

Int Poster J Dent Oral Med 2001, Vol 3 No 1, Poster 69

Quantitative REM-Untersuchung zur Biofilmbildung auf Titanoberflächen

Sprache: Deutsch

Autoren: Volker Braasch, Inge Schmitz, Klaus-Michael Müller, Wolf-Dieter Grimm

Universität Witten/Herdecke, ZMK, Abt. für Parodontologie; Universitätsklinik Bergmannsheil Bochum, Institut für Pathologie, Germany

Datum/Veranstaltung/Ort:

16.11.2000-18.11.2000

124. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK) gemeinsam mit der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie und der Landes Zahnärztekammer Hessen, Colgate-Forschungspreis 2000 der DGZMK Frankfurt am Main, Germany

Poster Award

Colgate Forschungspreis 2000

Einleitung

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung bestand darin, verschiedene Ti-Oberflächen mit elektronenoptischen und elektronenspektroskopischen Methoden zu charakterisieren und deren Einfluss auf die frühe subgingivale bakterielle Adhärenz in vivo zu quantifizieren. Die zu untersuchenden Titanoberflächen wurden als kronenähnlichen Prüfkörper mittels Procera -Technik (Cp) und Dentaurem-Gusstechnologie (Re) entsprechend den Anforderungen der REM-Analyse gestaltet und hergestellt. Die quantitative Bewertung der subgingivalen Biofilmbildung auf den Titanprüfkörpern erfolgte nach 6, 12 und 24 stündiger intraoraler Exposition. Sie wurde mit Hilfe des Computerprogramms Scion Image for Windows durchgeführt. Die Anzahl der Partikel war bei allen drei Expositionszeiten in der Re-Prüfkörpergruppe größer als in der Cp-Prüfkörpergruppe. Ursächlich verantwortlich für die trotz höherer Rauigkeitswerte signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $\alpha = 0,05$) verminderte subgingivale initiale bakterielle Adhärenz auf den hochglanzpolierten, gefrästen Titanprüfkörpern (Cp) könnten die mittels MIES (Metastable Induced Electron Spectroscopy) nachgewiesenen CH₂-Gruppen sein. Diese inhibitorisch wirkenden CH₂-Gruppen waren der äußeren Schicht aufgelagert und auf den gegossenen Ti-Oberflächen (Re) nicht zu identifizieren.

Material und Methoden

REM-Untersuchungen der Titanprüfkörper:

Prüfkörper (Abb.1, 2):

- gegossene Titanprüfkörper (Re1, Re2, Re3), Dentaurem-Technik aus rema-Titan (cp-Titan Grad 1)
- gefräste Prüfkörper (Cp1, Cp2, Cp3), Procera-Technik aus cp-Titan Grad 2.
- erreichte Endpoliturstufe entspricht einer zeitunabhängigen Maximalpolitur

Charakterisierung der Mikromorphologie:

- Rasterelektronenmikroskop DSM 940 der Firma Zeiss
 - bei 20 kV, Prüfkörperdetektorenabstand ca. 25 mm
 - Neigungswinkel der Prüfkörperoberfläche von 30°
 - Sterilisation im Autoklaven
 - zu untersuchende Areale: subgingivaler Randbereich der kronenförmigen Ti-Prüfkörper
 - Mikrofotographie bei den Vergrößerungen 500x, 1000x und 2000
- EDX-Analyse mit AN 10/25S Link Analytical (Oxford)

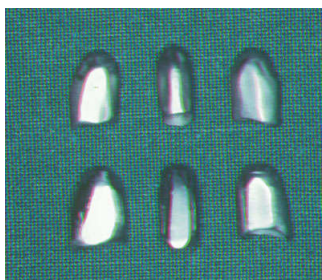


Abb. 1: Titanprüfkörper Cp und Re mit speziellem Design



Abb. 2: Präparierte Titanprüfkörper für REM-Untersuchung

Quantitative in vivo-Untersuchung zur initialen subgingivalen Adhärenz

- Reinigung der Titanprüfkörper mit 70%igem Ethanol im Ultraschallbad für 5 min, Luft trocknung, in Sterilfolie eingeschweißt, Sterilisation im Autoklaven intraorale Exposition von jeweils 6, 12 und 24 (t1, t2, t3) h an Zähne 31, 32

- Fixierung in 2,5%iger Glutaraldehydlösung
- Dehydrierung der an den Titanprüfkörpern anhaftenden Adsorbaten in aufsteigender Alkoholreihe für jeweils 15 min
- dreimaliges Waschen (0,05-M-Phosphatpufferlösung,, pH = 7,4, je 10 min)
- critical point-Trocknung CPD 030 [Blazers] und gold-sputtering (60nm) [Sputter Coater S 150 B (Edwards)]
- Darstellung der Adsorbate auf vier planen Oberflächen (mesial, lingual, vestibulär, distal) aller Titanprüfkörper im subgingivalen Randbereich bei Vergrößerung 100x, 1000x und 2000x
- Mikrofotografie mit Contax-Kamera auf Ilford PanF 50/135 SW Negativfilmen
- Quantitative Auswertung der fotografischen Abzüge (Ilford Multigrade IV RC de luxe) der Vergr. 1000x
- quantitative Bewertung der Adsorbate erfolgte mit Hilfe der Software Scion Image for Windows (Scion Corporation, Maryland, USA).

Die REM-Aufnahmen der Prüfkörperoberflächen zum Zeitpunkt t0 wurden für die Kalibrierung des Schwellenwertes herangezogen. Ein Areal von 1 µm² besteht bei einer Auflösung von 150 dpi aus rund 48 Bildpunkten. Für die Partikelanalyse wurde dieses Areal als untere Grenze einer zu analysierenden Partikelgröße angegeben. Die maximale Anzahl an Bildpunkten lag programmbedingt bei 999.999. (Abb. 3) Dies entspricht bei einer Auflösung von 150 dpi einer Fläche von rund 147,06 x 147,06 µm. Die Partikelanalyse einer jeden Aufnahme bestand in der fünfmaligen Vermessung einer 30 x 30 µm großen Fläche (Meßquadrat) innerhalb des gesamten Bildausschnittes. Das die Partikel eingrenzende Meßquadrat wurde über fünf verschiedene, zufällig ausgewählte Regionen des ca. 8.084 µm² großen Bildausschnittes gelegt. (Abb. 4) Die zufällige Auswahl der Regionen erfolgte mit Hilfe eines Rasters, das das REM-Bild in sechs gleichgroße und nummerierte Areale teilte. Durch das Zufallsprinzip wurde bei jeder Aufnahme fünfmal und unmittelbar vor jeder Messung ein Untersuchungsareal festgelegt. Danach erfolgte die Kalibrierung des Schwellenwertes zur Ausblendung des Hintergrundes bzw. der Materialoberfläche. Durch das Programm wurde dann diese binäre Darstellung des REM-Bildes auf Höhe des Meßquadrates in der gesamten Bildbreite gescannt. (Abb. 5, 6)

Die Auswertung der mit PC-IMAGE for Windows durchgeführten Partikel-Analyse auf subgingival gelegenen Titanoberflächen der Prüfkörper Re1-3 und Cp1-3 erfolgte mit der Software Excel 7.0 sowie mit der Statistik-Software SPSS 8.0 for Windows.

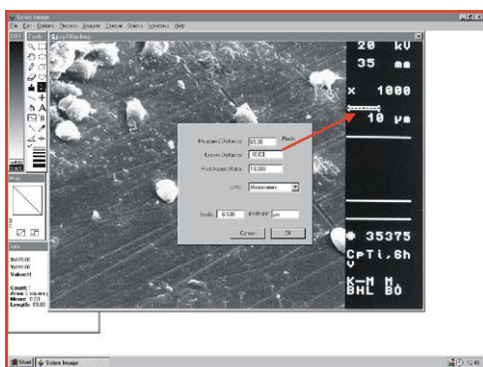


Abb. 3: Kalibrierung der Meßfunktion

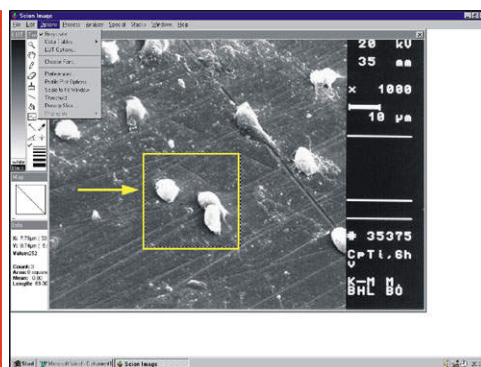


Abb. 4: Kalibrierung des Meßquadrates (30x30 µm)

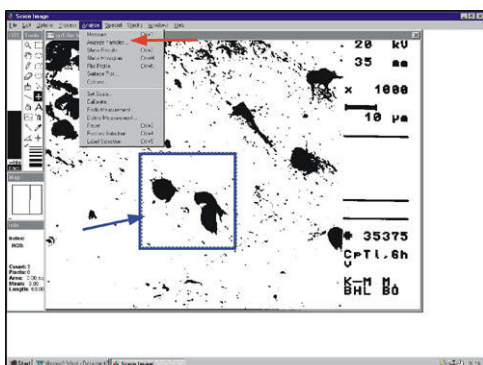


Abb. 5: Binäre Darstellung mit ausgeblendeter Prüfkörperoberfläche



Abb. 6: Gescannter Bildbereich des Meßquadrates

Ergebnisse

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der mit der Proceca-Technik hergestellten Ti-Prüfkörper Cp1-3 zeigten deutliche Spuren der maschinellen Bearbeitung. Der Verlauf, die Dichte, die Breite und Tiefe dieser Schleifritzen waren unterschiedlich. Weiterhin zeigten sich schollenartige Metallpartikel und kleine runde Vertiefungen. Charakteristisch für die Oberflächenmorphologie der mit der Dentaurum-Technik gegossenen Titanprüfkörper Re1-3 war ein sehr schmaler, morphologisch irregulärer Randbereich, der in eine elektronenmikroskopisch glatte Oberfläche überging. Dieser ca. 30 bis 50 µm breite Randbereich zeigte unregelmäßige Zerklüftungen. (Abb. 7) Die Anzahl, die Summe und der maximale Wert der gemessenen Partikel auf den subgingival gelegenen Titanprüfkörperoberflächen der gemessenen Partikelflächen war bei allen drei Re-Prüfkörpern deutlich größer als bei den für die gleiche Zeit intraoral exponierten Cp-Prüfkörpern. (Abb. 9, 10) Der berechnete Median der Partikelfläche auf den einzelnen Prüfkörpern bewegte sich von 1,84 µm² bis 2,72 µm². Aus dieser Nichtnormalverteilung ergibt sich die Notwendigkeit der Anwendung von nichtparametrischen Testverfahren. Der Vergleich (Mann-Whitney-U-Test) der beiden Ti-Prüfkörpergruppen bezüglich der ermittelten Partikelflächen nach den einzelnen intraoralen Expositionszeiten zeigte für die Re-Prüfkörpern signifikant (α = 0,05) größere Werte. (Abb. 10)

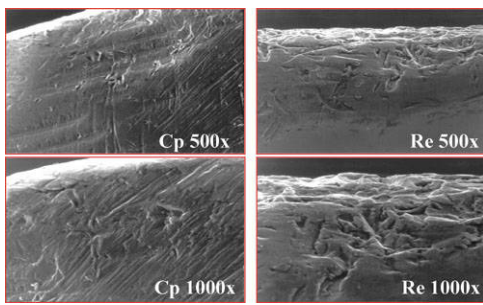


Abb. 7: REM der subgingivalen Prüfkörperbereich (Cp, Re)

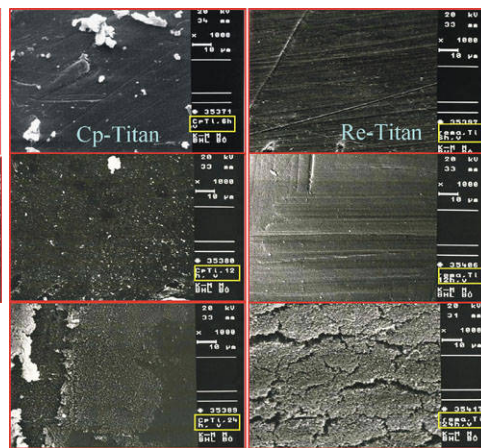
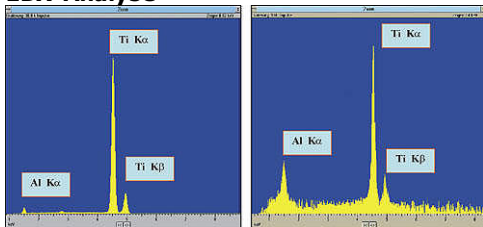


Abb. 8: REM der subgingivalen Prüfkörperbereich (Cp, Re) nach intraoraler Exposition (6, 12, 24 h)

EDX-Analyse



Cp-Titanprüfkörper, Re-Titanprüfkörper

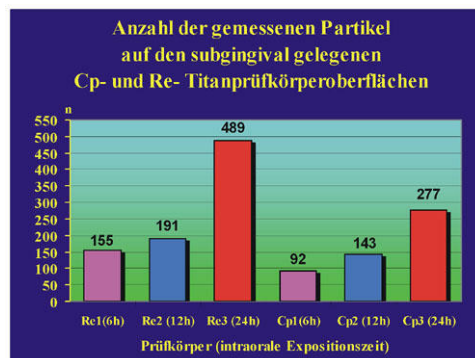


Abb. 9: Anzahl der gemessenen Partikel

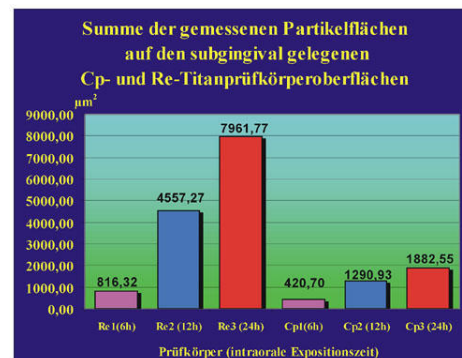


Abb. 10: Summe der gemessenen Partikelflächen

Diskussion und Schlussfolgerungen

Wir konnten feststellen, dass nach einer intraoralen Expositionszeit von sechs Stunden die Oberflächen beider Titanprüfkörper (Cp1 und Re1) adhären te rundliche und ovale Morphotypen von Bakterien aufweisen, die mit der Oberfläche durch fortsatzartige Strukturen verbunden und den Streptokokken zuzuordnen sind. Nach einer Expositionszeit von 24 Stunden zeigte sich auf beiden Prüfkörperoberflächen eine dichte Bakterienflora bestehend aus unterschiedlichen langen und kurzen stäbchenförmigen und filamentartigen Morphotypen. Im Vergleich der beiden Untersuchungsgruppen erscheint die bakterielle Besiedlung der Re-Prüfkörperoberfläche kompakter. In einer Untersuchung unserer Arbeitsgruppe konnte mit einem speziellen Spektroskopieverfahren, der Metastable Impact Elektron Spectroscopy (MIES), die chemische Beschaffenheit der obersten, auf der Titanoxidschicht befindlichen Adsorbatschicht unbehandelter Titanoberflächen untersucht werden. Hierbei stellte sich ein der Titanoxidschicht aufgelagerter, aus CH₂-Gruppen bestehender Verunreinigungsfilm dar. Diese Oberflächenveränderungen führen offensichtlich zu einer selektiven Adsorption spezifischer Speichelproteine wie Steinberg et al. (1998) in einer in vitro-Untersuchungen nachweisen konnten. Dies führen wir auf die nachgewiesenen CH₂-Gruppen zurück. Die inhibitorisch wirkenden CH₂-Gruppen waren der äußeren TiO₂-Schicht aufgelagert und auf den gegossenen Titanoberflächen nicht zu identifizieren. Damit muß der Textur von Ti-Oberflächen eine entscheidende Rolle bei der materialspezifischen Adsorption von Biopolymeren und die dadurch beeinflusste initiale bakterielle Adhärenz auf Titanoberflächen eingeräumt werden. Differenzen in der molekularen Zusammensetzung der Proteinschichten, in der Menge der adsorbierten Proteine, im zeitlichen Ablauf des Adsorptionsprozesses der unterschiedlichen sowie in der Struktur der Proteinschichten sind somit mögliche Folgen eines substratinduzierten Transfers von Oberflächeneigenschaften in die Pellikelschichten. Demnach wäre eine spezifische Pellikelzusammensetzung Ausdruck einer oberflächenspezifischen Adsorption selektiver Makromoleküle aus dem Speichel, die die Oberflächentextur der adsorbierenden Festkörperoberflächen widerspiegelt.

Bibliographie

- Abati S; Romeo E; Piccoli P; Lodi G: Plaque colonization of titanium dental implants: A scanning electron microscope study. *J Clin Periodontol* 1993; 20: 318-326
- Adell R; Eriksson B; Lekholm U; Brånemark PI, Jemt T: A long term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Impl* 1990; 5: 347-359
- Braasch V; Schmitz I; Heinz B; Vogt J; Morgner H; Grimm WD: Oberflächencharakteristik verschiedener dentaler Ti-Implantate im Bereich des mukosalen Attachments. Proceedings, T6 32. Jahrestagung der AG für Grundlagenforschung, DGZMK, Mainz, 13.-14.01.2000
- Edwards BN; Gold BR: Analysis of surface cleanliness of three commercial dental implants. *Biomaterials* 1992; 13(11): 775-780
- Gatewood RR; Cobb CM; Killoy WJ: Microbial colonization on natural tooth structure compared with smooth and plasma-sprayed dental implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 1993; 4(2): 53-64
- Grimm WD; Crawford L; Heinz B; Morgner H; Pilecki T: The surface composition of PROCERA-titanium: An ultrastructural study. 3rd International Symposium on Titanium in Dentistry. Sydney 1995, Proceedings 1995: 272
- Grimm WD; Crawford L; van der Hoeven H; Malevics N: Microbiological recolonization on titanium-surfaces of different fabricated methods. *J Dent Res* 1996; 75: 205
- Grimm WD; van der Hoeven H; Schmitz I: Bacterial adhesion to different free-energy-level-surfaces on titanium. *J Dent Res* 1998a; 77: 1246
- Grimm WD; van der Hoeven H; Schmitz I: Initial bacterial adhesion to different free-energy-level-surfaces on titanium. 4th International Symposium on Titanium in Dentistry. Genf 1998b; Proceedings 1998: 39
- Helsing AL; Lyberg T: Comparative surface analysis and clinical performance studies of Brånemark implants and related clones. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994; 9(4): 422-430
- Kean RA; Berry CW; Chiles DG: Antimicrobial activity of dental implant metal ions. *J Dent Res* 1988; 67 (Spec Iss): 142
- Klauber C; Lenz LJ; Henry PJ: Oxide thickness and surface contamination of six endosseous dental implants determined by electron spectroscopy for chemical analysis: a preliminary report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990; 5(3): 264-271
- Kozioł C; Morgner H; Tackenberg M: Quantitative Oberflächenanalyse mit MIES. FE & E Vorhaben, 13 N5681, 1993 Mombelli A; Buser D; Lang NP: Colonization of osseointegrated titanium implants in edentulous patients. Early results. *Oral Microbiol Immunol* 1988; 3: 113-120
- Mombelli A; Mericske-Stern R: Microbiological features of stable osseointegrated implants used as abutments for overdentures. *Clin Oral Implants Res* 1990; 1: 1-7
- Mombelli A; van Oosten MAC; Schurch E; Lang NP: The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol* 1987; 2: 145-151
- Morgner H: The characterization of liquid and solid surfaces with metastable helium atoms. *Adv. At. Mol. Opt. Physics* 1999; 42(B): 387-488
- Nakou M; Mikx FHM; Oosterwall PJM; Kruijssen JCWM: Early microbial colonization of perimucosal implants in edentulous patients. *J Dent Res* 1987; 66: 1654-1657
- Newman MG; Flemming TF: Periodontal considerations of implants and implant associated microbiota. *J Dent Educ* 1988; 52: 737-744
- Olefjord I; Hansson S: Surface analysis of four dental implant systems. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993; 8(1): 32-40
- Quirynen M: The clinical meaning of the surface roughness and the surface free energy of intraoral hard substrata on the microbiology of the supra- and subgingival plaque: results of in vitro and in vivo experiments. *J Dent* 1994; 22 Suppl 1: S13-S16
- Quirynen M; Bollen CM; Papaioannou W; Van Eldere J; van Steenberghe D: The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996; 11(2): 169-178
- Rimondini L; Fare S; Brambilla E; Felloni A; Consonni C; Brossa F; Carrassi A: The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium. *J Periodontol* 1997; 68(6): 556-562
- Salcetti MJ; Moriarty JD, Cooper LF; Smith FW; Collins JG; Socransky SS; Offenbacher S: The clinical, microbial and host response characteristics of failing implant. *Clin Oral Implants Res* 1997, 12: 32-42
- Schliephake P; Reiss G; Urban R; Neukam FW; Guckel S: Metal release from titanium fixtures during placement in the mandible: An experimental study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993; 8(5): 502-511
- Siegrist BE, Brex MC, Gusberti FA, Joss A, Lang NP: In vivo early human dental plaque formation on different supporting substances. A scanning electron microscopic and bacteriological study. *Clin Oral Implants Res* 1991; 2(1): 38-46
- Steinberg D; Sela MN; Klinger; Kohavi D: Adhesion of periodontal bacteria to titanium, and titanium alloy powders. *Clin Oral Implants Res* 1998; 9(2): 67-72
- Sutherland DS; Forshaw PD; Allen GC; Brown IT; Williams KR: Surface analysis of titanium implants. *Biomaterials* 1993; 14(12): 893-899
- Theilade E; Theilade J: Role of plaque in the etiology of periodontal disease and caries. *Oral Sciences Reviews* 1976,): 23-63
- Vezeau PJ; Koorbusch GF; Draughn RA; Keller JC: Effects of multiple sterilization on surface characteristics and in vitro biologic responses to titanium. *J Oral Maxillofac Surg* 1996; 54(6): 738-46
- Whittaker CJ, Klier CM, Kolen-brander PE: Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol* 1996; 50: 513-552
- Wolonsky LE; de Camargo PM, Erard JC; Newman MG: A study of in vitro attachment of *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces viscosus* to saliva-treated titanium. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1989; 4(1): 27-31
- Wu-Yuan CD; Eganhouse KJ; Keller JC; Walters KS: Oral bacterial attachment to titanium surfaces: a scanning electron microscopy study. *J Oral Implantol* 1995; 21(3): 207-213

This Poster was submitted on 09.02.01 by Professor Wolf-Dieter Grimm.

Correspondence address:

Prof. Wolf-Dieter Grimm
 Universität Witten/Herdecke
 Alfred Herrhausen Straße 50
 58448 Witten
 Tel.: (02302) 926-668

#32

Quantitative REM-Untersuchung zur Biofilmbildung auf Titanoberflächen

Braasch, V., Schmitz, I., Müller, K. M., Grimm, W.-D.



Universität Witten/Herdecke, ZMK, Abt. f. Parasitologie/ Universitätsklinik Bergmannsheil Bochum, Institut f. Pathologie



Das Ziel der vorliegenden Untersuchung bestand darin, verschiedene Ti-Oberflächen mit elektronenoptischen und elektronenspektroskopischen Methoden zu charakterisieren und deren Einfluss auf die Bildung subgingivaler Bakterien zu quantifizieren...

Material und Methoden:

REM-Untersuchungen der Ti-Prüfkörper:

- gepulste Ti-Prüfkörper (Ti1, Ti2, Ti3), Denture-Technik aus Titanyl-Titan (Ti-TiN-Gehalt)
• gelbte Ti-Prüfkörper (Cp1, Ccp2, Ccp3), Provena-Technologie mit Titan Oxid
• eroderte Ti-Prüfkörper (Cp1, Ccp2, Ccp3), Provena-Technologie mit Titan Oxid

Quantitative in vivo-Untersuchung zur initialen subgingivalen Adhärenz

- Reinigung der Ti-Prüfkörper mit 70%igem Ethanol in Ultraschallbad für 6 min, Lufttrocknung in Steriltüte
• vertikale Exposition von jeweils 6, 12 und 24 h an 24 x 24 mm in Zone II, 32
• Fixierung in 2,5%iger Glutaraldehydlösung
• Demontage der an den Ti-Prüfkörpern adsorbierten Adsorbaten in nachfolgender Alkoholgele Serie bis jeweils 15 min



Abb. 1 Ti-Prüfkörper (Ti1) mit glatter Oberfläche

Abb. 2 gepulste Ti-Prüfkörper für REM-Untersuchung

Die REM-Aufnahmen der Ti-Prüfkörperoberflächen zu 0, 6, 12 und 24 Stunden wurden für die Kalibrierung des Scanners verwendet. Ein Winkel von 1 µm besteht bei einer Auflösung von 150 dpi aus 48 Pixeln. Für die Partikelanalyse wurde die maximale Auflösung erreicht...



Abb. 3 - 6: subgingivale Adhärenz auf Ti-Prüfkörper (Ti1) zu 0, 6, 12 und 24 Stunden

Ergebnisse:

Die räumlich-zeitlich-quantitativen Aufnahmen der mit der Provena-Technologie hergestellten Ti-Prüfkörper Cp1-3 zeigten deutliche Spuren der menschlichen Biozönose. Die Verteilung der Bakterien und die Größe dieser Schichten waren unterschiedlich...

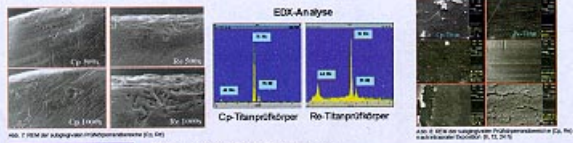


Abb. 7-9: EDX-Analyse der subgingivalen Biofilme auf Ti-Prüfkörper (Ti1) zu 0, 6, 12 und 24 Stunden

Diskussion und Schlussfolgerungen:

Wir konnten feststellen, dass nach einer Inzision ein Biofilmbau von sechs Stunden die Oberflächen beider Ti-Prüfkörper (Cp1 und Ti1) vollständig analysiert und so die Morphotypen von Bakterien aufwies, die mit der Oberfläche durch hohlräumliche Strukturen verbunden sind...

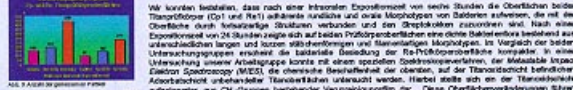


Abb. 10: relative Abundanz der Bakterienarten

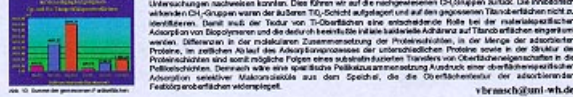


Abb. 11: relative Abundanz der Bakterienarten

braasch@uni-wh.de