

### **3. Ziele der Studie:**

In einer prospektiven, kontrollierten, randomisierten Einzelblindstudie sollte der Effekt der antimikrobiellen Zusatzmedikation mit Chlorhexidindiglukonat in einem Controlled-Delivery-Device (PerioChip) in der Behandlung der generalisierten Aggressiven Parodontitis untersucht und hinsichtlich der Wirksamkeit mit der Standardtherapie Amoxicillin/Metronidazol verglichen werden.

Die Calprotectin-Konzentration in der Sulkusflüssigkeit ausgewählter Referenzstellen wurde als Verlaufparameter der Parodontalbehandlung evaluiert.

### **4. Material und Methode**

#### **4.1 Studienpatienten**

Patienten, die in der Neuaufnahme der Abteilung für Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin die Verdachtsdiagnose „generalisierte Aggressive Parodontitis“ gestellt bekommen hatten, wurden in einer separaten Screening-Untersuchung auf ihre Eignung als Studienpatienten untersucht. Im Rahmen der Screening-Untersuchung wurden die allgemeine und die spezielle Anamnese erfragt, ein vollständiger dentaler Befund und ein Status der Sondierungstiefen mit einer konventionellen Parodontalsonde (PCP-UNC 15, Hu-Friedy, USA) erstellt. Waren keine aktuellen Röntgenbilder vorhanden, wurde eine Panoramaschichtaufnahme (OPG) angefertigt.

Die Studienteilnahme war anhand folgender Kriterien möglich:

- Einschlusskriterien:
  - schwere unbehandelte generalisierte Aggressive Parodontitis:
    - zwischen 18 und 40 Jahre alt
    - klinischer Attachmentverlust  $\geq 5$  mm an mindestens 2 Stellen bei mehr als zwölf Zähnen
    - mindestens drei Zähne außer Schneidezähnen und ersten Molaren betroffen
    - radiologisch sichtbarer horizontaler und vertikaler Knochenabbau
  - allgemeinmedizinisch gesund
  - mindestens 20 erhaltungsfähige Zähne vorhanden

(modifiziert nach Astemborski et al., 1989)

- Ausschlusskriterien:
  - bereits systematische Parodontalbehandlung erfolgt
  - Einnahme von Medikamenten mit Einfluss auf das Parodont in den letzten 6 Monaten  
(Antibiotika, Cortison; nicht steroidale antiinflammatorische Medikamente länger als 7 Tage)
  - Prämedikation vor Parodontalbehandlung notwendig
  - Allergie gegen in der Studie verwendete Medikamente oder deren Inhaltsstoffe
  - Schwangerschaft, Stillzeit
  - schlechte Mundhygiene  
(nach der Vorbehandlung API > 30%)

Die Patienten wurden mündlich und schriftlich über ihre Erkrankung, die Behandlungsmöglichkeiten und gemäß „Good Clinical Practice“ (ICH-GCP, Weltärztebund, 2002) über das Studienprotokoll aufgeklärt. Nach schriftlich erfolgter Einwilligung begann die Vorbehandlung.

## **4.2 Klinischer Ablauf**

### **4.2.1 Vorbehandlung / Hygienephase**

Im Rahmen der Vorbehandlung fanden 3-4 Prophylaxesitzungen mit Mundhygieneinstruktion und -motivation sowie Professioneller Zahnreinigung (PZR) statt. Bei der PZR wurden supragingivaler Zahnstein, Plaque und Verfärbungen mit Universalscalern und -küretten (M23, M23A, GX4, A. Deppeler, Schweiz) und einem piezo-keramischen Ultraschallscaler (Piezon Master 400, EMS, Schweiz) entfernt. Alle Zahnflächen wurden mit Gummikelch und fluoridhaltiger Polierpaste poliert. Die Verbesserung der Mundhygiene wurde durch die Erhebung des Approximalraum-Plaque-Index (API) (Lange et al., 1977) und des Papillen-Blutungs-Index (PBI) (Saxer & Mühlemann, 1975) kontrolliert. Zur Diagnosesicherung und Behandlungsplanung wurde in Paralleltechnik ein Röntgenstatus aller Zähne erstellt. Falls notwendig, wurden Füllungen rekonturiert und poliert und überstehende Kronenränder entfernt. Kariöse Läsionen und insuffiziente Füllungen wurden mit provisorischen oder definitiven Kompositfüllungen versorgt. Wurzelkanalbehandlungen wurden noch in der

Vorbehandlung mit einer definitiven Wurzelfüllung beendet. Zähne mit zirkulärem Attachmentverlust und weniger als 2 mm Restparodont wurden als nicht erhaltungswürdig definiert und extrahiert. Lücken wurden mit Komposit-Schienen oder laborgefertigten Provisorien geschlossen. Waren die konservierend-chirurgische und provisorische prothetische Vorbehandlung abgeschlossen und hygienische Verhältnisse etabliert ( $API \leq 30$ ), erfolgte die Baseline-Untersuchung.

#### **4.2.2 Klinische Parameter**

Die klinischen Parameter wurden zur Baseline und bei den Kontrolluntersuchungen 3 und 6 Monate nach Abschluss der Parodontalbehandlung in der Nachsorge-Phase erhoben. Die Sondierungstiefe (PPD) und der klinische Attachmentverlust (CAL) wurden an sechs Stellen pro Zahn mit einer auf 0,2 mm genauen und auf 0,25 N druckkalibrierten elektronischen Parodontalsonde mit hoher inter- und intraindividuelle Reproduzierbarkeit gemessen (Florida Probe FP 32 mit Software 3.0.6.8, Florida Probe Corporation, USA). Anwendung fand hierbei das CEJ-Handstück, mit dem die Schmelz-Zement-Grenze bei der CAL-Messung sicher ertastet werden kann (Preshaw et al., 1999). Blutung auf Sondieren (BoP) und Suppuration (Pus) wurden als vorhanden oder fehlend registriert. Furkationen wurden mit einer Nabers-Furkationssonde sondiert und der Furkationsbefall nach Grad 0-III eingeteilt. Die Zahnbeweglichkeit wurde durch Auslenkung mit einem Instrumentengriff bestimmt und nach Grad 0-III eingeteilt. Die Messwerte wurden automatisiert von der FP 32-Software in einer Datenbank (Access 97, Microsoft, USA) abgespeichert. Alle Messungen wurden durch den kalibrierten und gegenüber der Studienmedikation verblindeten Behandler durchgeführt.

#### **4.2.3 Gewinnung der Sulkusflüssigkeit**

Die zwei tiefsten und, falls vorhanden, eine flache proximale Stelle ( $PPD \leq 3\text{mm}$ ) wurden vor der Baselineuntersuchung anhand der Messwerte der Screeninguntersuchung zur Probenentnahme ausgewählt. Vor der Messung der klinischen Parameter wurden bei der Baseline-Untersuchung und bei jedem Kontrollbesuch die ausgewählten Stellen mit Watterollen isoliert, getrocknet und anschließend jeweils ein Papierstreifen (PerioCol Paper Strip, Oraflow, USA) bis zur Referenzmarkierung in den Sulkus eingeführt und dort für zehn Sekunden belassen. Die Sulkusflüssigkeitsfließrate wurde mit einem Periotron-Gerät (Periotron 6000, Oraflow, USA) gemessen. Nach der Gewinnung wurden die Proben einzeln

in 200µl (1% bovines Serum-Albumin in PBS) bei -80° C eingefroren. Das Periotron-Gerät wurde regelmäßig nach Herstellerangaben kalibriert, indem Volumina von 0-1,2 µl Lagerflüssigkeit bzw. Wasser in Schritten von 0,1 µl auf Papierstreifen pipettiert und die für beide Flüssigkeiten gemittelten Messwerte in eine Eichabelle umgerechnet wurden. Vor jeder Untersuchung wurde das Periotron-Gerät mit einem trockenen Papierstreifen auf Null gesetzt.

#### **4.2.4 Scaling/Root planing**

Alle Stellen mit einer Baseline-Sondierungstiefe von PPD  $\geq$  3,6 mm wurden in Lokalanästhesie (UDS / UDS forte, Aventis, Deutschland) mit scharfen Gracey-Küretten (5/6, 7/8, 11/12, 13/14, A. Deppeler, Schweiz) und einem piezo-keramischen Ultraschallscaler (Piezon Master 400, EMS, Schweiz) mittels Scaling / Root planing (SRP) behandelt. In Furkationen wurden zusätzlich Furkationsküretten (SQBL 1 P, Hu-Friedy, USA) benutzt. Die Behandlung erfolgte ohne ein Zeitlimit und dauerte so lange, bis mit einer Tastsonde (EXD 11/12, Hu-Friedy, USA) keine Rauigkeiten mehr auf der Wurzeloberfläche zu ertasten waren. Während des SRP wurde mehrere Male mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) subgingival gespült. Nach SRP wurde die Gingiva mit befeuchteten Watterollen eine Minute lang komprimiert, um die Größe des Koagulum zu verringern. Die Behandlungen erfolgten quadrantenweise in 4 Sitzungen innerhalb von 2 Wochen. Eine Woche nach der letzten SRP-Sitzung erfolgte eine Nachbehandlungssitzung (Mundhygienemotivation und -instruktion, PZR mit erneuter leichter subgingivaler Instrumentierung (ohne Anästhesie) zur prämedikamentösen Zerstörung des seit den SRP-Sitzungen neugebildeten Biofilms, anschließend Randomisierung). Die Patienten wurden angewiesen, zwischen der ersten SRP-Sitzung und der Nachbehandlung zweimal täglich eine Minute lang mit 0,12-prozentiger Chlorhexidindigluconat-Lösung (Chlorhexamed, Butler, Deutschland) zu spülen. Bei Bedarf wurde als Schmerzmittel Ibuprofen (400 mg, ratiopharm, Ulm, Deutschland) verordnet.

#### **4.2.5 Studienmedikation**

Die Anwendung der Studienmedikation erfolgte einzelblind ohne Kenntnis durch den Behandler.

Nach Abschluss der Nachbehandlung wurden die Patienten per Randomisierung in die Amoxicillin/Metronidazol- und die PerioChip-Gruppe (AM/PC) eingeteilt (Tabelle 9).

Patienten der AM-Gruppe erhielten ein Rezept über Amoxizillin/Metronidazol, wurden über die Anwendung informiert und über die möglichen Nebenwirkungen aufgeklärt.

Patienten der PC-Gruppe wurde an diesem Termin an jeder Stelle mit einer Baseline-Sondierungstiefe von  $PPD \geq 5$  mm ein PerioChip eingesetzt (maximal zwei pro Zahn). Gemäß der Empfehlung des Herstellers wurde die PC-Anwendung anhand des aktuellen Befundes bei der 3-Monats-Kontrolle wiederholt.

Patientengruppe	Studienmedikation	Anwendung
AM	Amoxizillin 500 mg (ratiopharm, Ulm, Deutschland) Metronidazol 250 mg (Artesan, Lüchow, Deutschland)	Nach Nachbehandlung: je 1 Tablette alle 8h für 10 Tage
PC	PerioChip 2.5 mg Chlorhexidindigluconat in kreuzvernetzter Gelatine (Dexcel Pharma, Deutschland)	Nach Nachbehandlung und 3-Monats-Kontrolle: Applikation eines PerioChip an jeder Stelle mit $PPD \geq 4.6$ mm

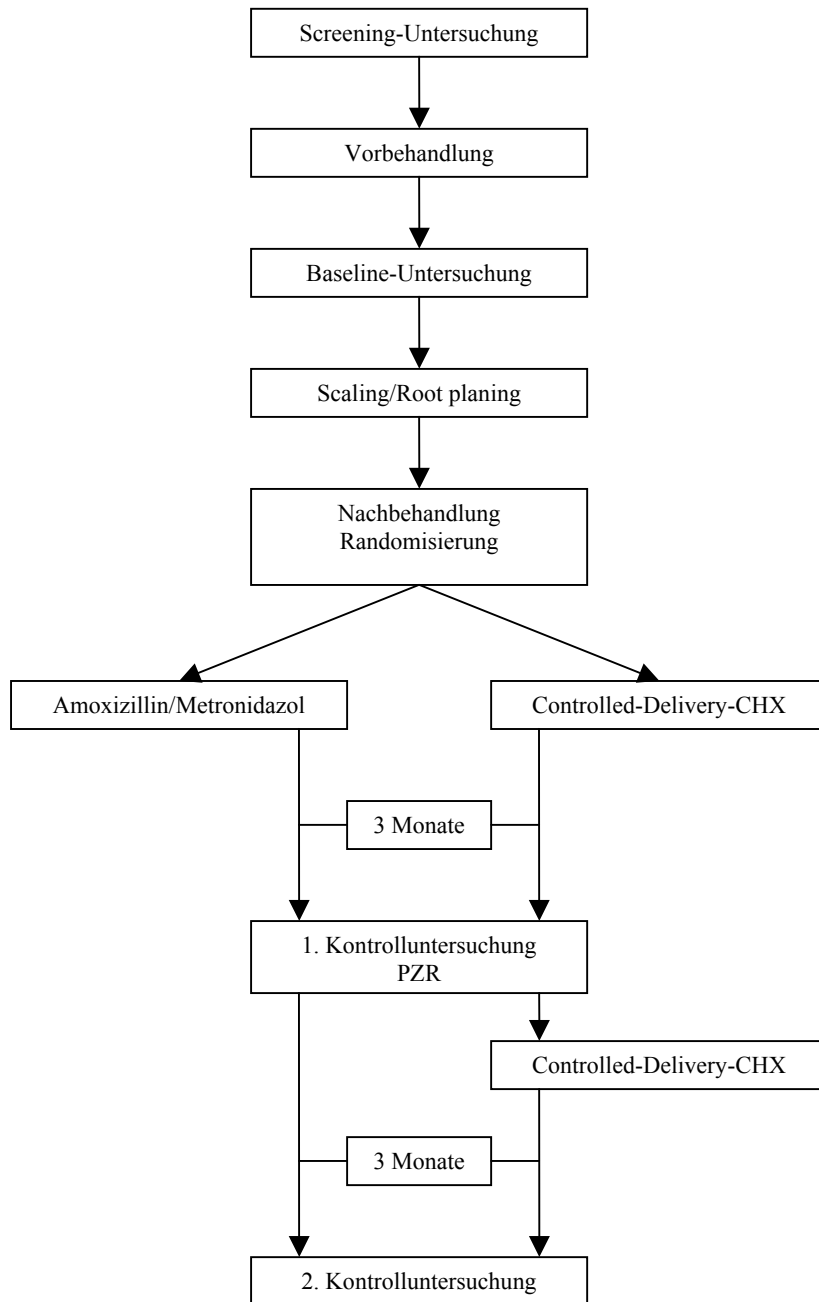
**Tabelle 9** Studienmedikation

#### 4.2.6 Nachsorge

Nachsorgeuntersuchungen fanden drei und sechs Monate nach Beendigung der medikamentösen Zusatztherapie statt. Eine Woche vor der Probenentnahme und der Erhebung der klinischen Parameter wurden eventuell vorhandene supragingivale Beläge entfernt und die Patienten erneut motiviert und instruiert, um eine Beeinflussung der Messungen durch Zahnstein, Plaque und Gingivitis zu vermeiden. Probenentnahmen und klinische Messungen wurden analog der Baseline-Untersuchung durchgeführt. Anschließend erfolgte eine PZR, bei der Stellen, die eine Sondierungstiefe von  $PPD \geq 4,6$ mm oder  $PPD \geq 3,6$ mm mit positiver Sondierungblutung aufwiesen, subgingival instrumentiert und mit  $H_2O_2$  (3%) gespült wurden. Zusätzlich wurde in der PC-Gruppe analog zur Empfehlung des Herstellers bei der 3-Monats-Kontrolle an jeder Stelle mit  $PPD \geq 4.6$ mm die Studienmedikation erneut eingesetzt.

Einen schematischen Überblick über den klinischen Ablauf gibt Abbildung 6.

**Abbildung 6** Klinischer Ablauf



#### 4.2.7 Analyse der Sulkusflüssigkeit

Die Bestimmung der Calprotectinkonzentration in der Sulkusflüssigkeit wurde mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-Kit (BMA Biomedicals, Augst, Schweiz; siehe Tabelle 10) durchgeführt. Zur Eluierung der Sulkusflüssigkeitsprobe aus dem Streifen wurden die Proben aufgetaut, jeweils eine Minute gerüttelt und mit 3000 Umdrehungen/min 5 Minuten lang bei Raumtemperatur zentrifugiert. Von den anschließend 1:400 mit Assay-Buffer verdünnten Proben wurden jeweils 2x 100µl zur Doppelbestimmung in Wells der bereits beschichteten Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platten wurden daraufhin pro Well mit 100µl Detektions-Antikörper beschickt und über Nacht bei 6°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde 6x mit destilliertem Wasser gewaschen und restliches Wasser durch Ausklopfen der Platten auf Zellstoff entfernt. Sofort danach wurde jedes Well mit 200 µl Substrat-Lösung beschickt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Farbreaktion mit 100 µl Stopp-Lösung pro Well beendet und die Extinktion photometrisch (Microplate Reader, BioRad Laboratories Inc., USA) bei einer Wellenlänge von 450nm bestimmt. Die Berechnung der Calprotectinkonzentration in der eluierten Probe erfolgte anhand der Standardkurve mit der Software Microplate Manager 4.0 (BioRad Laboratories Inc., USA). Proben, die aufgrund besonders hoher oder niedriger Calprotectinkonzentrationen außerhalb des Bereichs des Standards lagen, wurden in Verdünnungen von 1:800 bzw. 1:200 erneut getestet.

Reagens	Eigenschaften
Mikrotiterplatte	beschichtet mit murinen Antikörpern gegen Calprotectin
Calprotectin-Standard	500 ng/ml, rekombinant
Assay-Puffer	0.1 M Tris-Azetat-Puffer, 0.1% Casein, 2mM CaCl, pH-Wert 7.5
Detektions-Antikörper	Ursprung: Huhn, HRP-gekoppelt
Substrat	Tetramethylbenzidin
Stopp-Lösung	1 M Schwefelsäure

**Tabelle 10** Calprotectin-ELISA-Kit

Die Calprotectinkonzentration in der Sulkusflüssigkeit wurde aus der Konzentration der eluierten Probe mit der Formel  $x = \frac{c \otimes 200}{v}$  berechnet und in µg/µl angegeben.

$$x = \frac{c \otimes 200}{v}$$

<p>x: Calprotectinkonzentration in der Sulkusflüssigkeit  c: Calprotectinkonzentration in der eluierten Probe  v: SFFR in µl</p>
--

### 4.3 Datenverarbeitung und statistische Analyse

Die die klinischen Messwerte enthaltende Datenbank wurde mit der Software FP 32 Data Downloader (Florida Probe Corporation, USA) in eine Excel-Datei umgewandelt. In Excel (Excel 97, Microsoft, USA) erfolgte die Eingabe der Labordaten und anschließend die Vorbereitung der Rohdaten für die statistische Analyse mit dem Statistikprogramm SPSS 11.0 (SPSS, USA).

Die klinischen Parameter API, PPD, CAL, BoP und Pus wurden auf Patientenbasis analysiert. Für CAL, PPD, BoP und Pus wurden Mittelwerte aller Stellen und zusätzlich Mittelwerte getrennt nach mehr- und einwurzeligen Zähnen berechnet.

Die Sondierungstiefen wurden in vier Kategorien eingeteilt (Tabelle 11) und deren Häufigkeit zu jedem Untersuchungszeitpunkt bestimmt.

PPD-Kategorien			
flach	moderat	tief	sehr tief
0-3,4 mm	3,6-5,4 mm	5,6-6,4 mm	6,6-

**Tabelle 11**

An den Stellen mit SF-Probenentnahme wurden CAL, PPD, BoP, Pus, SFFR und die Calprotectinkonzentration stellenspezifisch analysiert.

Insgesamt fanden nicht-parametrische Tests Anwendung, da keine Normalverteilung vorlag. Der intraindividuelle Verlauf wurde mit dem Wilcoxon-Rangsummentest analysiert. Vergleiche von Test- und Kontrollgruppe wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Allgemein galt ein  $\alpha$ -Fehler von  $p \leq 0,05$  als signifikant. Bei Mehrfachtestungen wurde der p-Wert gemäß Bonferroni-Holm adjustiert.