des Abspülens, statt auf einer chemischen Wirkung der Phosphorsäure zu beruhen. Tastepe et al. (2013) untersuchten die Reinigungsleistung von Pulverstrahlgeräten mit 4 unterschiedlichen Pulvern sowie die der Phosphorsäure anhand von Titandiscs, die durch das Tragen im Mund mit oralem Biofilm kontaminiert und anschließend unter dem Rasterelektronenmikroskop beurteilt wurden. Alle untersuchten Pulverstrahlmethoden führten zu einer signifikanten Reduktion des Biofilms. Die Behandlung mit Phosphorsäure konnte jedoch keine signifikante Reduktion erreichen. Vielmehr zeigte sogar die Kontrollgruppe, die mit einem Pulverstrahlgerät ohne Einsatz von Pulver behandelt wurde, weniger Areale mit Biofilm als die Gruppe, die mit Phosphorsäure behandelt wurde.

In der klinischen Studie von Hentenaar et al. (2017) wurden von Periimplantitis betroffene Implantate im Rahmen einer offenen chirurgischen Therapie nach mechanischem Debridement entweder mit 35%iger Phosphorsäure oder mit steriler Kochsalzlösung behandelt. Der Vorteil in der Handhabung bei Verwendung eines Phosphorsäure-Gels besteht u.a. darin, dass es sich durch seine Gelform sehr präzise auf die zu behandelnde Oberfläche auftragen lässt ohne umgebendes Gewebe zu benetzen. Diese Viskosität kann sich aber nachteilig auf die Behandlung der strukturierten Oberfläche eines Titanimplantats auswirken, da durch die limitierte Fließfähigkeit ggf. nicht alle Einziehungen und Porositäten des Implantats erreicht werden können. Auf Grund dessen wurde in der Studie von Hentenaar das Gel während der Behandlung mit einer kleinen Bürste eingearbeitet. Dies führte in der sofortigen Untersuchung der Implantate schließlich zu einer stärkeren Reduktion der Anzahl anaerober Bakterien auf dem Implantat als die Behandlung mit steriler Kochsalzlösung. Die Behandlung mittels Bürste könnte die Phosphorsäuretherapie demnach positiv beeinflussen und sollte deshalb für weitere Studien in Betrachtung

gezogen werden. In der Nachuntersuchung nach 3 Monaten konnte dennoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Test- und der Kontrollgruppe sowohl in klinischen als auch in mikrobiellen Ergebnissen nachgewiesen werden. Auch in der klinischen Studie von Strooker et al. (1998) zeigte die Anwendung von Phosphorsäure einen ähnlichen Effekt wie die reine mechanische Behandlung der Implantate.

4.2.3 Die Wirksamkeit der PDT

Die mit $8,28 \times 10^6$ CFU/ml höchste Anzahl an koloniebildenden Einheiten nach der Therapie zeigten die mit der PDT behandelten Implantate. Sie wiesen keinen signifikanten Unterschied zu den unbehandelten Proben der Positiv-Kontrollen auf.

Der Rot-Grün-Quotient von 0,8 bei der PDT verwies ebenfalls auf eine verhältnismäßig geringe bakterienabtötende Wirkung. Im Vergleich zum Rot-Grün-Quotienten der Positiv-Kontrollen, der bei 0,4 lag, wird also deutlich, dass sich die mit der PDT therapierten Implantate nicht erheblich von den Positiv-Kontrollen unterschieden.

Unter Einbeziehung der REM-Bilder zeigte die PDT mit 26 % den höchsten Anteil an Bildausschnitten, auf denen noch sehr viele Bakterien (++) zu erkennen waren.

Die Rolle der PDT in der Periimplantitistherapie ist auch in anderen Studien noch nicht eindeutig herausgestellt worden. Sowohl in-vitro als auch in-vivo Versuche zeigen unterschiedliche Ergebnisse, die noch keine klaren Schlüsse erlauben. Einige klinische Studien konnten keine Unterschiede zwischen alleiniger mechanischer Reinigung der Implantate und zusätzlicher Anwendung der PDT herausstellen (Angelis et al. 2012; Bombeccari et al. 2013; Esposito et al. 2013).

Auch Bassetti et al. 2014 konnten in ihren Nachuntersuchungen nach 12 Monaten keinen Unterschied in klinischen und mikrobiologischen Parametern zwischen der PDT und der Behandlung mit lokaler Antibiotikagabe durch Minocyclin-Kügelchen feststellen. Sowohl die PDT als auch die lokale Antibiotikaverabreichung erfolgte als Begleittherapie nach mechanischem Debridement mit Titanküretten sowie glycinbasierter Pulverstrahlanwendung.

Andere Studien bestätigten die antimikrobiellen Effekte der PDT. Eick et al. (2013) zeigten anhand ihrer in-vitro Studie, dass die PDT mit Toluidinblau und einer LED im roten Spektrum (Wellenlänge 625 - 635 nm), wie sie auch in diesem Versuch Anwendung fand, in der Lage ist, die Lebensfähigkeit eines Biofilmes aus

periimplantitis-pathogenen Keimen zu reduzieren. Auch Haas et al. (1997) kamen in ihrer in-vitro Studie zu dem Ergebnis, dass die Kombination von Toluidinblau und Laser in einer Zerstörung der untersuchten Bakterien resultierte. Dörtbudak et al. (2001) konnten zeigen, dass die Anwendung von Toluidinblau und Laser auf Titanimplantaten, die sich in situ befanden, zu einer signifikanten Reduktion von allen drei untersuchten Bakterienspezies geführt hat (Dörtbudak et al. 2001). Weder Eick et al. noch Dörtbudak et al. gelang jedoch eine komplette Destruktion des Biofilms.

Die Wirksamkeit der PDT gegenüber *E. faecalis* wurde besonders in Zusammenhang mit der Desinfektion von Wurzelkanälen untersucht, da *E. faecalis* oft mit persistierenden endodontischen Infektionen einhergeht (Pinheiro et al. 2003). Meire et al. (2009) untersuchten sowohl bakterielle Suspensionen (in-vitro) von *E. faecalis* als auch die Wurzelkanäle von extrahierten und mit *E. faecalis* infizierten Zähnen (ex-vivo). Die PDT führte zu einer signifikanten Reduktion der Bakterien in Lösung. In den infizierten Zähnen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zu den unbehandelten Proben herausgestellt werden. Eine Erklärung für die schlechteren Ergebnisse könnte das Vorhandensein eines Biofilms in den extrahierten Zähnen sein, da sich die im Biofilm befindlichen Bakterien in vielen Eigenschaften von den planktonischen Bakterien unterscheiden. Dazu gehört u.a. das Vorhandensein von extrazellulärer Matrix, die Zellwand, die metabolische Aktivität und die Genexpression (Costerton 1999).

Bergmans et al. (2008) konnten in ihren Untersuchungen ebenfalls zeigen, dass mit Hilfe der PDT einzelne Zellen oder Monolayer deutlich besser eliminiert werden konnten als Biofilme. Zudem wurde ein deutlich geringerer antibakterieller Effekt auf *E. faecalis* als auf *Streptococcus anginosus* und *Fusobacterium nucleatum* nachgewiesen. Die höhere Resistenz von *E. faecalis* gegenüber der PDT könnte darauf zurückgeführt werden, dass *E. faecalis* die Fähigkeit besitzt eigenständig Sauerstoffradikale zu produzieren (Huycke et al. 2002). Da auch die antibakterielle Wirkung der PDT auf diesen Sauerstoffradikalen basiert, könnte dies ebenfalls eine mögliche Ursache für die relativ schwache antibakterielle Wirkung der PDT gegen *E. faecalis* sein.

Ebenfalls mit in Betracht gezogen werden sollte die Feststellung, dass grampositive Bakterien aufgrund ihrer Zellwandstruktur im Allgemeinen besser auf die PDT ansprechen, als gramnegative Bakterien (Malik et al. 1992).

Tennert et al. (2015) konnten in ihrem Versuch eine deutliche Verbesserung der Effektivität der PDT auf *E. faecalis* in Wurzelkanälen erreichen, indem sie den Photosensibilisator mit Hilfe von Ultraschall aktivierten. Diese Effektverstärkung konnte u.a. darauf zurückgeführt werden, dass die Ultraschallaktivierung zu einer besseren Infiltration des Farbstoffes durch den Biofilm und in die Irregularitäten der Dentintubuli geführt hat. Folglich gelingt es dem nicht aktivierten Farbstoff nicht den bakteriellen Biofilm aufgrund seiner extrazellulären Matrix zu durchdringen.

Auch in dieser Arbeit wurde die Dekontaminationsleistung der PDT an einem Biofilm aus *E. faecalis*, der sich auf einer mikrostrukturierten Oberfläche angesiedelt hat, untersucht, was eine Begründung für die weniger erfolgreichen Ergebnisse der PDT sein könnte. Für folgende Studien sollte demnach auch eine Ultraschallaktivierung des Farbstoffes in Betracht gezogen werden. Neben der vollständigen Benetzung mit Farbstoff spielt auch die Lichtzufuhr eine entscheidende Rolle, da der Farbstoff allein keinen antimikrobiellen Effekt auslösen kann (Takasaki et al. 2009). Auf dem schraubenförmigen Implantat können nicht alle Bereiche gleichermaßen gut belichtet werden, da durch die Limitation des periimplantären Knochendefektes eine Belichtung in einem ungünstigen Winkel erfolgen muss. Auch damit könnte die relativ schwache Wirkung der PDT auf Bakterien, die sich auf Implantaten befinden, erklärt werden.

4.2.4 Vergleich

Insgesamt betrachtet besitzen sowohl die PDT als auch die Phosphorsäurebehandlung die Fähigkeit eine Bakterienreduktion zu erreichen, wohingegen die PDT das geringste bakterizide Vermögen gezeigt hat. Im Vergleich zu der Reinigung der Implantate mit Plasma schnitten die beiden Therapiemöglichkeiten deutlich schlechter ab und sind daher in Bezug auf Bakterienelimination weniger effektiv.

Eine vollständige Reinigung der mikrotexturierten Implantatoberfläche bzw. Abtötung der Bakterien konnte jedoch von keiner der untersuchten Behandlungen erreicht werden. Dies wird anhand aller Untersuchungsmethoden deutlich.

Eine komplette Dekontamination ist wie auch mit der Literatur übereinstimmend nicht möglich, da die in der Mikrostruktur der Titanoberfläche befindlichen Bakterien durch mechanische und physikalisch-chemische Verfahren nicht vollständig erreicht werden können (Mombelli 2002).

4.3 Ausblick

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse könnte geschlossen werden, dass Plasma eine aussichtsreiche Methode zur Behandlung der Periimplantitis darstellt, da sie im Vergleich zu den anderen untersuchten Verfahren die beste Dekontaminationsleistung erbracht hat. Die hier vorgestellten Resultate reichen jedoch nicht aus, um den Einsatz von Plasma als „Goldstandard“-Therapie am Patienten zu empfehlen, da sich die Studie lediglich auf einen kleinen Teilaspekt der Periimplantitistherapie bezieht und weitere wichtige Faktoren unberücksichtigt lässt. Um eine Empfehlung für den routinemäßigen Einsatz von Plasma als Verfahren zur Behandlung der Periimplantitis am Patienten auszusprechen, bedarf es umfassenderen Studien, zu der auch randomisierte klinische Langzeitstudien und Metaanalysen gehören sollten.

5 Zusammenfassung

Die häufigste Ursache für den Verlust von dentalen Implantaten stellt die Periimplantitis dar, deren wichtigster ätiologischer Faktor eine persistierende bakterielle Infektion der Implantatoberfläche ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirksamkeit von drei verschiedenen Reinigungsmethoden (kaltes atmosphärisches Plasma, chemische Dekontamination mit Phosphorsäuregel und die antibakterielle photodynamische Therapie) in Bezug auf die Dekontamination von Titanimplantaten anhand eines in-vitro Modells untersucht. Dazu wurden insgesamt 45 Implantate in Unterkiefermodelle inseriert, in die zuvor eine Mulde gefräst wurde, um einen für die Periimplantitis typischen schüsselförmigen Knochendefekt zu imitieren. Nach der Kontamination mit *E. faecalis* und der anschließenden Kürettage mit einer Kunststoffkürette wurde die erste Gruppe für 3 Minuten mit kaltem atmosphärischem Plasma, die zweite Gruppe mit Phosphorsäure und die dritte Gruppe mit der antibakteriellen photodynamischen Therapie behandelt. Anschließend erfolgte die quantitative und qualitative Untersuchung mittels koloniebildender Einheiten, Leben-Tot-Fluoreszenzmikroskopie sowie Rasterelektronenmikroskopie.

Mit einem Mittelwert von $1,24 \times 10^5$ CFU/ml wiesen die Plasma-behandelten Implantate die wenigsten Mikroorganismen auf. Die höchste Anzahl an koloniebildenden Einheiten wurde nach der antibakteriellen photodynamischen Therapie mit einem Mittelwert von $8,28 \times 10^6$ CFU/ml gefunden. Bei den mit Phosphorsäure behandelten Implantaten konnte ein Mittelwert von $3,14 \times 10^6$ CFU/ml festgestellt werden. Beim Vergleich der Gruppen untereinander unterschied sich nur die Plasma-Gruppe signifikant von der Positiv-Kontroll-Gruppe ($p = 0,006$).

Eine vollständige Reinigung der mikrotexturierten Implantatoberfläche bzw. das Abtöten der Bakterien konnte durch keine der untersuchten Behandlungsoptionen erzielt werden. Die Bakterien in der Mikrostruktur der Titanoberfläche konnten folglich nicht vollends durch die mechanischen und physikalisch-chemischen Prozesse erreicht werden.

Aufgrund seiner antibakteriellen Wirkung in der hier vorgestellten Studie könnte Plasma in Kombination mit mechanischem Debridement eine vielversprechende Behandlungsmethode bei der Therapie von Periimplantitis sein. Es besteht jedoch weiterhin Bedarf bei der Forschung nach der effektivsten Therapiemethode.

6 Literaturverzeichnis

- Abduljabbar, T.; Javed, F.; Kellesarian, S. V.; Vohra, F.; Romanos, G. E. (2017): Effect of Nd:YAG laser-assisted non-surgical mechanical debridement on clinical and radiographic peri-implant inflammatory parameters in patients with peri-implant disease. In: *J Photochem Photobiol* 168, S. 16–19.
- Adell, R.; Eriksson, B.; Lekholm, U.; Brånemark, P. I.; Jemt, T. (1990): Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. In: *Int J Oral Maxillofac Implants* 5 (4), S. 347–359.
- Adell, R.; Lekholm, U.; Rockler, B.; Brånemark, P. I. (1981): A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. In: *Int J Oral Implantol (Berl)* 10 (6), S. 387–416.
- Albrektsson, T.; Hansson, H. A.; Ivarsson, B. (1985): Interface analysis of titanium and zirconium bone implants. In: *Biomater Adv* 6 (2), S. 97–101.
- Albrektsson, T.; Dahlin, C.; Jemt, T.; Sennerby, L.; Turri, A.; Wennerberg, A. (2014): Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign body reaction? In: *Clin Implant Dent Relat Res* 16 (2), S. 155–165.
- Alhag, M.; Renvert, S.; Polyzois, I.; Claffey, N. (2008): Re-osseointegration on rough implant surfaces previously coated with bacterial biofilm. An experimental study in the dog. In: *Clin Oral Implants Res* 19 (2), S. 182–187.
- Alonso, V.; García-Caballero, L.; Couto, I.; Diniz, M.; Diz, P.; Limeres, J. (2017): Subcutaneous emphysema related to air-powder tooth polishing. A report of three cases. In: *Aust Dental J* 62 (4), S. 510–515.
- Andreiotelli, M.; Wenz, H. J.; Kohal, R.-J. (2009): Are ceramic implants a viable alternative to titanium implants? A systematic literature review. In: *Clin Oral Implants Res* 20 Suppl 4, S. 32–47.
- Augthun, M.; Tinschert, J.; Huber, A. (1998): In vitro studies on the effect of cleaning methods on different implant surfaces. In: *Journal of periodontology* 69 (8), S. 857–864.
- Ayliffe, G. (2000): Decontamination of minimally invasive surgical endoscopes and accessories. In: *The Journal of hospital infection* 45 (4), S. 263–277.
- Azizi, B.; Budimir, A.; Mehmeti, B.; Jakovljević, S.; Bago, I.; Gjorgievska, E.; Gabrić, D. (2018): Antimicrobial Efficacy of Photodynamic Therapy and Light-Activated Disinfection Against Bacterial Species on Titanium Dental Implants. In: *Int J Oral Maxillofac Implants* 33 (4), S. 831–837.
- Bassetti, M.; Schär, D.; Wicki, B.; Eick, S.; Ramseier, C. A.; Arweiler, N. et al. (2014): Anti-infective therapy of peri-implantitis with adjunctive local drug delivery or photodynamic therapy. 12-month outcomes of a randomized controlled clinical trial. In: *Clin Oral Implants Res* 25 (3), S. 279–287.
- Belibasakis, G. N. (2014): Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. In: *Archives of oral biology* 59 (1), S. 66–72.
- Bergmans, L.; Moisiadis, P.; Huybrechts, B.; van Meerbeek, B.; Quirynen, M.; Lambrechts, P. (2008): Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. In: *Int Endod J* 41 (3), S. 227–239.

- Berney, M.; Hammes, F.; Bosshard, F.; Weilenmann, H.-U.; Egli, T. (2007): Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. In: *J Appl Environ Microbiol* 73 (10), S. 3283–3290.
- Bombeccari, G. P.; Guzzi, G.; Gualini, F.; Gualini, S.; Santoro, F.; Spadari, F. (2013): Photodynamic therapy to treat periimplantitis. In: *Implant dentistry* 22 (6), S. 631–638.
- Brånemark, P.-I. (Hg.) (1986): Tissue-integrated prostheses. Osseointegration in clin. dentistry. 1. reprinting. Chicago u. a.: Quintessence (Quintessence books).
- Bulacio, M.; Galván, L. R.; Gaudio, C.; Cangemi, R.; Erimbaue, M. I. (2015): Enterococcus Faecalis Biofilm. Formation and Development in Vitro Observed by Scanning Electron Microscopy. In: *Acta Odontol Latinoam* 28 (3), S. 210–214.
- Bürgers, R.; Gerlach, T.; Hahnel, S.; Schwarz, F.; Handel, G.; Gosau, M. (2010): In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. In: *Clin Oral Implants Res* 21 (2), S. 156–164.
- Buser, D.; Mericske-Stern, R.; Bernard, J. P.; Behneke, A.; Behneke, N.; Hirt, H. P. et al. (1997): Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part 1: 8-year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants. In: *Clin Oral Implants Res* 8 (3), S. 161–172.
- Buser, D.; Schenk, R. K.; Steinemann, S.; Fiorellini, J. P.; Fox, C. H.; Stich, H. (1991): Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. In: *J Biomed Mater Res A* 25 (7), S. 889–902.
- Buser, D.; Janner, S. F. M.; Wittneben, J.-G.; Brägger, U.; Ramseier, C. A.; Salvi, G. E. (2012): 10-year survival and success rates of 511 titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a retrospective study in 303 partially edentulous patients. In: *Clin Implant Dent Relat Res* 14 (6), S. 839–851.
- Chappuis, V.; Buser, R.; Brägger, U.; Bornstein, M. M.; Salvi, G. E.; Buser, D. (2013): Long-term outcomes of dental implants with a titanium plasma-sprayed surface. A 20-year prospective case series study in partially edentulous patients. In: *Clin Implant Dent Relat Res* 15 (6), S. 780–790.
- Chen, S.; Darby, I. (2003): Dental implants. Maintenance, care and treatment of peri-implant infection. In: *Aust Dental J* 48 (4), S. 212–220.
- Cieplik, F.; Tabenski, L.; Buchalla, W.; Maisch, T. (2014): Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. In: *Front Microbiol* 5, S. 405.
- Claffey, N.; Clarke, E.; Polyzois, I.; Renvert, S. (2008): Surgical treatment of peri-implantitis. In: *J Clin Periodontol* 35 (8 Suppl), S. 316–332.
- Coelho, P. G.; Giro, G.; Teixeira, H. S.; Marin, C.; Witek, L.; van Thompson, P. et al. (2012): Argon-based atmospheric pressure plasma enhances early bone response to rough titanium surfaces. In: *J Biomed Mater Res A* 100 (7), S. 1901–1906.
- Costerton, J. W. (1999): Bacterial Biofilms. A Common Cause of Persistent Infections. In: *Science* 284 (5418), S. 1318–1322.

- Davies, J. M.; Campbell, L. A. (1990): Fatal air embolism during dental implant surgery. A report of three cases. In: *Can J Anaesth* 37 (1), S. 112–121.
- do Nascimento, C.; Pita, M. S.; Pedrazzi, V.; Albuquerque J., Rubens Ferreira de; Ribeiro, R. F. (2013): In vivo evaluation of *Candida* spp. adhesion on titanium or zirconia abutment surfaces. In: *Arch Oral Biol* 58 (7), S. 853–861.
- Donlan, R. M.; Costerton, J. William (2002): Biofilms. Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. In: *Clin Microbiol Rev* 15 (2), S. 167–193.
- Dörtbudak, O.; Haas, R.; Bernhart, T.; Mailath-Pokorny, G. (2001): Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. In: *Clin Oral Implants Res* 12 (2), S. 104–108.
- Dostie, S.; Alkadi, L. T.; Owen, G.; Bi, J.; Shen, Y.; Haapasalo, M.; Larjava, Hannu S. (2017): Chemotherapeutic decontamination of dental implants colonized by mature multispecies oral biofilm. In: *J Clin Periodontol* 44 (4), S. 403–409.
- Duarte, P. M.; Reis, Andre F.; Freitas, P. M.; Ota-Tsuzuki, C. (2009): Bacterial adhesion on smooth and rough titanium surfaces after treatment with different instruments. In: *J Periodontol* 80 (11), S. 1824–1832.
- Dunavant, T. R.; Regan, J. D.; Glickman, G. N.; Solomon, E. S.; Honeyman, A. L. (2006): Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. In: *J Endod* 32 (6), S. 527–531.
- Duske, K.; Jablonowski, L.; Koban, I.; Matthes, R.; Holtfreter, B.; Sckell, A. et al. (2015): Cold atmospheric plasma in combination with mechanical treatment improves osteoblast growth on biofilm covered titanium discs. In: *Biomaterials* 52, S. 327–334.
- Duske, K.; Koban, I.; Kindel, E.; Schröder, K.; Nebe, B.; Holtfreter, B. et al. (2012): Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals. In: *J Clin Periodontol* 39 (4), S. 400–407.
- Eick, S.; Markauskaite, G.; Nietzsche, S.; Laugisch, O.; Salvi, G. E.; Sculean, A. (2013): Effect of photoactivated disinfection with a light-emitting diode on bacterial species and biofilms associated with periodontitis and peri-implantitis. In: *Photodiagnosis Photodyn Ther* 10 (2), S. 156–167.
- Eriksson, A. R.; Albrektsson, T. (1983): Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury. A vital-microscopic study in the rabbit. In: *J Prosthet Dent* 50 (1), S. 101–107.
- Esposito, M.; Grusovin, M. G.; Angelis, N. de; Camurati, A.; Campailla, M.; Felice, P. (2013): The adjunctive use of light-activated disinfection (LAD) with FotoSan is ineffective in the treatment of peri-implantitis. 1-year results from a multicentre pragmatic randomised controlled trial. In: *Eur J Oral Implantol* 6 (2), S. 109–119.
- Faggion, C. M., JR; Listl, S.; Fruhauf, N.; Chang, H.-J.; Tu, Y.-K. (2014): A systematic review and Bayesian network meta-analysis of randomized clinical trials on non-surgical treatments for peri-implantitis. In: *J Clin Periodontol* 41 (10), S. 1015–1025.
- Fernandes, L. A.; Almeida, J. M. de; Theodoro, L. H.; Bosco, A. F.; Nagata, Maria J. H.; Martins, Thiago M. et al. (2009): Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. In: *J Clin Periodontol* 36 (3), S. 219–228.

- Fluhr, J. W.; Sassning, S.; Lademann, O.; Darvin, Maxim E.; Schanzer, S.; Kramer, A. et al. (2012): In vivo skin treatment with tissue-tolerable plasma influences skin physiology and antioxidant profile in human stratum corneum. In: *Exp Dermatol* 21 (2), S. 130–134.
- Fox, S. C.; Moriarty, J. D.; Kusy, R. P. (1990): The effects of scaling a titanium implant surface with metal and plastic instruments. An in vitro study. In: *J Periodontol* 61 (8), S. 485–490.
- Fridman, G.; Shereshevsky, A.; Jost, Monika M.; Brooks, Ari D.; Fridman, A.; Gutsol, A. et al. (2007): Floating Electrode Dielectric Barrier Discharge Plasma in Air Promoting Apoptotic Behavior in Melanoma Skin Cancer Cell Lines. In: *Plasma Chem Plasma Process* 27 (2), S. 163–176.
- Gehrke, S. A.; Aramburú J., Jaime S.; Dedavid, B. A.; Shibli, J. A. (2016): Analysis of Implant Strength After Implantoplasty in Three Implant-Abutment Connection Designs. An In Vitro Study. In: *Int J Oral Maxillofac Implants* 31 (3), S. 65-70.
- Gorynia, S.; Koban, I.; Matthes, R.; Welk, A.; Gorynia, S.; Hübner, N.-O. et al. (2013): In vitro efficacy of cold atmospheric pressure plasma on *S. sanguinis* biofilms in comparison of two test models. In: *GMS Hyg Infect Control* 8 (1), Doc01.
- Gosau, M.; Hahnel, S.; Schwarz, F.; Gerlach, T.; Reichert, T. E.; Bürgers, R. (2010): Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on in vivo human oral biofilm. In: *Clin Oral Implants Res* 21 (8), S. 866–872.
- Gursoy, H.; Ozcakir-Tomruk, C.; Tanalp, J.; Yilmaz, S. (2013): Photodynamic therapy in dentistry. A literature review. In: *Clin Oral Investig* 17 (4), S. 1113–1125.
- Haas, R.; Dörtbudak, O.; Mensdorff-Pouilly, N.; Mailath, G. (1997): Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensitization and soft laser. An in vitro study. In: *Clin Oral Implants Res* 8 (4), S. 249–254.
- Hayek, R. R. A.; Araújo, N. S.; Gioso, M. A.; Ferreira, J.; Baptista-Sobrinho, C. A.; Yamada, Aécio M.; Ribeiro, M. S. (2005): Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. In: *J Periodontol* 76 (8), S. 1275–1281.
- Heinlin, J.; Morfill, G.; Landthaler, M.; Stolz, W.; Isbary, G.; Zimmermann, J. L. et al. (2010): Plasma medicine. Possible applications in dermatology. In: *J Dtsch Dermatol Ges: JDDG* 8 (12), S. 968–976.
- Heitz-Mayfield, Lisa J. A. (2008): Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. In: *J Clin Periodontol* 35 (8 Suppl), S. 292–304.
- Heitz-Mayfield, L. J. A.; Lang, N. P. (2010): Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. In: *Periodontol* 2000 53, S. 167–181.
- Heitz-Mayfield, L. J. A.; Mombelli, A. (2014): The therapy of peri-implantitis. A systematic review. In: *Int J Oral Maxillofac Implants* 29 Suppl, S. 325–345.
- Hentenaar, D. F. M.; Waal, Y. C. M. de; Strooker, H.; Meijer, H. J. A.; van Winkelhoff, A.-J.; Raghoobar, G. M. (2017): Implant decontamination with phosphoric acid during surgical peri-implantitis treatment. A RCT. In: *Int J Implant Dent* 3 (1), S. 33.
- Herbst, S. R.; Hertel, M.; Ballout, H.; Pierdzioch, P.; Weltmann, K.-D.; Wirtz, H. C. et al. (2015): Bactericidal Efficacy of Cold Plasma at Different Depths of Infected Root Canals In Vitro. In: *Open Dent J* 9, S. 486–491.

- Hjalmarsson, L.; Gheisarifar, M.; Jemt, T. (2016): A systematic review of survival of single implants as presented in longitudinal studies with a follow-up of at least 10 years. In: *Eur J Oral Implantol* 9 Suppl 1, S.155-62.
- Hojo, K.; Nagaoka, S.; Ohshima, T.; Maeda, N. (2009): Bacterial interactions in dental biofilm development. In: *J Dent Res* 88 (11), S. 982–990.
- Huycke, M. M.; Abrams, V.; Moore, D. R. (2002): Enterococcus faecalis produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. In: *Carcinogenesis* 23 (3), S. 529–536.
- Idlibi, A. N.; Al-Marrawi, F.; Hannig, M.; Lehmann, A.; Rueppell, A.; Schindler, A. et al. (2013): Destruction of oral biofilms formed in situ on machined titanium (Ti) surfaces by cold atmospheric plasma. In: *Biofouling* 29 (4), S. 369–379.
- Isbary, G.; Morfill, G.; Schmidt, H. U.; Georgi, M.; Ramrath, K.; Heinlin, J. et al. (2010): A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. In: *Br J Dermatol* 163 (1), S. 78–82.
- Jablonowski, L.; Koban, I.; Berg, M. H.; Kindel, E.; Duske, K.; Schröder, K. et al. (2013): Elimination of E. Faecalis by a New Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Handheld Device for Endodontic Treatment. A Preliminary Investigation. In: *Plasma Process. Polym.* 10 (6), S. 499–505.
- Jung, R. E.; Zembic, A.; Pjetursson, B. E.; Zwahlen, M.; Thoma, D. S. (2012): Systematic review of the survival rate and the incidence of biological, technical, and aesthetic complications of single crowns on implants reported in longitudinal studies with a mean follow-up of 5 years. In: *Clin Oral Implants Res* 23 Suppl 6, S. 2–21.
- Karring, E. S.; Stavropoulos, A.; Ellegaard, B.; Karring, T. (2005): Treatment of peri-implantitis by the Vector system. In: *Clin Oral Implants Res* 16 (3), S. 288–293.
- Klämpfl, T. G.; Isbary, G.; Shimizu, T.; Li, Y.-F.; Zimmermann, J. L.; Stolz, W. et al. (2012): Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest. In: *Appl Environ Microbiol* 78 (15), S. 5077–5082.
- Koban, I.; Holtfreter, B.; Hubner, N.-O.; Matthes, R.; Sietmann, R.; Kindel, E. et al. (2011): Antimicrobial efficacy of non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs in vitro - proof of principle experiment. In: *J Clin Periodontol* 38 (10), S. 956–965.
- Kolonidis, S. G.; Renvert, S.; Hämmerle, C. H. F.; Lang, N. P.; Harris, D.; Claffey, N. (2003): Osseointegration on implant surfaces previously contaminated with plaque. An experimental study in the dog. In: *Clin Oral Implants Res* 14 (4), S. 373–380.
- Konopka, K.; Goslinski, T. (2007): Photodynamic therapy in dentistry. In: *J. Dent. Res* 86 (8), S. 694–707.
- Kotsakis, G. A.; Lan, C.; Barbosa, J.; Lill, K.; Chen, R.; Rudney, J.; Aparicio, C. (2016): Antimicrobial Agents Used in the Treatment of Peri-Implantitis Alter the Physicochemistry and Cytocompatibility of Titanium Surfaces. In: *J Periodontol* 87 (7), S. 809–819.
- Kotsovilis, S.; Karoussis, I. K.; Trianti, M.; Fourmoussis, I. (2008): Therapy of peri-implantitis. A systematic review. In: *J Clin Periodontol* 35 (7), S. 621–629.

- Kreisler, M.; Götz, H.; Duschner, H. (2002a): Effect of Nd:YAG, Ho:YAG, Er:YAG, CO₂, and GaAlAs laser irradiation on surface properties of endosseous dental implants. In: *Int J Oral Maxillofac Implants* 17 (2), S. 202–211.
- Kreisler, M.; Kohnen, W.; Marinello, C.; Götz, H.; Duschner, H.; Jansen, B.; D'Hoedt, B. (2002b): Bactericidal Effect of the Er: YAG Laser on Dental Implant Surfaces: An In Vitro Study. In: *J Periodontol* 73 (11), S. 1292–1298.
- Kubasiewicz-Ross, P.; Fleischer, M.; Piłula, A.; Hadzik, J.; Nawrot-Hadzik, I.; Bortkiewicz, Olga et al. (2020): Evaluation of the three methods of bacterial decontamination on implants with three different surfaces. In: *Adv Clin Exp Med* 29 (2), S. 177–182.
- Kuboki, T.; Okamoto, S.; Suzuki, H.; Kanyama, M.; Arakawa, H.; Sonoyama, W.; Yamashita, A. (1999): Quality of life assessment of bone-anchored fixed partial denture patients with unilateral mandibular distal-extension edentulism. In: *J Prosthet Dent* 82 (2), S. 182–187.
- Kumazawa, R.; Watari, F.; Takashi, N.; Tanimura, Y.; Uo, M.; Totsuka, Y. (2002): Effects of Ti ions and particles on neutrophil function and morphology. In: *Biomaterials* 23 (17), S. 3757–3764.
- Kuo, H.-N.; Mei, H.-I.; Liu, T.-K.; Liu, T.-Y.; Lo, L.-J.; Lin, C.-L. (2017): In Vitro Laser Treatment Platform Construction with Dental Implant Thread Surface on Bacterial Adhesion for Peri-Implantitis. In: *Biomed Res Int* 2017, S. 4732302.
- Lafaurie, G. I.; Sabogal, M. A.; Castillo, D. M.; Rincón, M. V.; Gómez, Luz Amparo; Lesmes, Y. A.; Chambrone, L. (2017): Microbiome and Microbial Biofilm Profiles of Peri-Implantitis. A Systematic Review. In: *J Periodontol* 88 (10), S. 1066–1089.
- Larsen, O. I.; Enersen, M.; Kristoffersen, A. K.; Wennerberg, A.; Bunæs, D. F.; Lie, S. A.; Leknes, Knut N. (2017): Antimicrobial Effects of Three Different Treatment Modalities on Dental Implant Surfaces. In: *J Oral Implantol* 43 (6), S. 429–436.
- Le Guéhennec, L.; Soueidan, A.; Layrolle, P.; Amouriq, Y. (2007): Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. In: *Dent Mater* 23 (7), S. 844–854.
- Lee, C.-T.; Chen, Y.-W.; Starr, J. R.; Chuang, S.-K. (2016): Survival analysis of wide dental implant. Systematic review and meta-analysis. In: *Clin Oral Implants Res* 27 (10), S. 1251–1264.
- Lee, K.; Paek, K.-h.; Ju, W.-T.; Lee, Y. (2006): Sterilization of bacteria, yeast, and bacterial endospores by atmospheric-pressure cold plasma using helium and oxygen. In: *J Microbiol (Seoul, Korea)* 44 (3), S. 269–275.
- Levin, L.; Frankenthal, S.; Joseph, L.; Rozitsky, D.; Levi, G.; Machtei, E. E. (2015): Water jet with adjunct chlorhexidine gel for nonsurgical treatment of peri-implantitis. In: *Quintessence Int (Ber)* 46 (2), S. 133–137.
- Lindhe, J.; Meyle, J. (2008): Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. In: *J Clin Periodontol* 35 (8 Suppl), S. 282–285.
- Louropoulou, A.; Slot, D E.; van der Weijden, F. A. (2012): Titanium surface alterations following the use of different mechanical instruments. A systematic review. In: *Clin Oral Implants Res* 23 (6), S. 643–658.

- Mai-Prochnow, A.; Clauson, M.; Hong, J.; Murphy, A. B. (2016): Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. In: *Sci Rep* 6, S. 38610.
- Maisch, T.; Shimizu, T.; Li, Y.-F.; Heinlin, J.; Karrer, S.; Morfill, G.; Zimmermann, J. L. (2012): Decolonisation of MRSA, *S. aureus* and *E. coli* by cold-atmospheric plasma using a porcine skin model in vitro. In: *PloS one* 7 (4), e34610.
- Malik, Z.; Ladan, H.; Nitzan, Y. (1992): Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria. Problems and possible solutions. In: *J Photochem Photobiol* 14 (3), S. 262–266.
- Matarasso, S.; Quaremba, G.; Coraggio, F.; Vaia, E.; Cafiero, C.; Lang, N. P. (1996): Maintenance of implants. An in vitro study of titanium implant surface modifications subsequent to the application of different prophylaxis procedures. In: *Clin Oral Implants Res* 7 (1), S. 64–72.
- Mathew, M. T.; Barão, V. A.; Yuan, Judy C.-C.; Assunção, W. G.; Sukotjo, C.; Wimmer, Markus A. (2012): What is the role of lipopolysaccharide on the tribocorrosive behavior of titanium? In: *J Mech Behav Biomed Mater* 8, S. 71–85.
- Matthes, R.; Bender, C.; Schlüter, R.; Koban, I.; Bussiahn, R.; Reuter, S. et al. (2013): Antimicrobial Efficacy of Two Surface Barrier Discharges with Air Plasma against In Vitro Biofilms. In: *PloS one* 8 (7), e70462.
- Matthes, R.; Jablonowski, L.; Koban, I.; Quade, A.; Hübner, N.-O.; Schlueter, R. et al. (2015): In vitro treatment of *Candida albicans* biofilms on denture base material with volume dielectric barrier discharge plasma (VDBD) compared with common chemical antiseptics. In: *Clin Oral Investig* 19 (9), S. 2319–2326.
- Meire, M. A.; Prijck, K. de; Coenye, T.; Nelis, H. J.; Moor, R. J. G. de (2009): Effectiveness of different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model. In: *Int Endod J* 42 (4), S. 351–359.
- Mengel, R.; Meer, C.; Flores-de-Jacoby, L. (2004): The treatment of uncoated and titanium nitride-coated abutments with different instruments. In: *Int J Oral Maxillofac Implants* 19 (2), S. 232–238.
- Meyle, J. (2012): Mechanical, chemical and laser treatments of the implant surface in the presence of marginal bone loss around implants. In: *Eur J Oral Implantol* 5 Suppl, S71-81.
- Moisan, M.; Barbeau, J.; Moreau, S.; Pelletier, J.; Tabrizian, M.; Yahia, L'H (2001): Low-temperature sterilization using gas plasmas. A review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. In: *Int J Pharm* 226 (1-2), S. 1–21.
- Möller, B.; Terheyden, H.; Açı, Y.; Purcz, N. M.; Hertrampf, K.; Tabakov, A. et al. (2012): A comparison of biocompatibility and osseointegration of ceramic and titanium implants. An in vivo and in vitro study. In: *Int J Clin Oral Maxillofac Surg* 41 (5), S. 638–645.
- Mombelli, A.; Lang, N. P. (1998): The diagnosis and treatment of peri-implantitis. In: *Periodontol* 2000 17, S. 63–76.
- Mombelli, A. (2002): Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. In: *Periodontol* 2000 28 (1), S. 177–189.

- Mombelli, A.; Hashim, D.; Cionca, N. (2018): What is the impact of titanium particles and biocorrosion on implant survival and complications? A critical review. In: *Clin Oral Implants Res* 29 Suppl 18, S. 37–53.
- Nguyen-Hieu, T.; Borghetti, A.; Aboudharam, G. (2012): Peri-implantitis. From diagnosis to therapeutics. In: *J Investig Clin Dent* 3 (2), S. 79–94.
- Ntrouka, V.; Hoogenkamp, M.; Zaura, E.; van der Weijden, F. (2011): The effect of chemotherapeutic agents on titanium-adherent biofilms. In: *Clin Oral Implants Res* 22 (11), S. 1227–1234.
- Oh, S.-H.; Kim, Y.; Park, J.-Y.; Jung, Yea J.; Kim, S.-K.; Park, S.-Y. (2016): Comparison of fixed implant-supported prostheses, removable implant-supported prostheses, and complete dentures. Patient satisfaction and oral health-related quality of life. In: *Clin Oral Implants Res* 27 (2), e31-e37.
- Özkurt, Z.; Kazazoğlu, E. (2011): Zirconia dental implants: a literature review. In: *J Oral Implantol* 37 (3), S. 367–376.
- Pei, X.; Lu, X.; Liu, J.; Liu, D.; Yang, Y.; Ostrikov, K. et al. (2012): Inactivation of a 25.5 µm *Enterococcus faecalis* biofilm by a room-temperature, battery-operated, handheld air plasma jet. In: *J. Phys. D: Appl. Phys.* 45 (16), S. 165205.
- Pinheiro, E. T.; Gomes, B. P. F. A.; Ferraz, C. C. R.; Sousa, E. L. R.; Teixeira, F. B.; Souza-Filho, F. J. (2003): Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. In: *Int Endod J* 36 (1), S. 1–11.
- Pjetursson, B. E.; Thoma, D.; Jung, R.; Zwahlen, M.; Zembic, A. (2012): A systematic review of the survival and complication rates of implant-supported fixed dental prostheses (FDPs) after a mean observation period of at least 5 years. In: *Clin Oral Implants Res* 23 Suppl 6, S. 22–38.
- Mendes Duarte, P.; Figueiredo Reis, A.; Moreira de Freitas, P.; Ota-Tsuzuki, C. (2009): Bacterial Adhesion on Smooth and Rough Titanium Surfaces After Treatment With Different Instruments. In: *J Periodontol* 80 (11), S. 1824–1832.
- Preissner, S.; Wirtz, H. C.; Tietz, A.-K.; Abu-Sirhan, S.; Herbst, S. R.; Hartwig, S. et al. (2016): Bactericidal efficacy of tissue tolerable plasma on microrough titanium dental implants. An in-vitro-study. In: *J Biophotonics* 9 (6), S. 637–644.
- Renvert, S.; Quirynen, M. (2015): Risk indicators for peri-implantitis. A narrative review. In: *Clin Oral Implants Res* 26 Suppl 11, S. 15–44.
- Renvert, S.; Roos-Jansåker, A.-M.; Claffey, N. (2008): Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis. A literature review. In: *J Clin Periodontol* 35 (8 Suppl), S. 305–315.
- Renvert, S.; Samuelsson, E.; Lindahl, C.; Persson, G. R. (2009): Mechanical non-surgical treatment of peri-implantitis. A double-blind randomized longitudinal clinical study. I: clinical results. In: *J Clin Periodontol* 36 (7), S. 604–609.
- Roehling, S.; Astasov-Frauenhoffer, M.; Hauser-Gerspach, I.; Braissant, O.; Woelfler, H.; Waltimo, T. et al. (2017): In Vitro Biofilm Formation on Titanium and Zirconia Implant Surfaces. In: *J Periodontol* 88 (3), S. 298–307.
- Roehling, S.; Schlegel, K. A.; Woelfler, H.; Gahlert, M. (2018): Performance and outcome of zirconia dental implants in clinical studies. A meta-analysis. In: *Clin Oral Implants Res* 29 Suppl 16, S. 135–153.

- Romanos, G. E.; Gutknecht, N.; Dieter, S.; Schwarz, F.; Crespi, R.; Sculean, A. (2009): Laser wavelengths and oral implantology. In: *Lasers Med Sci* 24 (6), S. 961–970.
- Roncati, M.; Lucchese, A.; Carinci, F. (2013): Non-surgical treatment of peri-implantitis with the adjunctive use of an 810-nm diode laser. In: *J Indian Soc Periodontol* 17 (6), S. 812–815.
- Rupf, S.; Idlibi, Ahmad N.; Marrawi, F. A.; Hannig, M.; Schubert, A.; Mueller, L. von et al. (2011): Removing biofilms from microstructured titanium ex vivo: a novel approach using atmospheric plasma technology. In: *PloS one* 6 (10), e25893.
- Rupf, S.; Lehmann, A.; Hannig, M.; Schafer, B.; Schubert, A.; Feldmann, U.; Schindler, Axel (2010): Killing of adherent oral microbes by a non-thermal atmospheric plasma jet. In: *J Med Microbiol* 59 (Pt 2), S. 206–212.
- Sahrman, P.; Gilli, F.; Wiedemeier, D. B.; Attin, T.; Schmidlin, P. R.; Karygianni, L. (2020): The Microbiome of Peri-Implantitis. A Systematic Review and Meta-Analysis. In: *Microorganisms* 8 (5).
- Sahrman, P.; Ronay, V.; Hofer, D.; Attin, T.; Jung, R. E.; Schmidlin, P. R. (2015): In vitro cleaning potential of three different implant debridement methods. In: *Clin Oral Implants Res* 26 (3), S. 314–319.
- Saini, M.; Singh, Y.; Arora, P.; Arora, V.; Jain, K. (2015): Implant biomaterials: A comprehensive review. In: *World J Clin Cases* 3 (1), S. 52–57.
- Schmage, P.; Kahili, F.; Nergiz, I.; Scorziello, T. M.; Platzer, U.; Pfeiffer, P. (2014): Cleaning effectiveness of implant prophylaxis instruments. In: *Int J Oral Maxillofac Implants* 29 (2), S. 331–337.
- Schwarz, F.; Bieling, K.; Bonsmann, M.; Latz, T.; Becker, J. (2006): Nonsurgical treatment of moderate and advanced periimplantitis lesions. A controlled clinical study. In: *Clin Oral Investig* 10 (4), S. 279–288.
- Schwarz, F.; Ferrari, D.; Popovski, K.; Hartig, B.; Becker, J. (2009): Influence of different air-abrasive powders on cell viability at biologically contaminated titanium dental implants surfaces. In: *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 88 (1), S. 83–91.
- Schwarz, F.; Sahm, N.; Mihatovic, I.; Golubovic, V.; Becker, J. (2011): Surgical therapy of advanced ligature-induced peri-implantitis defects. Cone-beam computed tomographic and histological analysis. In: *J Clin Periodontol* 38 (10), S. 939–949.
- Schwarz, F.; Schmucker, A.; Becker, J. (2015): Efficacy of alternative or adjunctive measures to conventional treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis. A systematic review and meta-analysis. In: *Int J Implant Dent* 1 (1), S. 22.
- Shi, Q.; Song, K.; Zhou, X.; Xiong, Z.; Du, T.; Lu, X.; Cao, Y (2015): Effects of non-equilibrium plasma in the treatment of ligature-induced peri-implantitis. In: *J Clin Periodontol* 42 (5), S. 478–487.
- Shibli, J. A.; Martins, M. C.; Nociti, F. H.; Garcia, V. G.; Marcantonio, E. (2003): Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration. A preliminary histologic study in dogs. In: *J Periodontol* 74 (3), S. 338–345.
- Siddiqi, A.; Khan, A. S.; Zafar, S. (2017): 30 years of translational research in zirconia dental implants: A systematic review of the literature. In: *Oral Implantol*.

- Smeets, R.; Henningsen, A.; Jung, O.; Heiland, M.; Hammächer, C.; Stein, J. M. (2014): Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis--a review. In: *Head Face Med* 10, S. 34.
- Souza, J. C. M.; Henriques, M.; Teughels, W.; Ponthiaux, P.; Celis, J.-P.; Rocha, Luis A. (2015): Wear and Corrosion Interactions on Titanium in Oral Environment. Literature Review. In: *J Bio Tribo Corros* 1 (2), S. 3121.
- Stavropoulos, A.; Bertl, K.; Eren, S.; Gotfredsen, K. (2019): Mechanical and biological complications after implantoplasty-A systematic review. In: *Clin Oral Implants Res* 30 (9), S. 833–848.
- Stimmelmayer, M.; Edelhoff, D.; Güth, J.-F.; Erdelt, K.; Happe, A.; Beuer, F. (2012): Wear at the titanium-titanium and the titanium-zirconia implant-abutment interface. A comparative in vitro study. In: *Dent Mater* 28 (12), S. 1215–1220.
- Stocks, S. M. (2004): Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight. In: *Cytometry A* 61 (2), S. 189–195.
- Strooker, H.; Rohn, S.; van Winkelhoff, A. J. (1998): Clinical and microbiologic effects of chemical versus mechanical cleansing in professional supportive implant therapy. In: *Int J Oral Maxillofac Implants* 13 (6), S. 845–850.
- Takasaki, A. A.; Aoki, A.; Mizutani, K.; Schwarz, F.; Sculean, A.; Wang, C.-Y. et al. (2009): Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. In: *Periodontol* 2000 51, S. 109–140.
- Tastepe, C. S.; Liu, Y.; Visscher, C. M.; Wismeijer, D. (2013): Cleaning and modification of intraorally contaminated titanium discs with calcium phosphate powder abrasive treatment. In: *Clin Oral Implants Res* 24 (11), S. 1238–1246.
- Tennert, C.; Drews, A. M.; Walther, V.; Altenburger, M. J.; Karygianni, L.; Wrbas, K. T. et al. (2015): Ultrasonic activation and chemical modification of photosensitizers enhances the effects of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* root-canal isolates. In: *Photodiagnosis Photodyn Ther* 12 (2), S. 244–251.
- Tonetti, M. S.; Schmid, J. (1994): Pathogenesis of implant failures. In: *Periodontol* 2000 4, S. 127–138.
- Ulu, M.; Pekbagriyanik, T.; Ibis, F.; Enhos, S.; Ercan, U. K. (2018): Antibiofilm efficacies of cold plasma and er. YAG laser on *Staphylococcus aureus* biofilm on titanium for nonsurgical treatment of peri-implantitis. In: *Niger J Clin Pract* 21 (6), S. 758–765.
- van der Veen, S.; Abee, T. (2011): Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. In: *Int J Food Microbiol* 144 (3), S. 421–431.
- van Steenberghe, D.; Naert, I.; Jacobs, R.; Quirynen, M. (1999): Influence of inflammatory reactions vs. occlusal loading on peri-implant marginal bone level. In: *Adv Dent Res* 13, S. 130–135.
- van Winkelhoff, A. J.; Rams, T. E.; Slots, J. (1996): Systemic antibiotic therapy in periodontics. In: *Periodontol* 2000 10 (1), S. 45–78.
- Wennerberg, A.; Hallgren, C.; Johansson, C.; Danelli, S. (1998): A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. In: *Clin Oral Implants Res* 9 (1), S. 11–19.

- Wenz, H. J.; Bartsch, J.; Wolfart, S.; Kern, M. (2008): Osseointegration and clinical success of zirconia dental implants: a systematic review. In: *Int J Prosthodont* 21 (1), S. 27–36.
- Wilson, T. G.; Valderrama, P.; Burbano, M.; Blansett, J.; Levine, R.; Kessler, H.; Rodrigues, D. C. (2015): Foreign bodies associated with peri-implantitis human biopsies. In: *J Periodontol* 86 (1), S. 9–15.
- Wiltfang, J.; Zernial, O.; Behrens, E.; Schlegel, A.; Warnke, P. H.; Becker, S. T. (2012): Regenerative treatment of peri-implantitis bone defects with a combination of autologous bone and a demineralized xenogenic bone graft. A series of 36 defects. In: *Clin Implant Dent Relat Res* 14 (3), S. 421–427.
- Woedtke, Th. von; Reuter, S.; Masur, K.; Weltmann, K.-D. (2013): Plasmas for medicine. In: *Physics Reports* 530 (4), S. 291–320.
- Yang, Y.; Guo, J.; Zhou, X.; Liu, Z.; Wang, C.; Wang, K. et al. (2018): A novel cold atmospheric pressure air plasma jet for peri-implantitis treatment. An in vitro study. In: *Dent Mater J* 37 (1), S. 157–166.
- Yu, Q. S.; Huang, C.; Hsieh, F-H; Huff, H.; Duan, Y. (2007): Bacterial inactivation using a low-temperature atmospheric plasma brush sustained with argon gas. In: *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 80 (1), S. 211–219.
- Zablotsky, M. H.; Diedrich, D. L.; Meffert, R. M. (1992): Detoxification of endotoxin-contaminated titanium and hydroxyapatite-coated surfaces utilizing various chemotherapeutic and mechanical modalities. In: *Implant Dent* 1 (2), S. 154–158.
- Zhou, X.; Wu, D.; Liang, D.; Zhang, W.; Shi, Q.; Cao, Y. (2020): Evaluation of modified cold-atmospheric pressure plasma (MCAP) for the treatment of peri-implantitis in beagles. In: *Oral Dis*.
- Zimmermann, J. L.; Dumler, K.; Shimizu, T.; Morfill, G. E.; Wolf, A.; Boxhammer, V. et al. (2011): Effects of cold atmospheric plasmas on adenoviruses in solution. In: *J. Phys. D: Appl. Phys.* 44 (50), S. 505201.
- Zitzmann, N. U.; Berglundh, T. (2008): Definition and prevalence of peri-implant diseases. In: *J Clin Periodontol* 35 (8 Suppl), S. 286–291.

Publikationen

Aus dieser Dissertation hervorgegangene Publikationen:

Flörke C.; **Janning J.**; Hinrichs C.; Behrens E.; Liedtke KR.; Sen S.; Christofzik D.; Wiltfang J.; Gülses A. (2022) In-vitro assessment of the efficiency of cold atmospheric plasma on decontamination of titanium dental implants. *Int J Implant Dent.* 8(1), S.12. DOI: 10.1186/s40729-022-00411-9. PMID: 35275307; PMCID: PMC8917246.

Christian Flörke, **Josephine Janning**, David Christofzik, Elenore Behrens, Hendrik Naujokat, Jörg Wiltfang, Yahya Acil, Etablierung eines In-vitro-Modells zur Untersuchung von periimplantären Läsionen: Dekontamination von Implantatoberflächen mit kaltem Plasma, 68. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Kieferchirurgie 2018 (Vortrag)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dr. Christian Flörke, der nicht nur das Thema meiner Dissertation ausgewählt, sondern mich ebenso hervorragend bei der Umsetzung der gesamten Arbeit unterstützt hat. Er stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite und hat mich stets motiviert weiterzumachen.

Herrn Prof. Dr. Dr. Jörg Wiltfang als Direktor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel danke ich für die Möglichkeit diese wissenschaftliche Arbeit an der Klinik durchführen zu können.

Auch Herrn Prof. Dr. Yahya Açıllı danke ich dafür, dass er mir die wissenschaftlichen Laboratorien für meine Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Frau Regina Marquardt danke ich für die Einarbeitung in den Umgang mit Bakterien im Labor. Herrn Dipl.-Ing. Frank Lehmann möchte ich ebenso meinen Dank aussprechen, da er mich in das Verfahren der Rasterelektronenmikroskopie eingewiesen hat und bei Problemen sofort zur Stelle war.

Für die Bereitstellung der gesamten Implantate, die in dieser Arbeit untersucht wurden, möchte ich der Firma BEGO aus Bremen meinen Dank ausdrücken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Martin Sasse für alle Ratschläge zum wissenschaftlichen Arbeiten und für die hilfreichen Tipps.

Ganz besonders danken möchte ich jedoch meiner Familie und vor allem meiner Mutter und meinem Mann, die mich während des Studiums und darüber hinaus bei der Arbeit an dieser Dissertation stets bestärkt und unermüdlich ermutigt haben.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Josephine Janning, geb. am 11.01.1993 in Ankum, 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