

In-vitro-Untersuchungen zur Implantatdekontamination mit Hilfe eines CO₂-Lasers in einem
Periimplantitismodell.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

vorgelegt von: Rainer Rudolf Müller

aus: München

Erscheinungsjahr: 2006

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Gerhard Wahl
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Martin Exner

Tag der Mündlichen Prüfung: 18.10.2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
<http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss-online> elektronisch publiziert

Aus der Poliklinik für Chirurgische Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
im Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universität Bonn
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Gerhard Wahl

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abkürzungsverzeichnis | 4 |
| 1. Einleitung | 5 |
| 1.1. Einführung | 5 |
| 1.2. Fragestellung | 10 |
| 2. Material und Methode | 13 |
| 2.1. Material | 13 |
| 2.2. Methode | 18 |
| 2.2.1. Mikrobiologische Untersuchung | 24 |
| 2.2.2. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen | 25 |
| 2.2.3. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen | 25 |
| 2.2.4. Statistische Analyse | 26 |
| 3. Ergebnisse | 27 |
| 3.1. Mikrobiologische Untersuchungen | 27 |
| 3.2. Rasterelektronenmikroskopische Ergebnisse | 32 |
| 3.3. Fluoreszenzmikroskopische Ergebnisse | 35 |
| 4. Diskussion | 40 |
| 4.1. Biofilmmodell, bildhafte Darstellung des Biofilms und Methodik | 40 |
| 4.2. Mikrobiologische und fluoreszenzmikroskopische Ergebnisse | 42 |
| 5. Zusammenfassung | 52 |
| 6. Literaturverzeichnis | 54 |
| 7. Anhang | 60 |
| 7.1. Herstellernachweise | 60 |
| 7.2. Danksagung | 61 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------|------------------------------------|
| cw | continuous wave |
| EPS | extrazelluläre polymere Substanzen |
| h | Stunden |
| J | Joule |
| KBE | koloniebildende Einheiten |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| min | Minute |
| <i>P. aeruginosa</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| s | Sekunden |
| W | Watt |

1. Einleitung

1.1. Einführung

Die dentale Implantologie ist ein mittlerweile anerkanntes Therapiemittel und aus der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde nicht mehr wegzudenken. Im Jahr 2000 wurden laut Angaben der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde in der Bundesrepublik Deutschland ca. 200.000 Implantate inseriert. Die Tendenz ist weiterhin zunehmend. Gründe dafür sind ein ausgeprägtes Bewusstsein der Patienten für Ästhetik und Kaukomfort. Verbesserte Implantatdesigns, verfeinerte Operationstechniken und ausgereifere prothetische Versorgungskonzepte verbessern die Prognose für einen Langzeiterfolg. Dentale Implantate werden heute fast ausschließlich aus Titan gefertigt. Da Titan eine hohe Affinität zu Sauerstoff zeigt, bildet sich ein stabiler Oxidmantel an der Oberfläche, das Titanoxid. Dies bewirkt eine Korrosionsfestigkeit und damit eine Biokompatibilität, welche Voraussetzung für eine Osteointegration ist.

Trotzdem ist der Erfolg eines implantologisch-prothetischen Konzeptes nicht mit Sicherheit garantierbar. Komplikationen können intraoperativ, während der Einheilphase oder nach Abschluss der prothetischen Versorgung auftreten. Als Spätkomplikationen werden Komplikationen während der Belastungsphase angesehen. Dabei ist zwischen mechanischen Ursachen, wie der Lockerung oder Fraktur von Schraubverbindungen, der Fraktur des Implantates, und biologischen Ursachen zu unterscheiden. Zu den biologischen Spätkomplikationen zählen die Mukositis, die Periimplantitis, die rezessiv-atrophische Veränderung des periimplantären Weichgewebes und das Fehlen der keratinisierten Mukosa (Behneke und Behneke, 2003).

Die Periimplantitis ist eine der gravierendsten Spätkomplikationen, die zu spät erkannt und therapiert oft zur Entfernung des betroffenen Implantats führt. Sie ist definiert als eine situspezifische periimplantäre Entzündungsreaktion an einem sich unter Funktion befindlichen Implantat mit progressivem Verlust am knöchernen Stützgewebe (Behneke und Behneke, 2003). Klinisch imponieren erhöhte Sondierungstiefen, Blutung, Mobilität und Suppuration. Radiologisch ist eine trichter- bzw. schüsselförmige sowie spaltartige Knochendestruktion zu

erkennen. Die Ätiologie ist dabei multifaktoriell (Behneke und Behneke, 2003). So spielen parafunktionelle Aktivitäten des Patienten, exzentrische Okklussionskontakte und funktionelle Überbelastungen eine Rolle (De Smet et al., 2001; Isidor, 1997; Quirynen et al., 1992; Rangert et al., 1995). Als gesichert darf der Einfluss von mangelnder Mundhygiene angesehen werden und dadurch von mikrobiellen Pathogenen, die sich in der periimplantären Plaque befinden, beziehungsweise die fehlende oder mangelnde immunologische Antwort des Wirts auf die Pathogene. Das Keimspektrum stimmt weitgehend mit der einer chronisch progressiven Parodontopathie überein (Listgarten und Lai, 1999; Meffert, 1993; Mombelli und Lang, 1992). In vielen klinischen Studien wurden im Zusammenhang mit einer Periimplantitis gram-negative Anaerobier und Spirochäten, wie *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter recta*, *Bacteroides forsythus* und Capnozytophagen nachgewiesen (Augthun und Conrads, 1997; Becker et al., 1991; Listgarten und Lai, 1999; Mombelli, 2002). Wobei die Präsenz vieler dieser Keime auch in einem reizlosen periimplantären Sulkus nachweisbar sind (Wahl et al., 1992). Bei einem natürlichen Zahn wird das knöcherne Lager durch eine dentogingivale Barriere gegen Keime aus der Mundhöhle geschützt. Diese Barriere ähnelt bei einem Implantat eher einer Narbe und ist daher nicht so wirkungsvoll. Entzündungen am periimplantären Weichgewebe dehnen sich schneller auf das knöcherne implantäre Lager aus. Hat sich eine Periimplantitis erst einmal manifestiert, sind Knochen- und Weichgewebssrezessionen die Folge. Dadurch kommt es zur Exposition größerer Flächen des Implantates. Diese haben abhängig vom jeweiligen Implantattyp eine glatte oder eine additiv- oder ablativ-aufgeraute Oberfläche. Beide Oberflächentypen bieten durch Makro- und Mikroretentionen weitere Anheftungsmöglichkeiten für orale Plaque und die darin befindlichen Pathogene.

Die Ziele der Periimplantitis-Therapie bestehen darin, den progressiven Knochenabbau zu stoppen, entstandene Taschen durch Dekontamination der exponierten Implantatoberflächen zu eliminieren und - falls erforderlich - das Knochenlager zu rekonstruieren. In der Literatur werden dazu mehrere Strategien beschrieben. Die klassischen Therapieformen sind der Parodontaltherapie entlehnt mit leider unzureichenden Ergebnissen. Zur Entfernung von entzündlichem Gewebe stehen lediglich Kunststoffküretten zur Verfügung, da klassische Metallküretten oder herkömmliche Ultraschallgeräte gerade aufgeraute Implantatoberflächen negativ verändern (Buser und Maeglin, 1994). Ein neues Ultraschallgerät (Vector®) ist noch in der Erprobungsphase. Allerdings lassen sich Partikel von Karbon, die vom Ultraschallansatz

stammen, auf den behandelten Implantatoberflächen nachweisen (Schwarz et al., 2003; Schwarz et al., 2005a). Diese Partikel könnten die Knochenregeneration negativ beeinflussen. Als resektive Maßnahme wird die Einebnung und Politur der Makro- und Mikroretentionen mittels Hartmetallfräsen, diamantierten Schleifkörpern und Polierinstrumenten empfohlen (Buser und Maeglin, 1994). Die antimikrobielle Therapie in Form von lokaler Applikation oder systemischer Gabe hat sich lediglich als Initialtherapie oder als adjuvante Anwendung bewährt, nicht aber als Monotherapie (Behneke und Behneke, 2003). Zur Verfügung stehen lokale Desinfektiva wie Chlorhexidindigluconat-Spülungen in verschiedenen Konzentrationen, 3%-iges Wasserstoffperoxid oder Zitronensäure (Buchmann et al., 1994; Dennison et al., 1994; Sennheiser-Kirchner et al., 2004; Zablotsky et al., 1992) sowie antibiotische Wirkstoffe wie Metronidazol, Amoxicillin, Amoxicillin/Clavulansäure und Tetracyclin (Buchmann et al., 1996).

Idealerweise sollte eine Periimplantitistherapie auch die vollständige Wiederherstellung der knöchernen Verankerung des Implantates beinhalten. Dies ist zurzeit nur mit einem autogenen Knochentransplantat oder mit Knochenersatzmaterialien zu erreichen. In der Literatur wird dabei auch der Einsatz von Membranen empfohlen (Behneke und Behneke, 2003). Als Voraussetzung für den Erfolg dieser Techniken wird eine dekontaminierte Implantatoberfläche angesehen. Diese ist ebenso Voraussetzung für die primäre Osteointegration unmittelbar nach der Implantatinsertion. Kontaminationen auf Implantatoberflächen waren in früheren Jahren nicht nur mikrobieller Natur, sondern sie waren auch durch anorganische Rückstände während der Implantatfertigung bedingt oder durch ungeeignete Transportverpackungen und durch unsachgemäßes Sterilisieren. Diese Rückstände konnten in einer Studie von Wahl und Tuschewitzki (1987) nachgewiesen werden. Sie wurden unter anderem als Ursache für Entzündungsreaktionen während der Osteointegrationsphase angesehen. Dieses Problem gilt heute als nahezu gelöst.

Durch den Dekontaminationsvorgang im Rahmen der Periimplantitistherapie sollte die ursprüngliche Implantatoberfläche nicht verändert werden. Für die Dekontamination erscheint der Einsatz von Pulverstrahlgeräten momentan als das effektivste Therapiemittel (Augthun et al., 1998; Dennison et al., 1994). Als mögliche Nachteile dieses Verfahrens gelten die Gefahr einer Emphysembildung, die Beschädigung der Implantatoberfläche, die Einlagerung von Festkörperpartikeln und der Verlust der Oberflächenenergie (Bergendal et al., 1990; Chairay et

al., 1997; Kreisler et al., 2005). Ein Lösungsansatz könnte im Einsatz von Laserbestrahlung bestehen.

Der Begriff LASER (**L**ight **A**mplifikation by **S**timulated **E**mission of **R**adiation) bezeichnet das Funktionsprinzip, nach dem Licht durch induzierte Emission von Strahlung verstärkt wird. Die emittierten Lichtquanten haben die Eigenschaft der zeitlichen und räumlichen Kohärenz. Das Laserlicht ist monochromatisch. Die Auswahl an geeigneten Lasermedien ist vielfältig. Dazu zählen Gase wie CO₂, Festkörper wie Neodym, Flüssigkeiten mit Farbstoffmolekülen oder Halbleiter. Dementsprechend vielfältig sind auch die physikalischen Eigenschaften.

Viele der bisherigen Untersuchungen, die sich mit dem Einsatz in der Implantologie beschäftigen, beziehen sich allerdings auf tierexperimentelle bzw. In-vitro-Versuche. Der Nd:YAG-Laser scheint für eine Dekontamination von Implantatoberflächen ungeeignet zu sein, da die sterilisierende Wirkung unzureichend ist und es beim Einsatz des Nd:YAG-Lasers zum Aufschmelzen der Metalloberfläche kommt (Block et al., 1992; Romanos et al., 2000). Günstigere Eigenschaften scheint nach ersten klinischen Studien der Diodensoftlaser zu haben (Bach et al., 2000). Auch die Kombination des Diodensoftlaser mit photosensibilisierenden Agenzien sind Gegenstand von klinischen Studien (Dortbudak et al., 2000; Dortbudak et al., 2001; Dortbudak et al., 2002; Haas et al., 2000). Der Einsatz von Er:YAG- und GaAlAs-Lasern ist derzeit noch in der Erprobungsphase (Kreisler et al., 2002d; Kreisler et al., 2002c; Kreisler et al., 2002a; Schwarz et al., 2003; Schwarz et al., 2005b; Schwarz et al., 2005a). Ein weiterer Lasertyp, der CO₂-Laser, könnte für die Periimplantitistherapie geeignet sein.

Allerdings sind für alle Lasertypen noch zu wenige Daten für die ideale Einstellung der Energie- und Zeitparameter vorhanden, es liegen lediglich Empfehlungen vor. So besteht beim Abfahren der Implantatoberfläche mit Laserstrahlen die Gefahr, dass zu viel Energie auf den angrenzenden Knochen übertragen wird und bei der dadurch entstehenden Temperaturerhöhung der Knochen kompromittiert wird. Bei einer Überschreitung des Grenzwertes von 44° C kann eine Knochenschädigung nicht mehr ausgeschlossen werden (Eriksson und Albrektsson, 1983).

Wie bereits oben erwähnt ist ein Ziel der Periimplantitistherapie die absolute Dekontamination der exponierten Implantatoberflächen. Es muss davon ausgegangen werden, dass die mikrobiellen Pathogene nicht in ihrer planktonischen Form, sondern analog zu einer marginalen Parodontitis

(Darveau et al., 1997; Offenbacher, 1996) in einem Biofilm auf der Implantatoberfläche vorliegen. Der größte Teil eines Biofilms besteht aus Wasser. Der Wassergehalt kann zwischen 80 und 98% variieren. Die extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) stellen mit 60 bis 98% der Trockenmasse den größten Teil des organischen Anteils der Biofilmmasse dar (Christensen und Charaklis, 1990). In diese EPS-Gelmatrix sind die Mikroorganismen und abiotischen Partikel eingebettet. In dieser sesshaften Form können sich Bakterien auf den unterschiedlichsten natürlichen und künstlichen Oberflächen etablieren und imponieren - ähnlich wie dentale Plaque - als schleimig feuchter, weitgehend fester auf der Unterlage haftender Überzug (Costerton et al., 1999). Die größte Fraktion der polymeren Komponenten der EPS stellen Polysaccharide und Proteine dar. In geringeren Konzentrationen liegen daneben auch noch Nukleinsäuren, Lipide und Lipopolysaccharide vor (Burns, 1989; Jahn und Nielsen P.H., 1999). Lipopolysaccharide sind ein Bestandteil der äußeren Bakterienmembran und werden durch Zellyse freigesetzt. Gerade die Lipopolysaccharide rückten immer mehr in der Mittelpunkt von Studien. Sie fungieren als Endotoxine und wirken verstärkend auf die Immunreaktion (Hahn et al, 1994). Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Lipopolysaccharide von gramnegativen Bakterien und der Destruktion von parodontalem Stützgewebe (Dennison und Van Dyke, 1997; Gemmel et al., 1997).

Biofilme weisen einen komplexen, dreidimensionalen Aufbau auf und können von einer einzigen, mehreren oder vielen verschiedenen Bakterienspezies gebildet werden (Costerton et al., 1978). Dieser komplexe Aufbau schützt den Film vor Austrocknung und verhindert unter anderem eine Diffusion von antimikrobiellen Mitteln, wie zum Beispiel Antibiotika, bis in die untersten Schichten des Films (Flemming H.C. et al, 2000). Innerhalb eines Films finden sich mehrere Kompartimente mit unterschiedlichen pH-Werten und elektrochemischen Potentialen (Costerton et al., 1994). Dies macht die Bakterien innerhalb des Biofilms nahezu resistent gegen Antibiotika oder andere Desinfektiva (Costerton et al., 1999). Zudem sind Biofilme auf Grund der schlechten Zugänglichkeit in der Mundhöhle nur schlecht mechanisch entfernbar (Folwaczny und Hickel, 2003). So spielen bakterielle Biofilme in der Pathogenese zahlreicher dentaler Erkrankungen, wie Karies oder marginale Parodontitis, eine entscheidende Rolle (Offenbacher, 1996; Shu et al., 2000).

1.2. Fragestellung

Der in dieser Studie eingesetzte Lasertyp ist ein CO₂-Laser. Er besteht aus drei Hauptbauelementen, einer Pumpe, einem Lasermedium und einem Resonator. Als Lasermedium wird ein Gasgemisch aus 4,5% Kohlendioxid (CO₂), 13,5% Stickstoff und 82% Helium benutzt. Das CO₂-Laserlicht hat im Wasser ein Absorptionsmaximum. Bei einer Energiedichte über 318 Jcm⁻² entfaltet er eine bakterizide Wirkung durch schlagartige Verdampfung der getroffenen Zelle (Dederich et al., 1990; Wilson, 1994). Da Titan im Bereich der Wellenlänge des CO₂-Lasers die niedrigsten Absorptionswerte aufweist, wird der größte Anteil der eingestrahnten Energie reflektiert (Ganz, 1994). Weitere Eigenschaften von Titan sind ein hoher Schmelzpunkt und eine geringe Wärmeleitfähigkeit.

Der CO₂-Laser scheint zur Dekontamination von Implantatoberflächen geeignet zu sein, da wasserhaltige Biofilme mit relativ hoher Energie bestrahlt werden können und gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit eines Schadens am angrenzenden, knöchernen Implantatlager durch weitergeleitete Wärme als gering einzuschätzen ist.

In der Literatur sind zurzeit wenige Studien zu finden, die den Einsatz des CO₂-Lasers in der Implantologie untersucht haben. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der Bestrahlungsparameter, die in Studien zur Implantatdekontamination mit dem CO₂-Laser angewandt wurden.

Tabelle 1: Übersicht über verwendete bzw. empfohlene CO₂-Laser Bestrahlungsparameter im Rahmen einer Implantatdekontamination (cw=continous wave, W=Watt, s=Sekunde)

| Jahr | Autor | Lasertyp | Modus | Energie-/Zeit-Parameter | in vitro/in vivo |
|------|----------------|------------------------------|-------|-------------------------|-------------------|
| 1994 | Ganz | CO ₂ | cw | 4 W / 4 s | in vitro |
| 1995 | Oyster et al | CO ₂ | cw | 4 W / 6 s | in vitro |
| 1998 | Deppe | CO ₂ plus Scanner | cw | 2,5 W / 12 mal 5 s | in vitro /in vivo |
| 1998 | Kato et al | CO ₂ | cw | 286 J/cm ² | in vitro |
| 1999 | Romanos | CO ₂ | cw | 4 W | in vivo |
| 2002 | Kreisler et al | CO ₂ | cw | 2,5 W / 15 s | in vitro |
| 2002 | Kreisler et al | CO ₂ | cw | 1 W / 56 s | in vitro |

Erste Anwendungen des CO₂-Lasers finden sich im Bereich der Freilegung von geschlossen-einheilenden Implantatsystemen (Walsh, 1992). Auch dort wurde schon über eine mögliche Temperaturerhöhung im Knochen durch fortgeleitete Wärme im Rahmen der Laserbestrahlung diskutiert. Kato und Mitarbeiter (Kato et al., 1998) konnten einen bakteriziden Effekt auf *Streptococcus sanguis* und *Porphyromonas gingivalis* auf Titanplättchen durch den Einsatz des CO₂-Lasers nachweisen. Weitere Autoren untersuchten in in-vitro Versuchen die Temperaturentwicklung am Implantat und im angrenzenden knöchernen Implantatlager während einer CO₂-Laserbestrahlung (Deppe H, 1998; Ganz, 1994; Oyster et al., 1995; Swift et al., 1995). Kreisler und Mitarbeiter (2002b) stellten in ihren In-vitro-Untersuchungen eine kritische Temperaturerhöhung am Knochen auf 47° C im *continous-wave* (cw)-Modus bei 2,5 W nach 13 s und bei 1 W nach 56 s fest. Deppe (1998) konnte mit der zusätzlichen Verwendung des Silk TouchTM Flashscanners mit den Parametern 12x5 s, 2,5 W im cw-Modus eine Reduktion der Keimzahl des als hitzeresistent bekannten *Bacillus subtilis* um 99% in vitro erreichen ohne eine Temperaturerhöhung über 45° C am angrenzenden Knochen zu erzeugen. In einer darauf folgenden Studie an Beagle-Hunden konnte eine partielle Regeneration des knöchernen Implantatlagers durch Augmentation mit Knochenersatzmaterialien und Membrantechnik erreicht werden. Über nennenswerte Veränderungen an der Implantatoberfläche nach Bestrahlung mit dem CO₂-Laser wurde in keiner bekannten Studie berichtet. Romanos (1999) empfiehlt im

Rahmen einer Implantatdekontamination die Einstellung von 4 Watt. Eine zeitliche Mindest- oder Höchstdauer der Laserbestrahlung wird dabei nicht angegeben.

Ziel dieser Studie war es, *in vitro* einen stabilen Biofilm auf ITI-Implantate mit einer maschinell-abgedrehten glatteren Oberfläche im Schulterbereich und einer SLA-Oberfläche im zylindrischen Anteil zu generieren. Dazu wurde der Keim *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 939) eingesetzt. Dieser Keim ist im Rahmen der Umweltbiologie und der Wassertechnik bereits sehr intensiv untersucht worden. Es ist bekannt, dass *P. aeruginosa* in einem feuchten Milieu einen stabilen Biofilm bildet, was beispielsweise besonders ein Problem bei wasserführenden Kompartimenten in dentalen Behandlungseinheiten darstellt (Mills et al., 1986; Tall et al., 1995). Bisher ist noch kein Desinfektionsverfahren zur wirkungsvollen und dauerhaften Beseitigung des bakteriellen Biofilms in dentalen Behandlungseinheiten etabliert.

In einem zweiten Schritt sollte die kontaminierte Implantatoberfläche mit einem CO₂-Laser unter möglichst kliniknahen Bedingungen bestrahlt werden. Dazu wurden die kontaminierten Implantate in vier verschiedene Gruppen (Gruppe 1-4) eingeteilt. Gruppe 1 wurde nicht behandelt. Bei den drei restlichen Gruppen (Gruppe 2-4) wurden verschiedene Energie- und Zeitparameter verwendet. Es sollte geprüft werden, ob im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe eine Reduzierung der Keimzahl zu erzielen ist und ob sich unterschiedliche Kombinationen der Energie-/Zeit-Parameter in Bezug auf die Keimzahlreduktion unterscheiden.

Weiterer Gegenstand der Untersuchung war die Frage, ob durch die Behandlung mit dem CO₂-Laser die Entfernung der im Biofilm befindlichen extrazellulären Polysaccharide (EPS) möglich ist und Unterschiede innerhalb der einzelnen Kombinationen der Energie-/Zeit-Parameter feststellbar sind.

Die Parameter in Gruppe 2 und 4 wurden so gewählt, dass eine thermische Nekrose, die am angrenzenden periimplantären Knochen entstehen würde, sicher vermieden wird (Deppe H, 1998; Kreisler et al., 2002c). Der Parameter Zeit in Gruppe 3 wurde absichtlich höher gewählt, um zu beobachten, ob eine Verlängerung der Bestrahlungsdauer bei hoher Energieeinstellung einen Einfluss auf die Keimreduktion und Entfernung von extrazellulären Polysaccharide (EPS) auf den kontaminierten Implantatoberflächen hat.

2. Material und Methode

Alle Materialien wurden nach Herstellerangaben verarbeitet. Die Versuche wurden in den Räumen der Poliklinik für Chirurgische Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universitätszahnklinik Bonn, dem mikrobiologischen/histologischen Labor der Universitätszahnklinik Bonn und dem mikrobiologischen Labor am Institut für Hygiene der Universitätsklinik Bonn durchgeführt.

2.1. Material

Eine Implantatkavität wurde in ein Unterkiefersituationsmodell aus Gips mit einer großen Schalltlücke im vierten Quadranten in regio 045 für den in dieser Studie verwendeten Implantattyp (ITI, Standard Implantat, Regular Neck, Vollschraube, Länge: 10 mm, Durchmesser des Schraubenanteils: 4,1 mm, Durchmesser des Halsanteils: 4,8mm, Oberfläche: SLA, Fa. Straumann, Schweiz) präpariert. Anschließend wurde in die Implantatkavität im Gipsmodell ein Periimplantitis-ähnlicher, ossärer Defekt radiert. Aus dem radierten Gipsmodell wurde mittels eines additionsvernetzenden Silikons (Protesil, Austanal Medizintechnik, Köln, Deutschland) eine Ausgießform hergestellt. Diese Form wurde fünfmal mit Gießharz (Polyester, Fa. EFCO Produkte GmbH, Deutschland) aufgefüllt, um jeweils fünf identische Modelle zu gewinnen. An jedem Modell wurde an der Basis eine Artikulator-Montageplatte (Fa. SAM, München, Deutschland) fixiert (Abb. 1 u. 2). Vor jeder Versuchsreihe wurden die Modelle zur Desinfektion für 15 min in eine Isopropanol-Lsg. (70%) getaucht. Anschließend wurden die Modelle in einen Phantomkopf (Frasacco, Fa. Sachs, Deutschland) geschraubt (Abb. 3). Zur Dekontamination der Implantatoberflächen wurde in der vorliegenden Studie wurde ein CO₂-Laser mit einem 90°-Optik-Handstück verwendet (Sharplan 20C, Sharplan Lasers GmbH, Freising, Deutschland) (Abb. 4 und 5).

Abb. 1: Seitenansicht des Unterkiefermodells mit Implantatposition regio 45 und artifiziellem periimplantären Defekt (weißer Pfeil)

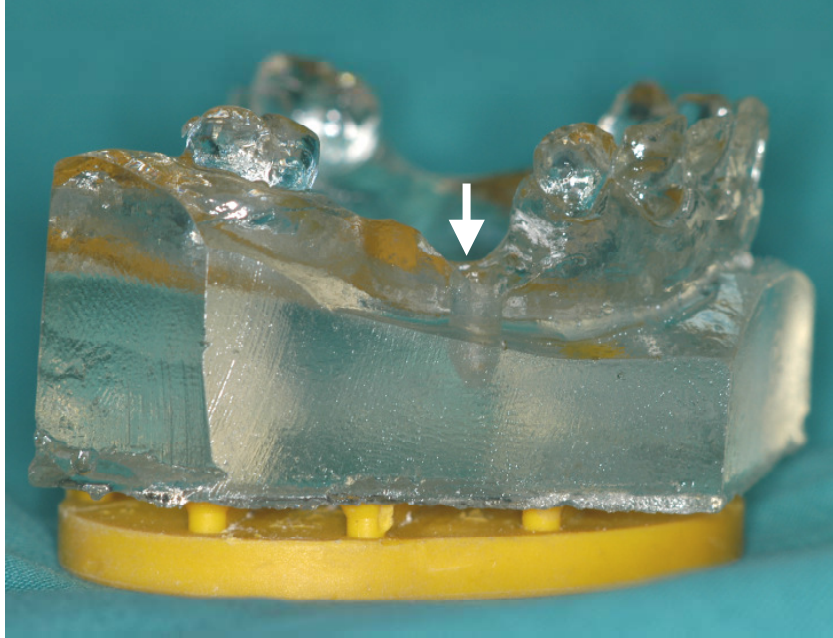


Abb. 2: Unterkiefermodell mit Implantatposition regio 45 und artifiziellem periimplantären Defekt (weißer Pfeil), Ansicht von okklusal.

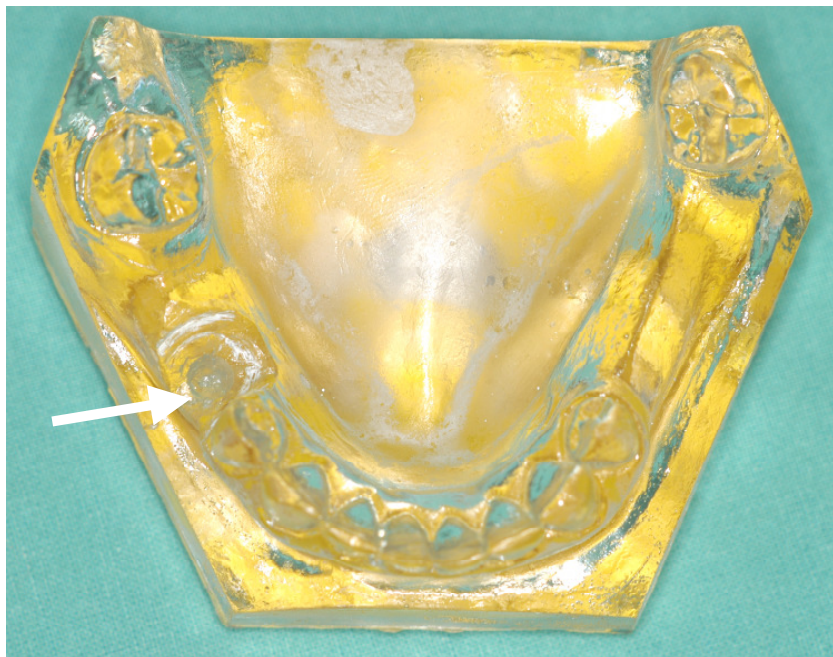


Abb. 5: 90°-Optik-Handstück des Sharplan CO₂-Lasers



Die Implantate wurden an den Einbringpfosten mit sterilen Pinzetten aus der sterilen Verpackung entnommen, aus der sterilen Plastikhalterung gelöst und um 180° gedreht wieder auf die noch sterile Plastikhalterung gesteckt. Anschließend wurde jeweils ein Implantat samt Plastikhalterung in ein steriles Schraubröhrchen gegeben. Zur starren Fixierung diente eine zwischen Plastikhalterung und Schraubröhrchen verkeilte, kleine Eppendorf-Pipettenspitze (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) (s. Abb. 6-8).

Abb. 6: Entnahme der Implantate mit sterilen Instrumenten aus der sterilen Transporthalterung

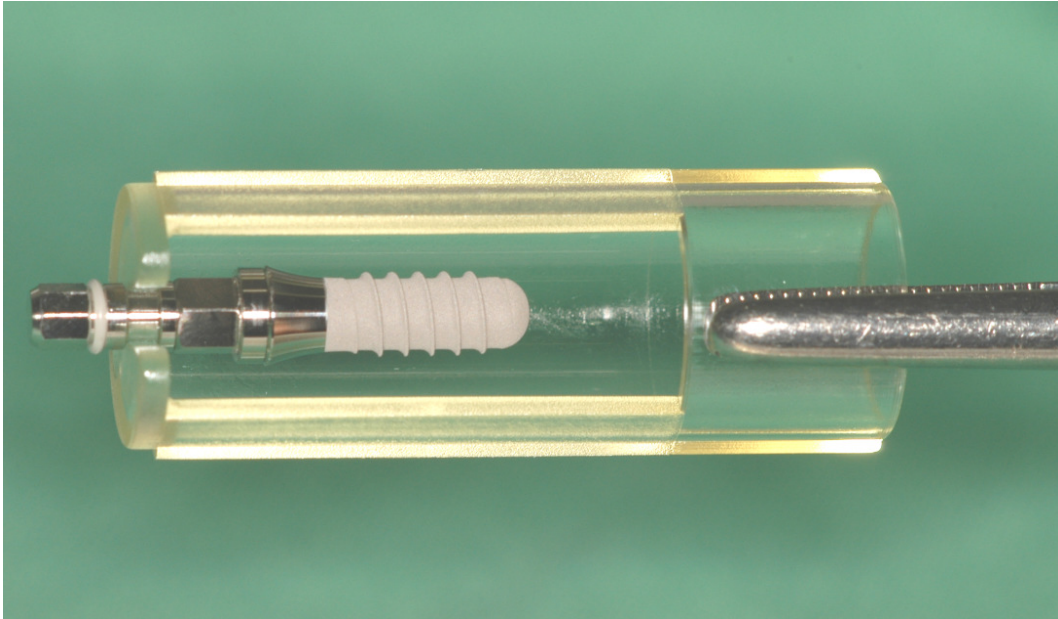


Abb. 7: Wenden des Implantats um 180° und Wiederbefestigen auf der sterilen Plastikhalterung

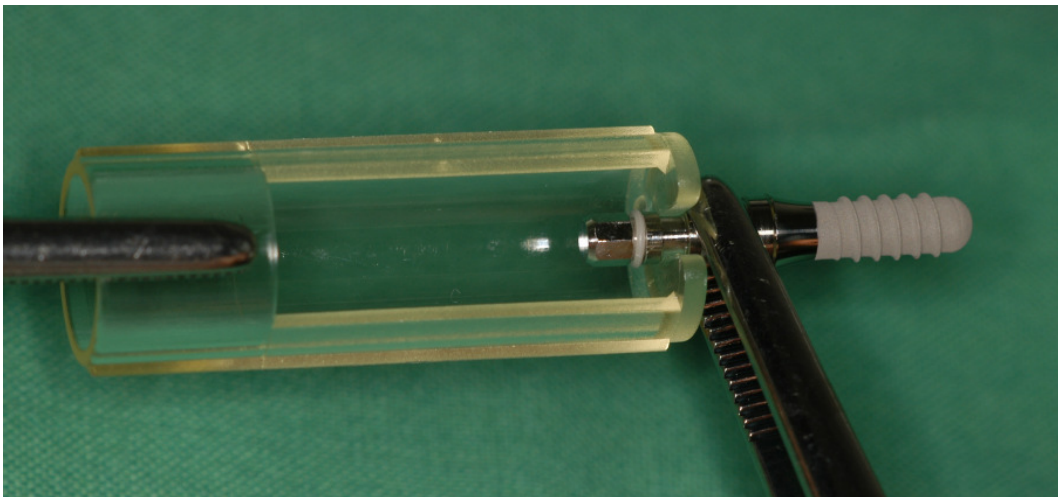


Abb. 3: Unterkiefermodell mit geplanter Implantatposition (weißer Pfeil) im Phantomkopf fixiert, Okklusionsebene ist nahezu senkrecht positioniert, um eine mögliche Kontamination der nicht kontaminierten Implantatoberfläche durch herabrinneende Bakteriensuspension zu vermeiden



Abb. 4: Bedienungstableau des Sharplan 20C CO₂-Laser





Abb. 8: Positionierung und Fixierung des Implantats in einem sterilen Schraubröhrchen mittels einer kleinen Pipettenspitze

2.2. Methode

Als Testkeim wurde *Pseudomonas aeruginosa* eingesetzt (DSM 939), der von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Deutschland) bezogen wurde. Vor jeder Versuchsreihe wurde eine Suspension mit diesem Keim wie folgt hergestellt:

Von einer zuvor mit *Pseudomonas aeruginosa* beimpften CaSo-Agar-Platte (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden 4 koloniebildende Einheiten (KBE) *Pseudomonas aeruginosa* mit einer sterilen Ösensonde entnommen, in 2 ml CaSo-Bouillon (Merck, Darmstadt, Deutschland) gegeben und auf dem Vortexer (VF2, Kanke & Klunke) für 15 Sekunden geschüttelt. Zur

Kontrolle wurde vor jeder Versuchsreihe eine Verdünnungsreihe der Keimsuspension durchgeführt, bei der aus der Lösung jeweils 1ml auf einer CaSo-Agar-Platte verstrichen und für 24 Stunden inkubiert wurde. Zu jeder Versuchsreihe lag danach eine Bakterienlösung im Bereich von 10^7 KBE/ml vor. Aus dieser Lösung wurden je 50 μ l mit je 10 ml CaSo-Bouillon zur endgültigen Keimsuspension verdünnt.

Die Schraubröhrchen wurden nun mit jeweils 9,5 ml der Keimsuspension mittels einer sterilen Eppendorf-Pipette (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) unter einer sterilen Werkbank (SterilGARD, Baker Company, USA) gefüllt. Durch dieses Auffüllen wurde eine Fläche von 67mm^2 des Implantates benetzt. Die benetzte Fläche setzt sich wie folgt zusammen (Abb. 9 und 10):

- Der glatte Halsbereich mit $47,9\text{ mm}^2$ (lt. Herstellerangaben).
- Der zylindrische Anteil mit der aufgerauten Oberfläche bis zum zweiten Gewindegang mit einer durchschnittlichen Höhe von ca. 3 mm mit einer resultierenden benetzten Oberfläche bis zu $19,1\text{ mm}^2$.

Abb. 9: Schraubröhrchen mit fixiertem Implantat bis zur zweiten Schraubwindung mit Keimlösung gefüllt (A= glatter, maschinell abgedrehter Halsbereich, B= raue Implantatoberfläche kontaminiert in Bakterienlösung, C= raue Implantatoberfläche unkontaminiert)

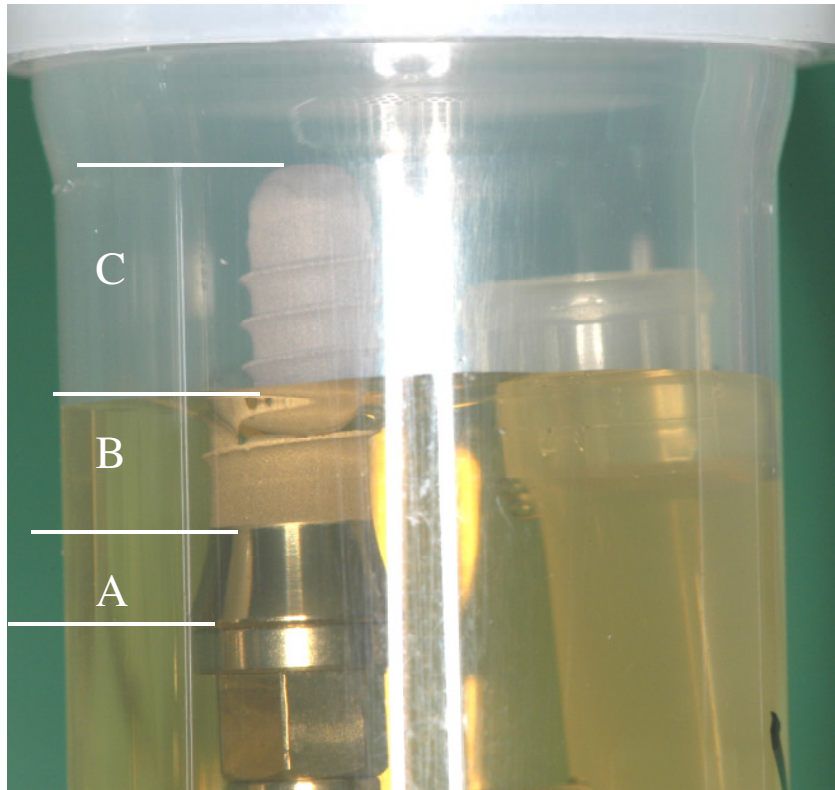
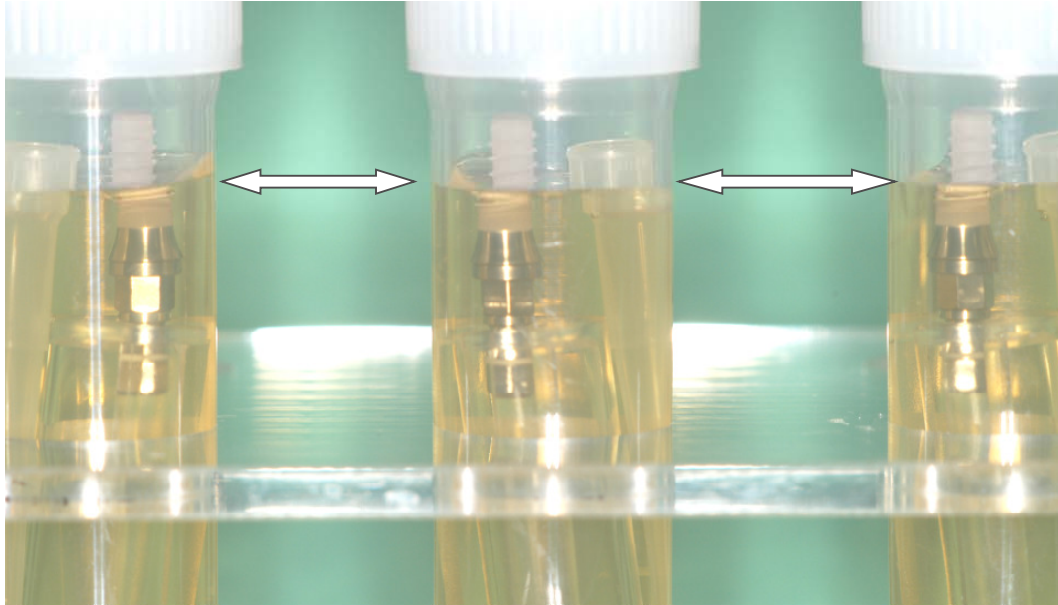


Abb. 10: 3 Schraubröhrchen mit fixiertem Implantat; alle bis zur zweiten Schraubwindung mit CaSo-Bouillon gefüllt (\Leftrightarrow = Füllhöhe der Suspension)



Die Schraubröhrchen wurden anschließend im Inkubationsschrank (Forma scientific, reach-in-incubator, Marietta Ohio, USA) bei 36° C bebrütet. Nach 48 h und weiteren 72 h wurden mit einer Eppendorf-Pipette jeweils 2ml der Bakteriensuspension aus den Schraubröhrchen entnommen und durch jeweils 2ml frische CaSo-Bouillon ersetzt. Insgesamt betrug die Inkubationszeit 7 Tage.

Danach wurden die Implantate mit sterilen Instrumenten (anatomische Pinzette, Implantat-Einbringinstrument und Unterkiefer-Frontzahn-Zange) (Abb. 11) aus den Röhrchen entnommen, die Plastikhalterung entfernt und je ein Implantat in je ein Modell eingesetzt. Zuvor wurde der Phantomkopf so positioniert, dass die Okklusionsebene des Unterkiefers senkrecht zum Boden ausgerichtet war, um eine Kontamination der unbenetzten Implantatoberfläche durch mögliche herabrinneende Bakteriensuspension zu vermeiden (s. Abb. 3 und Abb. 12)

Abb. 11: Implantat nach Entnahme aus dem Schraubröhrchen mittels steriler Unterkiefer-Frontzahn-Zange, gehalten am nicht kontaminierten, sterilen Ende

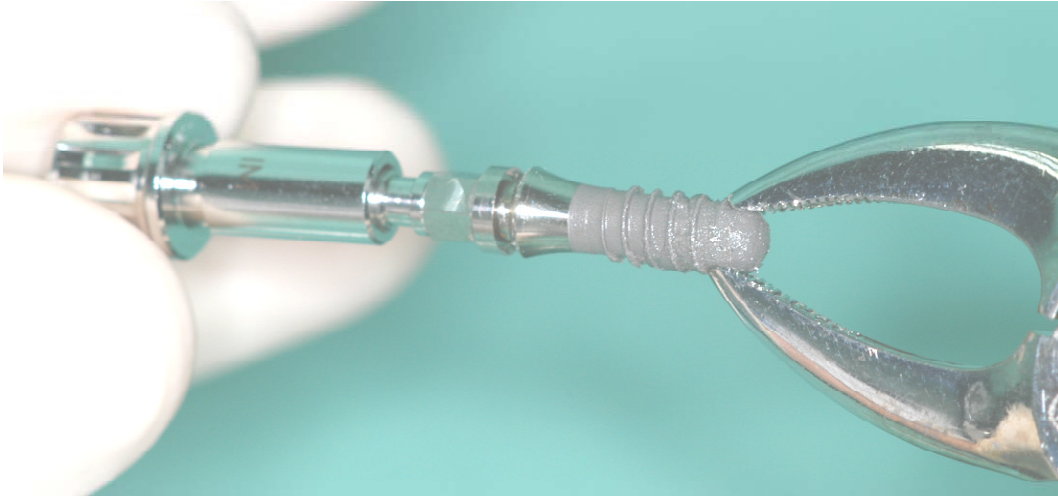


Abb. 12: Positionierung des Implantats im Modell und Versenkung des sterilen Anteils im „Knochen“. UK-Okklusionsebene ist nahezu senkrecht positioniert, um eine mögliche Kontamination der nicht kontaminierten Implantatoberfläche durch herabrinnende Bakteriensuspension zu vermeiden



Es wurden insgesamt 34 Implantate verwendet. 2 Implantate wurden zu Untersuchungen am Rasterelektronenmikroskop verwendet. Die restlichen Implantate wurden in vier Gruppen mit jeweils 8 Implantaten aufgeteilt und jede Gruppe unterschiedlich behandelt:

1. **Gruppe 1** wurde als Vergleichsgruppe nach 5 min unbehandelt aus dem Modell entnommen.
2. **Gruppe 2** wurde mit dem CO₂-Laser mit 2,5 W im cw-Modus für 12x5 s in wischender Bewegung zirkulär bestrahlt.
3. **Gruppe 3** wurde mit dem CO₂-Laser mit 2,5 W im cw-Modus für 6x50 s in wischender Bewegung zirkulär bestrahlt.
4. **Gruppe 4** wurde mit dem CO₂-Laser mit 1 W im cw-Modus für 6x50 s in wischender Bewegung zirkulär bestrahlt.

Abb. 13: Implantat wird mit dem CO₂-Laser (roter Laserspot) bestrahlt



Nach der Behandlung wurden die Implantate mit sterilen Instrumenten aus dem Modell entfernt und der Einbringpfosten abgeschraubt. Jeweils 6 Implantate einer Gruppe wurden anschließend zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) mikrobiologisch untersucht. Die

restlichen 2 Implantate einer Gruppe wurden zum Nachweis von extrazellulären Polysacchariden (EPS) fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

2.2.1. Mikrobiologische Untersuchung

Die mikrobiologischen Untersuchungen wurden nach den Vorgaben der Standardmethoden der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren durchgeführt (Gebel et al, 2001), um die KBE der noch auf den Implantaten verbliebenen Keime zu ermitteln.

Je ein Implantat wurde mit sterilen Instrumenten in ein mit 5 ml CaSo-Bouillon und etwa 1ml Glasperlen von 0,25 mm bis 0,5 mm Größe gefülltes steriles Schraubröhrchen gegeben (Abb. 14).

Abb. 14: Implantat im Schraubröhrchen mit CaSo-Bouillon und Glasperlen



Danach wurden die Schraubröhrchen auf dem Vortexer für 2min geschüttelt. Anschließend wurden in einer sterilen Werkbank 0,5ml mit einer Eppendorf-Pipette entnommen und damit eine Verdünnungsreihe bis 10^{-8} erstellt. Aus den Reagenzröhrchen der Verdünnungsreihe wurde jeweils 0,5ml mit einer Eppendorf-Pipette entnommen und auf einer CaSo-Agar-Platte (Merck,

Darmstadt, Deutschland) ausgestrichen und für 2 Tage im Brutschrank inkubiert. Die darauf folgende KBE-Zählung wurde ohne maschinelle Hilfsgeräte durchgeführt.

2.2.2. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Zur Färbung der EPS wurde je ein Implantat in ein mit jeweils 1ml Fertiglösung Sypro®(Ruby protein gel stain, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) gefülltes Röhrchen getaucht und für 30min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Implantate unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan, Axiovision-Software, Zeiss, Deutschland) untersucht und die Befunde auch photographisch dokumentiert. Um die Menge der gefärbten EPS der jeweiligen Gruppen vergleichen zu können, wurde diese subjektiv in einer Skala von 0 bis 10 geschätzt. Der Wert 0 stellt die absolute Dekontamination der behandelten Implantatoberflächen dar. Die vollständige Einfärbung der kontaminierten Implantatoberfläche wurde mit 10 bewertet.

2.2.3. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Implantate wurden in ein Glasschälchen gegeben und für 2 Stunden mit 25-prozentiger Glutaraldehydlösung überschichtet, anschließend für 30 Minuten in 0,2-prozentige Osmiumtetroxid-Lösung und für weitere 30 Minuten in Na-Kacodylat-Puffer eingelegt. Danach wurden die Implantate mit partikelfreiem Aqua bidest. dreimal für 5 Minuten gewaschen, mit einer ansteigenden Ethanolreihe (10%-100%) für jeweils 5 Minuten behandelt und über Nacht luftgetrocknet. Anschließend wurden die Implantate mit Goldspray gesputtert. Unter einem Rasterelektronenmikroskop (Leitz-AMR 1600T SEM, Leitz, Deutschland; Digital Image Proceeding System Software, Point Electronic, Deutschland) wurde der Biofilm auf dem Implantat vor der Behandlung bildhaft jeweils dargestellt.

2.2.4. **Statistische Analyse**

Die statistische Auswertung in Bezug auf die relative Reduzierung der KBE der jeweiligen Behandlung erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und SPSS 11.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA). Zur Feststellung signifikanter Unterschiede zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen wurde der Kruskal-Wallis- Test angewandt. Auf signifikante Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppen wurde nach Mann-Whitney-U getestet. Die Signifikanz wurde bei $p \leq 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Mikrobiologische Untersuchungen

Bezogen auf die Kontrollgruppe konnte in den Gruppen 2, 3, und 4 eine deutliche Reduktion der KBE festgestellt werden. Sie betrug im Median bei Gruppe 2: 99,89%, bei Gruppe 3: 99,98% und bei Gruppe 4: 99,95% (Tabelle 1, Abbildung 15 und 16).

Tabelle 2: Ergebnisse der KBE-Bestimmung von Gruppe 1-4 (Gruppe 1: unbehandelt; Gruppe 2: laserbestrahlt, 2,5 W, 12x5 s; Gruppe 3: laserbestrahlt, 2,5 W, 6x50 s; Gruppe 4: laserbestrahlt, 1 W, 6x50 s)

| Gruppe | Probe | KBE/cm ² | Median KBE/cm ² | KBE-Reduktion zu Gruppe 1 in % |
|--------|-------|---------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 1 | 1.000.000.147 | | |
| 1 | 2 | 597.014.925 | | |
| 1 | 3 | 323.880.597 | | |
| 1 | 4 | 1.298.507.463 | | |
| 1 | 5 | 155.223.881 | | |
| 1 | 6 | 328.358.209 | | |
| 1 | | | 617.164.179 | |
| 2 | 1 | 716.418 | | |
| 2 | 2 | 164.179 | | |
| 2 | 3 | 298.507 | | |
| 2 | 4 | 746.269 | | |
| 2 | 5 | 149.254 | | |
| 2 | 6 | 895.522 | | |
| 2 | | | 495.025 | 99,89 |
| 3 | 1 | 8955 | | |
| 3 | 2 | 167.164 | | |
| 3 | 3 | 13.433 | | |
| 3 | 4 | 95.522 | | |
| 3 | 5 | 161.194 | | |
| 3 | 6 | 73.134 | | |
| 3 | | | 86.567 | 99,98 |
| 4 | 1 | 125.373 | | |
| 4 | 2 | 201.493 | | |
| 4 | 3 | 237.313 | | |
| 4 | 4 | 146.269 | | |
| 4 | 5 | 279.104 | | |
| 4 | 6 | 234.328 | | |
| 4 | | | 203.980 | 99,95 |

Abb. 15: Boxplot der KBE-Bestimmung (KBE/cm²) der Gruppen 1, 2, 3 und 4; Boxplotdarstellung: obere Linie einer Box entspricht dem 75-, die untere dem 25-Perzentil, die Linie dazwischen dem Median

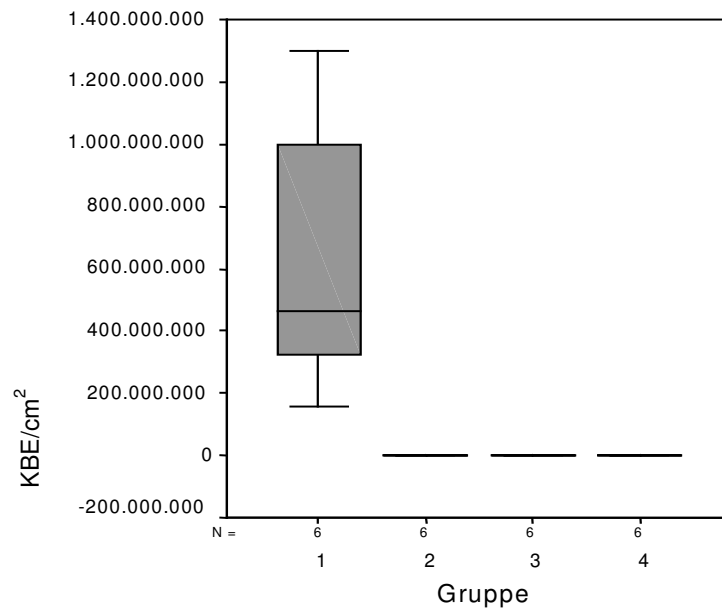
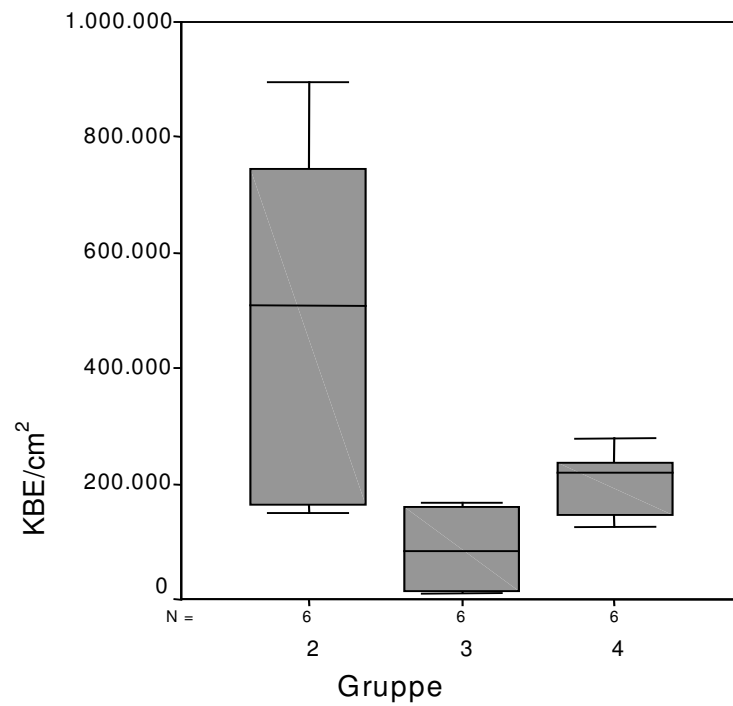


Abb. 16: Ausschnitt aus Abb. 15 zur besseren Übersicht der Boxplots der Gruppen 2, 3 und 4 mit entsprechend angepasster Ordinate



Im Vergleich zur Kontrollgruppe (Gruppe 1) unterschieden sich die KBE-Bestimmungen der anderen Gruppen (Gruppe 2, 3, 4) nach dem Kruskal–Wallis-Test hoch signifikant ($p < 0,001$) (Tabelle 3).

Tabelle 3: Datenanalyse nach Kruskal-Wallis der KBE/cm²-Werte der Gruppe 1 im Unterschied zu den Gruppen 2, 3, 4

| Gruppe | Fälle | | | | | |
|--------------------------------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|
| | Gültig | | Fehlen | | Gesamt | |
| | N | Prozent | N | Prozent | N | Prozent |
| 1 | 6 | 100,00 | 0 | ,0% | 6 | 100,00 |
| 2 | 6 | 100,00 | 0 | ,0% | 6 | 100,00 |
| 3 | 6 | 100,00 | 0 | ,0% | 6 | 100,00 |
| 4 | 6 | 100,00 | 0 | ,0% | 6 | 100,00 |
| Chi-Quadrat | | | | | 17,900 | |
| df (Anzahl der Freiheitsgrade) | | | | | 3 | |
| Asymptotische Signifikanz | | | | | 0,001 | |

Innerhalb der Gruppen 2, 3 und 4 lässt sich feststellen, dass mit den Bestrahlungsparameter 2,5 W und 6 x 50 s in Gruppe 3 die größte Keimreduktion erzielt wurde. Es folgen die Bestrahlungsparameter 1 W und 6 x 50 s in Gruppe 4 und die Parameter 2,5 W 12 x 5 s in Gruppe 2. Der Unterschied zwischen der Gruppe 2 und 3 (Tabelle 4) ist signifikant ($p < 0,16$), genau wie der Unterschied zwischen den Gruppen 3 und 4 ($p < 0,025$) (Tabelle 5).

Tabelle 4: Datenanalyse nach Mann-Whitney-U der KBE/cm²-Werte zwischen den Gruppen 2 und 3

| Gruppe | N | Mittlerer Rang | Rangsumme |
|--|----|----------------|-------------------|
| 2 | 6 | 9,00 | 54,00 |
| 3 | 6 | 4,00 | 24,00 |
| Gesamt | 12 | | |
| Mann-Whitney-U | | | 3,000 |
| Wilcoxon-W | | | 24,000 |
| Z (Prüfgröße zur Anpassung der Normalverteilung) | | | -2,402 |
| Asymptotische Signifikanz (2-seitig) | | | ,016 |
| Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)] | | | ,015 ^a |

^aNicht für Bindungen korrigiert

Tabelle 5: Datenanalyse nach Mann-Whitney-U der KBE/cm²-Werte zwischen den Gruppen 3 und 4

| Gruppe | N | Mittlerer Rang | Rangsumme |
|--|----|----------------|-------------------|
| 3 | 6 | 4,17 | 25,00 |
| 4 | 6 | 8,83 | 53,00 |
| Gesamt | 12 | | |
| Mann-Whitney-U | | | 4,000 |
| Wilcoxon-W | | | 25,000 |
| Z (Prüfgröße zur Anpassung der Normalverteilung) | | | -2,242 |
| Asymptotische Signifikanz (2-seitig) | | | .025 |
| Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)] | | | .026 ^a |

^aNicht für Bindungen korrigiert

Zwischen den Gruppen 2 und 4 war zwar ein deutlicher Unterschied zu erkennen, der jedoch nicht signifikant ist ($p < 0,109$) (Tabelle 6).

Tabelle 6: Datenanalyse nach Mann-Whitney-U der KBE/cm²-Werte zwischen den Gruppen 2 und 4

| Gruppe | N | Mittlerer Rang | Rangsumme |
|--|----|----------------|-------------------|
| 2 | 6 | 8,17 | 49,00 |
| 4 | 6 | 4,83 | 29,00 |
| Gesamt | 12 | | |
| Mann-Whitney-U | | | 8,000 |
| Wilcoxon-W | | | 29,000 |
| Z (Prüfgröße zur Anpassung der Normalverteilung) | | | -1,601 |
| Asymptotische Signifikanz (2-seitig) | | | ,109 |
| Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)] | | | ,132 ^a |

^aNicht für Bindungen korrigiert

3.2. Rasterelektronenmikroskopische Ergebnisse

Auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ist in Abbildung 17 bereits auf den Aufnahmen mit geringerer Vergrößerung ist deutlich Fremdmaterial im Bereich der ersten und zweiten Windung der Implantatoberfläche, welches als der generierte Biofilm identifizierbar ist, zu erkennen. Dieser Biofilm zeigt eine mehrschichtige, dreidimensionale Struktur, wie in den Abbildungen 18 und 19 bei höherer Vergrößerung zu sehen ist. Der Übergang vom Biofilm zur nicht kontaminierten Implantatoberfläche, explizit in Abbildung 20 dargestellt, ist deutlich in Abbildung 19 erkennbar.

Abb.17: Biofilm (dunkler Pfeil) auf Implantat, 25-fach vergrößert.

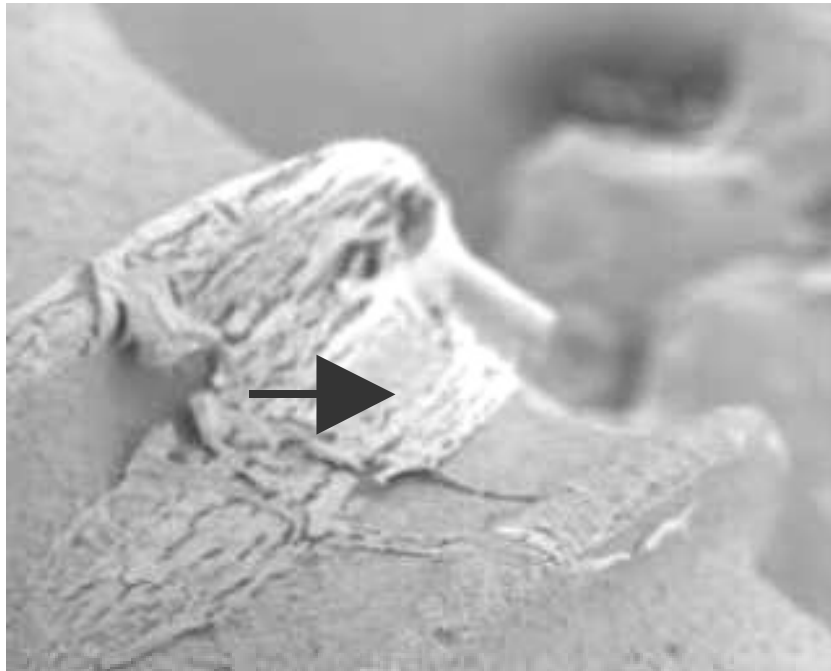


Abb. 18: Übergang nicht kontaminierte Implantatoberfläche (heller Pfeil) / Biofilm (dunkler Pfeil), 240-fach vergrößert

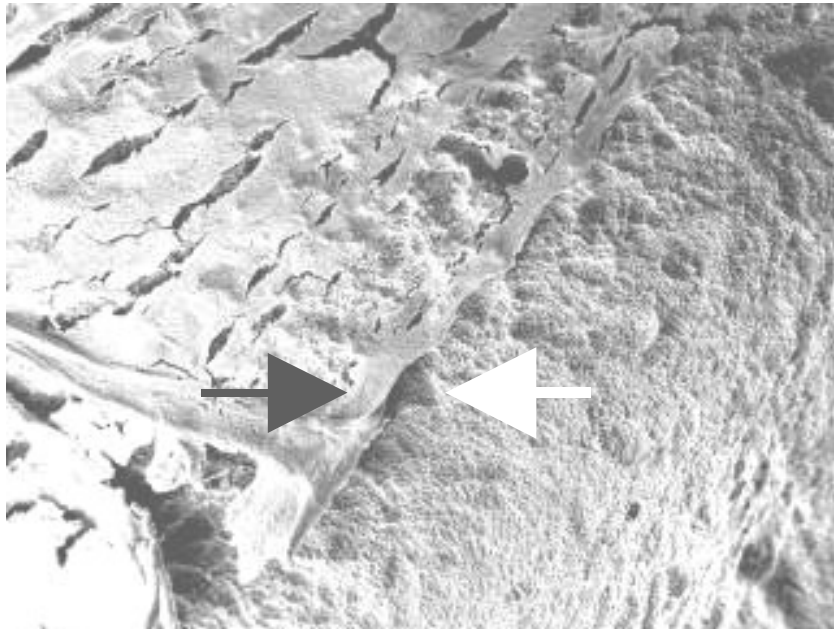


Abb. 19: Übergang nicht kontaminierte Implantatoberfläche (heller Pfeil) / mehrschichtiger Biofilm (dunkler Pfeil), 2400-fache Vergrößerung

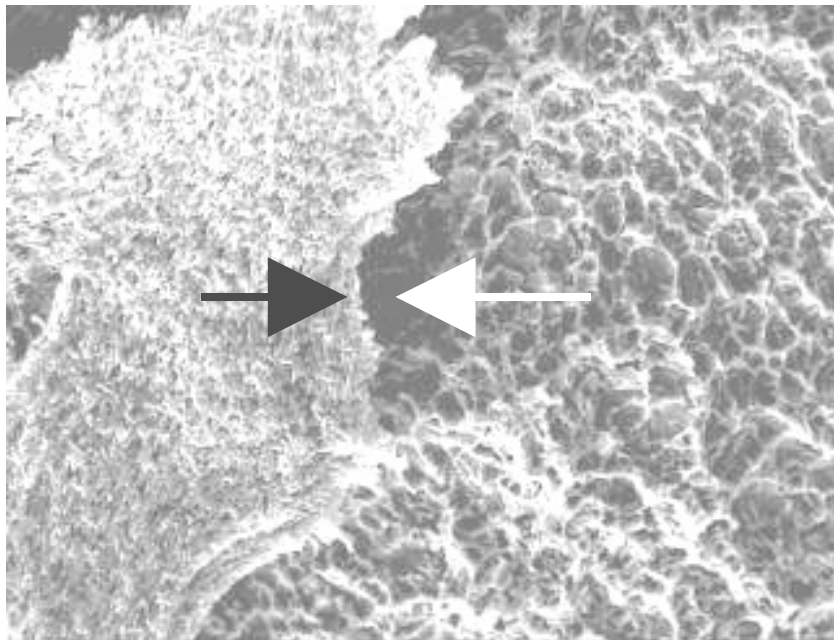
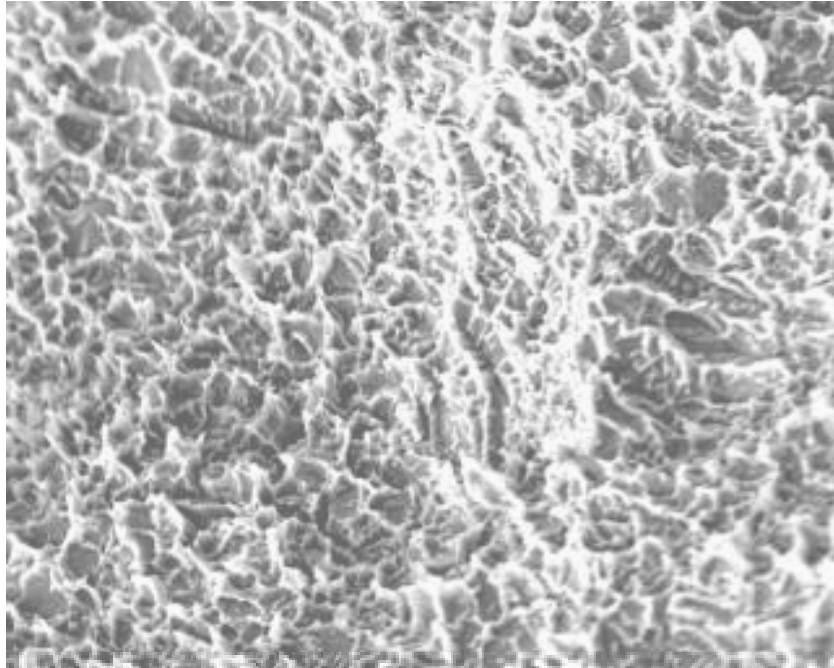


Abb.20: Nicht kontaminierte, originale SLA-Oberfläche, 2300-fache Vergrößerung



3.3. Fluoreszenzmikroskopische Ergebnisse

Bei den Untersuchungen unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 10-facher Vergrößerung ist in der Gruppe 1 ein dichter Belag von gefärbter EPS auf der Implantatoberfläche zu erkennen (Abb. 21, 22, 23). Der Färbung ist im Bereich der kontaminierten Fläche so stark ausgeprägt, dass die eigentliche Implantatoberfläche nicht mehr zu erkennen ist.

Abb.21: Gruppe 1(Kontrollgruppe), rotgefärbte EPS im Biofilm mit starker Ausprägung, Implantatoberfläche im kontaminierten Bereich kaum erkennbar

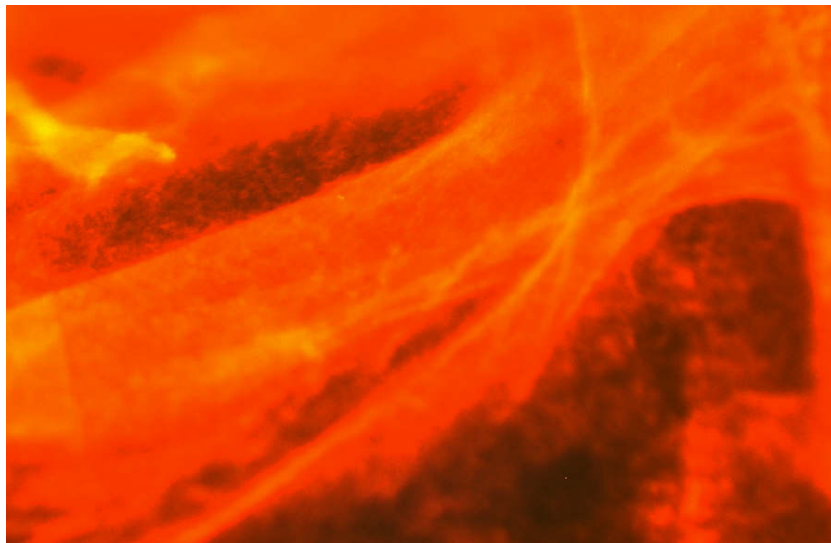


Abb.22: Gruppe 1(Kontrollgruppe), Übergang rotgefärbte EPS (dunkler Pfeil) / nicht kontaminierte Implantatoberfläche (heller Pfeil)

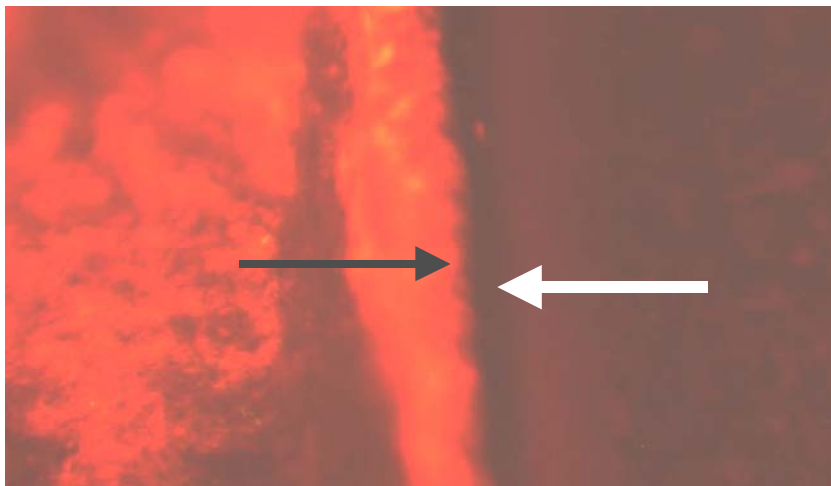
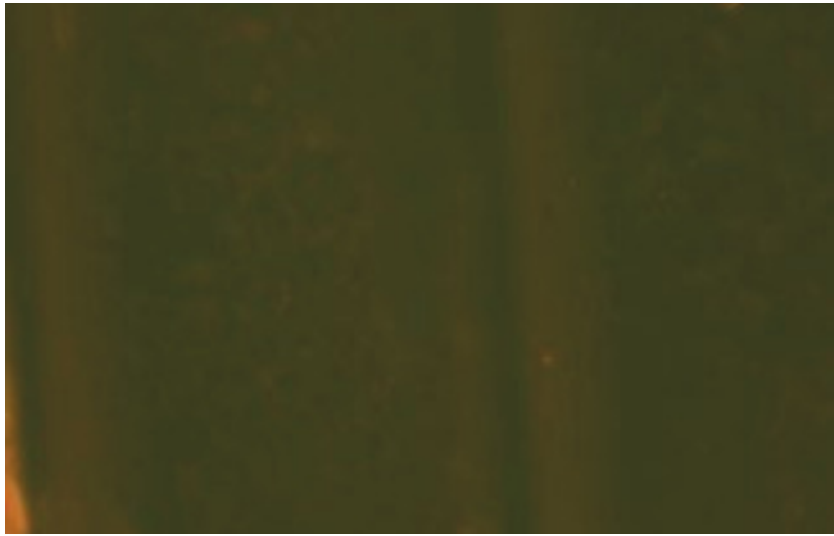


Abb. 23: Gruppe 1 (Kontrollgruppe), nicht kontaminierte Implantatoberfläche



In Gruppe 2 ist deutlich die „Spur“ des Laserstrahls auf der kontaminierten Implantatfläche zu erkennen. Auf Flächen, die vom Laserstrahl erfasst wurden, lassen sich keine rotgefärbte EPS nachweisen. Auf der restlichen Fläche befand sich noch rotgefärbte EPS (Abb. 24 und 25).

Abb. 24: Gruppe 2 (bestrahlt mit 2,5W cw, 12x5s), Übergang von behandelter Oberfläche (gestrichelter Pfeil) mit nicht entfernter, rotgefärbter EPS und nicht kontaminierte Oberfläche (heller Pfeil)

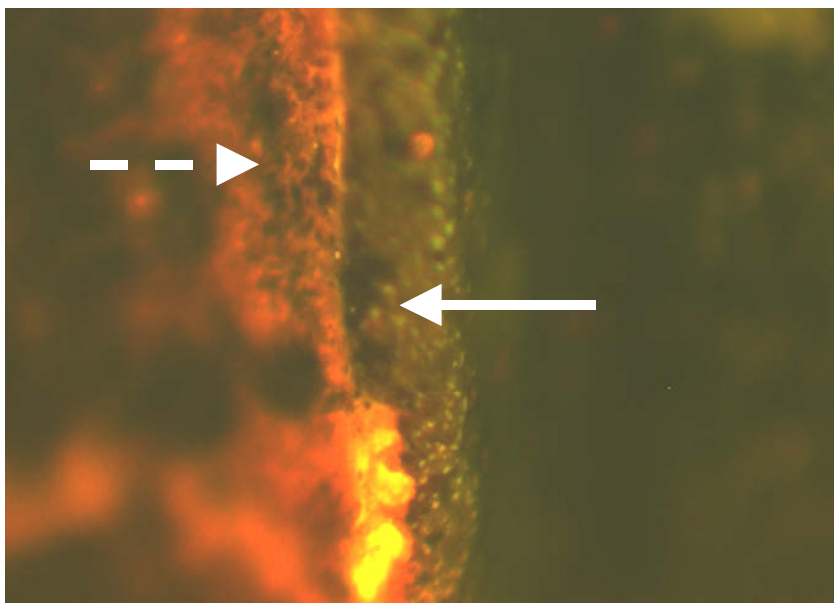
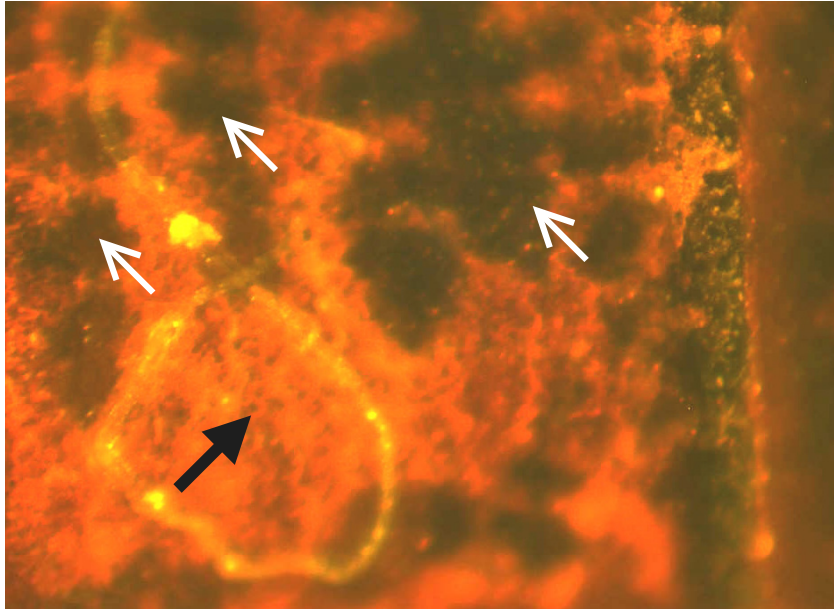


Abb.25: Gruppe 2 (bestrahlt mit 2,5W cw, 12x5s), nicht entfernte, rotgefärbte EPS auf kontaminierter Fläche (dunkler Pfeil), dekontaminierte Fläche (heller Pfeil)



Im Vergleich zu Gruppe 2 und 4 ist die Menge rot gefärbter EPS auf den Implantaten der Gruppe 3 deutlich reduziert, aber völlige eine Dekontamination wurde nicht erzielt (Abb. 26, 27).

Abb.26: Gruppe 3 (bestrahlt mit 2,5W cw, 6x50s), rot gefärbte EPS auf behandelter Implantatoberfläche am Übergang glatte/SLA Oberfläche (heller Pfeile)

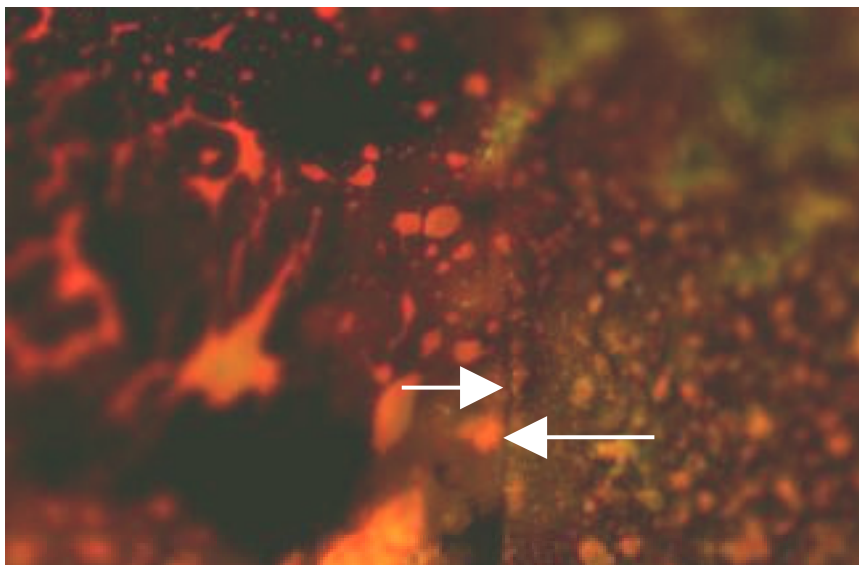
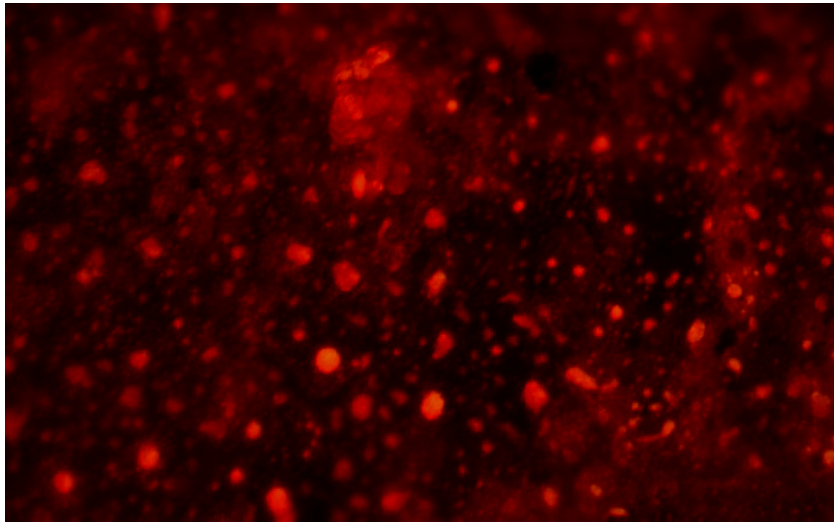


Abb. 27: Gruppe 3 (bestrahlt mit 2,5W cw, 6x50s), EPS rot gefärbt auf behandelter Implantatoberfläche



In Gruppe 4 ist die rot gefärbte EPS im Vergleich zu Gruppe 2 scheinbar weniger stark ausgeprägt, allerdings deutlicher als im Vergleich zu Gruppe 3 (Abb. 28, 29).

Abb. 28: Gruppe 4 (bestrahlt mit 1W cw, 6x50s), EPS rot gefärbt auf behandelter Implantatoberfläche

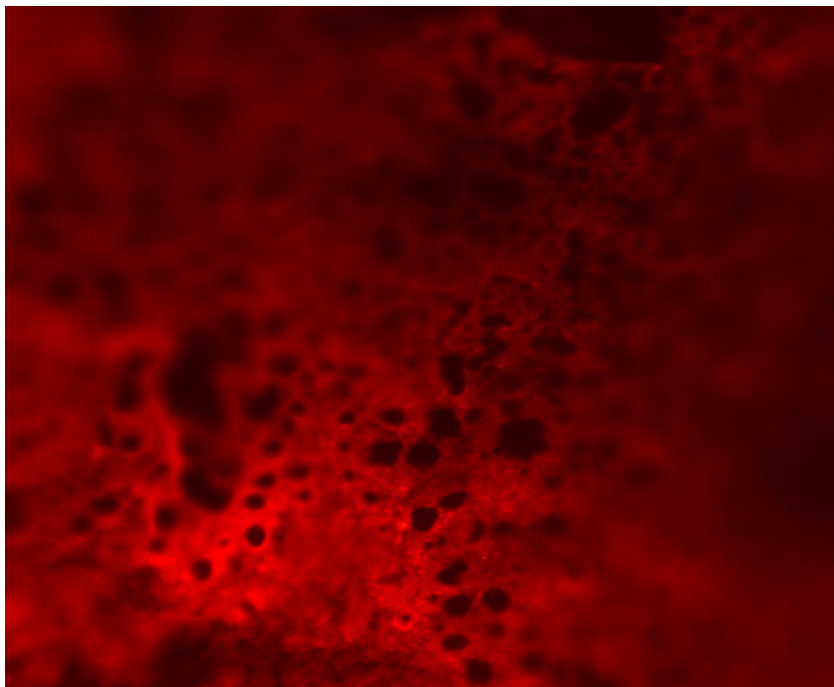
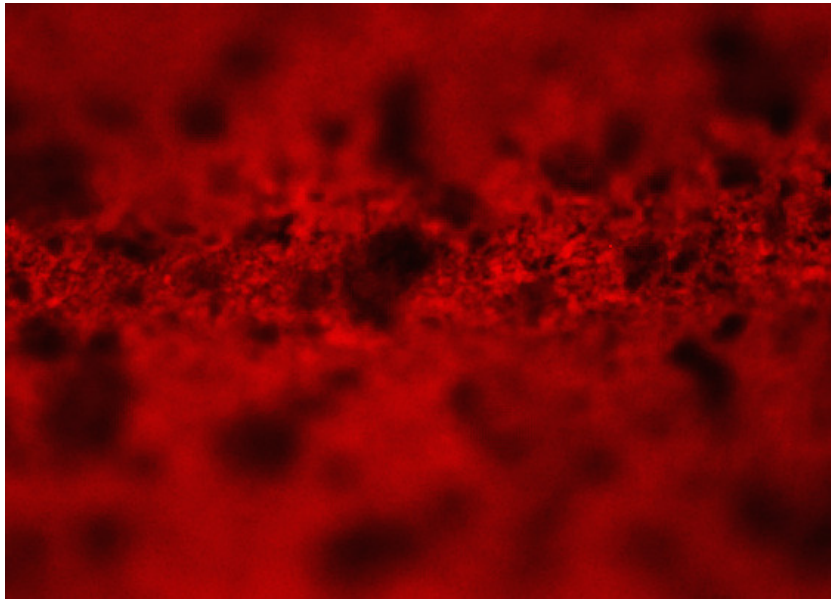


Abb. 29: Gruppe 4 (bestrahlt mit 1W cw, 6x50s), EPS rot gefärbt auf behandelter Implantatoberfläche



In einer Schätztabelle sind die einzelnen Gruppen mit den subjektiv ermittelten EPS-Mengen vergleichend gegenübergestellt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Subjektive Einschätzung der Menge rot gefärbter EPS auf den Implantaten der Gruppen 2, 3 und 4; 10 = kontaminierte Implantatoberfläche vollständig mit EPS bedeckt, , 0 = keine EPS auf kontaminierter Implantatoberfläche nachweisbar

| Gruppe | CO ₂ -Laser-Bestrahlungsparameter | Menge rot gefärbter EPS |
|--------|--|-------------------------|
| 1 | unbehandelt | 10 |
| 2 | 2,5W 12 mal 5s | 5 |
| 3 | 2,5W 6 mal 50s | 2 |
| 4 | 1W 6 mal 50s | 4 |

4. Diskussion

4.1. Biofilmmodell, bildhafte Darstellung des Biofilms und Methodik

In der vorliegenden Studie sollte zunächst untersucht werden, ob es möglich ist, einen Biofilm von *Pseudomonas aeruginosa* auf dentalen Implantaten *in vitro* zu generieren. Die mikrobiologischen Ergebnisse der Kontrollgruppe zeigen, dass es auf der Implantatoberfläche zu einer deutlichen Zunahme der Keimzahl kam (siehe Tabelle 2). Anhand der Bilder im Rasterelektronenmikroskop (REM) ist deutlich ein zusammenhängender, mehrschichtiger Bakterienrasen zu erkennen (vgl. Abb. 17-19).

Die extrazelluläre, polymere Substanzen (EPS) im Biofilm konnten dann im Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe des Färbemittels Sypro® Red protein gel stain, das zum Nachweis von EPS in der Umweltbiologie schon zum Einsatz kommt, bildhaft dargestellt werden. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass sich unter *in vitro* Bedingungen ein Biofilm auf einem Implantat aus Titan mit einer SLA-Oberfläche bilden kann.

Als Nachteil der hier präsentierten Methode ist anzumerken, dass der Biofilm nicht von den Bakterien produziert wurde, die eigentlich bei einer Periimplantitis nachgewiesen werden können. Diese Keime sind meist gramnegativ und anaerob. Besonders die anaerobe Eigenschaft erschwert es, die klinische Situation *in vitro* nachzustellen. So war es in Vorversuchen nicht gelungen, einen stabilen Biofilm mit dem Keim *Aktionobacillus aktinomycetemcomitans* zu züchten. Zudem ist noch unklar, inwieweit eine Begleitflora für die Bakterien notwendig ist, um sich an den entsprechenden Stellen zu etablieren, und ob die Zusammensetzung des Keimspektrums im Biofilm einen entscheidenden Einfluss hat. In der Mundhöhle lassen sich über 350 Bakterienarten nachweisen (Fine, 1995). Dieses Ökosystem wirkt in einem physiologischen Zusammenspiel (Gilbert et al., 1997). Es kann zwischen bestimmten Bakterienarten zu einer Symbiose kommen, die die Leistung der Keime steigert und die metabolische Situation aufrecht erhält, sog. interspecies cross-feeding, (Costerton et al., 1995; Costerton, 1999).

Letztlich können *in-vitro*-Versuche die komplexe Situation *in-vivo* nicht exakt kopieren (Bowden und Li, 1997; Fine, 1995). Daher können Ergebnisse aus *in-vitro*-Studien nicht direkt auf die

intraorale periimplantäre Situation übertragen werden. Im Gegensatz zu in-vivo-Studien sind in-vitro-Versuche aber einfacher durchführbar und reproduzierbar (Marsh und Bradshaw, 1997). Für die weiteren Fragestellungen dieser Studie war es von größerem Interesse, einen ausgeprägten und stabilen Biofilm auf einem Implantat zu generieren, da für diese Studie eher die physikalischen Eigenschaften des Biofilms im Vordergrund standen. Es ist davon auszugehen, dass verschiedene Biofilme sich in ihren biochemischen und physiologischen Eigenschaften unterscheiden, jedoch die physikalischen Eigenschaften vergleichbar sind wie etwa hinsichtlich des Wassergehalts und des Adhäsionsvermögens.

Zurzeit sind in der Zahnmedizin erste in-vitro-Biofilmmodelle im Bereich der Kariologie bekannt (Guggenheim et al., 2004; Pitten et al., 2003). Im Bereich der Parodontologie oder Implantologie sind bisher noch keine in-vitro-Biofilmmodelle in der Literatur beschrieben worden.

Die Darstellungen des Biofilms mittels REM und Fluoreszenzmikroskop sind relativ einfach durchzuführen, doch zeigen sie auch Schwächen. Aufgrund der Dehydrierungsvorgänge zur Präparation für das REM ist es nicht möglich, EPS und die Wasserhülle des Biofilms im REM darzustellen. Zudem bilden sich im Biofilm Risse und Biofilmpartikel können abplatzen. Daher birgt eine Kontrolle nach in-vitro-Dekontaminationsversuchen mittels REM zu viele Fehlerquellen.

Auch die Darstellung der EPS im Biofilm auf dentalen Implantaten mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops gelingt nicht ausreichend zufrieden stellend, da dentale Implantate meist einen runden Querschnitt aufweisen. Dies erschwert das flächenhafte Fokussieren der Implantatoberflächen und lässt eine quantitative Auswertung bezüglich der Flächen nicht zu. Bessere Möglichkeiten könnte die „Confokale Laserscanning Mikroskopie“ bieten.

Zur Ermittlung der Bakterienzahl auf Prüfkörpern werden in vielen Studien so genannte Abrollversuche durchgeführt. Bei diesen Abrollversuchen werden die Prüfkörper über eine Nährbodenschale gerollt, um die auf den Prüfkörpern haftenden Keime zu entfernen. In der vorliegenden Studie wurden zur Ermittlung der auf den Implantaten befindlichen Keime die von der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie empfohlenen Standardmethoden zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren für die Instrumentendesinfektion (Gebel et al, 2001) in leicht modifizierter Form angewandt. Die Versuchsröhrchen mit den Glasperlen, der

Nährflüssigkeit und den Versuchsobjekten, in diesem Fall Implantate, wurden zwei statt nur eine Minute lang geschüttelt, um sicherzustellen, dass biologisches Fremdmaterial vollständig von den Implantaten entfernt wurde.

Idealerweise hätten die Versuche mit der selben Bakterienlösung an einem Tag durchgeführt werden müssen. Dies war aus organisatorischen und zeitlichen Gründen jedoch nicht möglich. Um trotzdem vergleichbare Ergebnisse erzielen zu können, wurden vor jeder Versuchsreihe die Anzahl der Bakterien in der jeweiligen Lösung durch eine Verdünnungsreihe überprüft. Die jeweilig ermittelten koloniebildenden Einheiten lagen immer im Bereich von 10^7 /ml und die Unterschiede waren vernachlässigbar gering. Daher können die Ergebnisse dieser Studie als reproduzierbar angesehen werden, da immer von nahezu identischen Biofilmzuständen auszugehen ist.

4.2. Mikrobiologische und fluoreszenzmikroskopische Ergebnisse

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass mit einem CO₂-Laser eine hochsignifikante Reduzierung der KBE des Keims *Ps. aeruginosa* im Vergleich zur Kontrollgruppe möglich ist. Bei allen drei verwendeten Zeit/Leistungs-Parametern konnte eine Reduktion von 99,89% (Gruppe 2) bis 99,98% (Gruppe 3) erreicht werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch Deppe (1998), der in seinen in-vitro-Versuchen *Bacillus subtilis* als Testkeim verwendete. Kato und Mitarbeiter (Kato et al., 1998) erzielten eine Reduktion der Keime *Streptokokkus sanguis* und *Porphyromonas gingivalis* um 100%. Es ist also davon auszugehen, dass der CO₂-Laser eine bakterizide Wirkung hat, unabhängig davon, welcher Testkeim verwendet wird. Innerhalb der drei Versuchsgruppen zeigte die Versuchsgruppe (Gruppe 3), die mit den höchsten Zeit-/Energieparametern bestrahlt wurde, die wirkungsvollste KBE-Reduktion. Dabei scheint nicht nur eine höhere Energieeinstellung, sondern auch die längere Bestrahlungsdauer einen nicht unerheblichen Einfluss zu haben. Dies zeigt der Vergleich zwischen Gruppe 2 und 4, wobei der Unterschied statistisch nur als Tendenz sichtbar wird.

Desweiteren konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass mit den gewählten Parametern der CO₂-Laser auch im Stande ist, EPS eines Biofilms zu entfernen und somit auch den Biofilm selbst. Da es mit dem Fluoreszenzmikroskop nicht möglich war, die kontaminierte bzw.

behandelte Implantatoberfläche quantitativ zu erfassen (vgl. Kap. 4.1.), können Unterschiede innerhalb der drei Versuchsgruppen nur subjektiv eingeschätzt werden. Ähnlich den mikrobiologischen Ergebnissen lassen sich in der Gruppe 3 anscheinend am wenigsten EPS nach der Behandlung nachweisen, gefolgt von Gruppe 4 und 2. Auffallend ist bei Gruppe 4 und 2 das scheinbare Missverhältnis zwischen der Keimreduktion und der Menge noch nachweisbarer EPS. Die Keimreduktion liegt bei allen drei Gruppen im Bereich von 99,9%. Nimmt man Gruppe 3 zum Vergleich, ist bei Gruppe 2 und 4 in Relation zur jeweilig erreichten Keimreduktion deutlich mehr gefärbte EPS sichtbar. Während man in der Gruppe 2 genau die dekontaminierte Fläche wie eine Spur nach der Laserbestrahlung verfolgen kann, ist bei der Gruppe 4 der Rest von angefärbter EPS eher diffus verteilt. Daraus lässt sich möglicherweise folgern, dass für die bakterizide Wirkung die Leistungseinstellung des CO₂-Lasers nicht so entscheidend, dagegen für die Entfernung des Biofilms eine höhere Leistungseinstellung effektiver ist.

Die keimtötende Wirkung des CO₂-Lasers bei einer Wellenlänge von 10,6µm ist in der Literatur beschrieben (Adrian und Gross, 1979; Hooks et al., 1980; Nammour und Majerus, 1991; Zakariasen et al., 1986). Die Wirkung beruht auf photothermischen, photoablativen oder photomechanischen Effekten (Wilson, 1994). Dederich und Mitarbeiter (1990) konnten in einer Keimsuspension von *Streptokokkus sanguis*, *Streptokokkus mutans*, *Streptokokkus mitior* und *Actinomyces viscosus* einen keimreduzierenden Effekt von bis zu 99,4% beobachten.

Da Bakterien und Biofilme überwiegend aus Wasser bestehen (Christensen und Charaklis, 1990) und der CO₂-Laser sein Absorptionsmaximum im Wasser hat (Dederich et al., 1990; Wilson, 1994) ist der Effekt sowohl auf Bakterien als auch auf Biofilme zu erklären. Ganz (1994) stellte in seinen Untersuchungen fest, dass Titan im Bereich der Wellenlänge des CO₂-Lasers die niedrigsten Absorptionswerte aufweist. Daher sind diese Eigenschaften des CO₂-Lasers für eine Dekontamination von Implantaten, die aus Titan gefertigt sind, geeignet.

Für eine Dekontamination von natürlichen Zahn- oder Wurzeloberflächen, die zwar nur in geringen Mengen Wasser enthalten, sind diese Eigenschaften eher nachteilig. Nach der Behandlung von Dentin und Zement mit dem CO₂-Laser beschrieben Sasaki und Mitarbeiter (2002) das Entstehen von Cyanten und Cyanamiden auf der Wurzeloberfläche und eine schwarze, carbonisierte Oberfläche.

Bei Implantaten sind negative Veränderungen der Oberfläche nach Bestrahlung mit dem CO₂-Laser im cw-Modus in den bisher bekannten Studien nicht oder in vernachlässigbarem Rahmen beobachtet worden (Barak et al., 1998; Kreisler et al., 2002c; Kreisler et al., 2002b; Mouhyi et al., 1999; Oyster et al., 1995; Swift et al., 1995; Wooten et al., 1999). Deppe und Mitarbeiter (2002) beschreiben eine bläulich-graue Verfärbung bei Implantaten mit einer Titanplasma-Beschichtung nach Behandlung mit dem CO₂-Laser im Superpuls-Betrieb, die auf eine Veränderung der Oxidschichtdicke hinweist, und glatte Zonen, die als ein Aufschmelzen der Oberfläche interpretiert wurden. In kleinerem Maße wurden unter dem REM ähnliche Stellen nach Behandlung im cw-Modus gefunden, die aber keinen negativen Einfluss auf die anschließende Augmentation hatten. Auch die Oxidschichtdicke nahm nach Bestrahlung im cw-Modus zu. Diese Veränderung wird aber in Bezug auf die Biokompatibilität als unbedenklich eingestuft. In der gleichen tierexperimentellen Studie wurde auch kein erhöhter Titangehalt nach Bestrahlung dentaler Implantate mit dem CO₂-Laser im Vergleich zu nichtbestrahlten Implantaten in den Nachbargeweben, in den regionären Lymphknoten und in Organen wie Lunge, Leber, Milz und Niere gefunden. Kreisler und Mitarbeiter (Kreisler et al., 2002c) beobachteten Aufschmelzungen auf Titanplasma- und SLA-Oberflächen bei einer Energieflussrate von 30 Jcm⁻² und auf Hydroxylapatit-Oberflächen bei 15 Jcm⁻². In der vorliegenden Studie wurden keine Veränderungen der Oberfläche beobachtet.

Temperaturerhöhungen am angrenzenden periimplantären Knochen nach Bestrahlung mit dem CO₂-Laser wurden in einigen in-vitro-Studien bereits untersucht (Barak et al., 1998; Mouhyi et al., 1999; Oyster et al., 1995; Swift et al., 1995; Wooten et al., 1999). Erikson und Albrektson (1983) geben an, dass eine Temperaturerhöhung auf 47° C und mehr am angrenzenden Knochen zu irreversiblen Schädigung des Knochens führen kann. Eine Erhöhung auf 44° C scheint unbedenklich zu sein. Deppe (1998) benutzte in seinen CO₂-Laser-assistierten Studien ein zusätzliches Hilfsgerät, um die Gefahr thermischer Nebenwirkungen des CO₂-Lasers zu minimieren. Das von der Firma Sharplan vertriebene Gerät Silk Touch™ Flashscanner verwendet einen hochfokussierten Laserstrahl in einem spiralförmigen Muster. Der Laserstrahl fährt ein kreisförmiges Gebiet mit einem Durchmesser von 0,9 – 10 mm ab. In diesen Studien stellte sich die Einstellung 12 x 5 s, 2,5W im cw-Modus als die effektivste Einstellung in Bezug auf die bakterizide Wirkung heraus, ohne die Marke von 44° C zu überschreiten.

Kreisler und Mitarbeiter (Kreisler et al., 2002b) ermittelten, dass die kritische Marke von 47°C bei einer Bestrahlung mit dem CO₂-Laser bei eine Einstellung von 2,5W nach 15s, von 1W nach 56s erreicht wird. Alle der bisher bekannten Studien sind bezogen auf die Temperaturerhöhung bei in-vitro-Untersuchungen. Deppe (1998) und Kreisler et al. (Kreisler et al., 2002b) verwendeten einen ähnlichen Versuchsaufbau. Dentale Implantate wurden in einen Schweinekiefer inseriert und dieser dann in einem auf 37°C temperierten Wasserbad fixiert. Danach wurde das Implantat statisch mit dem CO₂-Laser mit verschiedenen Parametern bestrahlt, wobei das Laserhandstück fest in einer Halterung arretiert war, und die Temperatur am Übergang Implantat / Knochen mit einem Thermometer gemessen wurde. Wie bei allen In-vitro-Versuchen können die Ergebnisse nur bedingt auf die klinische Situation übertragen werden. Da klinisch mit dem Laser nur im Bereich von Sekunden statisch oder punktuell gearbeitet wird, wäre zu diskutieren, ob die Temperatur sich ähnlich verändert wie in den bekannten in-vitro-Studien. Zudem kann klinisch nicht immer die ideale Brennweite des Lasers eingehalten werden, was zu einer Abnahme der auf dem Implantat auftreffenden Energie führt.

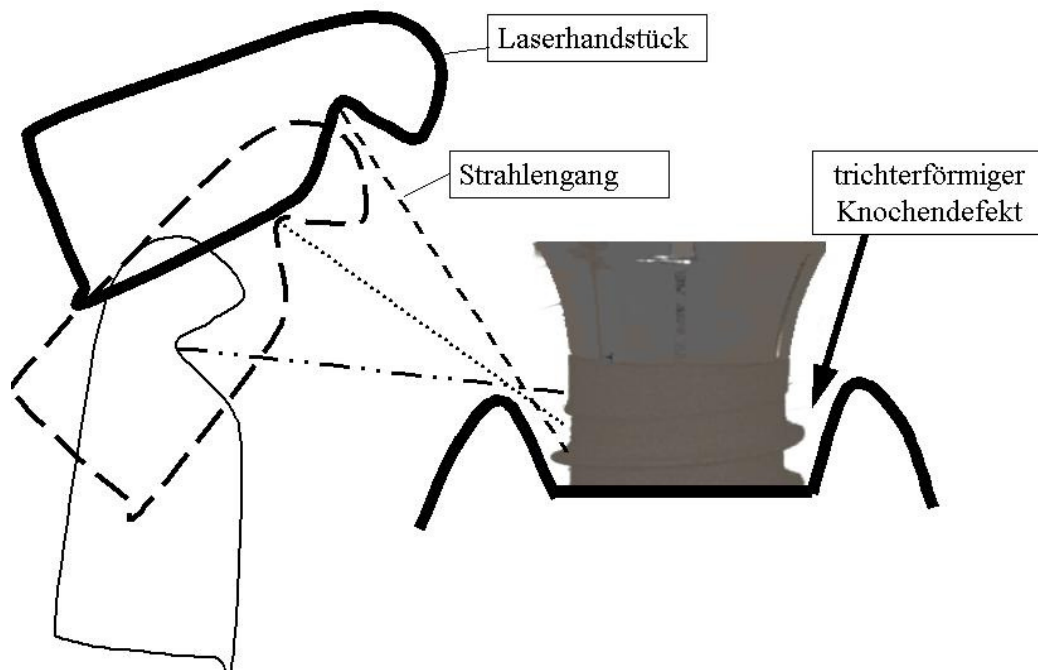
Klinisch liegt im Knochen eine Blutzirkulation vor, die die entstehende Wärme schneller ableiten kann als ein in-vitro-Wasserbad. Daher würde eventuell eine höhere Energie-/Zeiteinstellung des Lasers als die bisher empfohlenen Werte möglich sein, ohne das Knochen/Implantatinterface thermisch zu schädigen. Wie aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie abzuleiten ist, ist eine hohe Energie-/Zeiteinstellung am effektivsten. Romanos (1999) empfiehlt bei der Verwendung des CO₂-Lasers im Rahmen der Periimplantitistherapie eine Einstellung von 4W im cw-Modus, ohne die Bestrahlungsdauer festzulegen. Zeichen einer thermischen Nekrose wurden klinisch nicht festgestellt, periimplantäre Augmentationen nach einer so beschriebenen Dekontamination verliefen klinisch erfolgreich.

Während der Bestrahlung der glatten Oberfläche der Implantatschulter mit dem CO₂-Laser in dieser Studie konnte beobachtet werden, dass der Laserstrahl unkontrolliert reflektiert wurde. Der so reflektierte Strahl traf auf das Kunststoffmodell und verursachte Aufschmelzungen. Ob dieses Problem klinisch auch auftritt und ob dies negative Folgen hat, ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben worden.

In allen drei Versuchsgruppen wurde weder eine völlige Keimfreiheit noch eine vollständige Entfernung des Biofilms erzielt. Dafür könnte es mehrere Gründe geben. Als Hauptgrund gilt

wahrscheinlich, dass die Gesamtfläche der kontaminierten Implantatanteile nicht vollständig oder nicht mit ausreichender Intensität bestrahlt wurden. Da der Durchmesser eines normal fokussierten Laserspots circa 0,5mm beträgt, ist ein gleichmäßiges und vollständiges Abfahren einer bestimmten Fläche äußerst schwierig, vergleichbar mit dem Versuch, mit einem Bleistift eine bestimmte Fläche Papier vollständig in kurzer Zeit zu schraffieren. Bei Implantaten kommt erschwerend hinzu, dass eine gekrümmte Fläche vorliegt. Bestimmte Anteile der Fläche, zum Beispiel oral, distal oder approximal zu einem Nachbarzahn oder –implantat, sind zudem sehr schwer zugänglich. Ebenso schwer erreichbar sind freiliegende Implantatoberflächen innerhalb eines trichterförmigen Knochendefekts (Abb. 30). Ein sicheres und vollständiges Abfahren der kontaminierten Implantatflächen ist somit nicht gewährleistet. So ist es nahezu unmöglich, gleichmäßig die ideale Brennweite von circa 10 mm oder den idealen Einstrahlwinkel von 90° einzuhalten. Dies führt dazu, dass die Energie des Laserstrahls reduziert an der zu bestrahlenden Fläche ankommt. Der Aufbau des verwendeten Sharplan-Lasersystems mit seinem schwenkbaren Laserarm wirkt dabei etwas unhandlich. Als besondere Erschwernis zeigte sich in Gruppe 2 die sehr kurze Bestrahlungsdauer von nur 5 Sekunden. Diese Zeit scheint zu kurz, um das jeweilige Implantatsegment abzufahren und danach wieder genau den neuen Ansatzpunkt für die weiteren 5 Sekunden des abtastenden Bestrahls zu finden.

Abb.30: Strahlengang des Lasers und seine geometrische Ausrichtung im periimplantären Knochendefekt



Deppe und Mitarbeiter (2001) konnten im Tierexperiment nach einer CO₂-Laser-assistierten Periimplantitistherapie mit den Parametern 2,5W im cw-Modus für 12 mal 5 s und anschließender Augmentation einen Knochenneugewinn von bis zu 41 % erzielen, wobei die besseren Ergebnisse nach der Behandlung mit der Kombination CO₂-Laser und Pulverstrahlgerät erzielt wurden. Dies lässt sich möglicherweise auf eine umfangreichere Entfernung des Biofilms durch einen zusätzlichen Dekontaminationsvorgang, in diesem Fall mit dem Pulverstrahlgerät, erklären. Doch ist eher der Ansatz zur „Vergrößerung“ des Laserspotdurchmessers durch den Einsatz des Flashscanners, um eine größere Fläche sicherer abfahren zu können, verheißungsvoll. Es wäre in-vitro zu überprüfen, ob die eingestrahelte Energie für die jeweilige Fläche ausreichend ist, um auch den Biofilm entfernen zu können. Eine andere Möglichkeit zur Vergrößerung des Durchmessers eines CO₂-Laserstrahls wäre dessen Defokussierung. Allerdings müsste dann auch die Energie des Lasers höher eingestellt werden, da auch das Verhältnis Energie/Fläche sich ändern würde. Die neuen Energie-/Zeit-Parameter müssten dann wiederum auf die mögliche Hitzeübertragung und auf die bakterizide Wirkung und die Fähigkeit, auch den Biofilm zu

entfernen, überprüft werden, bevor zuverlässige Empfehlungen für den klinischen Einsatz gegeben werden können.

Zurzeit sind keine umfassenden klinischen Studien über den Einsatz des CO₂-Lasers im Rahmen der Periimplantitistherapie bekannt. Es gibt lediglich Berichte über Einzelfälle.

Ein Vergleich mit anderen Lasertypen im Rahmen der Periimplantitistherapie ist schwierig. Als gesichert darf angesehen werden, dass der Nd:YAG-Laser auf Grund der beobachteten Aufschmelzungen im Metall nicht bei einer Implantatdekontamination eingesetzt werden sollte (Block et al., 1992; Romanos et al., 2000).

Dagegen scheinen die Vertreter der Low-Power-Laser-Light-Gruppe, zum Beispiel der Diodenlaser, der Er:YAG- und der GaAlAs-Laser, eher geeignet zu sein. Auch beim Einsatz des Er:YAG-Lasers besteht die Gefahr einer Überhitzung durch ein zu langes Bestrahlen mit zu hoher Energieeinstellung (Kreisler et al., 2002a). In einer weiteren in-vitro-Studie erzielten Kreisler und Mitarbeiter (2005) nach einer Behandlung mit dem Er:YAG-Laser eine signifikant höhere Fibroblastenproliferationsrate auf Titanplättchen, die zuvor mit dem pathogenen Keim *Porphyromonas gingivalis* kontaminiert wurden, im Vergleich zu kontaminierten und unbehandelten Titanplättchen. In derselben Studie ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit dem Er:YAG-Laser und einem Pulverstrahlgerät feststellen. Allerdings konnten Veränderungen der Titanoberflächen nach der Behandlung mit dem Pulverstrahlgerät beobachtet werden. Aufgrund der kurzen Inkubationszeiten von bis zu 24 h von *Porphyromonas gingivalis* kann allerdings nicht von einer Biofilmquantität auf den Titanplättchen, wie sie auch klinisch imponiert, ausgegangen werden. In einer klinischen Studie, bei der die Effizienz des Er:YAG-Lasers in der Behandlung von periimplantären Läsionen mit der von konventionellen Behandlungsmethoden, Kunststoffküretten und lokale Desinfektiva, verglichen wurde, beobachteten Schwarz und Mitarbeiter (2005b) bei beiden Therapieformen eine signifikante Verbesserung der klinischen Parameter. Beim Parameter „Bleeding on Probing“ konnten mit dem Er:YAG-Laser deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden.

In einer weiteren in-vitro-Studie verglich die Arbeitsgruppe um Schwarz (2005a) die Behandlung von kontaminierten Titanplättchen, auf denen unter klinischen Bedingungen Biofilme gezüchtet wurden, mittels Er:YAG-Laser, einem Ultraschallsystem und konventionellen Methoden (Plastikküretten und Chlorhexidindigluconat-Lösung). Die Behandlung mit dem Er:YAG

benötigte die längste Behandlungsdauer, erzielte aber die größte gesäuberte Fläche und den geringsten verbliebenen Plaque-Biofilm. Im Vergleich zur Kontrollgruppe von unkontaminierten Titanplättchen waren auf den Plättchen der drei Behandlungsgruppen signifikant weniger mitochondriale Zellaktivitäten von Osteosarkomzellen nachweisbar.

Die Arbeitsgruppe um Bach (2000) konnte in-vitro nach einer Bestrahlung mit dem Diodenlaser für 20 s bei 1W keine Veränderung der Implantatoberfläche feststellen. In einer klinischen Studie konnten sie klinisch bessere Ergebnisse nach Einsatz des Diodenlasers im Vergleich zur konventionellen Therapie (Scaling / Entfernung des Granulationsgewebes) beobachten. In-vitro-Untersuchungen von Haas und Mitarbeitern (1997) ergaben eine vollständige Hemmung des Bakterienwachstums ohne Oberflächenveränderung des Implantats nach einer Bestrahlung mit einem Diodenlaser in Kombination mit einer photosensibilisierenden Substanz (Toluidinblau). Bei der Umsetzung des Versuchsansatzes in vivo konnte eine Reduktion der Bakterien um 2 bis 3 log-Stufen erzielt werden. Aber auch hier war eine vollständige Bakterienfreiheit nicht erzielt worden (Dortbudak et al., 2001). Insgesamt fehlen für die Low-Power-Laser-Light-Gruppe definitive Empfehlungen für Bestrahlungsdauer und Energieeinstellung, die einen klinischen Erfolg zuverlässig vorhersagbar machen. Auch ein Vergleich über die Effektivität zwischen den Vertretern der Low-Power-Laser-Light-Gruppe und dem CO₂-Laser in Bezug auf die bakterizide Wirkung und Fähigkeit, einen Biofilm sicher zu entfernen, ist nach derzeitigem Stand der Wissenschaft nicht möglich. Eine vergleichende in-vitro-Studie könnte für mehr Klarheit sorgen.

Auch aus einem Vergleich zwischen anderen in-vitro-Studien, die sich mit der Problematik der Periimplantitistherapie auseinandergesetzt haben, lassen sich nur bedingt Rückschlüsse für die Klinik ziehen. Zwar konnte in verschiedenen Laborstudien die Wirksamkeit von diversen Desinfektiva, wie Zitronensäure, Chlorhexidin in verschiedenen Konzentrationen, 3 %iges Wasserstoffperoxid und Trichlorethylen gegenüber bakteriellen Pathogenen nachgewiesen werden (Buchmann et al., 1996; Dennison et al., 1994; Mouhyi et al., 1998; Sennheiser-Kirchner et al., 2004; Zablotsky et al., 1992). Aber aufgrund der Auswahl unterschiedlicher Testkeime können die Ergebnisse der jeweiligen Arbeiten nicht verglichen werden und in keiner bisher bekannten Studie wurde ein dauerhafter klinischer Erfolg mit diesen Agenzien beschrieben.

In allen bisher bekannten in-vitro-Studien wurden in den Versuchen die planktonische Form unterschiedlicher Bakterien verwendet. Klinisch muss aber analog einer marginalen Parodontitis

(Darveau et al., 1997; Offenbacher, 1996) davon ausgegangen werden, dass die Bakterien in Form eines Biofilms auf den betroffenen Implantatoberflächen vorliegen. Der komplexe, dreidimensionale Aufbau der Biofilme, der von mehreren Bakterienspezies gebildet werden kann (Costerton et al., 1978), schützt den Film vor Austrocknung und verhindert unter anderem eine Diffusion von antimikrobiellen Mitteln bis in die untersten Schichten des Films (Flemming H.C. et al., 2000). Innerhalb eines Films finden sich mehrere Kompartimente mit unterschiedlichen pH-Werten und elektrochemischen Potentialen (Costerton et al., 1994). Dies macht die Bakterien innerhalb des Biofilms nahezu resistent gegen Antibiotika oder Desinfektiva (Costerton et al., 1999). Dies würde die relativ bescheidene klinische Wirkung der oben genannten Wirkstoffe und diverser Antibiotika im Rahmen einer Periimplantitistherapie erklären. Möglicherweise sind diese Eigenschaften eines Biofilms auch dafür verantwortlich, dass eine photosensibilisierende Substanz, wie sie in den Studien der Wiener Arbeitsgruppe (Dortbudak et al., 2001; Haas et al., 1997) eingesetzt wurde, nicht bis in die untersten Schichten des Biofilms vordringt und ihre Wirkung in Kombination mit einem Diodenlaser nicht vollständig entfalten kann. Möglicherweise würde es bereits zu einer Verbesserung führen, den Biofilm oder Reste davon anzufärben, um ein optisch kontrollierbares Abfahren noch kontaminierter Flächen zu gewährleisten. Gleichzeitig könnten unnötig verlängerte Bestrahlungszeiten vermieden werden, das Risiko einer Überhitzung des periimplantären Knochens minimiert und die Implantatoberfläche möglichst nicht beeinflusst werden.

Zudem darf eine mögliche Wirkung des nicht zellulären Biofilmanteils nicht unterschätzt werden. In den extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) sind Lipopolysaccharide (LPS) vorhanden (Burns, 1989; Jahn und Nielsen P.H., 1999), die als Endotoxine wirken und somit eine verstärkte Immunantwort verursachen (Hahn et al., 1994). Die Wirkung der meisten Desinfektiva oder vieler Antibiotika zielt auf die Bakterienmembran. Von der genauen Wirkung auf Bestandteile der EPS, wie z.B. LPS, ist bisher in keiner Studie berichtet worden. Daher sollte das Ziel einer Dekontaminationstherapie die vollständige Entfernung des Biofilms sein und sich nicht nur auf ein Abtöten der Keime innerhalb des Biofilms beschränken. Dennison und Mitarbeiter (1994) und Zablotsky und Mitarbeiter (1992) verwendeten in ihren Dekontaminationsstudien LPS. Die Ergebnisse unterscheiden sich im Vergleich zu Ergebnissen von in-vitro-Studien, die Bakterien verwendeten (Mouhyi et al., 1998; Sennheiser-Kirchner et al., 2004). Besonders die Dekontaminationswirkung von Chlorhexidin auf LPS zeigte sich als ineffektiv. Auch in den

Vorversuchen der vorliegenden Studie konnte mit Chlorhexidin-Spülungen nur eine unzureichende Entfernung des Biofilms erzielt werden.

5. Zusammenfassung

Zur Dekontamination freiliegender Implantatoberflächen, die Resultat eines entzündlich bedingten Knochenabbaus im Rahmen einer Periimplantitis sind, steht neben konventionellen Therapieansätzen auch der Einsatz des CO₂-Lasers zur Diskussion.

In der vorliegenden Studie wurde *in vitro* ein Biofilm auf 34 dentalen Implantaten generiert. Als Testkeim wurde *Pseudomonas aeruginosa* verwendet. Zwei Implantate wurden zur Untersuchung des generierten Biofilms unter dem Rasterelektronenmikroskop präpariert. Die restlichen 32 Implantate wurden in 4 Gruppen eingeteilt und unterschiedlich behandelt. Gruppe 1 wurde als Vergleichsgruppe nicht behandelt. Gruppe 2 wurde mit dem CO₂-Laser mit 2,5W im continuous-wave-Modus für 12 mal 5 s in wischender Bewegung bestrahlt. Gruppe 3 wurde mit dem CO₂-Laser mit 2,5W im continuous-wave-Modus für 6 mal 50 s in wischender Bewegung bestrahlt. Gruppe 4 wurde mit dem CO₂-Laser mit 1W im continuous-wave-Modus für 6 mal 50 s in wischender Bewegung bestrahlt. Alle Laserbestrahlungen fanden an den Implantaten in einer speziell hergestellten Modellserie mit imitierten periimplantären Defekten statt, um die klinischen und topographischen Besonderheiten zu realisieren. Je zwei Implantate jeder Gruppe wurden für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen aufbereitet. Die restlichen Implantate der 4 Gruppen (n=6) wurden zur Bestimmung der verbliebenen koloniebildenden Einheiten auf den Implantaten mikrobiologisch untersucht.

Ziel der Studie war es, zu prüfen, ob es möglich ist, mit dem CO₂-Laser sowohl die koloniebildenden Einheiten (KBE) des Testkeims als auch die extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) im Biofilm im Vergleich zur Kontrollgruppe zu reduzieren. Zudem sollte untersucht werden, ob es Unterschiede innerhalb der mit dem CO₂-Laser behandelten Gruppen gibt. Die deskriptive Analyse wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem Mann-Whitney-U-Test auf Signifikanz überprüft.

Die mikrobiologischen Ergebnisse zeigten, dass in den Gruppen 2, 3, 4 die koloniebildenden Einheiten des Testkeims im Vergleich zur Kontrollgruppe hoch signifikant zwischen 99,89 % (Gruppe 2), 99,95 % (Gruppe 4) und 99,98 % (Gruppe 3) reduziert waren. Innerhalb der Gruppen waren die Unterschiede zwischen Gruppe 2 und 3 und den Gruppen 3 und 4 signifikant.

Zwischen den Gruppen 3 und 4 war ein tendenzieller Unterschied feststellbar. Unter dem Fluoreszenzmikroskop war auch eine deutliche Reduzierung der am gefärbten extrazellulären polymeren Substanzen in den Testgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellbar. Da eine quantitative Auswertung fluorezenzmikroskopischer Ergebnisse nicht möglich war, konnten die Unterschiede innerhalb der Gruppen nur als Schätzung erfasst werden. Die geringste Menge gefärbter extrazellulären polymeren Substanzen war in Gruppe 3 zu erkennen, gefolgt von Gruppe 4 und 2. Auffallend war das scheinbare Missverhältnis in Gruppe 4 und 2 zwischen den koloniebildenden Einheiten und der Menge angefärbter extrazellulären polymeren Substanzen im Vergleich zu Gruppe 3.

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass der CO₂-Laser sowohl eine bakterizide Wirkung hat, als auch in der Lage ist, extrazellulären polymeren Substanzen und damit den Biofilm zu entfernen. Für die bakterizide Wirkung ist eine längere Bestrahlungszeit anscheinend eher von Bedeutung, um ein kontaminiertes Implantat vollständig abfahren zu können. Zur Entfernung des Biofilms scheint neben der Bestrahlungsdauer auch die Energieeinstellung einen entscheidenden Einfluss zu haben, um biologisches Fremdmaterial von einem kontaminierten Implantat zu entfernen. Allerdings wurde in keiner Gruppe eine absolute Sterilität erzielt, da wahrscheinlich die kontaminierten Flächen nicht vollständig und nicht mit ausreichend langer Intensität bestrahlt wurden bzw. bestrahlt werden konnten. Dies ist zum Teil auch bedingt durch den nicht immer gesicherten Zutritt des Laserstrahls zur Implantatoberfläche bedingt durch das Implantatdesign und die Konfiguration des Knochendefekts. Um den CO₂-Laser für den klinischen Einsatz empfehlen zu können, sind trotz vielversprechender Ansätze weitere in-vitro und klinische Untersuchungen notwendig.

6. Literaturverzeichnis

1. Adrian JC und Gross A. A new method of sterilization: the carbon dioxide laser. *J Oral Pathol* 1979; 8: 60-61.
2. Augthun M und Conrads G. Microbial findings of deep peri-implant bone defects. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997; 12: 106-112.
3. Augthun M, Tinschert J, Huber A. In vitro studies on the effect of cleaning methods on different implant surfaces. *J Periodontol* 1998; 69: 857-864.
4. Bach G, Neckel C, Mall C, Krekeler G. Conventional versus laser-assisted therapy of periimplantitis: a five-year comparative study. *Implant Dent* 2000; 9: 247-251.
5. Barak S, Horowitz I, Katz J, Oelgiesser D. Thermal changes in endosseous root-form implants as a result of CO₂ laser application: an in vitro and in vivo study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998; 13: 666-671.
6. Becker W, Becker BE, Newman MG, Nyman S. Clinical and microbiological findings, that can cause failure of dental implants. *Quintessenz* 1991; 42: 9-21.
7. Behneke A und Behneke N. Komplikationen in der Belastungsphase und ihre Therapiemöglichkeit. In: Koeck B und Wagner W, Hrsg. *Praxis der Zahnheilkunde - Implantologie*. München: Urban und Fischer, 2003:363-283.
8. Bergendal T, Forsgren L, Kvint S, Lowstedt E. The effect of an airbrasive instrument on soft and hard tissues around osseointegrated implants. A case report. *Swed Dent J* 1990; 14: 219-223.
9. Block CM, Mayo JA, Evans GH. Effects of the Nd:YAG dental laser on plasma-sprayed and hydroxyapatite-coated titanium dental implants: surface alteration and attempted sterilization. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992; 7: 441-449.
10. Bowden GH und Li YH. Nutritional influences on biofilm development. *Adv Dent Res* 1997; 11: 81-99.
11. Buchmann R, Khoury F, Hesse Th, Müller RF, Lange DE. Antimikrobielle Therapie der periimplantären Erkrankung. *Z Zahnärztl Implantol* 1996; 12: 152-157
12. Buchmann R, Khoury F, Lange DE. Die entzündliche periimplantäre Erkrankung (Periimplantitis). *Zahnärztl Mitt* 1994; 19: 2128-2134.
13. Burns RG. Microbial and enzymic activities in soil biofilms. In: Charaklis WG und Wilderer P.A., Hrsg. *Structure and function of biofilms*. New York: John Wiley & Sons, 1989:333-349.
14. Buser D und Maeglin B. Komplikationen mit ITI-Implantaten. In: Schroeder A, Sutter F, Buser D, Krekeler G, Hrsg. *Orale Implantologie*. Stuttgart: Thieme, 1994:S. 442

15. Chairay JP, Boulekbache H, Jean A, Soyer A, Bouchard P. Scanning electron microscopic evaluation of the effects of an air-abrasive system on dental implants: a comparative in vitro study between machined and plasma-sprayed titanium surfaces. *J Periodontol* 1997; 68: 1215-1222.
16. Christensen BE und Charaklis WG. Physical and chemical properties of biofilms. In: Charalis WG und Marshall KC, Hrsg. *Biofilms*. New York: John Wiley & Sons, 1990:93-130.
17. Costerton JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 11: 217-221.
18. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am* 1978; 238: 86-95.
19. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 711-745.
20. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 1994; 176: 2137-2142.
21. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 21-5-1999; 284: 1318-1322.
22. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol* 2000 1997; 14: 12-32.
23. De Smet E, van Steenberghe D, Quirynen M, Naert I. The influence of plaque and/or excessive loading on marginal soft and hard tissue reactions around Branemark implants: a review of literature and experience. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001; 21: 381-393.
24. Dederich DN, Pickard MA, Vaughn AS, Tulip J, Zakariassen KL. Comparative bactericidal exposures for selected oral bacteria using carbon dioxide laser radiation. *Lasers Surg Med* 1990; 10: 591-594.
25. Dennison DK, Huerzeler MB, Quinones C, Caffesse RG. Contaminated implant surfaces: an in vitro comparison of implant surface coating and treatment modalities for decontamination. *J Periodontol* 1994; 65: 942-948.
26. Dennison DK und Van Dyke TE. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol* 2000 1997; 14: 54-78.
27. Deppe, H. Experimentelle Untersuchungen zur Laser-assistierten Periimplantitistherapie. München, Techn. Univ., Habil.-Schr., 1998, S. 42.
28. Deppe H, Greim H, Brill T, Wagenpfeil S. Titanium deposition after peri-implant care with the carbon dioxide laser. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17: 707-714.
29. Deppe H, Horch HH, Henke J, Donath K. Peri-implant care of failing implants with the carbon dioxide laser. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001; 16: 659-667.

30. Dortbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* 2001; 12: 104-108.
31. Dortbudak O, Haas R, Mailath-Pokorny G. Effect of low-power laser irradiation on bony implant sites. *Clin Oral Implants Res* 2002; 13: 288-292.
32. Dortbudak O, Haas R, Mallath-Pokorny G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res* 2000; 11: 540-545.
33. Eriksson AR und Albrektsson T. Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: a vital-microscopic study in the rabbit. *J Prosthet Dent* 1983; 50: 101-107.
34. Fine DH. Chemical agents to prevent and regulate plaque development. *Periodontol* 2000 1995; 8: 87-107.
35. Flemming H.C., Wingender J, Mayer C, Koerstgens V, Borchard W. Cohesiveness in Biofilm matrix polymers. In: Allison D, Gilbert P, Lappin-Scott HM, Wilson M, Hrsg. *Community structure and cooperation in biofilms*. Cambridge: Cambridge University press, 2000:87-105.
36. Folwaczny M und Hickel R. Biofilm - Problem oder Perspektive? *Dtsch Zahnärztl Z* 2003; 58: 648-659.
37. Ganz CH. Evaluation of the safety of the carbon dioxide laser used in conjunction with root form implants: a pilot study. *J Prosthet Dent* 1994; 71: 27-30.
38. Gebel J, Werner HP, Kirsch-Altena A, Bansemir K. Instrumentendesinfektion. In: Gebel J, Werner HP, Kirsch-Altena A, Bansemir K, Hrsg. *Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren*. Wiesbaden: mhp Verlag, 2001:45-46.
39. Gemmel E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology* 2000 1997; 112-143.
40. Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 1997; 11: 160-167.
41. Guggenheim B, Guggenheim M, Gmur R, Giertsen E, Thurnheer T. Application of the Zurich biofilm model to problems of cariology. *Caries Res* 2004; 38: 212-222.
42. Haas R, Baron M, Dortbudak O, Watzek G. Lethal photosensitization, autogenous bone, and e-PTFE membrane for the treatment of peri-implantitis: preliminary results. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000; 15: 374-382.
43. Haas R, Dortbudak O, Mensdorff-Pouilly N, Mailath G. Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensitization and soft laser. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res* 1997; 8: 249-254.

44. Hahn H, Falke E, Klein P. Medizinische Mikrobiologie. Berlin: Springer Verlag, 1994: 232-233
45. Hooks TW, Adrian JC, Gross A, Bernier WE. Use of the carbon dioxide laser in sterilization of endodontic reamers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980; 49: 263-265.
46. Isidor F. Histological evaluation of peri-implant bone at implants subjected to occlusal overload or plaque accumulation. *Clin Oral Implants Res* 1997; 8: 1-9.
47. Jahn A und Nielsen P.H. Extraction of EPS. In: Wingender J, Neu TR, Flemming H.C., Hrsg. *Microbial extracellular polymer Substances*. Heidelberg, Berlin: Springer, 1999:49-72.
48. Kato T, Kusakari H, Hoshino E. Bactericidal efficacy of carbon dioxide laser against bacteria-contaminated titanium implant and subsequent cellular adhesion to irradiated area. *Lasers Surg Med* 1998; 23: 299-309.
49. Kreisler M, Al Haj H, d'Hoedt B. Temperature changes at the implant-bone interface during simulated surface decontamination with an Er:YAG laser. *Int J Prosthodont* 2002a; 15: 582-587.
50. Kreisler M, Al Haj H, Gotz H, Duschner H, d'Hoedt B. Effect of simulated CO₂ and GaAlAs laser surface decontamination on temperature changes in Ti-plasma sprayed dental implants. *Lasers Surg Med* 2002b; 30: 233-239.
51. Kreisler M, Gotz H, Duschner H. Effect of Nd:YAG, Ho:YAG, Er:YAG, CO₂, and GaAlAs laser irradiation on surface properties of endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002c; 17: 202-211.
52. Kreisler M, Kohnen W, Christoffers AB, Gotz H, Jansen B, Duschner H, d'Hoedt B. In vitro evaluation of the biocompatibility of contaminated implant surfaces treated with an Er : YAG laser and an air powder system. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16: 36-43.
53. Kreisler M, Kohnen W, Marinello C, Gotz H, Duschner H, Jansen B, d'Hoedt B. Bactericidal effect of the Er:YAG laser on dental implant surfaces: an in vitro study. *J Periodontol* 2002d; 73: 1292-1298.
54. Listgarten MA und Lai CH. Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth. *J Periodontol* 1999; 70: 431-437.
55. Marsh PD und Bradshaw DJ. Physiological approaches to the control of oral biofilms. *Adv Dent Res* 1997; 11: 176-185.
56. Meffert RM. Periodontitis and periimplantitis: one and the same? *Pract Periodontics Aesthet Dent* 1993; 5: 79-80, 82.
57. Mills SE, Lauderdale PW, Mayhew RB. Reduction of microbial contamination in dental units with povidone-iodine 10%. *J Am Dent Assoc* 1986; 113: 280-284.

58. Mombelli A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. *Periodontol* 2000 2002; 28: 177-189.
59. Mombelli A und Lang NP. Antimicrobial treatment of peri-implant infections. *Clin Oral Implants Res* 1992; 3: 162-168.
60. Mouhyi J, Sennerby L, Nammour S, Guillaume P, van Reck J. Temperature increases during surface decontamination of titanium implants using CO2 laser. *Clin Oral Implants Res* 1999; 10: 54-61.
61. Mouhyi J, Sennerby L, Pireaux JJ, Dourov N, Nammour S, van Reck J. An XPS and SEM evaluation of six chemical and physical techniques for cleaning of contaminated titanium implants. *Clin Oral Implants Res* 1998; 9: 185-194.
62. Nammour S und Majerus P. Sterilization potential of the CO2 laser. *Acta Stomatol Belg* 1991; 88: 183-186.
63. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol* 1996; 1: 821-878.
64. Oyster DK, Parker WB, Gher ME. CO2 lasers and temperature changes of titanium implants. *J Periodontol* 1995; 66: 1017-1024.
65. Pitten FA, Doering S, Kramer A, Rosin M. In vitro assay for the screening of the plaque-reducing activity of antimicrobial agents. *Arzneimittelforschung* 2003; 53: 182-187.
66. Quirynen M, Naert I, van Steenberghe D. Fixture design and overload influence marginal bone loss and fixture success in the Branemark system. *Clin Oral Implants Res* 1992; 3: 104-111.
67. Rangert B, Krogh PH, Langer B, Van Roekel N. Bending overload and implant fracture: a retrospective clinical analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995; 10: 326-334.
68. Romanos G. Laseranwendung in der Implantologie. In: Romanos G, Hrsg. *Atlas der chirurgischen Laserzahnheilkunde*. München: Urban & Fischer, 1999:174-175.
69. Romanos GE, Everts H, Nentwig GH. Effects of diode and Nd:YAG laser irradiation on titanium discs: a scanning electron microscope examination. *J Periodontol* 2000; 71: 810-815.
70. Sasaki KM, Aoki A, Masuno H, Ichinose S, Yamada S, Ishikawa I. Compositional analysis of root cementum and dentin after Er:YAG laser irradiation compared with CO2 lased and intact roots using Fourier transformed infrared spectroscopy. *J Periodontal Res* 2002; 37: 50-59.
71. Schwarz F, Rothamel D, Sculean A, Georg T, Scherbaum W, Becker J. Effects of an Er:YAG laser and the Vector ultrasonic system on the biocompatibility of titanium implants in cultures of human osteoblast-like cells. *Clin Oral Implants Res* 2003; 14: 784-792.

72. Schwarz F, Sculean A, Romanos G, Hertzen M, Horn N, Scherbaum W, Becker J. Influence of different treatment approaches on the removal of early plaque biofilms and the viability of SAOS2 osteoblasts grown on titanium implants. *Clin Oral Invest* 2005; 9: 111-117.
73. Schwarz F, Sculean A, Rothamel D, Schwenzer K, Georg T, Becker J. Clinical evaluation of an Er:YAG laser for nonsurgical treatment of peri-implantitis: a pilot study. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16: 44-52.
74. Sennheiser-Kirchner S, Schliesing J, Jacobs HG, Mergeryan H. Antimikrobielle Wirkung verschiedener chemischer Agentien auf rauhen Titanoberflächen. *Z Zahnärztl Implantol* 2004; 3: 152-157.
75. Shu M, Wong L, Miller JH, Sissons CH. Development of multi-species consortia biofilms of oral bacteria as an enamel and root caries model system. *Arch Oral Biol* 2000; 45: 27-40.
76. Swift JQ, Jenny JE, Hargreaves KM. Heat generation in hydroxyapatite-coated implants as a result of CO2 laser application. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; 79: 410-415.
77. Tall BD, Williams HN, George KS, Gray RT, Walch M. Bacterial succession within a biofilm in water supply lines of dental air-water syringes. *Can J Microbiol* 1995; 41: 647-654.
78. Wahl G, Müller F, Schaal KP. Die mikrobielle Besiedlung von Implantatelementen aus Kunststoff und Titan. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 1992; 102: 1321-1326.
79. Wahl G und Tuschewitzki G-J. Verunreinigungen auf Implantatoberflächen. *Z Zahnärztl Implantol* 1987; 3: 255-260.
80. Walsh LJ. The use of lasers in implantology: an overview. *J Oral Implantol* 1992; 18: 335-340.
81. Wilson M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. *Int Dent J* 1994; 44: 181-189.
82. Wooten CA, Sullivan SM, Surpure S. Heat generation by superpulsed CO2 lasers on plasma-sprayed titanium implants: an in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 88: 544-548.
83. Zablotzky MH, Diedrich DL, Meffert RM. Detoxification of endotoxin-contaminated titanium and hydroxyapatite-coated surfaces utilizing various chemotherapeutic and mechanical modalities. *Implant Dent* 1992; 1: 154-158.
84. Zakariasen KL, Dederich DN, Tulip J, DeCoste S, Jensen SE, Pickard MA. Bactericidal action of carbon dioxide laser radiation in experimental dental root canals. *Can J Microbiol* 1986; 32: 942-946.

7. Anhang

7.1. Herstellernachweise

- Artikulator-Montageplatte, SAM, München, Deutschland
- CaSo-Agar-Platte, Merck, Darmstadt, Deutschland
- CaSo-Bouillon, Merck, Darmstadt, Deutschland
- CO₂-Laser Sharplan 20C, Sharplan Lasers GmbH, Freising, Deutschland
- Digital Image Proceeding System Software, Point Electronic, Halle (Saale) Deutschland
- Eppendorf-Pipetten, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Eppendorf-Pipettenpitze, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Frasacco-Phantomkopf, Fa. Sachs, Deutschland
- Gießharz-Polyester, EFCO Produkte GmbH, Rohrbach Deutschland
- Inkubationsschrank, Forma scientific, reach-in-incubator, Marietta Ohio, USA
- ITI, Standard Implantat, Straumann, Waldenburg, Schweiz
- Microsoft Excel 2000, Microsoft Corporation, Redmond, USA
- Protesil[®], Austanal Medizintechnik, Köln, Deutschland
- Rastreelektronenmikroskop Leitz-AMR 1600T SEM, Leitz, Wetzlar, Deutschland
- SPSS 11.0 für Windows, SPSS Inc., Chicago, USA
- Sypro[®]Ruby protein gel stain, Molecular Probes, Eugene, USA
- Vortexer VF2, Kanke & Klunke, Göttingen, Deutschland
- Zeiss Axioplan, Axiovision-Software, Zeiss, Oberkochen Deutschland

7.2. Danksagung

Herrn Universitätsprofessor Dr. Gerhard Wahl danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die intensive Betreuung und die stets freundliche, konstruktive und anregende Begleitung dieser Arbeit.

Der Firma Straumann, Waldenburg, Schweiz, danke ich für die Bereitstellung der ITI-Implantate.

Herrn Universitätsprofessor Dr. Martin Exner danke ich für die Erlaubnis, die Laboreinrichtungen am Institut für Hygiene nutzen zu dürfen.

Besonderer Dank gebührt Frau Sylvia Koch, Herrn Dr. Jürgen Gebel und Herrn Andreas Otte für die Ratschläge in mikrobiologischen Fragen. Ohne diese wäre die Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Dr. Rolf Fimmers danke ich für die Beratung bei statistischen Problemen.

Frau Dagmar Kromer-Busch danke ich herzlich für die Hilfe beim Korrekturlesen.

Christiane danke ich für die moralische und liebevolle Unterstützung, denn diese war sehr anregend und ohne diese wäre nichts gegangen.