

Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie, Postfach 101007, D-40001 Düsseldorf

Clinical House Europe GmbH  
Löwenstrasse 2  
8001 Zürich  
SCHWEIZ

30.05.2008

Abschlussbericht zum Forschungsvertrag zwischen Clinical House Europe GMBH und der Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme des Universitätsklinikums Düsseldorf

**Problemstellung:** Auf allen Teilen einer prothetischen Suprakonstruktion von oralen Implantaten kommt es unmittelbar nach dem Einbringen in die Mundhöhle zur Wechselwirkung der Oberflächen mit den Mikroorganismen des oralen Milieus. Diese können innerhalb kurzer Zeit Biofilme auf allen Oberflächen bilden, die vor allem auch bei unzureichender Pflege die Hauptursache für das Entstehen einer Periimplantitis sind.

Ziel des vorliegenden Forschungsprojektes war es deshalb zu untersuchen, wie sich verschiedene Titan-Oberflächen durch einen Biofilm verändern können und inwieweit es hierdurch zu Veränderungen der Biokompatibilität dieser Oberflächen kommt.

**Versuchsaufbau:** Für die Untersuchungen standen folgende Titanoberflächen zur Verfügung:

- § Titan mit aufgesputterter Zirkonnitridschicht (ZN)
- § Titan mit anodisch aufgebracht goldfarbener Titanoxid-schicht (TO)
- § Titan mit Zirkonnitridschicht „dentin-gelbgold“- (ZN MAT)
- § Titan mit poliertem Reintitan grade 4 (RT)

## Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme

Direktor der Poliklinik  
Univ. Prof. Dr. J. Becker  
Tel.: (0211) 81-18140  
Fax: (0211) 81-16550  
eMail: [becker@uni-duesseldorf.de](mailto:becker@uni-duesseldorf.de)

Sekretariat:  
Frau Huß  
Tel. : (0211) 81-18141  
Fax: (0211) 81-16550  
eMail: [Huss@med.uni-duesseldorf.de](mailto:Huss@med.uni-duesseldorf.de)

Leitstelle der Poliklinik:  
Fr. Jürns  
Tel.: (0211) 81-18149

Patientenaufnahme Kieferklinik  
Fr. Peterek, Fr. Bellmann  
Tel.: (0211) 81-18149 (Fr. Jürns)

Forschungslabor  
Frau Hartig  
Tel.: (0211) 81-18167

Zahnärztlicher Notdienst  
Tel.: (0211) 81-16486

### Spezialsprechstunden

Laserchirurgie  
OA PD Dr. F. Schwarz  
Tel.: (0211) 81-16378 (Fr. Hesse)

Mundschleimhautsprechstunde  
Fr. Dr. A. Schaeben  
Tel.: (0211) 81-18149 (Fr. Jürns)

DVT-Röntgen-Diagnostik  
OA Dr. A. Künzel  
ZÄ K. Mai  
Tel.: (0211) 81-16378 (Fr. Hesse)

Narkosebehandlung  
Terminvergabe  
Tel.: (0211) 81-8270 (Fr. Saeger)

Webseiten der Poliklinik  
[www.uniklinik-duesseldorf.de/oralchirurgie](http://www.uniklinik-duesseldorf.de/oralchirurgie)

### Versuchsprotokoll für Proliferationstest:

Humane Gingiva-Fibroblasten der 5. Passage (Primärkultur der Firma Provitro GmbH Berlin, charakterisiert durch Immunhistologie als CD90/Thy-1 positiv) wurden auf den Probekörper mit einem Durchmesser  $\varnothing$  10 mm und einer Höhe von 3 mm in 48-Well Zellkulturplatten (Nunc, Wiesbaden) kultiviert (Abb. 1.). Die Zellen wurden in einer Dichte von 5.000 Zellen pro Well auf die Probekörper ausgesät. Als Positiv-Kontrolle diente die Polystyrol-Standardoberfläche in der Zellkultur. Die Zellen wurden in Standardmedium (DMEM low Glucose, (Gibco, Karlsruhe) mit Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (Gibco), 100 Units/ml Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptavidin Gibco) unter Standard-Zellkulturbedingungen (37°C, 5% Luftfeuchte) im Brutschrank kultiviert.

Unmittelbar nach der Aussaat (Baseline) (n=3) und am Tag 11 (n=8) wurde ein ATP-Assay durchgeführt (CellTiter-Glo® Lumineszenz Assay, Promega, Mannheim). Dieser Assay quantifizierte die ATP-Konzentration als Maß für die metabolische Aktivität der Zellen und damit auch für die Zellzahl. Die Gingiva-Fibroblasten benötigen für die Proliferation als adhärenente Zellen die Anhaftung an einer Oberfläche. Daher kann der Proliferationstest für die Messung der Biokompatibilität einer Oberfläche eingesetzt werden.

(Review siehe: Johnson et al. *Biocompatibility test procedure for materials evaluation in vitro. J Biomed. Mater Res* 1985 19(5):489-508).

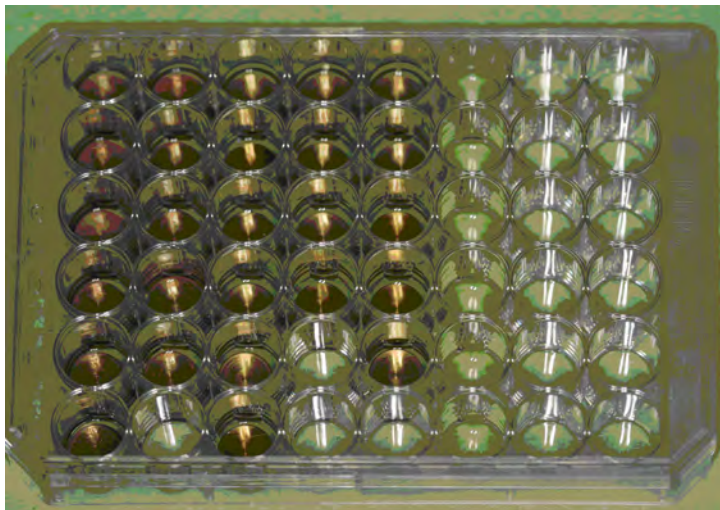


Abb. 1: Zellkulturplatte (48 Well) mit Probekörpern

### Versuchsprotokoll für die Testung der Plaqueakkumulation

Um einen *in vivo* supragingivalen Plaque-Biofilm zu sammeln, wurden n = 20 Probekörper pro getesteter Oberfläche an Gaumenplatten (Abb. 2) befestigt und von fünf verschiedenen Versuchspersonen (je 6 Probekörper pro Gaumenplatte) über einen Zeitraum von 24 Stunden getragen. Dieser Biofilm wurde mit dem Vitalfarbstoff Erythrosin angefärbt um Biofilm-Areale zu detektieren und auszumessen (Durchlichtmikroskop BX50, Olympus,

Hamburg; SIS Color View 3, Soft imaging System GmbH, Münster). Anschließend wurden die Titan-Probekörper mit einem Laser (Er:YAG Laser, Energiedichte 12,7 J/cm<sup>2</sup>, F =25 Hz) bestrahlt und mit einer normalen Zahnbürste nachgereinigt. Die Probekörper wurden daraufhin autoklaviert und mit Gingiva-Fibroblasten (s.o.) inkubiert. Nach 11 Tagen Inkubation wurde die Zellproliferation der auf den behandelten Probekörpern adhärenen Zellen quantitativ durch einen ATP-Assay (s.o.) untersucht (n=19) und qualitativ (n=1) durch Untersuchung der Zellmorphologie/Oberflächenveränderungen der Probekörper mittels Rasterelektronenmikroskopie.



Abb. 2: Gaumenplatte mit 6 Probekörpern

### **Ergebnisse:**

In der Abb. 3 sind die Ergebnisse des ATP-Assays gemessen in cps dargestellt. In allen Ansätzen ist eine Zellproliferation am Anstieg des ATP-Signals von Tag 0 (baseline, 0,5 Mill. cps) zu erkennen, der nach 11 Tagen auf einen Wert von 3,7 Mill. bei TO, 3,4 Mill. bei ZN, 2,5 Mill. bei ZN MAT, 2,9 Mill. bei RT und 4,8 Mill. für die Kontrolle Polystyrol (die eine Standardreferenzoberfläche für die Kultivierung adhärenen Zellen darstellt) ansteigt.

*(Lindl, T. Zell- und Gewebekultur. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2002, S. 24—28; speziell Nunclon Delta Oberfläche: Berger T et al. Large-scale generation of mature monocyte-derived dendritic cells for clinical application in cell factories. J Immunol. Methods 2002, 268(2):131-140).*

Daraus ergibt sich folgende Reihenfolge für die Anheftung der Gingiva-Fibroblasten auf den Oberflächen

### **Titanoxid > Zirkonnitrid > Zirkonnitrid matt > poliertes Reintitan**

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen der früher durchgeführten Zellexperimente zur Proliferation der Gingiva-Fibroblasten auf Zirkonnitrid, bei denen die Zellproliferation auf Zirkonnitrid sehr hoch und vergleichbar mit der Zellkontrolle war.

Klinisch ist zu erwähnen, dass derzeit poliertes Reintitan der klinische Standard bei Implantaten im transgingivalen Bereich ist. Die Befunde beim Titanitrid deuten deshalb auf

eine verbesserte Biokompatibilität bei der Einheilung im transgingivalen Bereich ("Periointegration") hin.

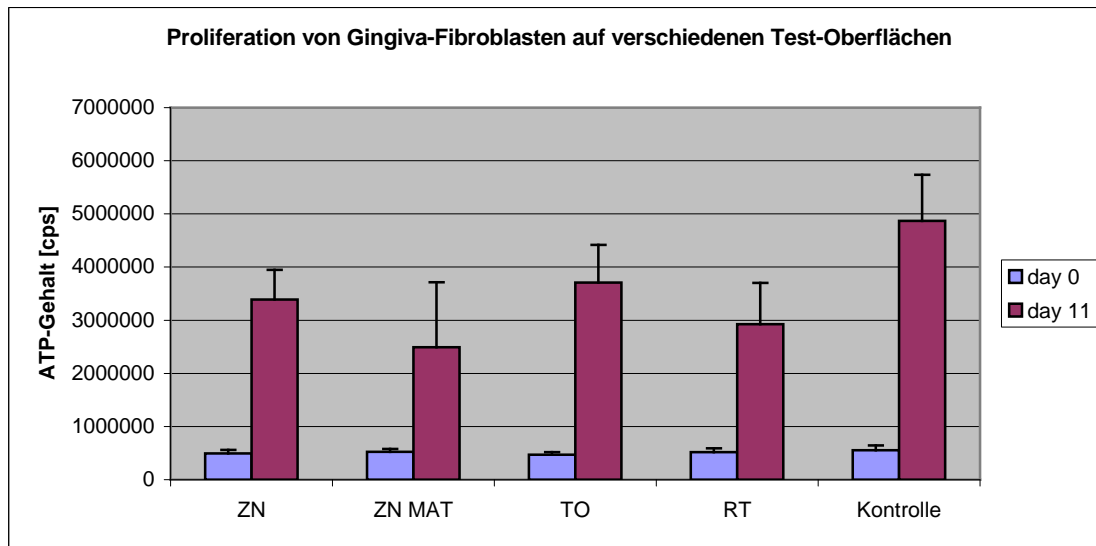


Abb. 3: Proliferation von Gingiva-Fibroblasten auf verschiedenen Test-Oberflächen am Tag 0 (Baseline) und nach 11 Tagen. Aufgetragen sind die Mittelwerte und Standardabweichungen.

Die Plaquebesiedlung auf den oral getragenen Testplatten zeigte für alle Testpersonen zusammen keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Oberflächen (Abb. 4).

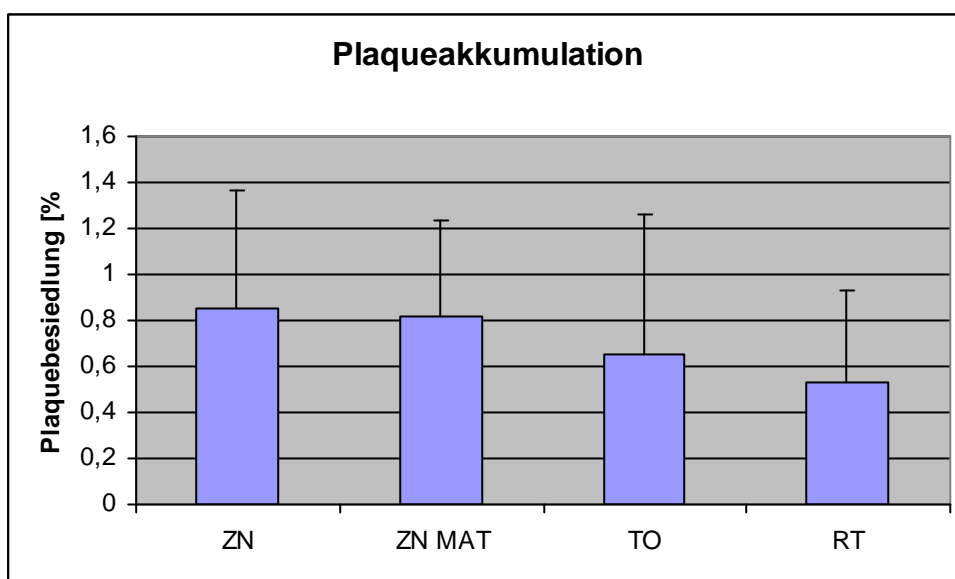


Abb. 4: Plaquesbesiedlung auf den verschiedenen Oberflächen in % nach 24 h Tragedauer durch 5 verschiedene Testpersonen.

Diese Befunde deuten bisher darauf hin, dass die Vorteile der höheren Biokompatibilität des Titanitrits nicht mit einer höheren Empfindlichkeit für eine Ausbildung eines Biofilms assoziiert sind.

Die zentrale Frage des vorliegenden Forschungsprojektes war es, wie sich die verschiedenen Oberflächen nach einer Biofilmentfernung verhalten werden. In der Abbildung 5 ist das Ergebnis der erneuten Besiedlung mit oraler Plaque besiedelten Oberflächen nach entsprechender Dekontamination (Laser, Zahnbürste) dargestellt. Verglichen mit der Kontrolle (Anheftung der Gingivazellen auf der Polystyrol-Oberfläche) ist die höchste Zellproliferation auf der Zirkonnitrid-Oberfläche zu verzeichnen, gefolgt von Titanoxid, Zirkonnitrid matt und Rein-Titan, so dass sich für die Anheftung der Gingiva-Fibroblasten auf den von Plaque gereinigten Oberflächen folgende Reihenfolge ergibt: (Abb. 5)

**Zirkonnitrid > Titanoxid > Zirkonnitrid matt > Rein-Titan**

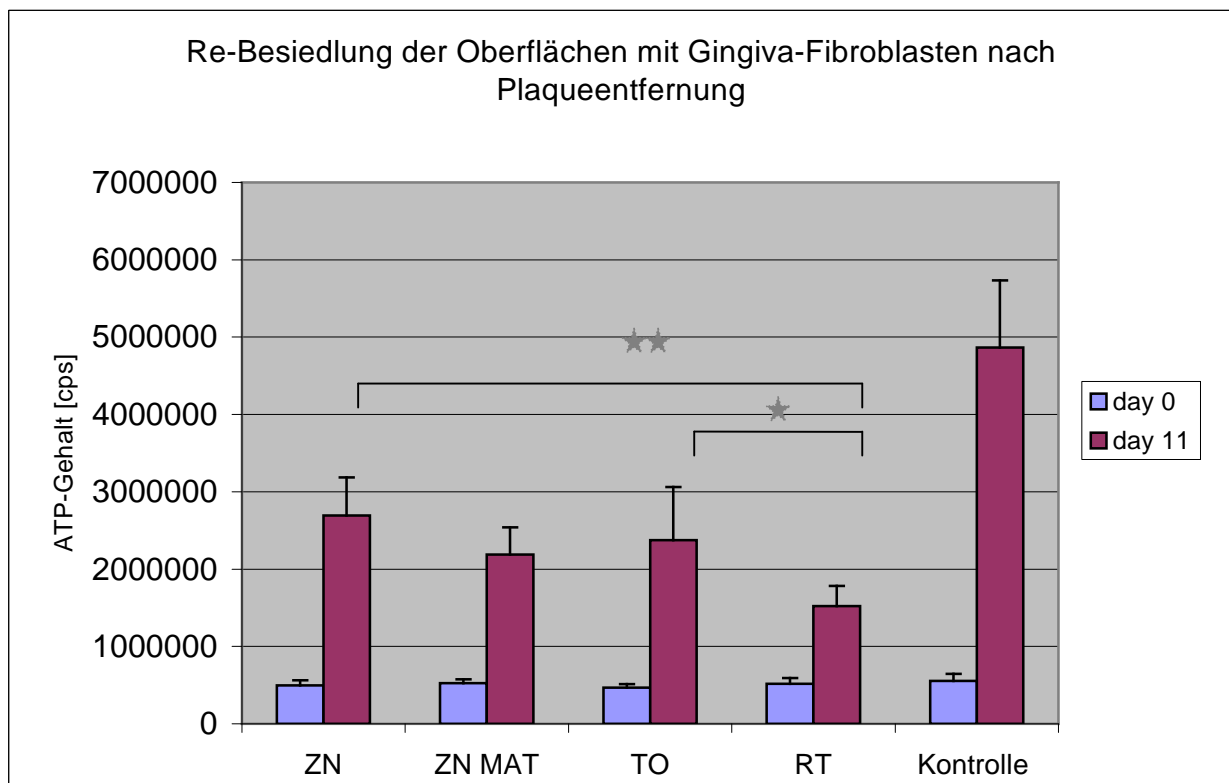


Abb. 5: Re-Besiedlung verschiedener Oberflächen nach Biofilmentfernung.

★ Signifikanzen  $p < 0,05$  (gepaarter T-Test).

★ ★  $p = 0,005$ , da  $< 0,01$  also hochsignifikant

### **Schlussfolgerungen:**

Da bisher Reintitan in der oralen Implantologie fast ausschließlich für Gingivaformer und Kronenaufbauten aus Titan genutzt wird, konnte durch diese in-vitro Untersuchung gezeigt werden, dass mit Zirkonnitrit eine Oberfläche mit besserer Biokompatibilität als beim bisherigen "Goldstandard" Reintitan zur Verfügung steht.

In der Nutzungsperiode von implantatgetragenen Zahnersatz kann es immer zur Biofilmbildung im Sulkus der Implantate kommen, durch die die "Periintegration" beeinträchtigt wird.

Biofilme können heute erfolgreich mechanisch oder mit einem Laser entfernt werden. Die vorliegende Untersuchung zeigte deutlich, dass es durch eine Biofilmbildung auf Reintitanoberflächen auch nach vollständiger Entfernung des Biofilms zu einer nachweisbaren Verschlechterung der ursprünglichen Biokompatibilität kommt.

Im Vergleich hierzu zeigte die Zirkonnitritoberfläche nach Biofilmentfernung eine hochsignifikant bessere Biokompatibilität für die Anheftung von Gingivafibroblasten. Dieser Vorteil bestand nicht nur im Vergleich zu Reintitan, sondern auch zu allen anderen untersuchten Oberflächen. Die vorliegenden Befunde deuten darauf hin, dass mit der Titannitritoberfläche eine neu entwickelte Oberfläche zur Verfügung, die neue Konzepte der "Periintegration" oraler Implantate eröffnet.

Düsseldorf, d. 30. Mai 2008-06-01

Univ.-Prof. Dr. Jürgen Becker