

Aus der Klinik für Zahnärztliche Prothetik, Propädeutik und Werkstoffkunde

(Direktor: Prof. Dr. M. Kern)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel an der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**IMMUNOLOGISCHE ABWEHRREAKTIONEN IN FOLGE MÖGLICHER
PYROGENBELASTUNG AUF IMPLANTATOBERFLÄCHEN**

Inauguraldissertation zu Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnmedizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

LARS OSSENKOP

aus **Hamburg**

Kiel 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Kern, Klinik für Zahnärztliche Prothetik,
Propädeutik und Werkstoffkunde

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Wiltfang, Klinik für Mund-, Kiefer- und
Gesichtschirurgie

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 24.04.2013

Gezeichnet: Lars Hermann Franz Ossenkop

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Dentale Implantate	1
1.2	Osseointegration	3
1.3	Periimplantitis und Pyrogene	4
1.4	Das Immunsystem	5
1.5	Einfluss von Implantaten auf das Immunsystem.....	8
1.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und ihr Prinzip	9
1.7	Kurzbeschreibung von Primern und ihrer Funktionen	10
1.8	Zielsetzung.....	11
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Probekörper	12
2.2	Vorbereitung der Instrumente und Materialien.....	12
2.3	Spenderblut und Blutentnahmen	12
2.4	Kontrollgruppen.....	12
2.5	Probenvorbereitung und Inkubation der Implantate	12
2.6	Depyrogenisierung der Implantate und Instrumente	13
2.7	Versuchsablauf nach Depyrogenisierung	13
2.8	Versuchserweiterung mit neuen Implantaten.....	13
2.9	RNA-Extraktion	13
2.10	Bestimmung der optischen Dichte (Konzentrationsbestimmung der RNA)	14
2.11	RNA-Qualitätskontrolle.....	14

2.12	cDNA-Synthese (reverse Transkription)	14
2.13	Quantitative PCR (qPCR).....	17
2.14	Datenanalyse und statistische Auswertung	18
3	Ergebnisse	19
3.1	Bestimmung der mRNA-Qualität	19
3.2	Genomanalyse mittels RT-qPCR.....	19
3.2.1	Analyse von Parametern, die unter anderem an einer LPS induzierten Toll-Like-Rezeptor gesteuerten Immunantwort beteiligt sind	20
3.2.2	Analyse von Parametern, die unter anderem an einer LPS induzierten Tumornekrose-Faktor gesteuerten Immunantwort beteiligt sind	24
3.2.3	Einfluss von dentalen Implantaten auf die IL-8-Genexpression und eine mögliche Regulation von IL-8	26
4	Diskussion.....	30
4.1	Diskussion der Methodik	30
4.2	Immunologische Reaktion der mit Implantaten inkubierten Blutproben.....	30
4.3	Auswirkung der Depyrogenisierung auf die Immunantwort	31
4.4	Betrachtung der IL-8 Expression im Bezug auf die Osseointegration	32
5	Zusammenfassung.....	33
6	Summary.....	34
7	Literaturverzeichnis	35
	Anhang.....	40
8	Danksagung.....	40
9	Veröffentlichungen	41
9.1.1	Originalarbeiten.....	41
9.1.2	Kongressbeiträge	41

10	Lebenslauf.....	42
11	Erklärung.....	43

Abkürzungsliste

BMP	Bone morphogenetic protein
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
Ceramic de	Zirkonoxidkeramik depyrogenisiert
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DEPC-Wasser	Diethylpyrocarbonat-Wasser
DGI	Deutsche Gesellschaft für Implantologie
DNA	Desoxiribonucleidacid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FADD	Fas-associated-death domain protein
G	Gewichtskraft
h	Stunde
IGF	Insulin like growth factor
IL	Interkeukin
LAL-Test	Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test
LPS	Lipopolysaccharide
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NaCl	Natrium Chlorid
NC	Negativkontrolle
NFκB	Nuclearfactor kappa-light-chain enhancer of activated B-cells
ng	Nanogramm
NT-Puffer	Neutralisation titers
p	Signifikanzlevel
PC	Positivkontrolle
PCR	Polymeraskettenreaktion
PDGF	Plateled derived growth factor
PRR	Pattern recognition receptor
R6K-Puffer	Replication of Plasmid R6K (Plasmid)
r ²	Steigung
RNA	Ribunucleidacid
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg (Sedimentationskoeffizient)
SYBR-Green	Cyanin-Farbstoff
TGFβ	Transforming growth factor beta
Titan de	Titan depyrogenisiert
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Tumor Necrose Factor

1 Einleitung

1.1 Dentale Implantate

Dentale Implantate sind eine derzeit weit verbreitete Therapieform für die Verankerung von Zahnersatz [1, 81]. Allein in Deutschland wurden im Jahr 2010 etwa 1.000.000 Implantate gesetzt (DGI). Dentale Implantate dienen als Verankerungsmöglichkeit für den Ersatz einzelner Zähne oder von Prothesen und finden sowohl im zahnlosen als auch im teilbezahnten Kiefer Anwendung [1, 35, 44].

Das Einbringen eines Implantates bei Zahnverlust ist die naheste restitutio ad integrum, bezogen auf eine unverblokte Kronenversorgung mit separatem Pfeiler. Derzeit finden dentale Implantate aus Titan oder Zirkonoxidkeramik Verwendung. Diese haben neben den funktionellen Aufgaben auch ästhetischen Ansprüchen zu genügen. Deshalb ist bei Titanimplantaten die graue Farbe des Werkstoffes, welche insbesondere im Oberkieferfrontzahnbereich sowie im Bereich der Prämolaren zum dunklen Durchscheinen durch die Gingiva führen kann, als nachteilig zu bewerten. Verstärkt wird dieses Problem bei besonders dünnem Weichgewebe im Bereich der Implantate [36, 92]. Abbildung 1a zeigt das gräulich durchschimmernde Titanimplantat, regio 22, bei dünnem Weichgewebe. Abbildung 1b zeigt im Vergleich die natürliche Gingivafarbe bei einem Keramikimplantat regio 22.



Abb. 1a: Zahn 22 vollverblendete Krone auf einem Titanimplantat
deutlicher Grauschimmer der Gingiva



Abb. 1b: Zahn 22: Vollkeramische Krone auf einem
Zirkonoxidkeramikimplantat natürlich, blasrosane
Gingivafarbe

Zirkonoxidkeramik steht demgegenüber als vollkeramisches Implantatmaterial zur Verfügung und wird insbesondere im ästhetisch interessanten Bereich verwendet [74], da ein weißes Implantatmaterial der natürlichen Zahnwurzel näher kommt als das dunkle Titan.

Desweiteren zeigen Patienten zunehmend mehr Interesse an metallfreien Werkstoffen, da die allgemeine Abneigung gegenüber Metallen steigt; außerdem ist ein vermeintlich vermehrtes Auftreten von allergischen Reaktionen feststellbar [51, 58, 87]. Neben Aluminiumoxid (Al_2O_3) beschäftigt sich die Implantatmaterialforschung heutzutage vorwiegend mit Zirkonium(dioxyd) (ZrO_2) [51]. Bedacht werden muss hierbei u.a. die mögliche Verunreinigung des Rohstoffs durch Hafnium sowie mit Lanthanoiden und auch mit radioaktiven Actinoiden wie z.B. Thorium oder Uran. Diese mögliche Radioaktivität von Zirkonoxidimplantaten wurde bereits 1991 von Fischer-Brandies et al. diskutiert [27]. Festgestellt wurde, dass die alpha-Emissionen verschiedener Zirkonoxidproben unterschiedlich waren. Ebenso lag die alpha-Emission von verwendetem Zirkonoxid im messbaren Bereich, wurde jedoch als vernachlässigbar eingestuft [66].

Außerdem ist die Befestigung des Abutments auf dem Keramikimplantat nicht ohne Risiken. Eine große Gefahr ist das Auftreten von Kerbspannungen, insbesondere im Bereich des Gewindes, wenn das Abutment auf dem Implantat verschraubt wird. Die Verklebung der Implantate mit den Abutments ist derzeit noch nicht durch Langzeitstudien belegt und kann daher noch nicht abschließend beurteilt werden. Wenn eine Verklebung der Sekundärteile auf den Keramikimplantaten gewählt wird, ist neben der Biokompatibilität der Keramik auch die Biokompatibilität des verwendeten Adhäsives von Bedeutung.

Titan wurde schon 1951 als künstliches Material zum Knochenersatz beschrieben [52] und wird seit vielen Jahrzehnten erfolgreich für enorme Dentalimplantate verwendet [31]. Titan bildet aufgrund seiner Reaktivität eine Oxidschicht an der Oberfläche aus, die mit einer Dicke bis zu 200 nm [85] als sehr resistent gilt und sich bei Verletzung wieder regeneriert. Die Oxidschicht besteht aus verschiedenen Bestandteilen wie TiO_2 , TiO , Ti_2O_3 , von welchen TiO_2 den größten Anteil ausmacht. Die Oxidschicht schützt das Implantat weitgehend vor abtragender Korrosion. Das als biokompatibel geltende Titan stellt sich jedoch durch neue Untersuchungen zunehmend als reaktiv dar. Erste Anzeichen von Allergien [88] und erhöhten Titankonzentrationen im Serum und in Organen lassen an seiner Biokompatibilität Zweifel aufkommen [72]. Keramik hingegen gilt als bioinertes Material [95]. Kritisch ist jedoch zu betrachten, dass der Langzeiterfolg von Implantaten nicht nur von der Osseointegration direkt nach der Implantation, sondern auch von der langfristigen Stabilität der Werkstoffe abhängt. Diesbezüglich ist Titan als Implantatmaterial aufgrund der vorhandenen Langzeitstudien im Vorteil. Zuvor hat sich bei vollkeramischen Implantaten aus Aluminiumoxid eine positive Osseointegration dargestellt, welche aber aufgrund der fehlenden Stabilität des Werkstoffes, nach negativen Ergebnissen aus Langzeitstudien, nicht zum langfristigen Einsatz des Materials führte.

1.2 Osseointegration

Osseointegration ist das unbestrittene Ziel der Implantation und ist eine „direkte strukturelle und funktionelle Verbindung zwischen organisiertem, lebendem Knochen und der Oberfläche eines belasteten Implantates“ [10, 11]. Von der Biokompatibilität [34] des Implantatmaterials, einem infektionsfreien Implantatbett [15], sowie der makro- und mikroskopischen Struktur [97] des Implantates ist der Heilungserfolg neben diversen anderen Faktoren abhängig. Bereits die Implantatinserterion führt im umliegenden Knochenlager zu intensiven Umbauvorgängen (bone remodelling) und Zellstoffwechselaktivitäten am Implantat-Knochen-Grenzbereich (Interface), die bei positivem Verlauf zur erfolgreichen Einheilung (Osseointegration) führt [63]. Die Knochenumbauvorgänge im Bereich der Implantatregion erinnern an die Wundheilung und die primäre Knochenheilung [57, 86]. Der primäre Schritt, die Angiogenese, wird nach der Hämostase mit Bildung eines Fibringerinnsels durch die Fibrinolyse unterstützt. Die Angiogenese geht einer Rekrutierung von Osteoblasten aus Knochenmarksstammzellen voraus. Aktivierte Mesenchymzellen aus umliegendem Bindegewebe sind ebenfalls an diesem Umbauprozess beteiligt [19]. Mediator induzierte Entzündungsreaktionen, u.a. durch Interleukine oder Chemokine, haben Einfluss auf die Knochenheilung [94]. Kollagenhaltige Matrix wird von differenzierten Osteoblasten nach deren Rekrutierung und Proliferation [57] gebildet. Die Implantatinserterion als chirurgischer Eingriff wird als Reiz zur Rekrutierung von Osteoblasten angesehen. Die organische Schicht zwischen der mineralisierten Knochenmatrix und dem alloplastischen Material wird als Interface bezeichnet [3]. Am Knochen-Implantat-Interface wird zunächst ein unverkalkter, fibrinhaltiger Osteoidsaum gefunden, der durch Mineralisationsvorgänge in Geflechtknochen umgewandelt wird. Anschließend erfolgt durch Osteoklasten- und Osteoblastenaktivität ein Umbau in Lamellenknochen, und es schließt sich ein zeitlebens anhaltender Prozess von Knochenumbauvorgängen an. Wichtige physiologische Mediatoren der Osseogenese sind eine Reihe von Wachstumsfaktoren wie u.a. Bone morphogenetic protein (BMP), Platelet derived growth factor (PDGF), Insulin like growth factor (IGF1 und IGF2) und Transforming growth factor (TGF β) [5, 55].

Exogene Pyrogene, wie LPS, sind potente Mediatoren [22] der bakteriellen mediatorgesteuerten Knochendestruktionskaskade [45, 67], welche, z.B. durch Periimplantitis, einen Implantatverlust hervorrufen können. Implantathersteller sind daher stets bemüht, die Produktion unter hochreinen Bedingungen zu gewährleisten und nach der Fertigstellung die Implantate zu sterilisieren. Eine Störung dieser physiologischen Prozesse, und damit ein negativer Verlauf der Osseointegration, kann zum Verlust des Implantates führen [89]. Derartige Implantatverluste können durch Entzündung oder bindegewebige Einheilung, das heißt fehlende Osseointegration, hervorgerufen werden. In der Frühphase

der osseointegrativen Stoffwechselaktivität muss daher eine Verunreinigung der Implantatoberfläche mit z.B. endogenen oder exogenen Pyrogenen ausgeschlossen werden, um eine Entzündungsgefahr zu minimieren. Weitere Präventivmaßnahmen umfassen eine mögliche präoperative Antibiotikagabe eine Stunde vor der Implantation [26].

1.3 Periimplantitis und Pyrogene

Eine der großen Gefahren in der dentalen Implantologie ist die periimplantäre Infektion, welche in die Mukositis und die Periimplantitis unterschieden wird. Die Mukositis stellt eine entzündliche Veränderung des periimplantären Weichgewebes dar, die ohne Knochenbeteiligung ist und reversibel verlaufen kann. Zur Periimplantitis kann es sowohl in der Einheilphase der Implantate, als auch nach der prothetischen Versorgung kommen [25]. Bei der Periimplantitis handelt es sich um einen Entzündungsprozess des Gewebes, das um das Implantat herum liegt, bei dem das knöcherne Implantatlager mit betroffen ist. Das entzündete Gewebe bewirkt lokal einen Knochenabbau mit letztlich folgendem Verlust des Implantates [93, 98]. Zur Verringerung der Periimplantitisgefahr nach der Insertion eines Implantates wird die geschlossene, submuköse Einheilung von drei bis vier Monaten bevorzugt. Außerdem werden prächirurgische Vorsichtsmaßnahmen unternommen, um bakterielle Verunreinigungen zu minimieren, wie z.B. die Reduktion der Keimbelastung in der Mundhöhle durch 0,2%ige Chlorhexidinspülung für 30 sec und insgesamt steriles Arbeiten des Operateurs [30]. Um eine Verunreinigung der Implantate bei der Implantation zu vermeiden, werden die verwendeten Operationsinstrumente zuvor im Autoklaven bei 134°C für 3 min sterilisiert. Jedoch wird keine sterile, sondern nur keimreduzierte Arbeitsweise in der keimbesiedelten Mundhöhle erreicht. Trotzdem müssen die verwendeten Materialien steril aufbereitet werden, um keine Infektion hervorzurufen.

Infektionen können u.a. durch Bakterien oder auch Pyrogene hervorgerufen werden. Pyrogene sind hitzebeständige, fiebererregende Stoffe mikrobieller Herkunft, welche 1875 von Burdon Sanderson erstmals beschrieben wurden und, wie in Janeways Immunobiology beschrieben, in endogene und exogene Pyrogene unterteilt. Zu den endogenen Pyrogenen zählen die Stoffe, die der Körper selbst produziert, wie etwa Interleukine. Exogene Pyrogene sind molekulare Verbindungen biologischen oder organischen Ursprungs, wie unter anderem Oligo-, Poly- und Lipopolysaccharide (LPS), gramnegativer Bakterien oder auch chemische Materialien wie z.B. Gummiabrieb. Exogene Pyrogene wie zum Beispiel LPS sind potente Mediatoren [22] der bakteriellen mediatorgesteuerten Knochendestruktionskaskade [45, 67]. Substanzen dieser Stoffklassen können eine indirekte pyrogene Reaktion durch die Aktivierung von Makrophagen hervorrufen. Endogene Pyrogene wie z.B. Interleukine werden

durch Aktivierung von z.B. exogenen Pyrogenen vom Körper selbst gebildet. Interleukine greifen im Hypothalamus in die Temperaturregulation des Körpers ein [17]. Um eine solche Fieberreaktion des Körpers nicht hervorzurufen, sollte man die Verwendung von pyrogenkontaminierten Materialien vermeiden. Zum Nachweis von Pyrogenen können der Kaninchentest, der Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) oder molekularbiologische Methoden angewendet werden [23, 40]. Die Nachteile der beiden erstgenannten Methoden können wie folgt zusammengefasst werden: Zum einen können mit diesen beiden Verfahren nur qualitative Positiv- oder Negativ-Antworten zum Vorhandensein von Pyrogenen gemacht werden, zum anderen handelt es sich bei dem Kaninchentest um ein Verfahren, bei dem die Körpertemperatur des Versuchstieres gemessen wird. Diese steigt in der Gegenwart von Pyrogenen an. Da jedoch jedes Tier individuell reagiert und nicht direkt mit dem Menschen vergleichbar ist, sind die Messergebnisse nicht problemlos übertragbar. Außerdem ist die mangelnde Sensitivität negativ zu bewerten.

Das Testverfahren des LAL-Tests beruht auf der Koagulation der Hämolymphe des Pfeilschwanzkrebsblutes und zeigt das Vorhandensein von Endotoxinen gramnegativer Bakterien an [21, 53]. Einem Pfeilschwanzkrebs kann mehrmals Hämolymphe entnommen werden, wodurch auch mehrere Tests pro Tier durchgeführt werden können. Es bleibt jedoch ein Tierversuch, der nicht in der Lage ist, dasselbe inflammatorische Potential von z.B. LPS anzuzeigen, welches im Menschen vorhanden wäre.

Neuere molekularbiologische Methoden wie z.B. die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) (siehe Kapitel 1.6) ermöglichen es, auf Nukleinsäurebasis mittels Genexpressionsanalyse die Folgen einer Pyrogenkontamination zu detektieren und so einzelne Bestandteile einer von Pyrogenen aktivierten Signaltransduktionskaskade zu analysieren. Dies hat den Vorteil, nicht nur einen Nachweis für das Vorhandensein von Pyrogenen zu erbringen, sondern es können außerdem quantitative Aussagen über die Intensität der, durch die vorhandenen Pyrogene eingeleiteten, humanen Immunreaktion und der an ihr beteiligten Effektoren gemacht werden.

1.4 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Körper vor Infektionen, welche durch Pathogene (körperfremde Stoffe) hervorgerufen werden können. Das Immunsystem der höheren Vertebraten wird in zwei Bereiche unterteilt. Die unspezifische, angeborene Immunität und die spezifische, adaptive Immunität, welche wiederum in die zelluläre- und die humorale Abwehr unterteilt wird [60]. Die spezifische Immunabwehr, welche in Abbildung 2 schematisch dargestellt wird, entstand vor etwa 450 Millionen Jahren und erlaubt die Wiedererkennung pathogener Stoffe bei erneuter Infektion. Die entwicklungsgeschichtlich

ältere, angeborene Immunabwehr, welche in allen mehrzelligen Organismen vorhanden ist, blieb darüber hinaus erhalten und nutzt zur Erkennung von fremden Stoffen keimbahnkodierte Rezeptoren [38]. Diese „pattern recognition receptors“ (PRRs) erkennen pathogenassoziierte Muster. Zu diesen gehören z.B. LPS, welches von sogenannten Toll-Like-Rezeptoren (TLRs) erkannt wird [8, 47, 49]. Nachdem der erste Schutz, die Epithelbarriere, überwunden ist, werden Pathogene sofort von Phagozyten erkannt. Das angeborene Immunsystem kann u.a. mit Hilfe von Makrophagen/Monozyten und dendritischen Zellen die Pathogene erkennen und zu deren Vernichtung u.a. neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen aktivieren [2]. Reicht diese Reaktion zur Bekämpfung nicht aus, werden inflammatorische Mediatoren und Zytokine von Immunzellen sezerniert, welche damit die weitere angeborene und spezifische Immunantwort steuern [41, 82]. Die Rezeptoren der unspezifischen Immunabwehr werden auf antigenpräsentierenden Zellen wie u.a. Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert [42, 61]. Diese Rezeptoren sind von einheitlicher Spezifität - also unspezifisch. Werden fremde Stoffe von diesen neu gebildeten Rezeptoren erkannt, wird die Produktion dieser Rezeptoren gesteigert, außerdem werden erfolgreiche Rezeptoren durch die Umwandlung von B-Zellen zu Gedächtniszellen langfristig gespeichert. So können eine Vielzahl von Zellen Pathogene erkennen und sofort eine Immunantwort hervorrufen, ohne vorher proliferieren zu müssen [62]. Die adaptive Immunabwehr produziert mit Hilfe der T- und B-Lymphozyten stetig neue Rezeptoren. Jede ungeprägte T- und B-Zelle trägt nur einen einzigen spezifischen Rezeptortyp an ihrer Oberfläche. Während der Entwicklung und Reifung im Knochenmark und Thymus wird die Spezifität der Rezeptoren durch einen einzigartigen genetischen Mechanismus erreicht [41, 82]. Durch eine sehr große Gesamtpopulation wird eine nahezu unbegrenzte Anzahl an Antigenrezeptoren bereit gestellt [41, 82]. Anschließend beginnt die Verständigung zwischen den Abwehrzellen mit weiteren Botenstoffen, u.a. den Interleukinen. In der folgenden Grafik wird dieser komplexe Abwehrprozess des spezifischen Immunsystems dargestellt. LPS z.B. induziert eine große Bandbreite von Wirtsreaktionen, welche insbesondere über Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktoren (TNF) zu einer Wechselwirkung mit dem Hypothalamus führt und eine Fieberreaktion zur Folge hat. TNF- α ist multifunktionell und kann sowohl zur Aktivierung von inflammatorischen Parametern als auch zur Induktion von Apoptose führen [54, 56]. Aktiviert wird die Genexpression unter anderem von LPS. Außerdem werden von Toll-Like-Rezeptoren wie z.B. TLR-4 und bei einigen Menschen auch TLR-9 [24], Lipopolysaccharide erkannt, die eine pro-inflammatorische Immunantwort hervorrufen können [7]. Sowohl TLR-4 als auch TLR-9 führen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B [41]. Im Verlauf der Immunreaktion kommt es nach der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B zur erhöhten

Produktion verschiedener Cytokine u.a. IL-1 β [16, 48]. Es konnte gezeigt werden, dass Titan zu einer erhöhten Genexpression von IL-8 führte [28, 77]. Auch von LPS umhüllte Titanpartikel können eine Immunreaktion auslösen [37].

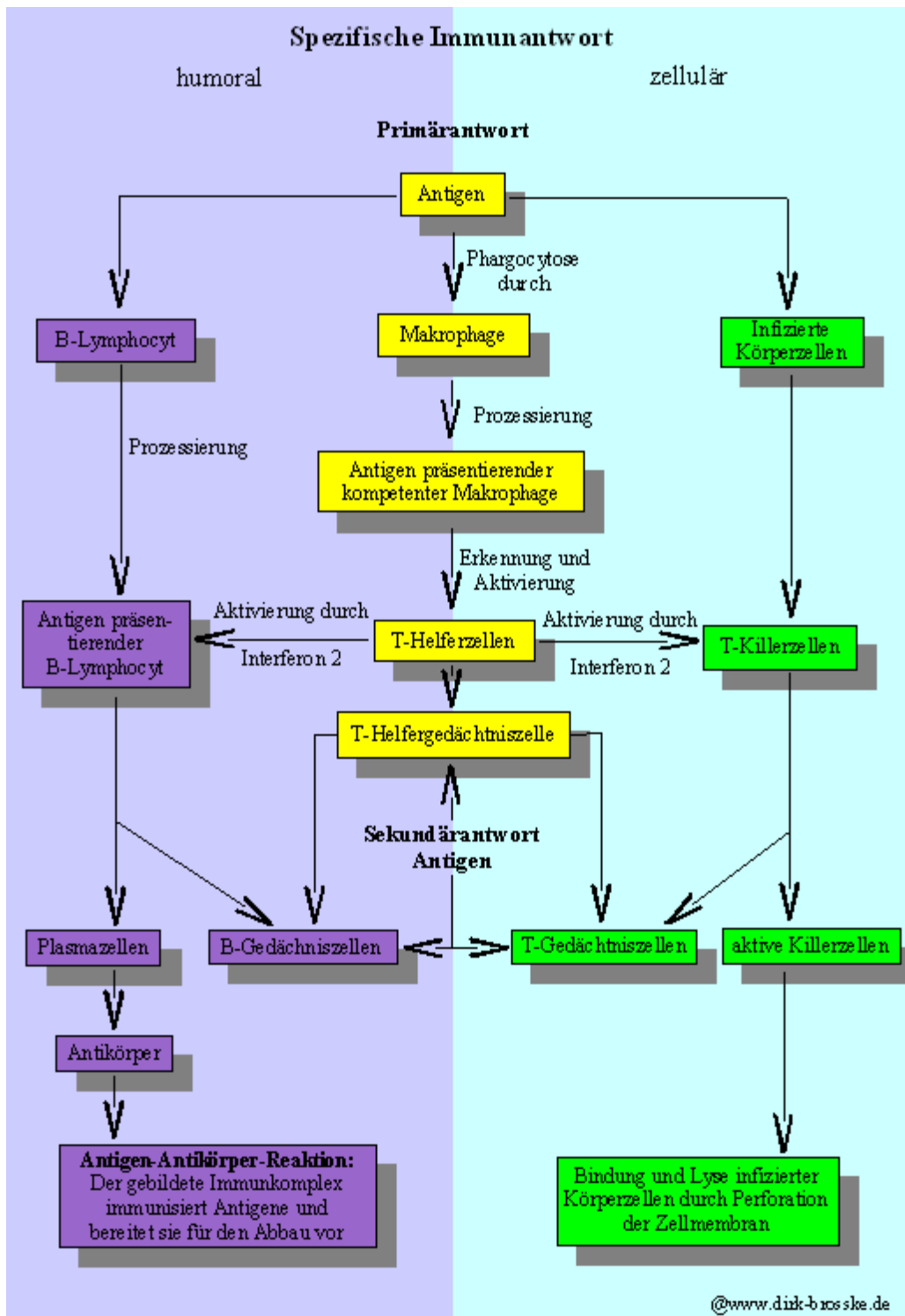


Abb. 2 Darstellung der spezifischen Immunantwort, die in den humoralen und zellulären Anteil aufgeteilt wird. Die Primärantwort geht vom Antigen aus, welches Antikörper generiert (Abbildung aus www.dirk-brosske.de).

1.5 Einfluss von Implantaten auf das Immunsystem

Frühere Studien haben gezeigt, dass dentale Implantate Immunreaktionen in humanem Blut hervorrufen können [70, 76]. Es zeigte sich, dass die Konzentration an Zytokinen, die an der Immunabwehr beteiligt sind, im Sulkusbereich von Implantaten höher ist als im Bereich von Zähnen [71]. Desweiteren ist bekannt, dass Implantatoberflächen im Laufe der letzten Jahre durch verschiedene Herstellungsverfahren modifiziert wurden, um eine zuverlässige Osseointegration zu erzielen [50], welche notwendig ist, um das Ziel der dentalen Implantologie, den prothetischen Zahnersatz, zu erreichen. Die Implantation, als chirurgischer Eingriff, wird zusammen mit dem Implantat als ein auslösender Reiz für die Rekrutierung von Osteoblasten gesehen. Daraufhin schütten aktivierte Mesenchymzellen aus der Umgebung des Implantates Mediatoren aus, die an der Immunantwort beteiligt sind [94]. Der komplexe Heilungsprozess beginnt mit der Hämostase und wird bis hin zur vollständigen Osseointegration durch Interleukine und andere Botenstoffe gesteuert [5, 55, 57, 73, 86]. Um eine mögliche Pyrogenbelastung von Materialien zu untersuchen, kann ein In-vitro-Pyrogentest durchgeführt werden [59]. Dieser ist in der Lage einen Anstieg von IL-1 β , durch eine Pyrogenbelastung von dentalen Titanimplantaten, nachzuweisen [76]. Arbeiten, die eine mögliche Pyrogenbelastung von Keramikimplantaten nachweisen, stehen noch aus. Durch die Analyse der Genexpression, mittels der Polymerase-Kettenreaktion von TNF- α und von FADD, welche Bestandteile der Signaltransduktionskaskade sind, ist es möglich eine Proinflammation von einer Apoptose zu unterscheiden [56]. Es können so, im Gegensatz zu der Endpunktbetrachtung des In-vitro-Pyrogentests, einzelne Teile der Signaltransduktionskaskade bestimmt werden und ein zeitlicher Verlauf untersucht werden. Interessant ist nun, ob ein unterschiedlicher Einfluss, von der Titanoberfläche im Vergleich zu der Zirkonoxidoberfläche, auf das Immunsystem besteht. Implantate verbleiben nach der Insertion im Körper und könnten einen dauerhaften Einfluss auf das Immunsystem haben. Interleukin-8 (IL-8) gehört zu den Chemokinen und wird unter anderem von stimulierten Osteoblasten gebildet und sezerniert. Diese werden entweder von mikroskopisch kleinem Abrieb oder auch von TNF- α , sowie von IL-1 β stimuliert [33]. IL-1 β wiederum wird zuverlässig nach LPS-Einfluss sezerniert [6], was Beitland et al. jedoch nicht für IL-8 feststellten. Es konnte allerdings 2010 von Johnson et al. ein Anstieg der IL-8-Konzentration gingivaler Keratinozyten nach Inkubation mit LPS festgestellt werden [46]. Prothetische Partikel, die bei der Implantatinsertion von Endoprothesen in den Organismus gelangen, können lokalisiert Immunzellen im implantatumgebenden Knochen aktivieren und einen Anstieg der IL-8 Konzentration hervorrufen [29]. Diese abgescherten Implantatpartikel

werden über körpereigene Zellen und Flüssigkeiten im Organismus verbreitet. Ein Anstieg der Titankonzentration im Organismus mit Einlagerung in den Organen könnte zu einer Funktionsschädigung dieser führen [84].

1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und ihr Prinzip

Die quantitative PCR (qPCR) ist eine Weiterentwicklung der von Mullis 1984 beschriebenen PCR [20]. Es handelt sich um eine schnelle und einfache Methode zur Vervielfältigung spezifischer Ausgangs-DNA durch Denaturierung der Doppelstrang-DNA, und anschließender Amplifikation mittels sequenzspezifischen Primern in Gegenwart einer hitzestabilen Polymerase. Die Polymerase-Kettenreaktion besteht aus drei Teilschritten, die sich wiederholen und startet mit der Denaturierung der DNA bei etwa 95°C. Es folgt eine primerabhängige Abkühlung bis zur sogenannten Annealingtemperatur, bei der sich der Primer an einer bestimmten Nukleotidsequenz des Einzelstranges anlagert. Nun erfolgt die Extension an den Primern mit der Polymerase als letzter Schritt bei 72°C. Die Polymerase lagert die im Reaktionsgemisch vorhandenen Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs: dA(denosin), dG(uanin), dC(ytosin) und dT(hymidin)) komplementär zum Ausgangsstrang an. Aus dieser Kopie werden nach (n) Zyklen im Idealfall (n) Verlängerungsprodukte, welche exponentiell viele Endprodukte ergeben [39]. Bei der qPCR, wie sie hier durchgeführt wurde, wird zusätzlich ein Cyanin-Farbstoff (SYBR-Green) verwendet. Dieser bindet an doppelsträngige DNA und bildet mit ihr einen DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex, der blaues Licht der Wellenlänge $\lambda_{\max}=494$ nm absorbiert und grünes Licht der Wellenlänge $\lambda_{\max}=521$ nm emittiert. Eine foto-optische Messung und damit eine Quantifizierung, der mit SYBR-Green beladenen Endprodukte, findet am Ende jeder Elongationsphase statt. Nach abgeschlossener PCR erfolgt die Schmelzkurvenanalyse des entstandenen Endproduktes. Hierbei wird unter stetiger Temperaturerhöhung die Fluoreszenz des DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplexes gemessen und ermittelt, wann die doppelsträngige DNA denaturiert und damit der Komplex zerbricht. Diese Analyse gibt Aufschluss über die Qualität der Endprodukte. Bei fälschlicherweise entstandenen Primer-Dimeren oder anderen falschen Endprodukten, wie z.B. unspezifischen PCR-Produkten, würden aufgrund der unterschiedlichen Schmelztemperaturen der einzelnen Produkte mehrere Absorptionsmaxima auftreten [79]. Oberhalb der Annealingtemperatur kommt es nicht zu einer Anlagerung von Primern an den DNA-Strang, und eine erfolgreiche PCR findet nicht statt [75, 83]. Unterhalb der Annealingtemperatur lagern sich die Primer nicht spezifisch und vollständig an die einzelsträngige DNA an. So erzeugt die Polymerase unterschiedliche Produkte, welche durch die abschließende Schmelzkurvenanalyse in Form von mehreren Absorptionsmaxima detektiert werden können.

1.7 Kurzbeschreibung von Primern und ihrer Funktionen

Primer sind DNA-Oligonukleotide, die als Startsequenz der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dienen und eine Länge von 18-24 Nukleotiden haben sollten [41]. Außerdem sollten sie keine Sekundärstrukturen sowie Homodimere bilden. Die besten Eigenschaften haben sie, wenn der Gehalt an Adenin/Thymidin zu Guanin/Cytosin ausgeglichen ist und sich am 3'Ende 2 besser 3 Guanin- oder Cytosin-Basen befinden. Aus der Zusammensetzung der Primer lässt sich die Schmelztemperatur u.a. mit Hilfe der Wallace-Regel [96] errechnen. Dazu werden für jedes Guanin/Cytosin Basenpaar 4 und für jedes Adenin/Thymidin Basenpaar 2 zusammengezählt. Die unterschiedliche Enthalpie, die durch die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen, sowie durch den Einfluss der van-der-Waals-Wechselwirkungen bei den Basenpaaren zustande kommt, ist die Grundlage dieser Berechnung. Von der Summe wird 5 subtrahiert und man erhält eine erste Näherung der Anlagerungstemperatur (Annealingtemperatur) in Grad Celsius, die kurz unter der Schmelztemperatur liegt [96]. Weitere Methoden zur Bestimmung der Annealingtemperatur sind z.B. die „nearest neighbour“ Methode, bei der nicht nur die Bindungsenergie der Basenpaare betrachtet wird, sondern auch noch die Interaktion mit dem vorgelagerten Basenpaar [12]. Um eine möglichst hohe Spezifität der produzierten Endprodukte zu erreichen, wird eine Annealingtemperatur nahe der theoretischen Annealingtemperatur gewählt. Bei einer Annealingtemperatur, die etwa 3°C unter der errechneten Temperatur liegt, ist die Spezifität meist groß genug. Oberhalb der Annealingtemperatur würde es nicht zu einer Anlagerung von Primern an den DNA-Strang kommen und eine erfolgreiche PCR würde nicht stattfinden [75, 83].

Die Hersteller von Primern haben oft ihre eigenen firmeninternen Algorithmen zur Errechnung der Annealingtemperaturen entwickelt, die auf den oben beschriebenen Methoden beruhen. Diese Herstellerangaben finden im Laboralltag meist Verwendung.

1.8 Zielsetzung

Wie in der Einleitung dargestellt ist eine pyrogenfreie Oberfläche dentaler Implantate aus Titan und Zirkonoxidkeramik von entscheidender Bedeutung für einen infektionslosen Einheilungsprozess. Es liegen bislang nur wenige Daten über die Pyrogenfreiheit der Implantatoberflächen vor. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher eine mögliche Pyrogenbelastung auf der Oberfläche dentaler Implantate aus Titan und Zirkonoxidkeramik zu untersuchen. Ein weiteres Ziel war es einen möglichen Unterschied zwischen Titan- und Zirkonoxidkeramikimplantaten im Bezug auf die Immunreaktion zu untersuchen. Sowie die Untersuchung, ob durch Depyrogenisierung der Implantate mittels trockener Hitze eine Immunantwort moduliert werden kann.

Ein weitere nachzugehende Frage dieser Arbeit war es, in wieweit die hier verwendeten dentalen Implantate, zu einer Freisetzung von IL-8 führen, und ob eine derartige IL-8 Stimulation durch IL-1 β oder den IL-8 Rezeptor moduliert wird.

2 Material und Methoden

2.1 Probekörper

Als Probekörper dienten 5 Titanimplantate mit gestrahlten-geätzten Oberflächen (Camlog SCREW-LINE Implantate Promote plus mit 11 mm Länge, 4,3 mm Durchmesser, Camlog Biotechnologies CH-Basel) und 5 Zirkonoxidkeramikimplantate mit gestrahlten Oberflächen (white-SKY Implantate mit 10 mm Länge, 4,0 mm Durchmesser, bredent medical GmbH, D-Senden). Titan- und Keramikimplantate wurden parallel zu Positiv- und Negativkontrollen in humanem Vollblut inkubiert und die wesentlichen Modulatoren einer pyrogeninduzierten Immunreaktion mittels qPCR analysiert.

2.2 Vorbereitung der Instrumente und Materialien

Alle zuvor nicht pyrogenfreien Arbeitsmaterialien wurden bei 250°C in trockener Hitze für 30 min depyrogenisiert.

2.3 Spenderblut und Blutentnahmen

Unmittelbar nach der Blutentnahme von einem gesunden männlichen, kaukasischen Spender mit einem Butterfly BD Valu-Set über einen Multi-Adapter (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) in EDTA-Röhrchen (Sarstedt, D-Nümbrecht) wurde das Blut bis zur Inkubation auf Eis gekühlt.

2.4 Kontrollgruppen

Als Positivkontrolle wurde EDTA-Blut mit 20 ng/ml LPS (*Salmonella enterica* Serotyp Minnesota Gamma; Th. Geyer, D-Hamburg) stimuliert, als Negativkontrolle diente unstimuliertes EDTA-Blut.

2.5 Probenvorbereitung und Inkubation der Implantate

Es wurde auf einem Labortisch mit Laminair-Flow-Klimatechnik (Heraeus Laminair HB 2448 K, Heraeus, D-Hanau) gearbeitet. Je 2 ml EDTA-Blut wurde mit fabrikneuen Implantaten einzeln in den pyrogenfreien 14 ml Falcon Reaktionsgefäßen (Becton Dickinson, F-Meylan) inkubiert. Die Inkubation fand in einem Water-Jacketed-Incubator (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung statt. Die Proben wurden mit 50 Umdrehungen pro Minute auf einem Mini-Taumel-Wipptisch (WT 17, Biometra, D-Göttingen) in Bewegung gehalten, um eine Phasentrennung des Blutes in zelluläre Bestandteile und Plasma zu vermeiden. Nach 24 Stunden wurden dreimal 200µl Blut mit je 800µl PRISure (Promolgene, D-Berlin,) gemischt und bei -80°C bis zur weiteren RNA-Extraktion eingefroren. Anschließend wurden die Implantate mit 0,9%iger NaCl-Lösung für fünf Minuten

im Ultraschallbad gereinigt, erneut mit 0,9%iger NaCl-Lösung abgespült und in Duranglasschalen verwahrt.

2.6 Depyrogenisierung der Implantate und Instrumente

Für den zweiten Teil der Untersuchung wurden die verwendeten Instrumente sowie die Implantate in den Duranglasschalen bei 250°C trockener Hitze für 30 min depyrogenisiert [68]. Die Depyrogenisierung sollte auf die Stabilität der Zirkonoxidkeramik und des Titans keinen nennenswerten Einfluss haben, da diese Materialien in der Kronen- und Brückenprothetik z.T. schon seit Jahrzehnten mit Verblendkeramiken versehen werden, die bei weit höheren Temperaturen (mind. 600°C) aufgebrannt werden [90].

2.7 Versuchsablauf nach Depyrogenisierung

Demselben Spender wurde wie unter 2.3 beschrieben erneut Blut abgenommen und die depyrogenisierten Implantate sowie die Positiv- und Negativkontrollen wie unter 2.4 und 2.5 beschrieben inkubiert.

2.8 Versuchserweiterung mit neuen Implantaten

Die Analyse der 24-h-Messwerte zeigte, dass zwischen den Proben und den Kontrollgruppen nur geringe Differenzen lagen, welche durch das abgeschlossene System zu erklären waren und es daher erforderlich war, weitere Zeitpunkte, nämlich 1 h und 8 h Inkubationszeit, in die Untersuchung aufzunehmen.

Die Studie wurde daraufhin mit fünf weiteren fabrikneuen Titanimplantaten und fünf weiteren Zirkonoxidkeramikimplantaten sowie Blut desselben Spenders wiederholt. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie unter 2.2 bis 2.5 beschrieben, mit der Ausnahme, dass nach 1 h Inkubationszeit von jeder Probe 2x200 µl Blut für die RNA-Isolation entnommen wurde. Das verbleibende Blut, welches die Implantate noch immer bedeckte, wurde für weitere 7 h inkubiert. Dann wurden erneut 2x200 µl Blut für die RNA-Isolation entnommen und der Versuch beendet.

2.9 RNA-Extraktion

Zur RNA-Extraktion wurden die Blut/PRIsure-Proben aufgetaut. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und einminütigem Durchmischen wurden die Proben 3 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417 R; Eppendorf, D-Hamburg; 4°C, 12000 G, 15 min). Der wässrige Überstand (450 µl) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit Isopropanol (Merck, D-Darmstadt; 450 µl) gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde 1 µl Glycogen (1 mg/ml) hinzupipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die

Proben erneut zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417 R; Eppendorf; 4°C, 12000 G, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene Präzipitat mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen. Hierzu wurden die Präzipitate in Ethanol aufgeschüttelt (Vortex Genie 2, Bender & Hobein AG, CH-Zürich), 5 min bei 7500 G und 4°C zentrifugiert und der Ethanol verworfen. Erneut wurde 1 ml 75%iger Ethanol hinzupipettiert, aufgeschüttelt und zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die geöffneten Reaktionsgefäße für 15 min unter einen Abzug gestellt, um die Restfeuchtigkeit entweichen zu lassen. Das resultierende Präzipitat wurde in 20 µl Diethylpyrocarbonat(DEPC)-Wasser (Promolgene, D-Berlin) gelöst und für 2 min in einem Thermomixer (Thermomixer 5436, Eppendorf, D-Hamburg) bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gekühlt und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

2.10 Bestimmung der optischen Dichte (Konzentrationsbestimmung der RNA)

Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte mit einem Spektrophotometer (Nano-Drop 1000, Peq-Lab, D-Erlangen). Zur Kalibrierung des Nano-Drop wurde die Elektrode mit DEPC-Wasser gereinigt und geeicht. Zur Bestimmung der optischen Dichte wurden 2 µl jeder Probe gemessen. Zwischen jeder Probenbestimmung wurde die Elektrode erneut mit DEPC-Wasser gereinigt und anschließend getrocknet.

2.11 RNA-Qualitätskontrolle

Zur Qualitätskontrolle wurden 2 µl RNA (100 ng/µl) mit 2 µl R6K-Puffer (PeqLab) gemischt, zentrifugiert und 3 min bei 72°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gestellt. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte vollautomatisch in der TapeStation-Elektrophorese (Lab 901, PeqLab). Die RNA-Qualität wurde mittels der integrierten Software (Screentape Software, PeqLab) berechnet, wobei die Relation zwischen 28S und 18S RNA zugrunde gelegt wurde, jedoch auch der Anteil an fragmentierter RNA berücksichtigt wurde. Die Screentape Software berechnete nach Beendigung der Elektrophorese die sogenannte Screentape Disintegration Variable (SDV). SDV-Werte unterhalb von 10 deuten laut Hersteller auf RNA von guter bis sehr guter Qualität hin, wohin gegen SDV-Werte von 10-25 auf RNA akzeptabler Qualität hinweisen und SDV-Werte oberhalb von 25 auf sehr stark degradierte bzw. inakzeptable RNA hinweisen.

2.12 cDNA-Synthese (reverse Transkription)

Für die c-DNA-Synthese wurden im ersten Schritt pro Probe dreimal je 0,2 µg RNA und je 1 µl Oligo dT 12V Primer (10 µM) gemischt und mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl ergänzt. Der Primer hybridisiert am poly-a-Schwanz der RNA. Die Proben wurden 5 min bei 65°C zur Primeranlagerung inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Für

die reverse Transkription wurde zunächst ein Mastermix aus je 1 µl dNTPs (jeweils 2,5 mM), 4 µl Reaktionspuffer, 0,25 µl Reversetranskriptase (200 u/µl) und 2,75 µl DEPC-Wasser hergestellt (cDNA-Synthesekit, Promolgene, D-Berlin). Je 8 µl des Mastermixes wurden mit den 12 µl der Primeranlagerungsreaktion gemischt und in einem Thermoblock (Thermocycler, BIOMETRA, Göttingen-D) wie folgt inkubiert: (60 min, 37°C; 10 min, 72°C); anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt. Die bis hierher erstellten Triplets pro Probe wurden nun vereinigt und mittels des PCR-Extrakt II-Kits (Macherey&Nagel, D-Düren) gereinigt, um überschüssige dNTPs und Primer zu entfernen. Zu diesem Zweck wurde jede Probe mit jeweils 240 µl NT Puffer gemischt, auf eine Säule pipettiert und 1 min bei 11000 G zentrifugiert. Das resultierende Eluat wurde verworfen. Anschließend wurden 600 µl NT3-Puffer auf die Säulen pipettiert und die Proben erneut 1 min bei 11000 G zentrifugiert und das Eluat ebenfalls verworfen. Um die Restfeuchtigkeit zu minimieren, wurde erneut für 2 min bei 11000 G zentrifugiert und die geöffneten Säulen für drei Minuten bei 70°C in einem Thermomixer (Thermomixer 5436, Eppendorf) inkubiert. Die Säulen wurden danach in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt, D-Nümbrecht) gestellt. Auf jede Säule wurden 60 µl NE Puffer pipettiert, 1 min bei RT inkubiert und für 1 min bei 11000 G zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben auf jeweils 150 µl mit NE Puffer gebracht und in 50 µl Aliquots bei -20°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

Tabelle 1: Darstellung der untersuchten Gene, ihrer Funktion und der Annealingtemperatur [43]. Anmerkung: Da es sich bei den verwendeten Primern um kommerziell erhältliche Primermixe handelt, können die Primersequenzen nicht angegeben werden.

Gen	Funktion	Annealingtemperatur
Haushaltsgene	Haushaltsgene werden unabhängig vom Zellzyklus und äußeren Einflüssen konstant exprimiert und nicht reguliert.	
β-actin	Kontrolle der Zellintegrität; beteiligt beim Proteinabbau, wurde als Haushaltsgen (nicht-reguliertes Gen) verwendet	60°C
18S RNA	Bestandteil der Eukaryoten-RNA, wurde als Haushaltsgen (nicht-reguliertes Gen) verwendet	60°C
β 2-microglobulin	β 2-microglobulin gehört zur MHC Klasse 1, wird auf jeder kernhaltigen Zelle	60°C

	exprimiert, wurde als Haushaltsgen (nicht-reguliertes Gen) verwendet	
Interleukine (IL)	Zytokine, deren Expression erstmals in weißen Blutkörperchen (Leukozyten) entdeckt wurde. Botenstoff zwischen Leukozyten und Makrophagen	
Interleukin-1 β (IL-1 β)	Produktion wird u.a. durch LPS oder andere endogene Pyrogene stimuliert; von Monozyten und Makrophagen produziert; fördert die Kapillarisierung und Heilung	62°C
Interleukin-8 (IL-8)	Chemotaktische Rekrutierung von Leukozyten; fördert die Kapillarisierung und Heilung	60°C
Interleukin-8 Rezeptor (IL-8R)	Rezeptor für Interleukin 8	60°C
Toll Like Rezeptoren (TLRs)	TLRs sind transmembrane Proteine, die PAMPs=pathogen associated molecular patterns erkennen. Induzieren die Produktion von Cytokinen und Chemokinen nach der Stimulation durch PAMPs.	
Toll Like Rezeptor 4 (TLR-4)	TLR-4 erkennt LPS gram-negativer Bakterien und spielt in der angeborenen Immunabwehr eine bedeutende Rolle	61°C
Toll Like Rezeptor 9 (TRL-9)	TLR-9 erkennt CpG Sequenzen aus Bakterien und Viren und kann mit LPS interagieren	60°C
Tumor Necrose Factor alpha (TNF- α)	TNF- α kann die Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Ausschüttung anderer Zytokine anregen;	60°C

	wird von Makrophagen und T-Zellen ausgeschüttet; wird durch LPS stimuliert	
Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NFkB)	NFkB verstärkt die Transkription der Immunzellen, wird z.B. über Signaltransduktionskaskaden durch TNF- α oder TLRs aktiviert	58°C
Fas-associated death domain protein (FADD)	FADD ist ein Adaptermolekül, das mit verschiedenen Zelloberflächenrezeptoren und Mediatoren der Apoptose wie z.B. TNF- α interagiert.	60°C

Es ist bekannt, dass LPS ein wesentlicher Bestandteil der Lipidmembran gram-negativer Bakterien ist und als Stimulans für die Immunreaktion in Pyrogentests Verwendung findet. LPS stimuliert die TLR-4 Genexpression und bei einigen Menschen anstelle der TLR-4 Genexpression die TLR-9 Genexpression. Um dies zu überprüfen, ob eine mögliche Pyrogenkontamination der Implantatoberfläche vorhanden war, wurde die TLR-4 Genexpression im Blut von einem gesunden, männlichen Spender nach der Inkubation mit Implantaten untersucht. Als Kontrolle diente Blut desselben Spenders, das mit LPS versetzt wurde. IL-1 β ist ein bekannter Indikator für eine Kontamination mit LPS. Deshalb wurde in dieser Studie auch die Genexpression von IL-1 β untersucht. TNF- α kann sowohl zur Aktivierung von inflammatorischen Parametern als auch zur Induktion von Apoptose führen. Um zu untersuchen, ob der beobachtete Anstieg von TNF- α zur Inflammation oder zur Apoptose führte, wurde als Indikator für die Apoptose die Genexpression von FADD gemessen. Zudem wurde in einem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Titanimplantaten sowie von Keramikimplantaten auf die IL-8 Genexpression untersucht.

2.13 Quantitative PCR (qPCR)

In dem PCR-Mastermix sind sowohl die Taq-Polymerase (aus *Thermophilus aquaticus*) als auch alle vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs: dA(denosin), dG(uanin), dC(ytosin) und dT(hymidin)) vorhanden. Für jede quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR) wurden jeweils 2,5 μ l cDNA (entspricht 10 ng totaler RNA) mit einem Mastermix aus 12,5 μ l 2xHotStartMix (Promolgene, D-Berlin), 1,0 μ l Primer Mix (Promolgene), 0,5 μ l SYBR-

Green (Promolgene), 8,5 µl DEPC Wasser (Promolgene) gemischt und wie folgt inkubiert: 10 min bei 95°C (initiale Denaturierung), gefolgt von 40 Zyklen mit jeweils 20 sec bei 95°C (Denaturierung), 20 sec Primeranlagerung (Temperatur siehe Tab. 1), 20 sec 72°C (Elongation). Dann folgte die abschließende Schmelzkurvenanalyse. Die Datengenerierung wurde in jedem Zyklus jeweils nach der Elongationsphase erhoben. Untersucht wurden die Parameter B2M, 18 s RNA, β -actin, TLR-4, TLR-9, NF κ B, IL-1 β , TNF- α , FADD, IL-8 und IL-8R.

2.14 Datenanalyse und statistische Auswertung

Für die Datenanalyse wurden die CT-Mittelwerte der 3 Housekeeping-Gene β -actin, 18S RNA und B2M als Referenzwerte verwendet. Unterschiede in der Genexpression der Zielgene (siehe Tab.1) wurden mittels der Δ CT-Methode nach Nolan et al. bestimmt [69]. Die statistische Analyse der resultierenden Δ CT-Werte wurde mit dem GraphPad InStat3 Programm durchgeführt. Es wurden einfaktorielle Varianzanalysen (1-way-ANOVAs) sowie Tukey Post Hoc Tests durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p \leq 0,05$) festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der mRNA-Qualität

Die mRNA-Qualität und Quantität aller Proben wies gute Screentape Disintegration Variable (SDV) Werte von unter 10 auf. Dies ist laut Herstellerprotokoll ein Hinweis auf gute und intakte RNA-Qualität. Deswegen konnte zur cDNA-Synthese bei dieser Qualitätseinstufung der oligo dT-V Primer verwendet werden.

3.2 Genomanalyse mittels RT-qPCR

Zwischen den Titanimplantaten und den Zirkonoxidkeramikimplantaten wurden Veränderungen in der Genexpression festgestellt. In der Negativkontrolle wurden keine Veränderungen der Genexpression detektiert. Weder die Implantate noch die LPS-Stimulation hatten Einfluss auf die Genexpression der drei Haushaltsgene (β -aktin, 18S RNA und B2M).

3.2.1 Analyse von Parametern, die unter anderem an einer LPS induzierten Toll-Like-Rezeptor gesteuerten Immunantwort beteiligt sind

In der vorliegenden Arbeit konnten keine signifikanten Änderungen in der Genexpression von TLR-4 (Abb. 3) festgestellt werden.

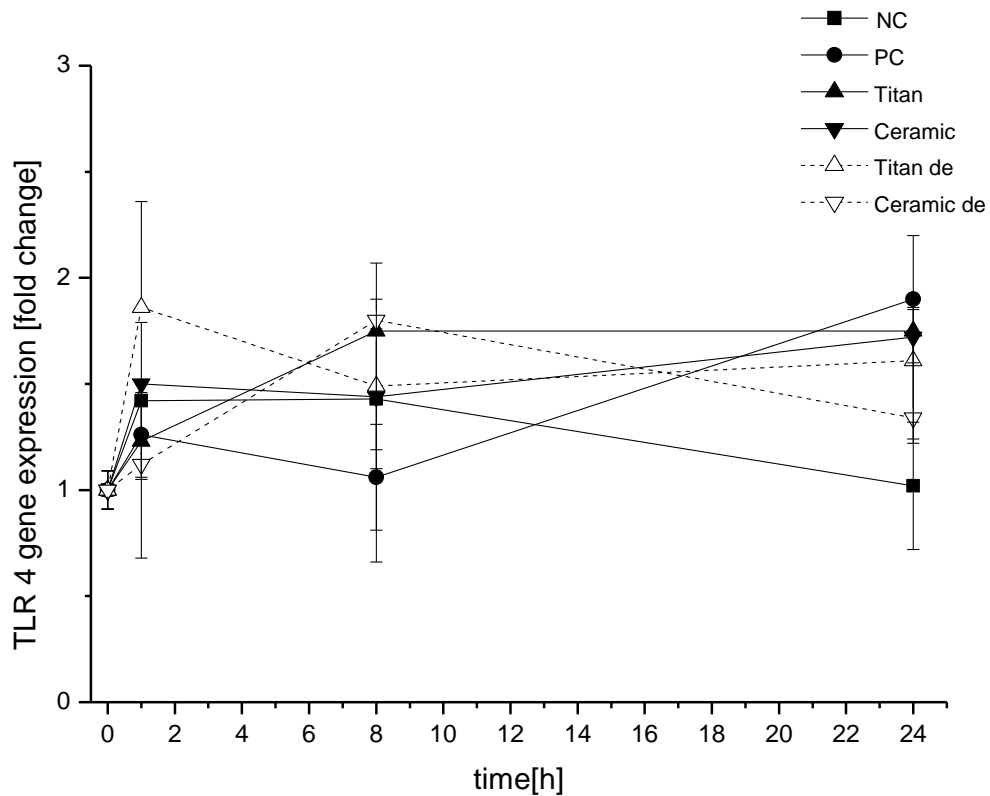


Abb. 3: Einfluss von Titan- und Zirkonoxidkeramikimplantaten auf TLR-4 Genexpression vor und nach Depyrogenisierung. Mittelwerte und Standardabweichungen

NC = Negativkontrolle; PC = Positivkontrolle; Titan = fabrikneue Titanimplantate; Ceramic = fabrikneue Zirkonoxidkeramikimplantate; Titan de = depyrogenisierte Titanimplantate; Ceramic de = depyrogenisierte Zirkonoxidkeramikimplantate

In Abb. 4 ist die TLR-9 Genexpression in Abhängigkeit von LPS bzw. Implantaten dargestellt. Nach 1 h Inkubation zeigten die Positivkontrolle und alle Implantatproben einen signifikanten Anstieg der TLR-9 Genexpression ($p \leq 0,05$). Nach 8 h war die TLR-9 Genexpression in der Positivkontrolle noch immer signifikant höher, während zwischen den restlichen Proben keine signifikanten Unterschiede zu der Negativkontrolle zu messen war. Nach der Depyrogenisierung waren die Messergebnisse aller Blutproben, die mit Implantaten inkubiert wurden, nicht signifikant unterschiedlich zur Negativkontrolle ($p > 0,05$).

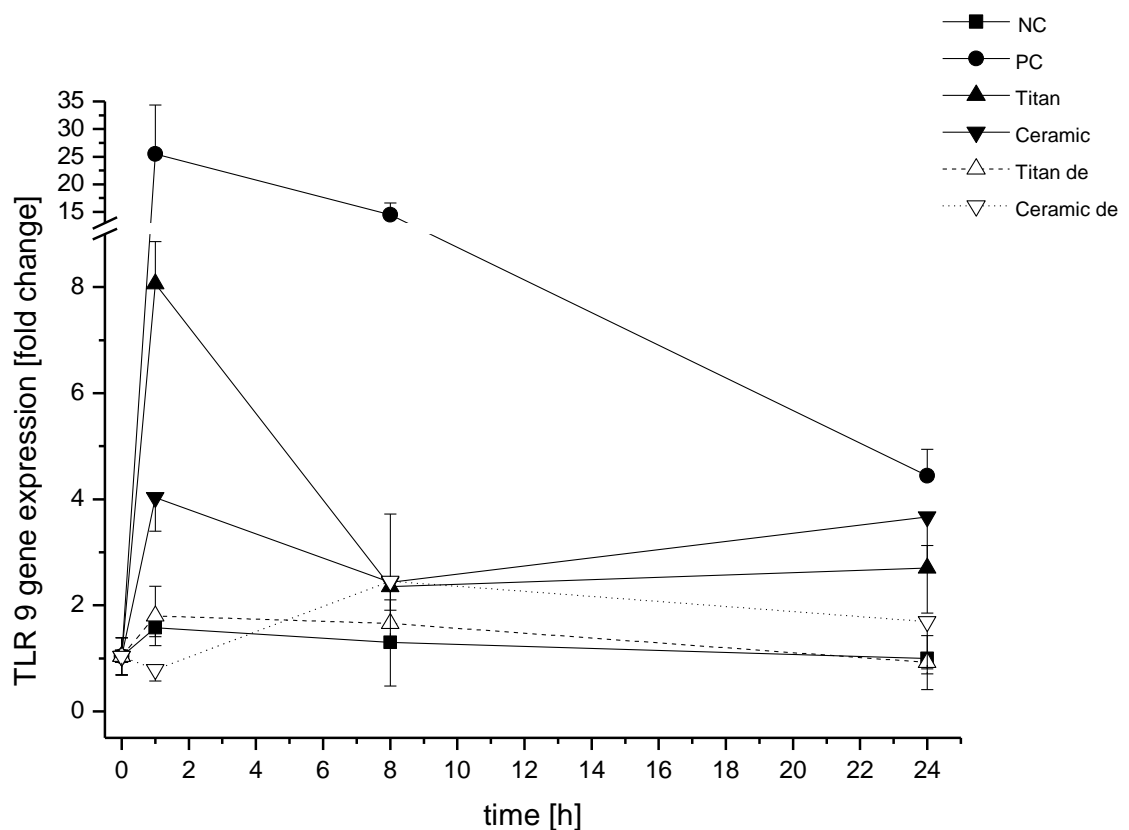


Abb. 4: TLR-9 Genexpression als fold-change vor und nach Depyrogenisierung von Titan- und Zirkonoxidkeramikimplantaten

Als nächstes wurde die Genexpression von NFκB untersucht (Abb. 5). Nach 1 h und 8 h zeigte die Positivkontrolle einen NFκB (Abb. 5) Genexpressionsanstieg welcher nach 24 h wieder auf das 1 h Niveau abfiel. Fabrikneue Titan- und Keramikimplantate zeigten nach 1 h ebenfalls Genexpressionsanstiege von NFκB, welche nach 24 h auf das Niveau der Negativkontrolle abfielen. Nach Depyrogenisierung stieg die NFκB Genexpression nur nach 8 h an und fiel nach 24 h auf den Wert der Negativkontrolle ab.

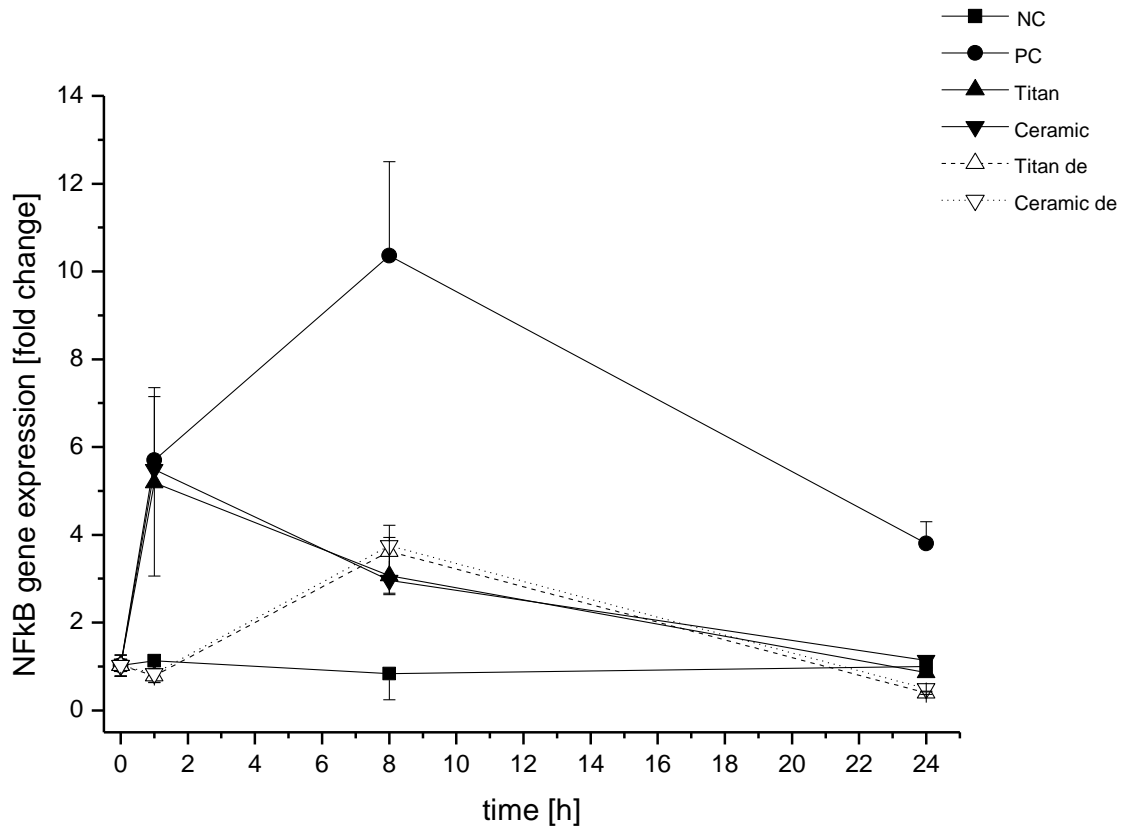


Abb. 5: NFκB Genexpression als fold-change vor und nach Depyrogenisierung von Titan- und Keramikimplantaten

In Abb. 6 ist die Genexpression von IL-1 β nach 1 h, 8 h und 24 h Inkubation dargestellt. Die IL-1 β Genexpression stieg bei der mit LPS stimulierten Positivkontrolle signifikant an. Die mit Implantaten inkubierten Blutproben zeigten nur nach einer Stunde einen Anstieg der IL-1 β Genexpression, danach fielen die Messwerte wieder auf das Niveau der Negativkontrollen. Desweiteren war bei den Titanimplantaten dieser Anstieg deutlich höher als bei den Zirkonoxidkeramikimplantaten ($p \leq 0,05$). Die Positivkontrolle wies einen signifikanten Anstieg ($p \leq 0,05$) der IL-1 β Genexpression auf. Die mit fabrikneuen Implantaten inkubierten Blutproben zeigten nur nach 1 h einen IL-1 β Genexpressionsanstieg, welcher bei den Titanimplantaten signifikant höher war als bei den Zirkonoxidkeramikimplantaten. Nach 8 h und 24 h war kein signifikanter Unterschied zu der Negativkontrolle messbar. Nach der Depyrogenisierung zeigte keine Probe zu den untersuchten Zeitpunkten einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle ($p > 0,05$).

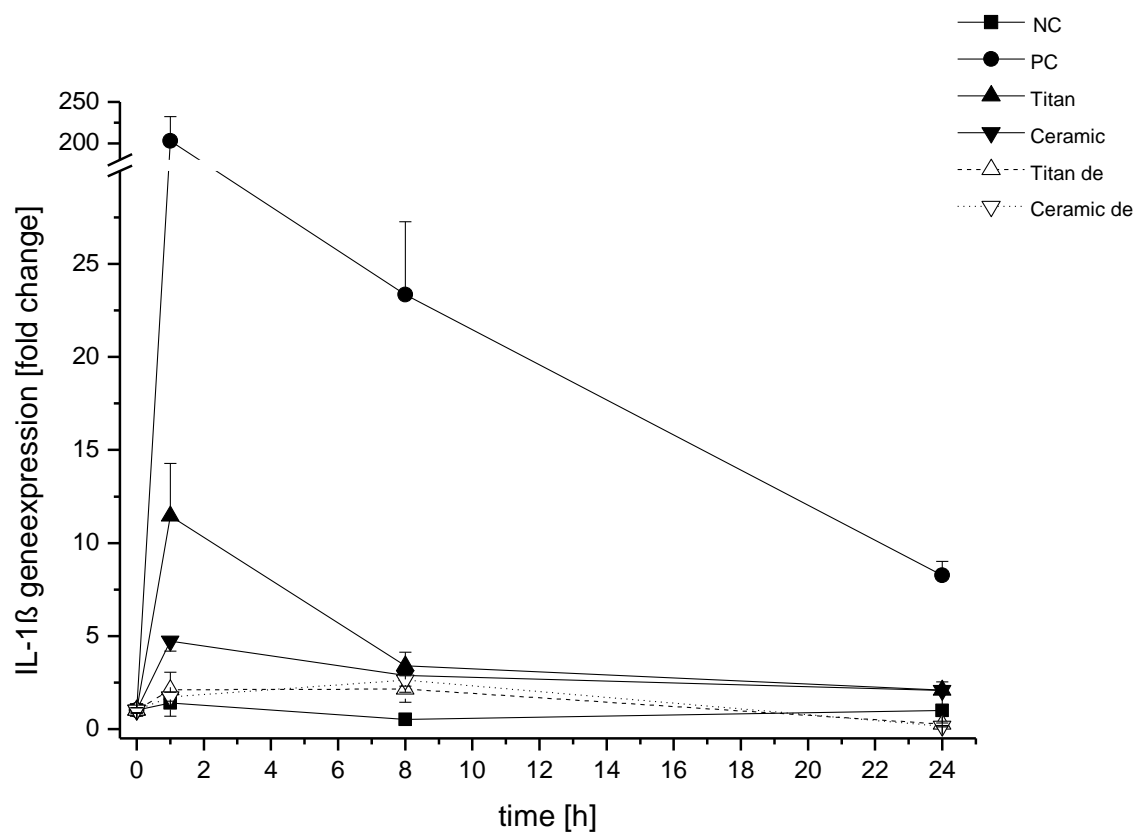


Abb. 6: IL-1 β Genexpression als fold-change vor und nach Depyrogenisierung von Titan- und Keramikimplantaten

3.2.2 Analyse von Parametern, die unter anderem an einer LPS induzierten Tumor-Nekrose-Faktor gesteuerten Immunantwort beteiligt sind

Die folgende Abb. 7 zeigt die Genexpression von TNF- α . Ein signifikanter Anstieg der TNF- α -Genexpression ($p \leq 0,05$) konnte nach 1 h, 8 h und 24 h Inkubation der Positivkontrolle gemessen werden. Fabrikneue Titanimplantate riefen ebenfalls einen TNF- α -Genexpressionsanstieg nach 1 h hervor. Fabrikneue Zirkonoxidkeramikimplantate zeigten einen ähnlichen Verlauf, der allerdings eine signifikant geringere TNF- α -Genexpression als bei den Titanimplantaten hervorrief ($p \leq 0,05$). Beide Implantatgruppen zeigten nach der Depyrogenisierung keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Negativkontrolle.

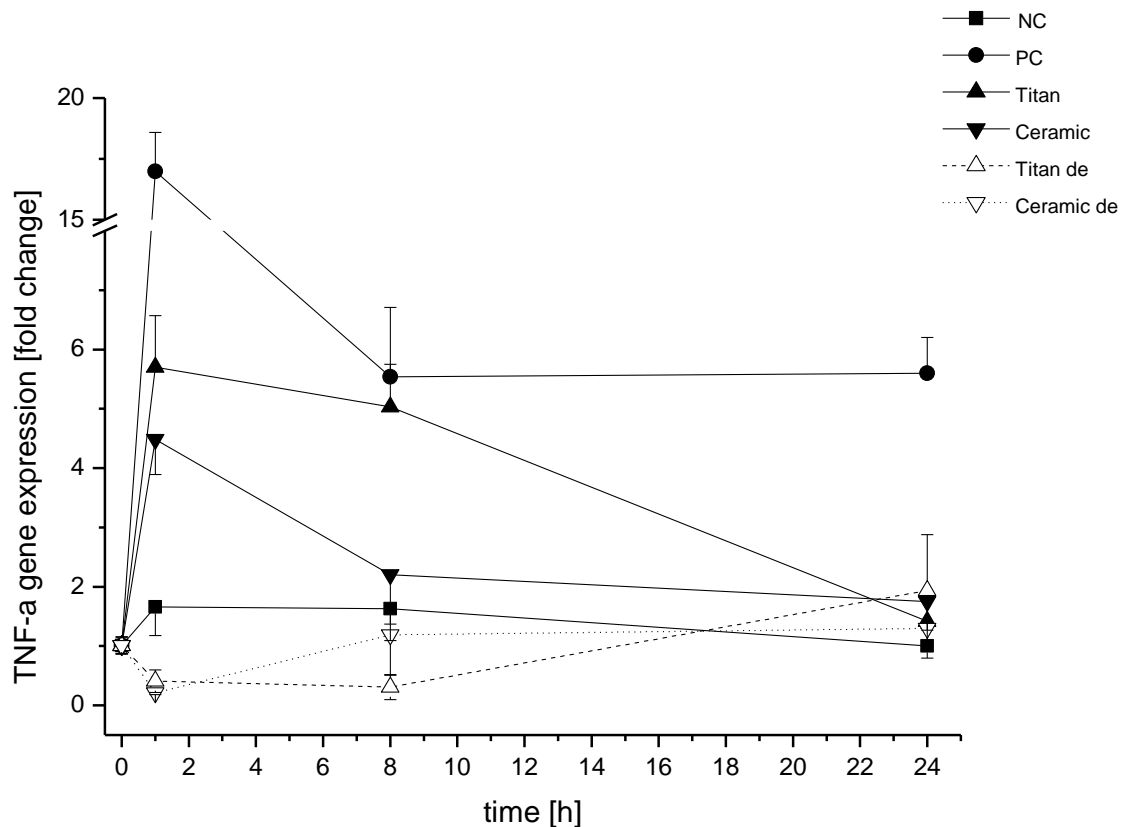


Abb. 7: TNF- α Genexpression als fold-change vor und nach Depyrogenisierung von Titan- und Keramikimplantaten.

Es zeigte sich, dass die Genexpression von FADD keine signifikante Änderung aufwies (Abb. 8; $p > 0,05$). Die Messwerte der FADD-Genexpression zeigen nach 1 h, 8 h und 24 h insgesamt einen leichten Anstieg, der nach 1 h bzw. 8 h zunehmend abfiel und untereinander keinen signifikanten Unterschied aufwies.

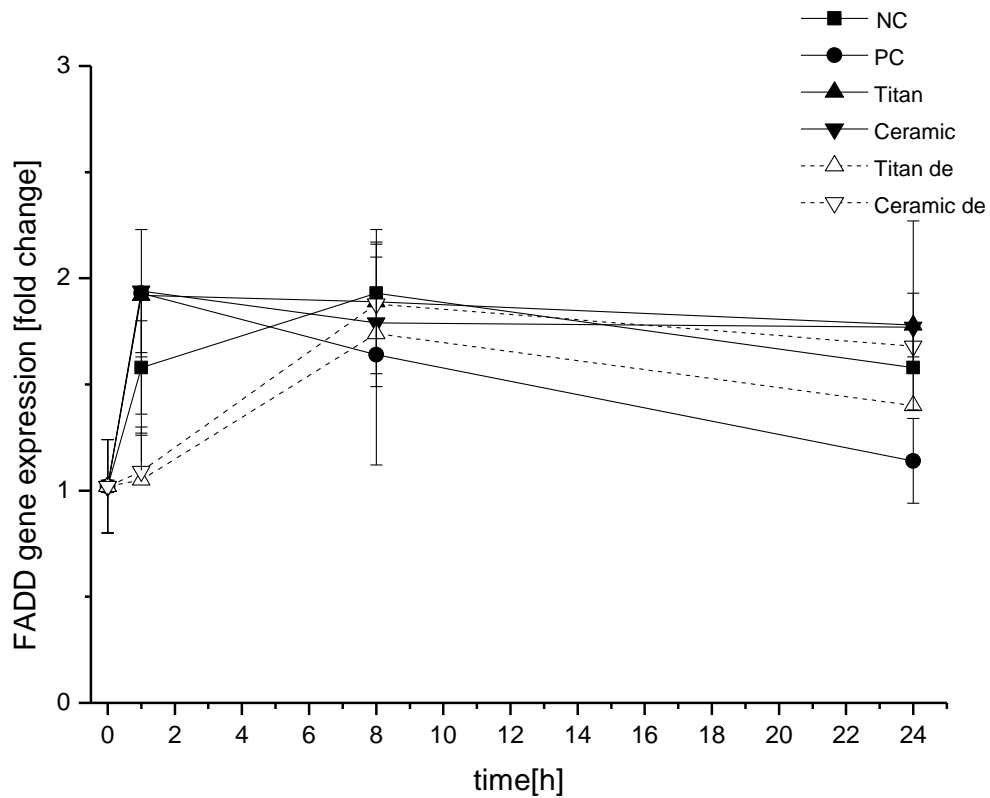


Abb. 8: FADD-Genexpression als fold-change vor und nach Depyrogenisierung von Titan- und Keramikimplantaten

3.2.3 Einfluss von dentalen Implantaten auf die IL-8-Genexpression und eine mögliche Regulation von IL-8

Es zeigte sich, dass die Titanimplantate einen signifikanten Anstieg der IL-8 Genexpression sowohl fabrikneu als auch depyrogenisiert hervorriefen. Auch die Zirkonoxidkeramikimplantate riefen sowohl im fabrikneuen Zustand als auch nach der Depyrogenisierung einen signifikanten Anstieg der IL-8-Genexpression hervor (Abb. 9).

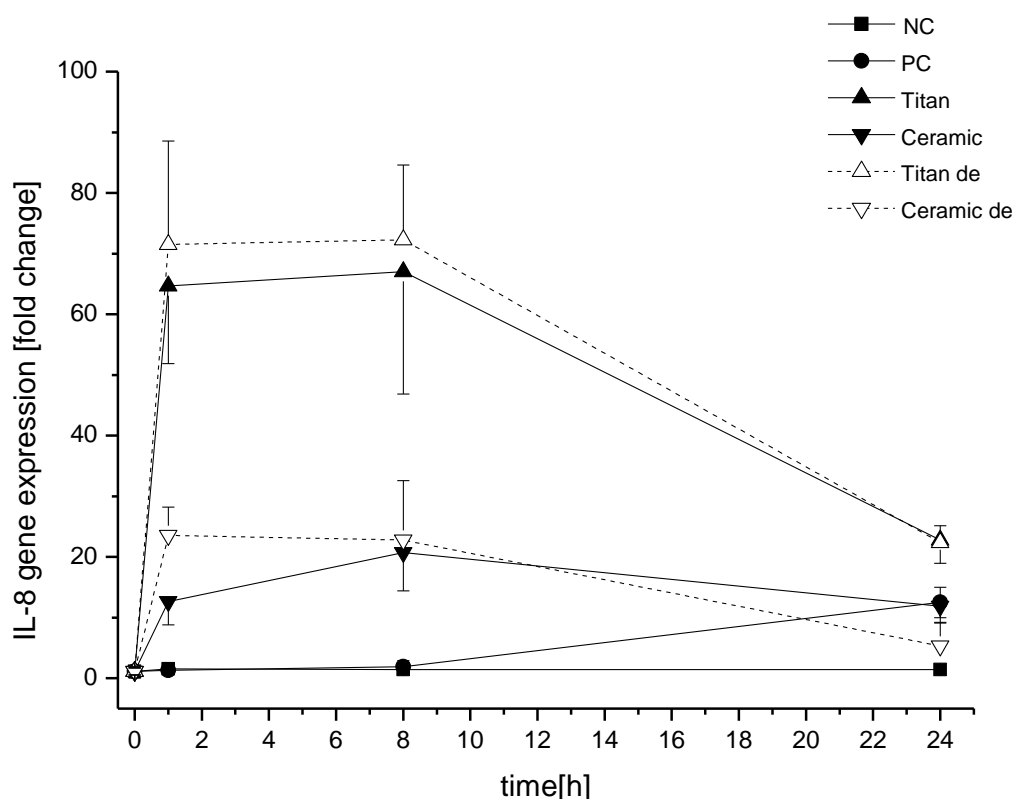


Abb. 9: IL-8-Genexpression als fold-change vor und nach Depyrogenisierung von Titan- und Keramikimplantaten

Aus Abb. 9 ist zu ersehen, dass die IL-8-Genexpression nach 1 h bei Titanimplantaten und depyrogenisierten Titanimplantaten im Vergleich zu Zirkonoxidkeramikimplantaten und depyrogenisierten Zirkonoxidkeramikimplantaten sowie zur Positivkontrolle und Negativkontrolle signifikant anstieg. Zirkonoxidkeramikimplantate und depyrogenisierte Zirkonoxidkeramikimplantate riefen ebenfalls einen signifikanten IL-8-Genexpressionsanstieg im Vergleich zur Positivkontrolle und Negativkontrolle hervor. Nach 8 h bestanden diese signifikanten Unterschiede weiterhin. Nach 24 h fiel die IL-8-Genexpression bei den Titanimplantatproben und den depyrogenisierten Titanimplantaten, sowie bei den

Zirkonoxidkeramikimplantaten und den depyrogenisierten Zirkonoxidkeramikimplantaten ab. Die Positivkontrolle stieg auf den Wert von Keramik an. Signifikante Unterschiede bestanden jedoch noch immer zwischen Titan, depyrogenisiertem Titan, Zirkonoxidkeramik und depyrogenisierter Zirkonoxidkeramik im Vergleich zur Negativkontrolle.

Nach der Untersuchung der Genexpression von IL-8 wurde in einem weiteren Schritt nach einem Zusammenhang zwischen der IL-8 Genexpression und der Genexpression vom IL-8-Rezeptor gesucht. Es zeigte sich, ein ähnlicher Verlauf der IL-8-Rezeptor-Genexpression wie der der IL-8-Genexpression (Abb. 10).

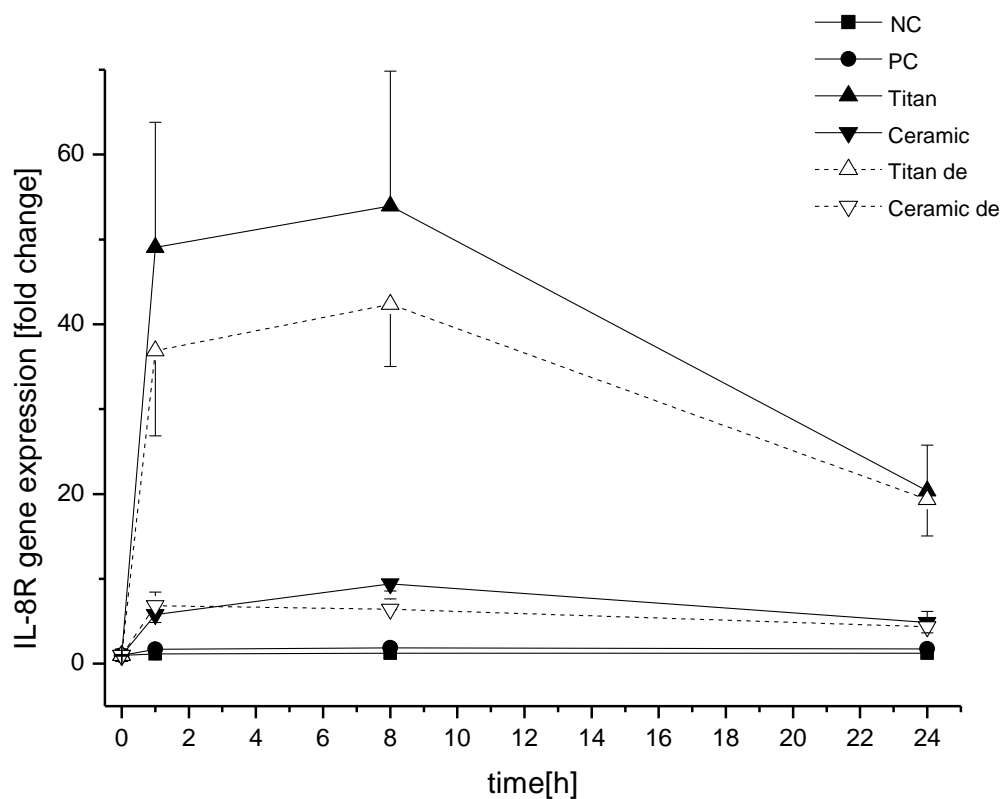


Abb. 10: IL-8 Rezeptor-Genexpression als fold-change vor und nach Depyrogenisierung von Titan- und Keramikimplantaten

Die IL-8 Rezeptor-Genexpression (Abb. 10) stieg nach 1 h bei den Titanimplantatprobe und den depyrogenisierten Titanimplantatproben im Vergleich zu allen anderen Messwerten signifikant an. Die erhöhte Genexpression bleibt auch nach 8 h und 24 h bestehen. Die Zirkonoxidkeramik-Implantatproben und die depyrogenisierten Zirkonoxidkeramik-Implantatproben zeigen einen Anstieg der IL-8 R Genexpression nach 1 h, 8 h und 24 h, die signifikant höher ist, als die der Positivkontrolle und Negativkontrolle,

allerdings signifikant niedriger als die Genexpression bei den Titanimplantatproben und den depyrogenisierten Titanimplantatproben.

Wie aus der folgenden Abbildung 11 zu ersehen ist, konnte eine positive Korrelation zwischen IL-8 und IL-8 R nachgewiesen werden. Die hier dargestellte Korrelationskurve zeigt einen Zusammenhang der nachweisbaren Genexpression von IL-8- und IL-8-Rezeptor. Bei dieser Untersuchung wurden alle generierten Ergebnisse der Titanimplantate und der Keramikimplantate herangezogen. Je größer die IL-8 Genexpression gewesen ist, desto mehr IL-8 R wurde exprimiert.

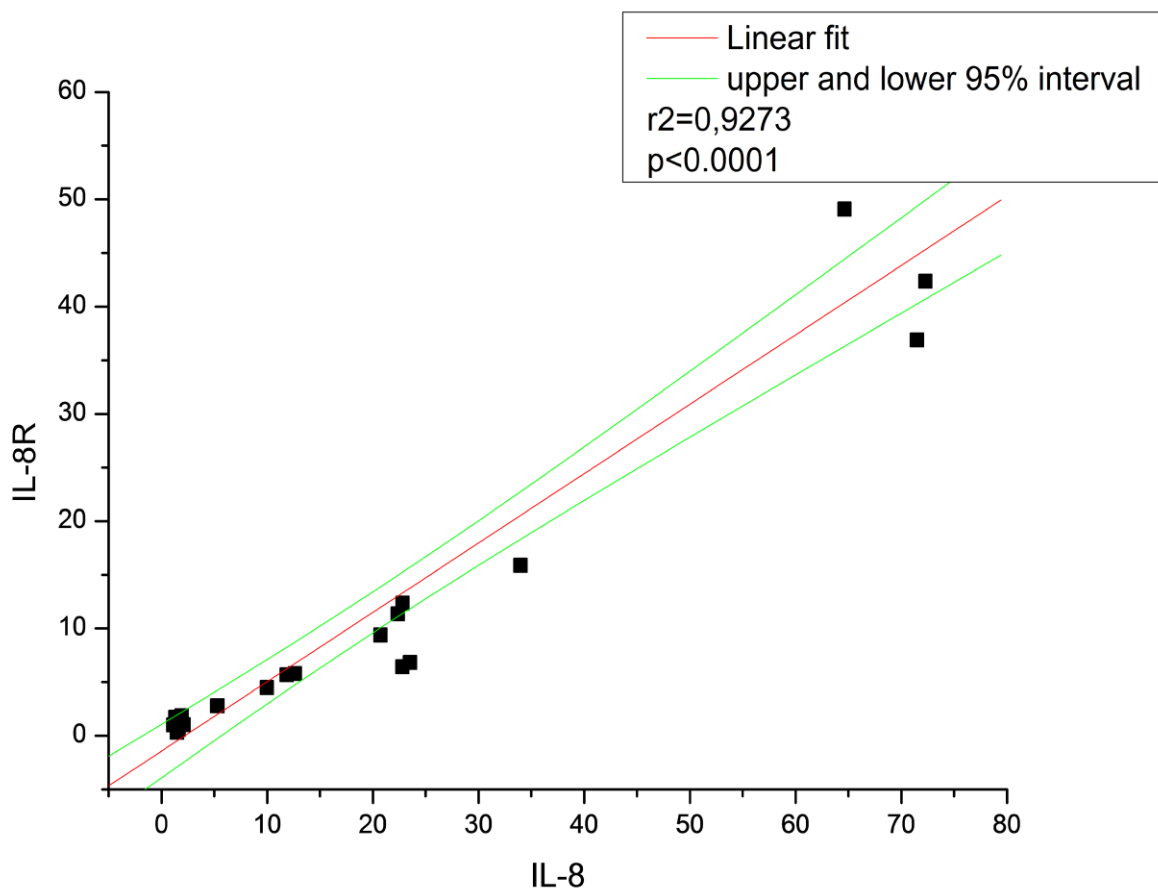


Abb. 11: Korrelation von IL-8-Genexpression und IL-8 Rezeptor-Genexpression

Die x-Achse zeigt den fold-change der IL-8-Genexpression, die y-Achse zeigt den fold-change der IL-8R-Genexpression.

In Abbildung 12 ist die Korrelationskurve zwischen IL-8 und IL-1 β gezeigt, welche eine IL-1 β unabhängige IL-8 Genexpression darstellt. Dieses Ergebnis stellte sich bei der Untersuchung aller generierten Ergebnisse aller Titanimplantat- sowie aller Zirkonoxidkeramik-Implantatproben dar. Es wird deutlich, dass kein Zusammenhang zwischen der IL-8-Genexpression und der IL-1 β -Genexpression bestand.

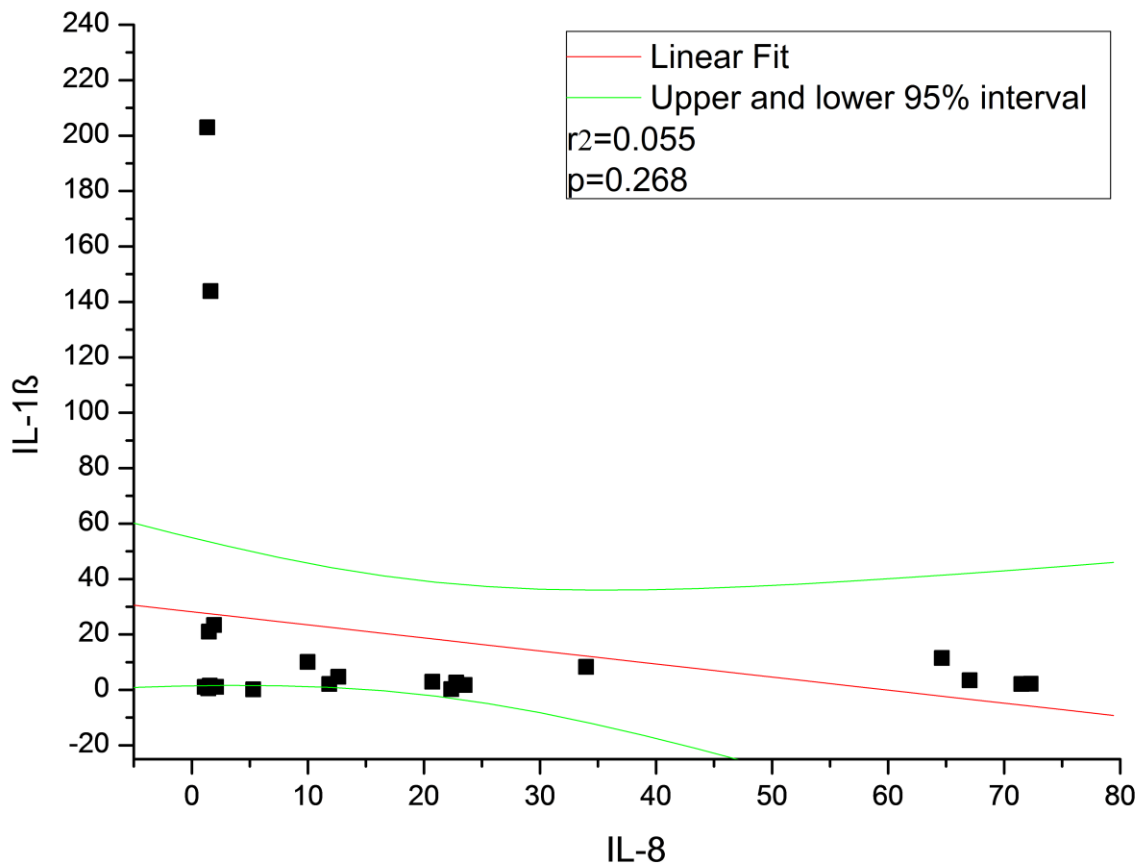


Abb. 12: Korrelation von IL-8-Genexpression und IL- β -Genexpression

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

Neuere molekularbiologische Methoden wie die qPCR (siehe Kapitel 1.6) ermöglichen es, auf Nukleinsäurebasis mittels Genexpressionsanalyse die Folgen z.B. einer Pyrogenkontamination zu detektieren und so einzelne Bestandteile einer von Pyrogenen aktivierten Signaltransduktionskaskade zu analysieren. Dies hat den Vorteil, nicht nur ein Nachweis für das Vorhandensein von Pyrogenen zu sein, sondern es können quantitative Aussagen über die Intensität der Immunreaktion und der an ihr beteiligten Effektoren gemacht werden. LPS, wie in der vorliegenden Studie verwendet, hat den Vorteil, dass ein Medium biologischen Ursprungs verwendet werden konnte [14, 80]. Die hohe Bioaktivität des LPS bot die Möglichkeit einer zuverlässigen Detektion schon bei geringen Mengen.

Die Immunreaktion ist jedoch stark spenderspezifisch [4, 32, 59], weshalb in der vorliegenden Studie für alle Proben Blut desselben Spenders verwendet wurde. Dementsprechend lassen sich die hier generierten Werte als Absolutwerte nicht direkt mit anderen Studien vergleichen.

Von Interesse sind hier die Materialunterschiede zwischen Titan und Zirkonoxidkeramik. Dabei stellen die relativen Unterschiede zwischen den verschiedenen verwendeten Implantatmaterialien und den positiven und negativen Kontrollgruppen die zur Diskussion stehenden Ergebnisse dar. Somit war in der vorliegenden Arbeit nicht die biologische Reaktion verschiedener Individuen von Bedeutung, sondern die unterschiedliche Reaktion auf die verschiedenen Implantatmaterialien. Die Ergebnisse der Positiv-Kontrollgruppe zeigen eine physiologische Reaktion nach direktem LPS-Kontakt, was in Übereinstimmung mit der derzeitigen Literatur steht [24]. Dies erlaubt es, die Ergebnisse der mit Implantaten inkubierten Blutproben als eine physiologische Reaktion einzuordnen.

4.2 Immunologische Reaktion der mit Implantaten inkubierten Blutproben

Die fabrikneuen Titanimplantate riefen bei allen untersuchten Parametern, die eine Reaktion auf das Vorhandensein der Implantate zeigten, eine signifikant stärkere Reaktion hervor als die Zirkonoxidkeramikimplantate. Diese Beobachtung, dass Zirkonoxidkeramik ein weniger reaktives Material ist, steht in Übereinstimmung mit derzeitigen Untersuchungen der Medizintechnik [95]. In der vorliegenden Studie sollten die initialen immunologischen Effekte, die nach Kontakt zwischen Implantat und Blut ausgelöst werden, untersucht werden. Ein weiterer Schwerpunkt war der Vergleich der verwendeten Materialien. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die mit Implantaten inkubierten Blutproben eine gute Übereinstimmung gegenüber der hervorgerufenen Immunreaktion der mit LPS versetzten

Blutproben aufwiesen. Dies kann zum einen als ein Hinweis auf eine LPS-ähnliche Pyrogen-Kontamination sowohl der Titan- als auch der Keramikimplantate gewertet werden, welche sich bei Titan höher als bei Zirkonoxidkeramik darstellte. Zum anderen können die über den gesamten 24-stündigen Versuchsverlauf beobachteten Veränderungen, nämlich eine Abschwächung der Immunreaktion sowohl nach Implantatkontakt als auch nach LPS-Stimulation, als eine physiologische Abschwächung in einem geschlossenen In-vitro-System gewertet werden. Eine solche Abschwächung kann ohne Zusatz von neuen Nährstoffen, wie z.B. in Zellkultursystemen üblich, als physiologisch betrachtet werden, zumal sich die LPS-Kontrollen im Versuchsverlauf ähnlich wie die Proben mit Implantatkontakt verhalten haben. Daher können die festgestellten Ergebnisse als vergleichbar und damit für ein geschlossenes System als typische LPS induzierte Immunreaktion gewertet werden. Ein direkter Vergleich mit der derzeitigen Literatur ist aufgrund der mangelnden Vergleichbarkeit der angewendeten Methodik schwierig. Perala et al. konnten jedoch in Blutzellen, die in Gegenwart verschiedener dentaler Titanimplantate inkubiert wurden, einen Anstieg von IL-1 β und TNF- α -Protein feststellen [76]. Insbesondere IL-1 β und TNF- α sind an der proinflammatorischen Immunreaktion, sowie der Temperaturregulation über den Hypothalamus, beteiligt. TNF- α ist in der Signaltransduktionskaskade multifunktionell [56]. Durch die Untersuchung der Genexpression von FADD konnte außerdem gezeigt werden, dass die Reaktion aufgrund einer nicht gesteigerten Genexpression von FADD nicht in Richtung des bestimmten Zelltods (Apoptose) geht. Exogene Pyrogene wie z.B. LPS sind potente Mediatoren [22] der bakteriellen mediatorgesteuerten Knochendestruktionskaskade [45, 67], welche im Implantatverlust, u.a. durch Periimplantitis, enden kann. Implantathersteller sind daher stets bemüht, die Produktion unter sauberen Bedingungen zu gewährleisten und nach der Fertigstellung der Implantate diese zu sterilisieren. Ein Anstieg von Mediatoren im frühen Verlauf der Einheilung wird in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert und ist zum Teil im Zusammenhang mit der Osteoblastenrekrutierung als positiv für die anschließende Heilung beschrieben worden [18, 57]. Die frühen Umbauvorgänge nach der Implantation sind erste Indikatoren für eine erfolgreiche Osseointegration, welche für eine funktionelle Restauration auf den Implantaten von essentieller Bedeutung ist.

4.3 Auswirkung der Depyrogenisierung auf die Immunantwort

Es ist bekannt, dass trockene Hitze bei 250°C für 30 min (Depyrogenisierung) pyrogene Stoffe entfernt [68]. Außerdem ist bekannt, dass die Depyrogenisierung der Implantate einen LPS inaktivierenden Effekt hat [64, 65]. Dieser Effekt konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Die hervorgerufene Immunantwort, die ähnlich der LPS induzierten Immunantwort ist, war nach der Depyrogenisierung sowohl bei den Titanimplantaten als

auch bei den Keramikimplantaten nach einer Stunde signifikant geringer als die ermittelten Werte der fabrikneuen Proben. Dies entspricht einer Reduzierung der Oberflächenbelastung mit LPS oder LPS ähnlichen Stoffen. Die nicht stimulierte Negativkontrolle bewegte sich in demselben Messbereich. Depyrogenisierung ist demzufolge eine Möglichkeit eine LPS-ähnlich induzierte Immunantwort zu reduzieren. Der Anstieg der TNF- α und TLR medierten Genexpression, die bei der Inkubation mit fabrikneuen Titanimplantaten auftraten, stellten sich nach der Depyrogenisierung signifikant niedriger dar. Dies lässt, wie in der Literatur beschrieben, auf eine pyrogenähnliche Kontamination der Implantate schließen [76] und ist in Übereinstimmung mit Befunden von in der Chirurgie verwendeten Aneurismenclips [59]. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse hätten zusätzlich fabrikneue Implantate sowohl der Titan- als auch der Keramikgruppe depyrogenisiert werden sollen, um einen möglichen Einfluss der Depyrogenisierung auf fabrikneue Implantate zu evaluieren.

4.4 Betrachtung der IL-8 Expression im Bezug auf die Osseointegration

Osseointegration ist das unbestrittene Ziel der Implantation und wird als eine „direkte strukturelle und funktionelle Verbindung zwischen organisiertem, lebendem Knochen und der Oberfläche eines belasteten Implantates“ verstanden [10, 11]. Die anfänglich erhöhte Genexpression von IL-8 in humanem Vollblut ist ein Indiz für den Beginn einer inflammatorischen Reaktion. Die IL-8-Genexpression war bei den Titanimplantaten deutlich erhöht. Der in dieser Studie gefundene LPS unabhängige Anstieg könnte einen aseptischen Implantatverlust erklären.

Der Einfluss von IL-1 β und damit letztlich auch der von LPS auf IL-8 wird kontrovers diskutiert. Das vorliegende Ergebnis der LPS unabhängigen IL-8-Genexpression ist als Bestätigung der derzeitigen Literatur zu werten [13, 78]. Da die IL-1 β -Genexpressionsbestimmung allgemein als LPS-Nachweis herangezogen werden kann [9, 91], konnte hier eine LPS unabhängige IL-8 Genexpression nachgewiesen werden. Um eine eindeutige Aussage über die Osseointegration der unterschiedlichen Werkstoffe treffen zu können, und ob diese LPS-ähnliche Immunreaktion daran modulierend mitwirkt, sind zu dieser immunologischen Untersuchung zusätzliche klinische Langzeitstudien nötig. Bei diesen sollte die immunologische Analyse der Patienten zum Beispiel über Sulkusfluiduntersuchungen, über Serumuntersuchungen oder durch die Biopsie des Gewebes, welches um das Implantat herum liegt, erfolgen.

Schlussfolgernd ist eine verringerte Immunreaktion, ähnlich der LPS induzierten Immunreaktion, nach der depyrogenisierenden Hitzebehandlung gemessen worden. Eine Depyrogenisierung am Ende des Fertigungsprozesses sollte daher von den Implantatherstellern überdacht werden.

5 Zusammenfassung

Die kontinuierlich hohe Implantatversorgung lässt Implantate im Fokus der Zahnmedizin stehen. Implantathersteller sind weiterhin auf der Suche die Verträglichkeit der Implantatmaterialien für den Menschen zu optimieren. In dieser Arbeit sollte initial überprüft werden, ob fabrikneue dentale Titan- und Keramikimplantate eine pyrogen-induzierte Immunantwort in humanem Blut hervorrufen. Falls dies so wäre, sollte untersucht werden, ob eine zusätzliche Hitzebehandlung der Implantate eine Modellierung einer solchen Immunantwort verursachen würde.

Je fünf fabrikneue Titan- und Keramikimplantate wurden für 1 h; 8 h und 24h in humanem Blut inkubiert, danach wurden die Implantate gereinigt, depyrogenisiert (trockene Hitze 250°C; 30 min) und erneut in humanem Blut desselben Spenders (männlich, kaukasisch) inkubiert. Zu jedem Zeitpunkt wurden Blutaliquots entnommen, aus denen RNA isoliert wurde. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurden Genexpressionanalysen durchgeführt. Es wurden gezielt Gene analysiert, die an der LPS induzierten TLR-, bzw. TNF- α medierten Immunantwort beteiligt sind. Des Weiteren wurden Gene analysiert, die an einer IL-8 gesteuerten Immunantwort beteiligt sein können. Es wurden einfaktorielle Varianzanalysen sowie Tukey Post Hoc Tests durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p \leq 0,05$) festgelegt.

Sowohl Titanimplantate als auch Zirkonoxidkeramikimplantate wiesen Verunreinigungen auf, die ähnliche Immunantworten hervorriefen wie LPS. Dabei waren die Reaktionen auf die Titanimplantate deutlich größer als die auf die Zirkonoxidkeramikimplantate. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Immunantworten nach Hitzebehandlung der Implantate deutlich geringer ausfielen.

Zusammen betrachtet konnte bei den in dieser Studie verwendeten Implantaten ein Anstieg der IL-8 und IL-8 Rezeptor-Genexpression festgestellt werden. Diese Reaktion wurde durch die Depyrogenisierung nicht beeinflusst und ist LPS-unabhängig.

Die untersuchten dentalen Implantate initiierten Immunantworten, die auf eine Pyrogenbelastung der Implantate hindeuten und die zu einer temporären Stimulation inflammatorischer Mediatoren führen. Des Weiteren konnte eine Interleukin-1 β - und damit vermutlich LPS-unabhängige Stimulation von IL-8 und seinem Rezeptor nachgewiesen werden. Sowohl die LPS-abhängigen TLR- und TNF- α induzierten Signaltransduktionswege als auch der IL-8 medierte Signaltransduktionsweg können an (frühen) Entzündungsreaktion beteiligt sein, an deren Ende ein Implantatverlust stehen könnte.

6 Summary

In Germany dental implants are used about 1.000.000 times a year. The dentists and the manufacturers are interested in the implant success and try to optimize the dental implant material as much as possible. In this study the initial aim was to investigate whether new dental implants made from titanium or zirconia evoke a pyrogene-induced immune response in human blood. If so the next step would have been to investigate if heat-treatment of the implants would result in a modulation of such immune responses.

Therefore five new titanium and zirconia implants, each, were incubated in human blood for 1 h, 8 h and 24 h. Hereafter the implants were cleaned, depyrogenised (dry heat incubation, 250°C; 30 min) and again incubated in blood obtained from the same donor (male, Caucasian). Blood aliquots for RNA-extraction were obtained at each of the above mentioned time points. RNA was transcribed into cDNA and gene expression analysis was performed by means of quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR). qPCR analysis focussed on genes which are known to be involved in either the Toll Like receptor (TLR) or the Tumor necrosis factor (TNF)- α mediated immune response. In a second approach genes involved in the Interleukin (IL)-8 mediated immune response were analysed. Statistical analysis was performed by means of one-way-ANOVA followed by Tukey Post Hoc tests, with $p \leq 0.05$ accepted for statistical significance.

Titanium as well as zirconia implants exhibited contaminations that evoke a LPS-like immune response. However, the observed alterations were significantly higher in titanium than in zirconia implants. It could also be demonstrated that these responses were attenuated after the dry heat treatment.

In addition it could be shown that the implants used in this study led to an increased IL-8 and IL-8 receptor gene expression. Since this reaction was not influenced by the dry heat treatment, it is likely that this reaction is LPS-independent.

The investigated dental implants initiated immune responses which, in part an immune response indicative of a pyrogene contamination resulting in a temporal increase of inflammatory molecules. Furthermore a IL-1 β , hence LPS independent stimulation of IL-8 and its receptor could be detected. Both, the LPS-dependent TLR- and TNF- α induced signal transduction cascade, as well the IL-8 mediated signal transduction cascade, could be involved in an (early) inflammatory reaction, possibly leading to ultimate loss of the implant.

7 Literaturverzeichnis

1. Adell, R., Eriksson, B., Lekholm, U., Brånemark, P.I., Jemt, T.: Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants* 5, 347-59 (1990).
2. Aderem, A., Underhill, D.M.: Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17, 593-623 (1999).
3. Albrektsson, T.O., Johansson, C.B., Sennerby, L.: Biological aspects of implant dentistry: osseointegration. *Periodontol* 2000 4, 58-73 (1994).
4. Aulock, S.V., Deininger, S., Draing, C., Gueinzius, K., Dehus, O., Hermann, C.: Gender difference in cytokine secretion on immune stimulation with LPS and LTA. *J Interferon Cytokine Res* 26, 887-92 (2006).
5. Bab, I.A., Einhorn, T.A.: Regulatory role of osteogenic growth polypeptides in bone formation and hemopoiesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 3, 31-46 (1993).
6. Beitland, S., Opdahl, H., Aspelin, T., Saetre, L., Lyberg, T.: Blood leucocyte cytokine production after LPS stimulation at different concentrations of glucose and/or insulin. *Acta Anaesthesiol Scand* 53, 183-9 (2009).
7. Beutler, B.: Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430, 257-63 (2004).
8. Beutler, B.: The Toll-like receptors: analysis by forward genetic methods. *Immunogenetics* 57, 385-92 (2005).
9. Bowie, A., O'Neill, L.A.: The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 67, 508-14 (2000).
10. Brånemark, P.I., Adell, R., Breine, U., Hansson, B.O., Lindstrom, J., Ohlsson, A.: Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 3, 81-100 (1969).
11. Brånemark, P.I., Hansson, B.O., Adell, R., Breine, U., Lindstrom, J., Hallen, O., Ohman, A.: Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl* 16, 1-132 (1977).
12. Breslauer, K.J., Frank, R., Blocker, H., Marky, L.A.: Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3746-50 (1986).
13. Candel-Marti, M.E., Flichy-Fernandez, A.J., Alegre-Domingo, T., Ata-Ali, J., Penarrocha-Diago, M.A.: Interleukins IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and periimplant disease. An update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 16, e518-21 (2011).
14. Caroff, M., Karibian, D., Cavaillon, J.M., Haeffner-Cavaillon, N.: Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect* 4, 915-26 (2002).
15. Chang, S.W., Shin, S.Y., Hong, J.R., Yang, S.M., Yoo, H.M., Park, D.S., Oh, T.S., Kye, S.B.: Immediate implant placement into infected and noninfected extraction sockets: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 107, 197-203 (2009).
16. Cogswell, J.P., Godlevski, M.M., Wisely, G.B., Clay, W.C., Leesnitzer, L.M., Ways, J.P., Gray, J.G.: NF-kappa B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF-kappa B binding site and a nonconsensus CRE-like site. *J Immunol* 153, 712-23 (1994).
17. Conti, B., Tabarean, I., Andrei, C., Bartfai, T.: Cytokines and fever. *Front Biosci* 9, 1433-49 (2004).
18. Cooper, L.F., Masuda, T., Yliheikkilä, P.K., Felton, D.A.: Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. *Int J Oral Maxillofac Implants* 13, 163-74 (1998).
19. Davies, J.E.: In vitro modeling of the bone/implant interface. *Anat Rec* 245, 426-45 (1996).
20. Deepak, S., Kottapalli, K., Rakwal, R., Oros, G., Rangappa, K., Iwahashi, H., Masuo, Y., Agrawal, G.: Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Curr Genomics* 8, 234-51 (2007).
21. Ding, J.L., Ho, B.: Endotoxin detection--from limulus amebocyte lysate to recombinant factor C. *Subcell Biochem* 53, 187-208 (2010).

22. Dixon, D.R., Darveau, R.P.: Lipopolysaccharide heterogeneity: innate host responses to bacterial modification of lipid A structure. *J Dent Res* 84, 584-95 (2005).
23. E. Nürnberg, P.S.: Hangers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. 5. Auflage. Springer Verlag, Heidelberg 1991.
24. Eaton-Bassiri, A., Dillon, S.B., Cunningham, M., Ryczyn, M.A., Mills, J., Sarisky, R.T., Mbow, M.L.: Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 72, 7202-11 (2004).
25. Esposito, M., Hirsch, J.M., Lekholm, U., Thomsen, P.: Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci* 106, 721-64 (1998).
26. Esposito, M., Worthington, H.V., Loli, V., Coulthard, P., Grusovin, M.G.: Interventions for replacing missing teeth: antibiotics at dental implant placement to prevent complications. *Cochrane Database Syst Rev* CD004152 (2010).
27. Fischer-Brandies, E., Pratzel, H., Wendt, T.: Zur radioaktiven Belastung durch Implantate aus Zirkonoxid. *Dtsch Zahnärztl Z* 46, 688-90 (1991).
28. Fritz, E.A., Glant, T.T., Vermes, C., Jacobs, J.J., Roebuck, K.A.: Titanium particles induce the immediate early stress responsive chemokines IL-8 and MCP-1 in osteoblasts. *J Orthop Res* 20, 490-8 (2002).
29. Gallo, J., Raska, M., Mrazek, F., Petrek, M.: Bone remodeling, particle disease and individual susceptibility to periprosthetic osteolysis. *Physiol Res* 57, 339-49 (2008).
30. Garg, A.K., Reddi, S.N., Chacon, G.E.: The importance of asepsis in dental implantology. *Implant Soc* 5, 8-11 (1994).
31. Gibbard, L.L., Zarb, G.: A 5-year prospective study of implant-supported single-tooth replacements. *J Can Dent Assoc* 68, 110-6 (2002).
32. Gordon, A., Greenfield, E.M., Eastell, R., Kiss-Toth, E., Wilkinson, J.M.: Individual susceptibility to periprosthetic osteolysis is associated with altered patterns of innate immune gene expression in response to pro-inflammatory stimuli. *J Orthop Res* 28, 1127-35 (2010).
33. Greenfield, E.M., Beidelschies, M.A., Tatro, J.M., Goldberg, V.M., Hise, A.G.: Bacterial pathogen-associated molecular patterns stimulate biological activity of orthopaedic wear particles by activating cognate Toll-like receptors. *J Biol Chem* 285, 32378-84 (2010).
34. Han, C.H., Johansson, C.B., Wennerberg, A., Albrektsson, T.: Quantitative and qualitative investigations of surface enlarged titanium and titanium alloy implants. *Clin Oral Implants Res* 9, 1-10 (1998).
35. Henry, P.J., Laney, W.R., Jemt, T., Harris, D., Krogh, P.H., Polizzi, G., Zarb, G.A., Herrmann, I.: Osseointegrated implants for single-tooth replacement: a prospective 5-year multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 11, 450-5 (1996).
36. Heydecke, G., Kohal, R., Glaser, R.: Optimal esthetics in single-tooth replacement with the Re-Implant system: a case report. *Int J Prosthodont* 12, 184-9 (1999).
37. Hirayama, T., Tamaki, Y., Takakubo, Y., Iwazaki, K., Sasaki, K., Ogino, T., Goodman, S.B., Konttinen, Y.T., Takagi, M.: Toll-like receptors and their adaptors are regulated in macrophages after phagocytosis of lipopolysaccharide-coated titanium particles. *J Orthop Res* (2011).
38. Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., Ezekowitz, R.A.: Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-8 (1999).
39. Holzapfel, B., Wickert, L.: Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim 2007.
40. Hurley, J.C.: Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clin Microbiol Rev* 8, 268-92 (1995).
41. Janeway, C.A., Travers, P.: Immunobiology-The Immune System in Health and Disease. Auflage. In: (Hrsg.): Band 5. Volume, Garland Publishing Inc., London 2001.
42. Janeway, C.A., Jr.: Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1, 1-13 (1989).

43. *Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.*: Immunology. 6. Auflage. Garland Science, New York 2005.
44. *Jemt, T.*: Fixed implant-supported prostheses in the edentulous maxilla. A five-year follow-up report. *Clin Oral Implants Res* 5, 142-7 (1994).
45. *Jiang, Y., Mehta, C.K., Hsu, T.Y., Alsulaimani, F.F.*: Bacteria induce osteoclastogenesis via an osteoblast-independent pathway. *Infect Immun* 70, 3143-8 (2002).
46. *Johnson, G.K., Guthmiller, J.M., Joly, S., Organ, C.C., Dawson, D.V.*: Interleukin-1 and interleukin-8 in nicotine- and lipopolysaccharide-exposed gingival keratinocyte cultures. *J Periodontol Res* 45, 583-8 (2010).
47. *Joyee, A.G., Yang, X.*: Role of toll-like receptors in immune responses to chlamydial infections. *Curr Pharm Des* 14, 593-600 (2008).
48. *Kaisho, T., Akira, S.*: Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity. *Acta Odontol Scand* 59, 124-30 (2001).
49. *Kaisho, T., Akira, S.*: Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta* 1589, 1-13 (2002).
50. *Koch, F.P., Weng, D., Kramer, S., Biesterfeld, S., Jahn-Eimermacher, A., Wagner, W.*: Osseointegration of one-piece zirconia implants compared with a titanium implant of identical design: a histomorphometric study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 21, 350-6 (2010).
51. *Kohal, R.J., Weng, D., Bachle, M., Strub, J.R.*: Loaded custom-made zirconia and titanium implants show similar osseointegration: an animal experiment. *J Periodontol* 75, 1262-8 (2004).
52. *Leventhal, G.S.*: Titanium, a metal for surgery. *J Bone Joint Surg Am* 33-A, 473-4 (1951).
53. *Levin, J., Bang, F.B.*: The Role of Endotoxin in the Extracellular Coagulation of Limulus Blood. *Bull Johns Hopkins Hosp* 115, 265-74 (1964).
54. *Li, H., Lin, X.*: Positive and negative signaling components involved in TNFalpha-induced NF-kappaB activation. *Cytokine* 41, 1-8 (2008).
55. *Linkhart, T.A., Mohan, S., Baylink, D.J.*: Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 19, 1S-12S (1996).
56. *Liu, Z.G.*: Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Res* 15, 24-7 (2005).
57. *Masuda, T., Yliheikkila, P.K., Felton, D.A., Cooper, L.F.*: Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part I. In vivo studies. *Int J Oral Maxillofac Implants* 13, 17-29 (1998).
58. *Mayer, v.B.V., Frank I, Bieger W*: Titan: Garant für Biokompatibilität oder potentielles Allergen? *Umweltmedizin.de*, 2000.
59. *Mazzotti, F., Beuttler, J., Zeller, R., Fink, U., Schindler, S., Wendel, A., Hartung, T., von Aulock, S.*: In vitro pyrogen test--A new test method for solid medical devices. *J Biomed Mater Res A* 80, 276-82 (2007).
60. *Medzhitov, R., Janeway, C.A., Jr.*: Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9, 4-9 (1997).
61. *Medzhitov, R., Janeway, C.A., Jr.*: Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 295-8 (1997).
62. *Medzhitov, R., Janeway, C., Jr.*: Innate immunity. *N Engl J Med* 343, 338-44 (2000).
63. *Meffert, R.M.*: Endosseous dental implantology from the periodontist's viewpoint. *J Periodontol* 57, 531-6 (1986).
64. *Miyamoto, T., Okano, S., Kasai, N.*: Inactivation of Escherichia coli endotoxin by soft hydrothermal processing. *Appl Environ Microbiol* 75, 5058-63 (2009).
65. *Moesby, L., Hansen, E.W., Christensen, J.D., Hoyer, C.H., Juhl, G.L., Olsen, H.B.*: Dry and moist heat sterilisation cannot inactivate pyrogenicity of Gram positive microorganisms. *Eur J Pharm Sci* 26, 318-23 (2005).
66. *Muss, C., Mellinghoff, J*: Umweltmedizinische Aspekte für die Verwendung Zirkonoxid in der Zahnheilkunde. *Dtsch Zahnärztl Z* 62, 141-148 (2007).

67. *Nair, S.P., Meghji, S., Wilson, M., Reddi, K., White, P., Henderson, B.:* Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect Immun* 64, 2371-80 (1996).
68. *Nakata, T.:* Destruction of challenged endotoxin in a dry heat oven. *J Pharm Sci Technol* 48, 59-63 (1994).
69. *Nolan, T., Hands, R.E., Bustin, S.A.:* Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1559-82 (2006).
70. *Nowzari, H., Yi, K., Chee, W., Rich, S.K.:* Immunology, microbiology, and virology following placement of NobelPerfect scalloped dental implants: analysis of a case series. *Clin Implant Dent Relat Res* 10, 157-65 (2008).
71. *Nowzari, H., Phamduong, S., Botero, J.E., Villacres, M.C., Rich, S.K.:* The Profile of Inflammatory Cytokines in Gingival Crevicular Fluid around Healthy Osseointegrated Implants. *Clin Implant Dent Relat Res* (2010).
72. *Nuevo-Ordóñez, Y., Montes-Bayon, M., Blanco-Gonzalez, E., Paz-Aparicio, J., Raimundez, J.D., Tejerina, J.M., Pena, M.A., Sanz-Medel, A.:* Titanium release in serum of patients with different bone fixation implants and its interaction with serum biomolecules at physiological levels. *Anal Bioanal Chem* (2011).
73. *Oates, T.W., Cochran, D.L.:* Bone cell interactions and regulation by inflammatory mediators. *Curr Opin Periodontol* 3, 34-44 (1996).
74. *Oliva, J., Oliva, X., Oliva, J.D.:* Zirconia implants and all-ceramic restorations for the esthetic replacement of the maxillary central incisors. *Eur J Esthet Dent* 3, 174-85 (2008).
75. *Owczarzy, R., Vallone, P.M., Gallo, F.J., Paner, T.M., Lane, M.J., Benight, A.S.:* Predicting sequence-dependent melting stability of short duplex DNA oligomers. *Biopolymers* 44, 217-39 (1997).
76. *Perala, D.G., Chapman, R.J., Gelfand, J.A., Callahan, M.V., Adams, D.F., Lie, T.:* Relative production of IL-1 beta and TNF alpha by mononuclear cells after exposure to dental implants. *J Periodontol* 63, 426-30 (1992).
77. *Pesskova, V., Kubies, D., Hulejova, H., Himmlova, L.:* The influence of implant surface properties on cell adhesion and proliferation. *J Mater Sci Mater Med* 18, 465-73 (2007).
78. *Petkovic, A.B., Matic, S.M., Stamatovic, N.V., Vojvodic, D.V., Todorovic, T.M., Lazic, Z.R., Kozomara, R.J.:* Proinflammatory cytokines (IL-1beta and TNF-alpha) and chemokines (IL-8 and MIP-1alpha) as markers of peri-implant tissue condition. *Int J Oral Maxillofac Surg* 39, 478-85 (2010).
79. *Qiagen:* QuantiTect SYBR Green PCR Handbook. 1. Auflage. Epoch Biosciences Hilden 2003.
80. *Raetz, C.R.:* Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem* 59, 129-70 (1990).
81. *Ratner, B.D.:* Replacing and renewing: synthetic materials, biomimetics, and tissue engineering in implant dentistry. *J Dent Educ* 65, 1340-7 (2001).
82. *Roitt, I., Male, D., Brostoff, J., Roth, D.:* Immunology. 7. Auflage. Mosby London, 2006.
83. *Rychlik, W., Spencer, W.J., Rhoads, R.E.:* Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res* 18, 6409-12 (1990).
84. *Sarmiento-Gonzalez, A., Encinar, J.R., Marchante-Gayon, J.M., Sanz-Medel, A.:* Titanium levels in the organs and blood of rats with a titanium implant, in the absence of wear, as determined by double-focusing ICP-MS. *Anal Bioanal Chem* 393, 335-43 (2009).
85. *Sawase, T., Hai, K., Yoshida, K., Baba, K., Hatada, R., Atsuta, M.:* Spectroscopic studies of three osseointegrated implants. *J Dent* 26, 119-24 (1998).
86. *Schenk, R.K., Buser, D.:* Osseointegration: a reality. *Periodontol* 2000 17, 22-35 (1998).
87. *Sicilia, A., Cuesta, S., Coma, G., Arregui, I., Guisasola, C., Ruiz, E., Maestro, A.:* Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients. *Clin Oral Implants Res* 19, 823-35 (2008).
88. *Siddiqi, A., Payne, A.G., De Silva, R.K., Duncan, W.J.:* Titanium allergy: could it affect dental implant integration? *Clin Oral Implants Res* 22, 673-80 (2011).
89. *Slaets, E., Carmeliet, G., Naert, I., Duyck, J.:* Early trabecular bone healing around titanium implants: a histologic study in rabbits. *J Periodontol* 78, 510-7 (2007).

90. *Strietzel, R.*: Die Werkstoffkunde der Metall-Keramik-Systeme. 1. Auflage. Neuer Merkur Verlag, München 2005.
91. *Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S.*: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11, 443-51 (1999).
92. *Tan, P.L., Dunne, J.T., Jr.*: An esthetic comparison of a metal ceramic crown and cast metal abutment with an all-ceramic crown and zirconia abutment: a clinical report. *J Prosthet Dent* 91, 215-8 (2004).
93. *Vervaeke, S., De Bruyn, H.*: [Peri-implantitis]. *Rev Belge Med Dent* 63, 161-70 (2008).
94. *Weryha, G., Leclere, J.*: Paracrine regulation of bone remodeling. *Horm Res* 43, 69-75 (1995).
95. *Wintermantel E, S.-W.H.*: *Medizintechnik Life Science Engineering*. 4. Auflage. Springer, Berlin 2008.
96. *Wu, D.Y., Ugozzoli, L., Pal, B.K., Qian, J., Wallace, R.B.*: The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol* 10, 233-8 (1991).
97. *Zinger, O., Anselme, K., Denzer, A., Habersetzer, P., Wieland, M., Jeanfils, J., Hardouin, P., Landolt, D.*: Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials* 14, 2695-711 (2004).
98. *Zitzmann, N.U., Berglundh, T.*: Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol* 35, 286-91 (2008).

Anhang

8 Danksagung

Für das Zustandekommen einer solchen Arbeit ist immer die breite Unterstützung und Hilfe von Freunden, Kollegen und wissenschaftlichen Gesellschaften nötig, denen die folgende Danksagung gilt.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. M. Kern bedanken, der es mir ermöglicht hat, die vorliegende Arbeit anzufertigen, sowie für seine Hilfe, die erhobenen Daten auch international darzustellen. Herrn Dr. S. Harder möchte ich für die Unterstützung bei der Beschaffung von Fördergeldern, sowie für die freundliche Einführung in das Thema und die Unterstützung bei der Veröffentlichung der generierten Daten danken. Frau Dr. E. S. Quabius möchte ich für die unermüdliche Unterstützung gerade im biologischen Teil der Arbeit und die immer wiederkehrende Motivation bei der Vollendung herzlich danken. Frau Hilke Clasen möchte ich für die großartige Unterstützung und die Einführung in die molekularbiologischen Techniken insbesondere der RNA-Extraktion und den anschließenden qPCRs danken. Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. D. Kabelitz für die freundliche Aufnahme im Institut für Immunologie, in dessen Laborräumen der praktische Teil der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde.

Mein besonderer Dank gilt der DGPro (Deutsche Gesellschaft für Prothetische Zahnmedizin und Biomaterialien e.V.), die durch ihre finanzielle Unterstützung diese Arbeit ermöglicht hat.

Außerdem möchte ich Herrn Frank Lehmann danken. Ohne ihn wäre mir die grafische Darstellung der Daten für die internationalen Kongresse nicht in solcher Perfektion möglich gewesen.

Zum Schluss danke ich herzlichst meiner Familie für die Unterstützung nicht nur während der Anfertigung dieser Arbeit, sondern insbesondere auch dafür, dass sie mir meine Ausbildung ermöglicht hat.

Auch gilt mein Dank noch zahlreichen weiteren Personen die hier keine namentliche Erwähnung fanden, aber trotzdem zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

9 Veröffentlichungen

9.1.1 Originalarbeiten

Harder S, Quabius ES, Ossenkop L, Mehl C, Kern M. Surface contamination of dental implants assessed by gene expression analysis in a whole-blood in vitro assay. A preliminary study. *J Clin Periodontol* 2012;39:987-994.

Quabius ES, Ossenkop L, Harder S, Kern M. Dental implants stimulate expression of Interleukin-8 and its receptor in human blood. An in vitro approach. *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials* 2012;100:1283-1288.

9.1.2 Kongressbeiträge

Ossenkop L, Harder S, Quabius ES, Kern M. Surface pyrogen contamination of commercial dental implants. *J Dent Res* 2011, Spec Iss A, Abstr No 3412 (Posterpräsentation).

Ossenkop L, Quabius ES, Harder S, Kern M. Dental implants stimulate expression of Interleukin-8 and its receptor in human blood. 35th Annual Congress EPA 2011, Abstr No 46 (Posterpräsentation).

Quabius ES, Ossenkop L, Harder S, Kern M. Surface pyrogen contamination of dental-implants: effect on immune parameters in human-blood. 35th Annual Congress EPA 2011, Abstr No 65 (Kurzvortrag).

10 Lebenslauf

15.08.1984	Geboren in Hamburg
	Mutter: Dr. Christa Ossenkop
	Vater: Dr. Bernd Ossenkop
1990-1994	Grundschule Hainholz Elmshorn
1994-2003	Bismarck Gymnasium Elmshorn
2003	allgemeine Hochschulreife
2003-2004	Ableisten des Zivildienstes an der Raboisenschule Elmshorn
2004-2009	Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Dezember 2009	Staatsexamen
März 2010	Assistenz Zahnarzt in der Klinik für Zahnärztliche Prothetik, Propädeutik und Werkstoffkunde des UK SH Kiel

11 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Betreuer – und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.