

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Jörg Wiltfang)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Entwicklung der Periimplantitis im Knockoutmausmodell

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde der
Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

KATHRIN STEHLING, geb. LIEKFELD
aus **PASEWALK**

KIEL 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Stephan Thomas Becker

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Philip Rosenstiel

Tag der mündlichen Prüfung: 15.09.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 15.09.2017

gez.:

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. <u>Einleitung</u>	1
1.1. Aufbau des dentoalveolären Apparates	3
1.1.1. Alveolarknochen und Desmodont	3
1.1.2. Wurzelzement	3
1.1.3. Gingiva	3
1.2. Mukositis	4
1.3. Parodontitis	4
1.4. Periimplantitis	6
1.5. Anforderungen an Implantat-Werkstoffe	9
1.5.1. Titan	9
1.5.2. Osseointegration	9
1.6. Knockout-Maus	10
1.6.1. Herstellung von Knockout-Mäusen	11
1.7. NOD2	14
1.8. NOD2 und Parodontitis	15
2. <u>Fragestellung</u>	16
3. <u>Material und Methode</u>	18
3.1. Versuchstiere, Zusammensetzung der Tiergruppen und Haltung	18
3.1.1. Versuchstiere	18
3.1.2. Zusammensetzung der Tiergruppen	18
3.1.3. Haltung	18
3.2. Implantate und Ligaturen	19
3.2.1. Implantate	19
3.2.2. Ligaturen	19
3.3. Zeitstrahl, Operativer Eingriff, postoperative Haltung, Überwachung und Euthanasierung	20
3.3.1. Zeitstrahl	20

3.3.2.	Operativer Eingriff	20
3.3.3.	Postoperative Haltung	21
3.3.4.	Überwachung	22
3.3.5.	Euthanasierung	22
3.4.	Histologische Aufarbeitung	22
3.4.1.	Fixierung	22
3.4.2.	Entwässerung	23
3.4.3.	Einbettung	23
3.4.4.	Aufarbeitung	24
3.4.5.	Mikroradiographien	24
3.4.6.	O-Toluidinblau-Färbung	25
3.4.7.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	26
3.5.	Radiologische Diagnostik und Auswertung	26
3.6.	Histologische Diagnostik und Auswertung	27
3.7.	Statistische Auswertung	27
4.	<u>Ergebnisse</u>	28
4.1.	Tierüberleben	28
4.2.	Gewichtskontrolle	29
4.3.	Implantatüberleben	30
4.4.	Histologische Ergebnisse	32
4.4.1.	Normal (C57BL/6N) NUR Implantat	32
4.4.2.	Normal (C57BL/6N) Implantat UND Ligatur	34
4.4.3.	Knockout NUR Implantat	35
4.4.4.	Knockout Implantat UND Ligatur	37
4.5.	Mikroradiologische Ergebnisse	39
4.5.1.	Normal (C57BL/6N) NUR Implantat	39
4.5.2.	Normal (C57BL/6N) Implantat UND Ligatur	40
4.5.3.	Knockout NUR Implantat	41
4.5.4.	Knockout Implantat UND Ligatur	42
5.	<u>Diskussion</u>	43
5.1.	Wahl des Studiendesigns	44
5.2.	Untersuchungszeitraum	46

5.3.	Inseration der Implantate	47
5.4.	Wahl des Implantatdesigns und –materials	48
5.5.	Histologische Aufbereitung	50
5.6.	Wahl der Immundefizienz	50
6.	<u>Zusammenfassung</u>	53
7.	<u>Literaturverzeichnis</u>	55
8.	<u>Anhang</u>	63
8.1.	Tierversuchsantrag	63
9.	<u>Danksagung</u>	64
10.	<u>Lebenslauf</u>	65
11.	<u>Publikation</u>	66

Abkürzungsverzeichnis

aqua dest.	Aqua destillata
CARD15	Caspase Recruitment Domain
DNA	Desoxyribonukleinsäure
IL-1 β	Interleukin-1 β
KG	Körpergewicht
KIK	Knochenimplantatkontakt
LPS	Lipopolysaccharide
NDB	Nucleotide-binding-domain-Region
NF κ B	NF-Kappa-B-Signalweg
NOD1	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
MDP	Muramyl-Dipeptid
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha

1. Einleitung

In der zahnärztlichen Praxis hat sich im Verlauf der letzten zwei Jahrzehnte ein unübersehbarer Wandel vollzogen. Trotz der auf dem Vormarsch befindlichen Prophylaxe wird es auch in Zukunft Patienten geben, die einen Zahnverlust erleiden und denen mit dentalen Implantaten am ehesten im Sinne eines Zahnersatzes geholfen werden kann. Neben unfallbedingter und angeborener Zahnunterzahl nimmt vor allem die erhöhte Lebenserwartung mit spätem aber dennoch einsetzendem Zahnverlust die Hauptursache ein.

Höhere Versorgungsansprüche der Bevölkerung sprechen ebenfalls für die zunehmende Bedeutung der Implantologie. Letztlich werden erst dentale Implantate als „Zahnersatz“ im definitionsgemäßen Sinne gesehen (Brinkmann & Hartmann, 2000).

Die zahnärztliche Implantologie ist dank ihrer Fortschritte in den vergangenen 20 Jahren so mehr und mehr zum Versorgungsstandard für die Rehabilitation von voll- und teilbezahnten Patienten herangereift. Klinische und technische Entwicklungen haben das Indikationsspektrum für Implantatbehandlungen erweitert und diese Art der zahnärztlichen Versorgung auch niedergelassenen Praktikern zugänglich gemacht. In Deutschland setzen Zahnärztinnen und Zahnärzte sowie Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgen mittlerweile mehr als eine Million dentale Implantate pro Jahr, Tendenz steigend (DGI - Deutsche Gesellschaft für Implantologie im Zahn-, Mund- und Kieferbereich e. V., 2016)

Doch die routinemäßig durchgeführten Implantatversorgungen scheinen trotz hoher Erfolgsraten nicht nur mit nutzbringenden Effekten für den Patienten verbunden zu sein (Carcuac & Jansson, 2010). Neue Formen der Erkrankungen oraler Weich- und Hartgewebe wie die der periimplantären Mukositis und/oder Periimplantitis werden durch die Inserteration von Implantaten gefördert (Belibasakis G. N., 2014; Belibasakis et al., 2015).

Die Ursachen, die zu einem entzündlich bedingten Verlust periimplantärer Weich- und Hartgewebe führen, sind bis heute nicht definitiv geklärt (Pesce et al., 2014; Pirih et al., 2015). Offensichtlich ist die Identifizierung der entscheidenden Risikofaktoren durch die Komplexität der zugrunde liegenden Erkrankungsmechanismen sehr erschwert.

Einleitung

Die Prävalenz der Periimplantitis wird zum heutigen Zeitpunkt zwischen 10-16% und die einer Mukositis zwischen 40-48% eingeschätzt (Daubert et al. 2015; Mir-Mari et al. 2012; Swierkot et al. 2012). Die komplexen Zusammenhänge zwischen systemischen und lokalen Faktoren sowie ihre Auswirkungen auf die Krankheitsentstehung haben dazu geführt, dass in vielen Studien oftmals nur Teilbereiche der Pathogenese untersucht werden können. In klinischer Hinsicht erscheint es verständlicherweise naheliegend, von ähnlichen Erkrankungsmechanismen wie bei Gingivitiden und Parodontitiden auszugehen. Eine ganze Reihe epidemiologischer Untersuchungen weist außerdem auf Zusammenhänge zwischen einer Periimplantitis und einer therapierten beziehungsweise bestehenden Parodontitis hin. Dieser Zusammenhang könnte auf eine ähnliche Zusammensetzung der Bakterienflora und damit auf eine gemeinsame Erkrankungsursache schließen lassen (Carcuac & Jansson, 2010; Gatti et al., 2008; Koldslund et al., 2011; Renvert et al., 2014; Wilson, 2013). Patienten mit einer vorherigen akuten Parodontitis sollen demnach ein fünffach erhöhtes Risiko für eine Mukositis und sogar ein vierzehnfaches Risiko für eine Periimplantitis aufweisen (Swierkot et al., 2012). Bei genauerer Betrachtung sind jedoch Unterschiede im Keimspektrum parodontaler und periimplantärer Gewebe erkennbar.

Weitere Ursachen für periimplantäre Entzündungen können Zementüberschüsse im periimplantären Sulkus (Korsch et al., 2014; Korsch & Walther, 2014; Wilson, 2009) oder die Oberflächenbeschaffenheit von dentalen Implantaten sein. Weiterhin gelten, ähnlich wie bei der Parodontitis, systemische Erkrankung, wie unter anderem Diabetes und Herz-Kreislauf-Krankheiten, sowie Rauchen als spezifische Risikofaktoren für die Entstehung einer periimplantären Entzündung (Jepsen et al., 2015; Smeets et al., 2014). Die Eliminierung insbesondere des Risikofaktors Rauchen, eine gute häusliche Mundhygiene sowie ein regelmäßiger zahnärztlicher Recall stellen für viele Autoren grundlegende Maßnahmen sowohl zur Prävention als auch für das Management periimplantärer Weich- und Hartgewebe dar (Corbella et al., 2011; Costa et al., 2012; Hsu et al., 2014; Jepsen et al., 2015; Mishler und Shiau, 2014; Renvert et al., 2013; Serino et al., 2014). Jedoch können präventive und therapeutische Maßnahmen nur dann zielgenau und effizient eingesetzt werden, wenn die Ätiologie und der Pathomechanismus einer Erkrankung bekannt sind. Diese tierexperimentelle Arbeit soll dazu einen Beitrag leisten.

1.1. Aufbau des dentoalveolären Apparates

Der Begriff Parodont (griechisch: para: neben, bei, entlang; odons: Zahn) beschreibt das funktionelle Verankerungssystem der Zähne. Dieser sogenannte Zahnhalteapparat besteht aus vier Komponenten: dem Alveolarknochen (Kieferknochen), der Gingiva (Zahnfleisch), dem Wurzelzement und dem Desmodont (Wurzelhaut).

1.1.1. Alveolarknochen und Desmodont

Der ca. 200 µm breite Spalt zwischen Zahnwurzel und Alveolarknochen wird von einem diffizilen Geflecht aus Kollagenfasern durchzogen und Desmodont genannt (Lüllmann-Rauch, 2003). Die auch als Sharpey-Fasern bezeichneten Kollagenfasern verlaufen in unterschiedlichen Richtungen vom Kieferknochen zum Zement und sorgen für eine federnde Aufhängung des Zahnes im Knochenfach. Bei Belastung wird der Knochen somit stets auf Zug beansprucht. Ferner inserieren in den Desmodontalspalt auch Nervenfasern sowie Lymph- und Blutgefäße.

1.1.2. Wurzelzement

Das ca. 100-150 µm dicke Wurzelzement ist der Zahnwurzel, genauer dem Wurzelzementin, flächig aufgelagert und ähnelt in seinem histologischen Aufbau dem Knochen (Lüllmann-Rauch, 2003). Hier inserieren die oben genannten desmodontalen Kollagenfasern und befestigen demzufolge die Wurzel im Alveolarknochen.

1.1.3. Gingiva

Die Gingiva, auch marginales Parodont genannt, umgibt auf Höhe des Zahnhalses als keratinisiertes Weichgewebe den Zahn und den koronalen Anteil des Alveolarknochens. Dieses ca. 3 mm breite, unverschiebliche Zahnfleisch geht an der mukogingivalen Grenzlinie in die verschiebliche Alveolar- und Mundbodenschleimhaut über. Zahnwärts vom Gingiva-Rand liegt der Sulkus (sulcus gingivalis). Hierbei handelt es sich um eine ca. 0,5 mm tiefe Rinne, an deren Boden das Saumeepithel folgt. Das Saumeepithel sorgt als eine Art Manschette für einen annähernd lückenlosen Anschluss der Gingiva zum Zahn (Lüllmann-Rauch, 2003).

1.2. Mukositis

Bei der Mukositis handelt es sich um eine reversible Entzündung des periimplantären Weichgewebes (Albrektsson et al., 1994). Sie ist das erste Anzeichen einer potentiell akzelerierenden Erkrankung im Mundraum.

Die periimplantäre Mukosa ist auf zweierlei Weise mit der Oberfläche von Implantaten verbunden: Koronal befindet sich eine dem Saume epithel entsprechende Epithelbarriere, die etwa 2 mm lang ist. Daran schließt sich eine etwa 1-1,5 mm breite Zone von fibrösem Bindegewebe an. Die kollagen Faserbündel verlaufen parallel zur Implantatoberfläche und inserieren teils im Periost (Knochenhaut) des Kieferknochens. Kommt es nun zu ungestörter Plaqueakkumulation oder Fremdkörperinserteration im Bereich oraler Implantate entwickeln sich entzündliche Läsionen in der periimplantären Schleimhaut. Frühe Wirtsreaktionen entsprechen im Großen und Ganzen denen der oralen Gingiva. Bei langandauernden Plaqueauflagerungen scheinen diese Läsionen sich jedoch schneller in apikaler Richtung zu entwickeln (Müller, 2006). Es kommt zur Erweiterung der Gefäße, Erhöhung der Sulkusfluid-Fließrate, Schwellung und Blutung bei Sondierung (Khammissa et al., 2012; Astatov-Frauenhoffer et al., 2013; Wilson, 2013; Schwarz et al., 2008).

Beim Ausbleiben von Therapien, wie zum Beispiel der Politur der Zahnoberfläche oder dem Entfernen des Fremdkörpers, ist die Mukositis als Vorstufe einer Parodontitis oder einer Periimplantitis zu verstehen. Die jeweiligen Übergänge sind dabei fließend und klinisch nicht eindeutig abgrenzbar (Schwarz et al., 2008).

1.3. Parodontitis

Bei der Parodontitis (griechisch: para: neben, bei, entlang; odons: Zahn; -itis: Entzündung) handelt es sich um einen bakteriell induzierten entzündlichen Abbau des Zahnhalteapparats mit potentiell ansteckender Wirkung. Eine Parodontitis beginnt immer mit einer Gingivitis (griechisch: gingiva: Zahnfleisch; -itis: Entzündung), die sich durch Schwellung, Rötung und Blutung der Gingiva bemerkbar macht. Ursache ist die Ansammlung von Bakterien in Form von Plaque, welche aus Zahnbelägen, die nicht ausreichend bei der Mundhygiene eliminiert wurden, besteht.

Einleitung

Bei weiterer Akkumulation bakterieller Plaque entwickeln sich nach unbestimmter Zeit etablierte Läsionen und es kommt zur Ausbildung einer Zahnfleischtasche mit einer subgingivalen bakteriellen Mikroflora (Müller, 2006). Schreitet die Plaquefront über die Schmelz-Zement-Grenze des Zahnes hinaus, wird das Stadium der Parodontitis erreicht. Sie zeichnet sich durch den in der Regel apikal gerichteten und lateral begrenzten, progredienten Verlust von Teilen des Parodontiums aus. Bei fulminanten Verläufen kommt es neben dem Knochenabbau zur Zahnlockerung und final zum Zahnverlust.

Man kann mehrere Formen der Parodontitis unterscheiden. Die aktuelle Klassifikation der Parodontalerkrankungen basiert auf den Beschlüssen des „International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions“ aus dem Jahr 1999. Allen gemein ist, dass aus dem Biofilm bakterielle Stoffwechsel- und Zerfallsprodukte freigesetzt werden, welche die körpereigene Abwehr in Gang setzen. Der Versuch des Wirts die pathogenen Bakterien durch die Immunreaktion zu beseitigen stellt gleichzeitig den Hauptanteil der parodontalen Destruktion dar.

Die Mundhöhle wird von mehr als 500 verschiedenen Bakterien kolonisiert, von denen die meisten unbedeutend (residente Flora) und nützlich (kommensale Flora) sind (Slot & Taubermann, 1992; Moore 1994; Socransky et al., 2000). Nur wenige Bakterien sind parodontalpathogen, also krankheitserregend. Diese werden als Marker- oder Hauptleitkeime bezeichnet und sind obligat (immer) oder fakultativ (nach Bedarf) anaerob und gramnegativ. Davon sind Pathogene mit starker Assoziation zu Parodontalerkrankungen unter anderem *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Tannerella forsythia* (Müller, 2006).

Das Vorhandensein dieser krank machenden Mikroorganismen bedeutet aber nicht zwangsläufig den Ausbruch der Erkrankung. Vielmehr spielen erworbene und verhaltensbedingte Risikofaktoren wie Diabetes mellitus Typ I oder II, Tabakkonsum, HIV-Infektion, Medikamenteneinnahme, möglicherweise Stress und wahrscheinlich Osteoporose sowie genetische Faktoren wie beispielsweise Interleukin-1-Polymorphismen eine Rolle (Müller, 2006).

1.4. Periimplantitis

Analog zur Parodontitis handelt es sich bei der Periimplantitis (griechisch: peri: um etwas herum; plantare: pflanzen; -itis: Entzündung) ebenfalls um einen plaqueinduzierten Knochenabbau. Gegenüber der Mukositis ist die Periimplantitis eine progressiv-irreversibel verlaufende Entzündungssymptomatik des periimplantären Weich- und Hartgewebes, welche mit Knochenresorption, herabgesetzter Osseointegration, gesteigerter Taschentiefe und Pusbildung einhergeht (Khammissa et al., 2012; Astatov-Frauenhoffer et al., 2013; Wilson, 2013; Schwarz et al., 2008).

Histopathologisch unterscheidet sich die Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrats bei der Periimplantitis nicht grundsätzlich von der Parodontitis (Mombelli et al., 1987). Als pathogene Leitkeime werden häufig Spektren aus unter anderem *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*, *Streptococcus constellatus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* und *Treponema denticola* nachgewiesen. Ein wesentlicher Unterschied zur Parodontitis besteht allerdings darin, dass neben den oben genannten Leitkeimen insbesondere *Staphylococcus aureus* eine besondere Rolle für die Periimplantitis zu spielen scheint. Salvi et al. (2008) stellten für diesen Keim eine hohe Titanaffinität fest.

Der histologische Aufbau von Weich- und Hartgeweben an enossalen Implantaten unterscheidet sich von den eingangs geschilderten anatomischen Strukturen des Zahnhalteapparats. Vergleicht man das physiologische Parodont mit der periimplantären Mukosa fällt auf, dass die Ausdehnung des entzündlichen Infiltrats bei einer periimplantären Entzündung gravierender verläuft. Zitzmann und Berglundh (Zitzmann & Berglundh, 2008) sowie Schwarz et al. (2008) fassten zusammen, dass bei der periimplantären Mukosa mikroskopisch direkter Knochen-Implantat-Kontakt besteht, subepithelial mehr Kollagenfasern und weniger Fibroblasten sowie Gefäße vorhanden sind und die Kollagenfasern zur Implantatoberfläche parallel verlaufen. So besitzt ein Implantat keinen dem Zahn vergleichbaren Abwehrmechanismus. Klinisch entzündungsfreie periimplantäre Mukosa wird von einem keratinisierten Epithel bedeckt, welches histologisch dem oralen Epithel gesunder Gingiva entspricht. Es setzt sich Richtung Implantat in einem ca. 2 mm langen Saume epithel fort, welches in eine Bindegewebszone von ungefähr 1-2 mm Höhe übergeht und sich dann dem

Einleitung

knöchernen Implantatbett anlegt (Berglundh & Lindhe, 1996). Die Kollagenfasern des periimplantären Bindegewebes zeigen andere Eigenschaften als die des Zahnfleischs. Sie inserieren meist in groben Bündeln im Periost des marginalen Knochens und sind mehr oder weniger parallel zur Implantatoberfläche ausgerichtet. Im Sinne eines Narbengewebes enthält die periimplantäre Mukosa deutlich mehr Kollagen als die Gingiva, aber weniger Fibroblasten als entsprechende Teile des Zahnfleischs (Kornman et al., 1997 b).

Die Blutversorgung der periimplantären Mukosa erfolgt, anders als beim Zahnfleisch, lediglich über einen Weg, nämlich über die großen supraparietal verlaufenden Blutgefäße an der Außenseite des Alveolarknochens. Aus diesem Grund und aufgrund des Fehlens der zemento-gingivalen Faserbündel kann die periimplantäre Entzündung im Vergleich zur Parodontitis deutlich rascher in die tieferen Bindegewebs- und krestalen Schichten vordringen.

Mombelli (Mombelli 1997) beschreibt fünf Eigenschaften der Periimplantitis:

1. Radiologisch nachgewiesener vertikaler Abbau des krestalen Knochens,
2. Entstehung einer periimplantären Tasche,
3. Blutung und eventuell Pusentleerung bei leichter Sondierung,
4. Gingivale Schwellung und Rötung und
5. Eine häufig schmerzfreie Situation.

Wie oben aufgeführt, sollte die Sondierung bei minimalem Kräfteinsatz erfolgen, wobei der sogenannte „platform switch“ (Implantatdurchmesser kleiner als Abutmentdurchmesser) die Sondierung erschweren und so das wahre Ausmaß einer Periimplantitis verbergen kann (Al-Nsour et al., 2012).

Je nach Art des Knochendefekts unterscheidet Schwarz et al. (2008) weiterhin einen intraossären Klasse I-Defekt von einem supraalveolären Klasse II-Defekt am krestalen Implantatübergang. Nach Spiekermann (1984) können außerdem horizontaler- (Klasse I), schüsselförmiger- (Klasse II), trichter- und spaltförmiger- (Klasse III a, b) sowie horizontal-zirkulärer Knochenabbau (Klasse IV) charakterisiert werden.

Als allgemeine Risikofaktoren für die Entwicklung einer Periimplantitis gelten eingeschränkte Mundhygiene, mangelnde Compliance, vorausgegangene Gingivitiden und Parodontitiden mit besonderer Beachtung der Restbezaehlung und

Einleitung

Weichgewebsschäden beziehungsweise qualitativ minderwertiges Weichgewebe am Ort der Insektion (Schwarz et al., 2008; Charyeva et al., 2012; Huynh-Ba et al., 2008; Lorenz & Klang, 2013; Smeets et al., 2014).

Auch Nikotinabusus und systemische Erkrankungen, wie Diabetes oder Immunsuppression, gelten als spezifische Risikofaktoren für die Entstehung einer periimplantären Entzündung (Jepsen et al., 2015; Smeets et al., 2014).

Im Unterschied zur Parodontitis kann eine Periimplantitis auch iatrogen durch einen im Sulkus befindlichen Fremdkörper ausgelöst werden. Dabei handelt es sich häufig um dentale Restaurationszement. Diese durch „Zementitis“ induzierte Periimplantitis liegt bei fast jedem 5. Implantat vor, wobei die Entfernung der Zementreste zu einem Rückgang der Entzündungsreaktion um fast 60% führt (Korsch et al., 2014).

Therapeutisch steht die Behandlung der periimplantären Mukositis an oberster Stelle. Dementsprechend sollte die Remotivation zu effektiver Mundhygiene, die mechanische Implantatreinigung mit speziellen Instrumenten (Titan- und Kunststoffküretten, Ultraschall, Pulverstrahl, photodynamische Therapie), die topische Applikation (zum Beispiel Betaisodonna) und/oder die orale Gabe (Chlorhexidylglukonate, Fluoride, Wasserstoffperoxid, Natriumperkarbonat) von Antiseptika sowie gegebenenfalls eine chirurgische Korrektur bei ungünstiger Weichgewebsmorphologie erfolgen. Bei fortgeschrittenen Periimplantitiden sind zusätzliche chirurgische Maßnahmen erforderlich. Hier werden gemäß der Gesamtstudienlage bezüglich chirurgischer Augmentationsansätze häufig autologe, allogene und xenogene Biomaterialien als Augmentationsmaterialien bei knöchernen Defekten verwendet, wobei allogene und xenogene Transplantate dem autologen Material nahezu gleichwertig sind (Fischer et al., 2011; Smeets et al., 2014 b). Die am häufigsten angewandte chirurgische Intervention stellt dabei die parodontale Lappenoperation mit Osteoplastik (47%), gefolgt vom Einsatz von Knochenmaterialien (20%) dar (Lagervall et al., 2013). Dabei konnte für beide Verfahren kumuliert eine Erfolgsrate von 69% verzeichnet werden, welche bei Patienten mit Risikofaktoren wie Rauchen, Parodontitis und schlechter Mundhygiene signifikant niedriger war.

Bei Mobilität des Implantats ist als ultima ratio nur die Explantation zu sehen.

1.5. Anforderungen an Implantat-Werkstoffe

Um eine dauerhafte Einheilung und einen guten Weichgewebsabschluss beim Durchtritt durch die orale Mukosa zu ermöglichen, müssen Implantat-Werkstoffe einerseits eine ausreichende Sicherheit gegenüber mechanischem Versagen bieten und andererseits gewebeverträglich sein. Damit das Kriterium der sogenannten Biokompatibilität erfüllt ist, darf der Werkstoff während der Implantationszeit weder vom Wirtsorganismus abgebaut, noch das Material in Form von Korrosionsprodukten freigesetzt werden.

Als Werkstoffe für dentale Implantate eignen sich daher heutzutage vor allem Titan und Zirkoniumdioxid.

1.5.1 Titan

Titan ist ein in der Erdkruste vorkommendes chemisches Element. Es gehört aufgrund seiner geringen Dichte von $4,5 \text{ g/cm}^3$ zu den Leichtmetallen und steht im Periodensystem in der IV. Nebengruppe, der sogenannten Titangruppe. Titan wird aus natürlichen Lagerstätten mit titanhaltigen Mineralen, vor allem Ilmenit (FeTiO_3) und Ruti (TiO_2) gewonnen (Strub, Kern, Türp, Witkowski, Heydecke, & Wolfart, 2011).

Es genügt in seiner Reinform nicht den Anforderungen für Implantatkörper in der Mundhöhle und muss daher über das Zulegieren von anderen Metallen verfestigt werden.

Titan bildet an der Luft eine äußerst widerstandsfähige Oxidschicht (Passivierungsschicht) aus. Dies macht Titan in vielen Medien korrosionsbeständig. Es zeichnet sich folglich durch eine hervorragende Biokompatibilität aus, welche in zahlreichen In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen nachgewiesen werden konnte (Lautenschlager & Monaghan, 1993). Titan wird daher neben enossalen Implantaten auch unter anderem in Form von Osteosyntheseplatten und in der Hüftprothetik erfolgreich angewandt.

1.5.2. Osseointegration

Der von Brånemark 1966 erstmals beschriebene Vorgang der Osseointegration (lateinisch: Os: Knochen; integrare: einbinden) beschreibt einen im lichtmikroskopischen Bereich sichtbaren direkten funktionellen und strukturellen

Verbund zwischen dem organisierten lebenden Knochengewebe und der Oberfläche eines belasteten Knochenimplantats (Brånemark, Zarb, & Albrektsson, 1985).

Er ist bei Titanimplantaten aufgrund der Oxidschicht möglich. Hierbei kommt es zu einem funktionell knöchernen Einbauprozess des Implantats im Knochen. Dieser Heilungsprozess basiert darauf, dass Osteoblasten an die mikrorauhe Oberfläche des Implantats heranwachsen und dort einen zirkumferenten Defektknochen bilden. Dabei kommt es allerdings nicht zum vollständigen Einbau des Implantats in den Knochen. Es verbleiben Areale in denen sich kein Knochen sondern vielmehr ein Gerüst aus unter anderem Osteopontin und Osteocalcin ausbildet. Heute wird die Osseointegration daher mit dem klinischen Begriff „Bone to Implant Contact“ beschrieben, der im Bereich von 40-60% liegt (Goto, 2014).

1.6. Knockout-Maus

Eine Knockout-Maus (englisch: knock-out: außer Gefecht setzen) ist eine Maus, bei der mittels einer genetischen Manipulation ein ganz bestimmtes Gen gezielt ausgeschaltet wurde, um dessen Wirkungen zu prüfen.

Die Wissenschaftler Mario Capecchi und Oliver Smithies waren es, die auf die Idee kamen, die Fähigkeit der homologen Rekombination von Säugerzellen zu nutzen, um gezielt Gene auszutauschen (Mak, 2007). Sir Martin John Evans entdeckte eine Möglichkeit, Erbinformationen in die Keimbahn eines Organismus einzuschleusen (Evans, Carlton, & Russ, 1997). Schlussendlich führte die Kombination beider Methoden im Jahre 1989 zur Herstellung des ersten Knockout-Mausstammes, einem Mäusestamm, bei dem ein bestimmtes Gen dauerhaft ausgeschaltet war. Der Beitrag dieser 3 Wissenschaftler zur Forschung wurde 2007 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin honoriert.

Um nun die Wirkung des Knockout-Gens untersuchen zu können, benötigt man zwei Mäusestämme, die in sämtlichen Genen identisch sind und sich nur in dem Knockout-Gen unterscheiden. Bei dem ersten Stamm ist das Gen intakt, bei dem zweiten defekt. Dann müssen Unterschiede im Körperbau oder der Physiologie auf dieses Gen zurückgeführt werden. Daher benötigt man für dieses Experiment von vornherein einen Mäusestamm, bei dem alle Tiere den gleichen genetischen Hintergrund haben. Es werden deshalb Inzuchttiere verwendet. Diese Inzucht wird

schon seit einigen hundert Generationen durch konsequente Bruder-Schwester-Verpaarung erreicht, was dazu führt, dass sich die Tiere genetisch gar nicht oder nur sehr geringfügig unterscheiden.

Mit Knockout-Tieren kann daher nicht nur eine konkrete Krankheit untersucht werden. Man kann auch ganz grundsätzlich die Frage stellen, wozu ein Gen im Körper dient.

Mit Hilfe von Knockout-Mäusen lassen sich zahlreiche Krankheiten des Menschen in einem genetisch definierten Kleintiermodell generieren, das schnell, kostengünstig und in großer Zahl verfügbar ist. Man verspricht sich aus diesen Untersuchungen Rückschlüsse auf die Bedeutung bestimmter Gene bei der Entstehung und dem Verlauf von Krankheiten ziehen zu können und entsprechende Therapiemöglichkeiten zu etablieren.

1.6.1. Herstellung von Knockout-Mäusen

Basis des gezielten Gen-Knockouts ist die Tatsache, dass fast alle Gene der Säugerzellen immer in zwei identischen Kopien vorliegen, auf jedem Chromosomen-Paar eine. Säugerzellen besitzen die Fähigkeit, gleiche DNA-Bereiche zwischen homologen Chromosomen wechselseitig auszutauschen. Dieser als homologe Rekombination bezeichnete Mechanismus dient beispielsweise der Neukombination des Erbgutes während der Meiose. Homologe Rekombination findet aber nicht nur zwischen Chromosomenpaaren, sondern auch zwischen einem rekombinanten DNA-Molekül (Vektor), welches künstlich in die Zelle eingebracht wurde und einem Chromosom statt.

Dieses Geschehen wurde für die gezielte Geninaktivierung in Säugerzellen adaptiert (Braun & Willnow, 1996). Es handelt sich um ein Verfahren, durch das an einer gezielt ausgesuchten Stelle im Erbgut eine beliebige andere Sequenz eingesetzt werden kann.

Für die Erzeugung von Knockout-Mäusen werden Stammzellen von Mäusen verwendet, die aus Blastozysten entnommen wurden. Die entnommenen Stammzellen können durch Zugabe von Wachstumsfaktoren beliebig in vitro vermehrt und am Leben gehalten werden. Diese Stammzellen werden nun durch homologe Rekombination genetisch verändert. An die Stelle eines ausgesuchten intakten Gens setzt man eine künstlich hergestellte Sequenz, einen

Einleitung

Inaktivierungsvektor. Dieser besteht aus dem zu inaktivierenden Gen, das eine Mutation trägt. Der Inaktivierungsvektor muss wichtige Eigenschaften bedienen. Zum einen soll er einen Marker enthalten, der dazu dient diejenigen Zellen später positiv zu filtern, die das veränderte Erbgut besitzen. In der Regel wählt man hierfür das Neomycinresistenzgen. Bei Zugabe von Neomycin (Antibiotikum) sterben alle Zellen, die die Sequenz nicht integriert haben.

Zum anderen ist noch ein Marker erforderlich, mit welchem man testen kann, ob der Einbau des Inaktivierungsvektors an der richtigen Stelle im Maus-Genom erfolgt ist. Hierfür wird das Gen für die Thymidinkinase des Herpes-Simplex-Virus genutzt. Bei der anschließenden Behandlung mit einem Virostatikum (zum Beispiel Ganciclovir) wird ein Produkt gebildet, welches die Verdopplung der DNA hemmt. Dieser Marker dient also dazu die Zellen bei denen eine homologe Rekombination aufgetreten ist von solchen zu unterscheiden bei denen eine zufällige Integration aufgetreten ist. Die Zellen, in denen die Sequenz sich an einer falschen Stelle integriert hat, werden nun abgetötet. Der Inaktivierungsvektor wird mittels Elektroporation, Mikroinjektion oder einem anderen geeigneten Verfahren in die Stammzelle eingeführt. Die Elektroporation beschreibt einen Prozess, bei dem die Stammzellmembran durch einen elektrischen Strom so durchlässig gemacht wird, dass die künstlichen DNA-Moleküle eindringen können. Bei der Mikroinjektion wird mittels einer Mikrokapillare der DNA-Vektor direkt in den Zellkern beziehungsweise in das Zytoplasma der Zelle injiziert. In den Stammzellen kommt es nun durch homologe Rekombination zu einem wechselseitigen Austausch der Genbereiche des Vektors und des chromosomalen Genortes.

Diese mutierten Stammzellen werden nun vermehrt und erneut in Blastozysten injiziert, welche wiederum einer scheinchwangeren Maus implantiert werden. Die heranwachsenden Tiere (Chimäre) enthalten Gewebe aus einer Mischung von Zellen der Blastozyste und der genetisch veränderten Stammzellen (Deutsches Ärzteblatt, 1996). Man nennt diese Tiere also Chimäre, weil deren Körperzellen nicht alle dasselbe Erbgut enthalten. Der Anteil beider Zelltypen an der Chimäre lässt sich beispielsweise an der Fellfärbung abschätzen, da die Blastozysten aus einem Mausstamm mit zum Beispiel schwarzer Fellfarbe, die Stammzellen dagegen aus einem Stamm mit brauner Färbung gewonnen werden. Im gleichen Verhältnis, in dem braune und schwarze Flecken das Fell ausbilden, sind beide Zelltypen auch in allen anderen Geweben einschließlich der Keimbahn vertreten. Um nun Tiere zu

Einleitung

erhalten, welche ausschließlich Körperzellen mit heterozygotem Gendefekt tragen, wird die Chimäre mit einer normalen Inzuchtmaus gekreuzt. Die Nachkommen sind meist homozygot (gesund), aber einige von ihnen tragen das veränderte Gen, weil die Ei- oder Samenzelle von der eingesetzten Stammzelle abstammt. Sie sind heterozygot. Diese heterozygoten Tiere müssen nun durch Untersuchungen des Erbgutes herausgefunden werden. Von solchen heterozygoten Tieren benötigt man ein Weibchen und ein Männchen. Diese werden miteinander gekreuzt, die sogenannte konsequente Bruder-Schwester-Verpaarung. 25% der Nachkommen dieses Paares müssen homozygot krank sein. Damit ist das gesteckte Ziel erreicht. Es sind homozygot-defiziente Knockout-Mäuse entstanden.

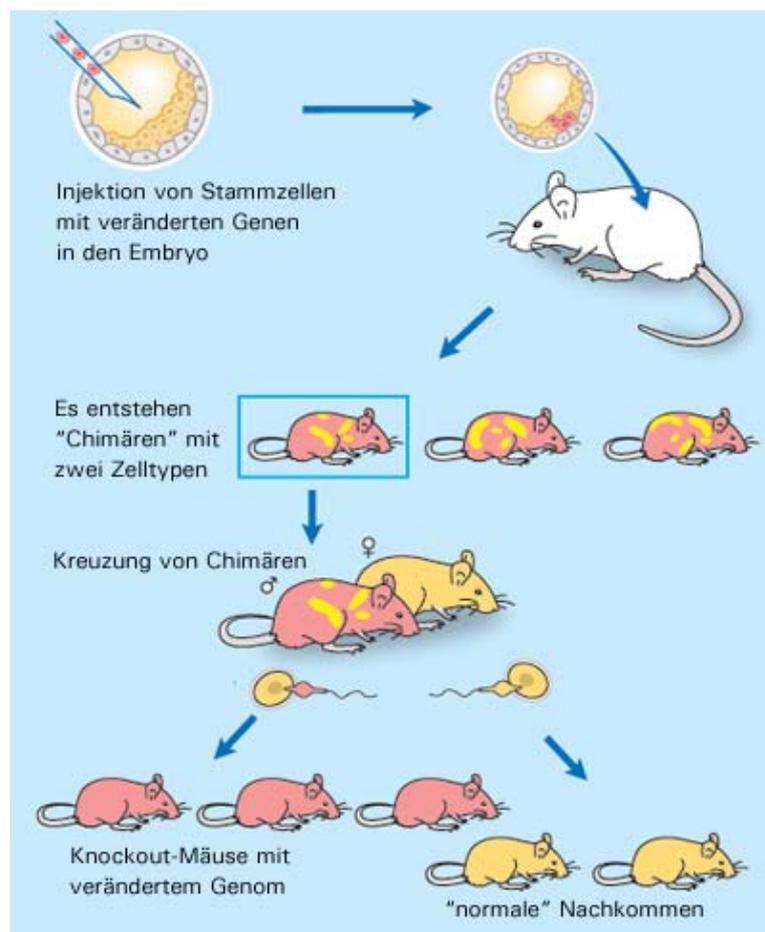


Abb. 1.1. Schematische Darstellung der Produktion von Knockout-Mäusen (in Anlehnung an Nobelfoundation, 2007)

Die gezielte Geninaktivierung mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen stellt eine effiziente und hilfreiche Technik dar, die die Herstellung und Verfügbarkeit präzise definierter Tiermodelle mit menschlichen Erkrankungen ermöglicht. Sie hat sich daher rasant zu einem wichtigen Bereich der medizinischen Forschung entwickelt (Braun & Willnow, 1996).

1.7. NOD2

Das Protein NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2) ist ein intrazellulärer Rezeptor für Fremdstoffe im angeborenen Immunsystem der Säugetiere (Ogura et al., 2001 a).

Es wurde im Jahre 2001 auf Chromosom 16 von zwei unterschiedlichen Arbeitsgruppen als erstes Crohn-assoziiertes Gen identifiziert (Ogura et al., 2001 a; Hugot et al., 2001). Man fand in Chromosom 16 eine Sequenz, die zur Expression eines Peptids führte, dessen Nucleotide-Binding-Domäne-Region (NDB) signifikant mit der des bereits zuvor entdeckten NOD1 übereinstimmte. Aus diesem Grund wurde dieses Protein, zusammengesetzt aus 1040 Aminosäuren, welche zu 34% der Aminosäuresequenz des NOD1 entsprechen, als NOD2/CARD15 bezeichnet und der NOD1-Familie zugeordnet (Ogura et al., 2001 b). Im Gegensatz zu NOD1 wird NOD2 hauptsächlich zytosolisch von Monozyten, Makrophagen (Ogura et al., 2001 b), aber auch von dendritischen Zellen, Granulozyten (Gutierrez et al., 2002) und intestinalen Epithelzellen, wie beispielsweise Paneth-Zellen exprimiert (Lala, et al., 2003).

Als sogenannter Pattern-Recognition Rezeptor (englisch: pattern: Muster; recognition: Erkennung; receptor: Empfänger) erkennt NOD2 Pathogene anhand charakteristischer Muster und fungiert als Auslöser einer komplexen Signalkaskade, die wesentlich an der Einleitung der Immunantwort beteiligt ist. Er erkennt insbesondere das bakterielle Muramyl-Dipeptid (MDP) als kleinsten Bestandteil bakteriellen Peptidoglykans (Girardin, et al., 2003). Nach Stimulation von NOD2 mit MDP kommt es zu einer Aktivierung des NF-Kappa-B-Signalweges (NFκB). Dieser evolutionär konservierte Signalweg spielt eine essentielle Rolle in der Regulation diverser Gene, die mit der Entwicklung angeborener und adaptiver Reaktionen zur Erkennung und immunologischer Kontrolle pathogener Organismen assoziiert sind. Es kommt zu einer erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin-1β (IL-1β), Interleukin-12 und Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF-α). Die Aktivierung von NFκB gilt als kritisch für die Entstehung von Entzündungen. Zusammen mit NOD1 ist NOD2 damit ein zentraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems.

Neuere Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass NOD2 neben bakteriellen auch virale Muster erkennt und als Folge dessen die virale Immunkaskade aktiviert. (Sabbah & Chang, 2009).

1.8. NOD2 und Parodontitis

Bei der Pathogenese der marginalen Parodontitis spielen Monozyten und Makrophagen mit ihren Entzündungsmediatoren TNF- α beziehungsweise IL-1 β eine entscheidende Rolle (Shapira et al., 2001). In Anwesenheit von Lipopolysacchariden (LPS), welche aus der Zellwand gramnegativer Bakterien stammen, werden die Entzündungsmediatoren über den Weg des Transkriptionsfaktors NF κ B synthetisiert und freigesetzt (Nichols et al., 2001). Die freigesetzten proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β sind die Protagonisten des chronischen parodontalen Entzündungsgeschehens. Sie sind die Schlüsselregulatoren der Immunabwehr schlechthin, können aber auch, je nach Konzentration, gewebschädigende Wirkung haben. Beide Zytokine wurden in erhöhter Konzentration im Sulkusfluid und im parodontalen Gewebe bei chronischen Parodontitiden nachgewiesen (Schwartz et al., 1997) und sind im Rahmen der Pathogenese wohl am besten erforscht. Die Wirkung der beiden Substanzen kann als synergistisch bezeichnet werden. Wie bei anderen Zytokinen auch, haben sie autokrine und parakrine Wirkung. Unter physiologischen Bedingungen, das heißt, bei niedrigen Konzentrationen, liegt die Hauptfunktion der Zytokine in der Entzündungsförderung.

Im NOD2/CARD15-Gen wurde in mehreren Studien im Zusammenhang mit der chronisch entzündlichen Magen-Darm-Erkrankung Morbus Crohn eine Punktmutation beschrieben. In vitro führte dieses defekte Protein nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (Ogura et al., 2001 a) zu einer signifikant verminderten Aktivierung des NF κ B im Vergleich zu Zellen mit unverändertem Protein. Folglich ist die Bildung der proinflammatorischen Zytokine, u.a. TNF- α , reduziert.

Nachdem die Destruktion parodontalen Stützgewebes vor allem über proinflammatorische Zytokine vermittelt wird, könnte die Mutation des NOD2 Gens auch im Zusammenhang mit der Pathogenese der Periimplantitis stehen. Die vorliegende Studie soll Aufschluss über einen möglichen Zusammenhang zwischen der NOD2/CARD15-Mutation und einer Periimplantitis im Mausmodell geben.

2. Fragestellung

Aufgrund des häufig auftretenden Krankheitsbildes der Periimplantitis und dem noch geringen Wissen um die genetische Entstehung der Erkrankung ist die weitere Erforschung der Pathogenese sinnvoll.

In vitro-Untersuchungen stellen eine starke Reduktion der Komplexität des Organismus dar. Die Wirkweise von Substanzen lässt sich so nur in einzelnen Zellpopulationen erfassen. Eine Darstellung von komplexen Signalwegen und Interaktionen innerhalb verschiedener Zellpopulationen, wie sie gerade im Verlauf der immunologischen Prägung stattfindet, ist nicht möglich.

Erst in einem in vivo-Modell zeigt sich, ob sich die erhobene Hypothese auf einen komplexen Organismus übertragen lässt. Das Tiermodell ist somit unerlässlich. Es existieren bisher Tiermodelle der Parodontitis für größere Tiere wie Primaten, Schweine, Schafe, Hunde und Kaninchen (Page & Schroeder 1982, Madden & Caton 1994, Berglundh et al. 2007). Die Anzahl der Tiere in diesen Testreihen betrug nur 4 bis 6 Individuen. Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an Tieren und/oder genetisch veränderten Knockout-Tieren sind jedoch nur schwer realisierbar. Die Größe der Tiere lässt einen Studienaufbau mit einer entsprechend großen Anzahl an Individuen im Hinblick auf finanzielle und logistische Probleme äußerst schwierig erscheinen.

Aufbauend auf der wissenschaftlichen Arbeit von Becker et al. (Becker et al., 2013), die erfolgreich belegte, dass die Implantation enossaler Implantate und die künstliche Induktion einer Periimplantitis an lebenden Mäusen möglich ist, wurde in der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit versucht, ein Knockoutmausmodell für die Untersuchung der Periimplantitis zu etablieren.

Das Ziel ist es, ein Periimplantitismodell in Knockoutmäusen weiter zu entwickeln um verschiedene Wirtsfaktoren, die zur Entstehung der Periimplantitis beitragen, untersuchen zu können.

Im Einzelnen wurden folgende Fragen beleuchtet:

- Ist es möglich eine verlässliche und reproduzierbare enossale Insertion der Implantate an lebenden Knockoutmäusen vorzunehmen?

Fragestellung

- Zeigen die Versuchstiere nach palatinaler Insertion der Membran-Nägel große Veränderungen hinsichtlich der Nahrungsaufnahme, des Verhaltens und des Gewichts?
- Ist die Induktion einer Periimplantitis bei Knockout-Mäusen möglich?
- Gibt es einen Unterschied bezüglich der Induktion und der Pathogenese der Periimplantitis zwischen dem Inzuchtstamm C57BL/6N und den Knockoutmäusen NOD2-defizient?
- Kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob der genetische Defekt der hier verwendeten Knockoutmäuse NOD2 signifikant mehr zu einer Induktion einer Periimplantitis oder zu einem Implantatverlust führt?

3. Material und Methode

3.1. Versuchstiere, Zusammensetzung der Tiergruppen und Haltung

3.1.1. Versuchstiere

Als Tiermodell wurden 40 Mäuse von der Firma Charles Rivers Laboratories bezogen. Davon gehörten 20 weibliche Mäuse dem Inzuchtstamm der Art C57BL/6N an. Die weiteren 20 Mäuse gliederten sich in 13 weibliche und 7 männliche Knockoutmäuse der Art NOD2. Die Durchführung des Versuches wurde mittels Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens beim Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein bewilligt (Tierversuchsantrag Nummer V 312-72241.121-14). Es lagen keine Einwände vor.

Die verwendeten Mäuse wurden entsprechend den geltenden Richtlinien für Versuchstiere in der Zentralen Tierhaltung, Campus Kiel des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein gehalten. Die Tiere waren zum Untersuchungsbeginn zwischen 8 und 25 Wochen alt.

3.1.2. Zusammensetzung der Tiergruppen

Gruppe	Induktionsmechanismus	Anzahl der Tiere
1	Normal (C57BL/6N) NUR Implantat	10
2	Normal (C57BL/6N) Implantat UND Ligatur	10
3	Knockout NUR Implantat	10
4	Knockout Implantat UND Ligatur	10

Abb. 3.1. Zusammensetzung der Tiergruppen

3.1.3. Haltung

Als Lagerungsort für die Versuchstiere wurde präoperativ der Luftstromschrank Uni Protect der Firma EHRET genutzt. Nach der Operation wurden die Mäuse in

konventionellen Käfigschalen Bio A.S.® Käfig Typ 2 L der Firma BIOSCAPE gehalten.

3.2. Implantate und Ligaturen

3.2.2. Implantate

Als Implantate wurden 40 FRIOS® Membran-Nägel (0,4mm x 1,6mm) der Firma Dentsply Friadent GmbH, Mannheim median in den Gaumen der Versuchstiere inseriert. Diese Membran-Nägel (siehe Abb. 3.2.) sind aus einer Titanlegierung gefertigt, gammasterilisiert und damit absolut biokompatibel. Als Hilfsinstrument wurde bei der Implantatinseration das FRIOS® Membran-Nägel Setzinstrument benutzt.



Abb. 3.2. Frios® Membran-Nagel (Fa. Dentsply Friadent GmbH, Mannheim)

3.2.3. Ligaturen

Als Ligaturmaterial wurde jeweils bei 10 Knockoutmäusen und 10 normalen Mäusen (C57BL/6N) polyfiles, resorbierbares Nahtmaterial Vicryl 5.0 der Firma Johnson & Johnson verwendet (Ethicon, Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt, Deutschland).

3.3. Zeitstrahl, Operativer Eingriff, postoperative Haltung, Überwachung und Euthanasierung

3.3.1. Zeitstrahl

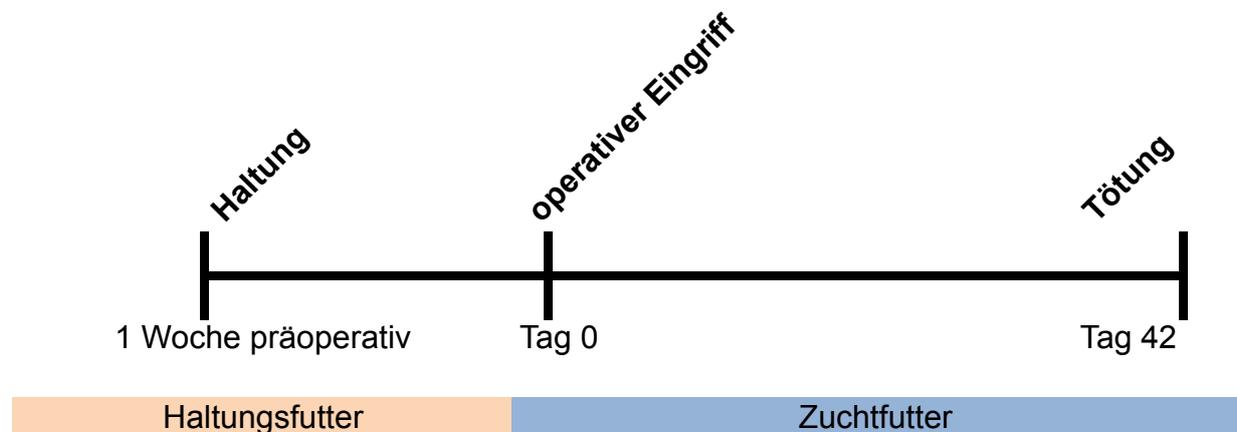


Abb. 3.3.1. Zeitstrahl

Abbildung 3.3.1. zeigt, dass die 40 Versuchstiere präoperativ 1 Woche Haltungsfutter und ab dem operativen Eingriff für den Untersuchungszeitraum von 42 Tagen bis zur schmerzfreien Euthanasierung Zuchtfutter erhielten.

3.3.2. Operativer Eingriff

Vor der geplanten Operation wurden alle 40 Versuchstiere für 3 Stunden in Scantainern gehalten. Arbeitsplätze, Instrumente und Hände wurden so desinfiziert, dass der operative Eingriff unter aseptischen, aber nicht sterilen Bedingungen stattfand. Alle 40 Versuchstiere erhielten eine intraperitoneale Narkose mit Sedierung und Analgesie unter 100mg/kg KG Ketamin sowie 16 mg/kg KG Xylazin. Ketamin führt zu einer dissoziativen Anästhesie, worunter die Erzeugung von Schlaf und Schmerzfreiheit unter weitgehender Erhaltung der Schutzreflexe verstanden wird. Xylazin wird als Beruhigungsmittel, Analgetikum und zur Entspannung der Skelettmuskulatur verwendet.

Nachdem sichergestellt wurde, dass die Versuchstiere vollständig betäubt waren, erfolgte die Insertion der FRIOS® Membran-Nägel median am Gaumen direkt hinter den oberen Schneidezähnen mittels FRIOS® Membran-Nägel Setzinstrument (siehe Abb. 3.3.2.).

Material und Methode

Bei 20 Versuchstieren, jeweils bei 10 normalen Mäusen (C57BL/6N) und bei 10 Knockoutmäusen (NOD2), wurden die Membran-Nägel, die zusätzlich mit einer Vicryl-Ligatur versehen wurden, implantiert. Die restlichen 20 Tiere, jeweils 10 Mäuse der Art C57BL/6N und 10 Knockoutmäuse der Art NOD2, dienen als Kontrollgruppen (siehe Abb. 3.1. Zusammensetzung der Tiergruppen).



Abb. 3.3.2. Das Foto zeigt die Insertion eines FRIOS® Membran-Nagels median am Gaumen direkt hinter den oberen Schneidezähnen einer Maus mittels FRIOS® Membran-Nägel Setzinstrument.

3.3.3. Postoperative Haltung

In der ersten präoperativen Woche erhielten alle Versuchstiere normales Haltungsfutter. Diese Tiernahrung ssniff® R/M-H ist als Futtermittel für Mäuse im Erhaltungsstoffwechsel vorgesehen und besteht zu 58% aus Kohlenhydraten, zu 33% aus Proteinen und zu 9% aus Fett.

Prophylaktisch wurde für 3 Tage das Schmerzmittel Buprenorphin (0,1 mg/kg KG) im Futter gereicht.

Ab der ersten postoperativen Woche wurde allen Versuchstieren die hochkalorische, kohlenhydratreiche Tiernahrung ssniff® EF R/M acc. AIN 93G gereicht. Diese Spezialnahrung wird als Zuchtfutter verwendet und enthält 61% Kohlenhydrate, 24% Proteine und 15% Fett. Alle Mäuse wurden gleich ernährt.

3.3.4. Überwachung

Direkt nach dem operativen Eingriff erfolgte eine engmaschige (alle 4 Stunden tagsüber) Überwachung der Tiere hinsichtlich ihres klinischen Zustands, des Körpergewichts, der äußeren Erscheinung, der Atmung, des spontanen und provozierten Verhaltens sowie der Reaktion auf Reize.

In den ersten 10 postoperativen Tagen wurde eine tägliche Gewichtskontrolle, danach einmal wöchentlich, mittels geeichter Waage durchgeführt. Ein Tier erreichte die zuvor im Tierversuchsantrag festgelegten Abbruchkriterien (Gewichtsverlust > 20%, gestörtes Fressverhalten und gestörte Hauterscheinungen) und musste schmerzfrei euthanasiert werden.

3.3.5. Euthanasierung

Nach 6 Wochen wurden alle Versuchstiere unter Allgemeinanästhesie mittels zervikaler Dislokation (Genickbruch) getötet. Die Schädel der Mäuse wurden vom Körper getrennt und der Unterkiefer entfernt um eine optimale Darstellung des harten Gaumens zu gewährleisten.

Im Anschluss daran erfolgten die Vorbereitungen für die Einbettung der Tierschädel.

3.4. Histologische Aufarbeitung

3.4.1. Fixierung

Die Köpfe der Mäuse wurden für die Methylmethacrylateinbettung zur histologischen Untersuchung wie folgt aufgearbeitet: Zunächst wurden alle Tierschädel für 14 Tage in einem Behältnis mit 10%-igem Formalin gelagert. Daraufhin erfolgte eine numerische Zuordnung auf Halbkarton mit Bleistift für jede Maus und die Fixierung der Präparate für drei Tage in einer Lösung aus:

- 400 ml Formalin 37%
- 1000 ml Glutardialdehyd 25%
- 8600 ml Sörensenpuffer (136,09 g Kaliumdihydrogenphosphat und 178 g Dinatriumhydrogenphosphat auf 10 Liter aqua dest.)

3.4.2. Entwässerung

Die Tierschädel wurden anschließend in Gaze gewickelt und für 2 Tage einem Entwässerungs- und Einbettvorgang unterzogen. Es erfolgte das Auswaschen der Fixierlösung unter fließendem Leitungswasser für 12 Stunden und das Entwässern in einer aufsteigenden Alkoholreihe:

- | | |
|---------------------------|-----------|
| - 60% vergällter Ethanol | 2 Stunden |
| - 80% vergällter Ethanol | 2 Stunden |
| - 90% vergällter Ethanol | 4 Stunden |
| - 96% vergällter Ethanol | 5 Stunden |
| - 100% vergällter Ethanol | 4 Stunden |
| - 1 : 1 Ethanol : Aceton | 1 Stunde |
| - 1 : 1 Ethanol : Aceton | 4 Stunden |
| - 100% vergällter Ethanol | 1 Stunde |
| - 100% vergällter Ethanol | 4 Stunden |
| - 100% vergällter Ethanol | 3 Stunden |

3.4.3. Einbettung

Es schloss sich die Durchtränkung der Mäuseköpfe mit Methylacrylsäure-Methylester für 12 Stunden und die anschließende Verwahrung des Einbettungsgemisches für weitere 5 Tage im Kühlschrank an. Da eine Maus aufgrund der im Tierversuchsantrag festgelegten Abbruchkriterien während des Untersuchungszeitraums bereits getötet werden musste, erfolgte die Vorbereitung von nur 39 Methacrylatsockeln in jeweiligen Glasbehältnissen. Auf die Methacrylatsockel wurde schlussendlich jeweils der Schädel eines Versuchstieres möglichst parallel zur Tischebene gebracht und mittels einer Methacrylatflüssigkeit innerhalb von 3 Tagen zu einem Kunststoffblock wie folgt ausgehärtet.

Schrittweise Einbettung bei 38° Celsius in:

- 2 Liter Methacrylsäuremethylester 99% (Fa. Fluka 64200) als Monomer
- 400 ml Nonylphenol-Polyethylenglycolacetat (Fa. Fluka 74432) als Weichmacher
- 20 ml Phtalsäuredibutylester (Merck 800919) als Weichmacher und als Katalysator –Alpha, Alpha- Azoisobutyronitril (Fa. Fluka 11630)

3.4.4. Aufarbeitung

Sodann folgte das jeweilige, weiterhin möglichst parallel zur Tischebene, mittige Zerteilen der 39 Kunststoffblöcke mit einer diamantierten Bandsäge (Exact 300cl, Fa. Exact Apparatebau, Norderstedt, Deutschland), in 2 Teile. Alle so entstandenen 78 Hälften wurden an einer Poliermaschine (Saphier 360E, Fa. Exact, Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) mit Nassschleifpapier (Siliziumkarbid, Fa. Exact Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) der Körnungen 500, 1200, 2400 und 4000 unter geringem Substanzabtrag standardisiert und zur etablierten Oberfläche parallelisiert.

Jeweils 39 der halben polierten Kunststoffblöcke wurden auf entfettete Folienträger für Mikroradiographien gebracht (A).

Die anderen 39 halben Kunststoffblöcke wurden auf einen zuvor mit Alkohol entfetteten Objektträger (Fa. Kulzer, Wehrheim) mit Technovit 7200 (Fa. Kulzer, Wehrheim) geklebt (B).

Von allen auf die Folien- sowie Objektträger aufgebrachten Kunststoffblöcken wurde jeweils ein 200 µm dicker Schliff mit Hilfe der bereits erwähnten diamantierten Bandsäge (Exact 300cl, Fa. Exact Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) hergestellt. Diese 200 µm dicken Schriffe wurden weiterhin mit der Poliermaschine (Saphier 360E, Fa. Exact, Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) auf eine Dicke von 40 µ - 80 µ zuzüglich der Folien- und Objektträgerdicke reduziert und poliert. Alle Schriffe wurden mit einer Fühlerlehre auf ihr Dicke hin kontrolliert.

3.4.5. Mikroradiographien

Die 39 Folienträger (A) mit der Schliffdicke zwischen 80 und 100 µm wurden folgend vom Objektträger abgezogen, auf Diagröße zurechtgeschnitten und zunächst zwischen zwei Objektträgern so gelagert, dass das Präparat bei dem Transport in den Röntgenraum nicht verknickt. Anschließend wurden 39 Röntgenplatten mit einem Diamantschreiber mit Präparatnummer und Datum vorbereitet. Die Präparate wurden mit dem Gesicht nach unten auf die beschichteten Seiten der Röntgenplatten mit tesafilm® befestigt. Die Röntgenplatten wurden dann jeweils in der Röntgenkammer platziert. Es erfolgte die Exponierung bei 3 mA und 25 kV. Nach Beendigung der Belichtung durchliefen die Röntgenplatten unter steter Bewegung (Schwenken) mit einer großen Pinzette folgende Lösungen:

- Entwicklungsbad mit 100 ml Stocklösung (Periomat) und 300 ml aqua dest. für

Material und Methode

5 Minuten bei 20°C

- Stoppbad mit 4 ml Eisessig und 400 ml aqua dest. für 2 Minuten
- Fixierungsbad mit 100 ml Fixierer (Kodak) und 300 ml aqua dest. für 10 Minuten
- Wässerung unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten

Gegen die Entstehung von Kalkflecken wurden die Röntgenplatten in eine Spüllösung (AGEPON) getaucht und im Anschluss zum Trocknen unter einen Abzug gelegt.

Anschließend erfolgte die Eindeckelung mit Eukitt (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München).

Nach der Erstellung der Mikroradiographien wurden die Schliche von den bisher aufgebrauchten Folienträgern wieder auf Objektträger überführt, so dass nun insgesamt 78 aufgearbeitete Präparate auf Objektträgern entstanden.

3.4.6. O-Toluidinblau-Färbung

Alsdann erfolgte bei der Hälfte aller Präparate eine Färbung mit Toluidinblau.

Hierfür wurden die Präparate wie folgt behandelt:

- | | |
|---|-------------|
| - Entkalkung mit 0,1% Ameisensäure | 3 Minuten |
| - Spülen mit aqua dest. | 1 Minute |
| - Anätzen der organischen Oberfläche mit Methanol 20% | 100 Minuten |
| - Spülen in aqua dest. | 1 Minute |
| - Färben in Toluidinblau O (C.I. 52040, Certistain®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) Lösung | 15 Minuten |
| - Spülen in Aqua dest. | 1 Minute |
| - Spülen in 85% Ethanol | 1 Minute |
| - Spülen in 90% Ethanol | 1 Minute |
| - Spülen in 95% Ethanol | 1 Minute |
| - Spülen in 100% Ethanol | 1 Minute |
| - Spülen in Xylol | 1 Minute |

Anschließend erfolgte die Eindeckelung mit Eukitt (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München).

3.4.7. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei der anderen Hälfte aller Präparate erfolgte eine Färbung mit Hämatoxylin-Eosin. Dazu wurden die Präparate wie folgt behandelt:

- Entkalkung mit 0,1% Ameisensäure	3 Minuten
- Spülen mit aqua dest.	1 Minute
- Anätzen der organischen Oberfläche mit Methanol 20%	100 Minuten
- Spülen in aqua dest.	1 Minute
- Färben in Hämatoxylin O (C.I. 52040, Certistain®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) Lösung	3 Minuten
- Spülen in aqua dest.	1 Minute
- Spülen in fließend Leitungswasser	10 Minuten
- Spülen in aqua dest.	1 Minute
- Färben in Eosin	3 Minuten
- Spülen in aqua dest.	1 Minute
- Spülen in Xylol	1 Minute

Anschließend erfolgte die Eindeckelung mit Eukitt (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München).

3.5. Radiologische Diagnostik und Auswertung

Die Auswertung der Mikroradiographien erfolgte mit dem Material-Mikroskop Axio Observer.Z1m der Firma ZEISS (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) und der Mikroskop-Camera AxioCam MRc5 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena). Es wurde mit einer 2,5-fachen Vergrößerung gearbeitet. Die Aufnahmen wurden mit der Mikroskop-Software AxioVision Release 4.9.1 SE64 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) auf einem PC mit dem Betriebsprogramm Windows 2000 bearbeitet, gespeichert und inspiziert.

3.6. Histologische Diagnostik und Auswertung

Für die Auswertung der histologischen Präparate wurde ein Mikroskop (Mikrophot FxA, Nikon GmbH, Düsseldorf) mit einer digitalen Kamera (AxioCam MRc5, Carl Zeiss AG, Oberkochen) benutzt. Es wurden die Objektive für die 50-, 100-, 200- und 400-fache Vergrößerung verwendet. Die Aufnahmen wurden digital mit AXIOVISION 4.6 LE (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) auf einem PC mit Windows 2000 Betriebssystem bearbeitet und begutachtet.

3.7. Statistische Auswertung

Die Datenauswertung und die Erstellung der Graphiken erfolgten mit Microsoft Excel (Microsoft® Office 2011). Zur Berechnung der signifikanten Unterschiede wurde eine Vierfeldertafel kombiniert mit dem ChiSquare-Test genutzt.

4. Ergebnisse

4.1. Tierüberleben

Von den 40 in das Tierexperiment einbezogenen Mäusen überlebten 39 Mäuse den Beobachtungszeitraum von 6 Wochen. Es konnte demnach ein Knockoutmausmodell für die Untersuchung der Periimplantitis etabliert werden. Ein Tier aus der Gruppe Normal (C57BL/6N) NUR Implantat, wurde an Tag 9 aufgrund der zuvor im Tierversuchsantrag festgelegten Abbruchkriterien schmerzfrei euthanasiert.

Ergebnisse

4.2. Gewichtskontrolle

Die in den ersten 10 Tagen tägliche und anschließend einmal wöchentliche Gewichtsdocumentation ergab keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei jeder Maus kam es zwischen dem 1. und 2. Beobachtungstag zu einem Gewichtsverlust von im Mittelwert 7,2% des Ausgangsgewichts. Dieser Verlust wurde bei allen Tieren in den weiteren Beobachtungstagen vollständig wieder aufgeholt. Lediglich ein Tier aus der Gruppe Normal (C57BL/6N) NUR Implantat, verlor weiterhin an Gewicht und musste an Tag 9 aufgrund der zuvor im Tierversuchsantrag festgelegten Abbruchkriterien getötet werden.

Alle überlebenden Mäuse nahmen im Vergleich zum Ausgangsgewicht bis zum Ende des sechswöchigen Untersuchungszeitraumes zu.

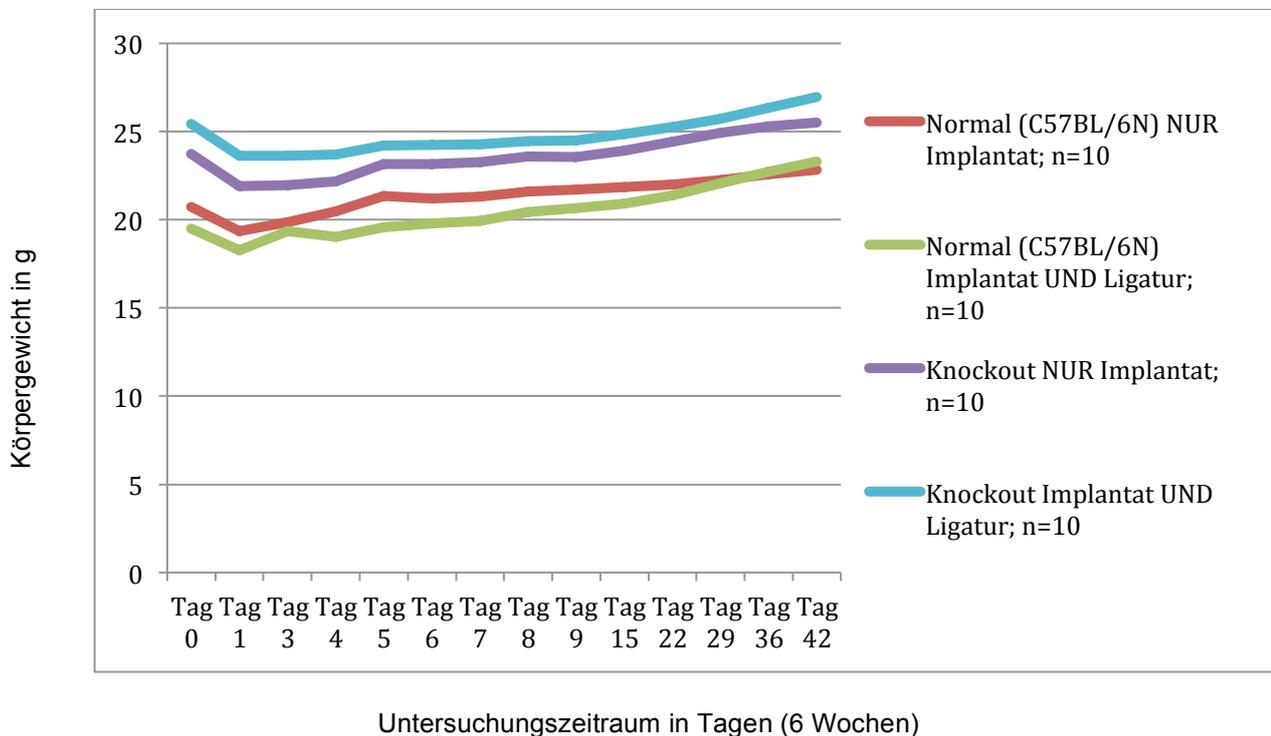


Abb. 4.2. Dargestellt ist der Entwicklungsverlauf des Körpergewichts der Versuchstiere als Mittelwert der jeweiligen Gruppen ab dem Tag der Implantation (Tag 0) bis zum Ende des Untersuchungszeitraums nach 6 Wochen.

4.3. Implantatüberleben

Nach dem Ablauf des Beobachtungszeitraumes von 6 Wochen wurden alle Tiere getötet und der Körper sowie der Unterkiefer vom Tierschädel getrennt.

Es erfolgte die Dokumentation der in situ verbliebenen Implantate am Tag der Euthanasierung (siehe Tab.4.3.). Sowohl in der Gruppe Normal (C57BL/6N) NUR Implantat als auch in der Gruppe Knockout NUR Implantat verblieben von ursprünglich jeweils 10 Implantaten 4 Implantate in situ (siehe Abb.4.3.). Bei jeweils 6 Mäusen aus beiden Gruppen war das inserierte Implantat aus dem Oberkiefer herausgefallen. In beiden Gruppen, Normal (C57BL/6N) Implantat UND Ligatur sowie Knockout Implantat UND Ligatur, in denen die Implantate der Versuchstiere zuvor mit Ligaturen versorgt worden waren, gingen alle Implantate verloren. Es konnte ein signifikant höherer Implantatverlust in den Gruppen Normal (C57BL/6N) Implantat UND Ligatur sowie Knockout Implantat UND Ligatur im Vergleich zu den Gruppen Normal und Knockout NUR Implantat nachgewiesen werden ($P=0,0227$). Allerdings gingen in beiden Gruppen der Versuchstiere mit unversehrten Implantaten, Normal und Knockout NUR Implantat, gleich viele Implantate verloren, was darauf schließen lässt, dass die gewählte Immundefizienz NOD2 der Knockoutmäuse keinen Einfluss auf die Periimplantitis hat. Es konnte bei keinem der verloren gegangenen Implantate aus allen Gruppen festgestellt werden, an welchem Beobachtungstag das Implantat verloren ging.

Gruppe	Normal (C57BL/6N) NUR Implantat; n = 10	Normal (C57BL/6N) Implantat UND Ligatur; n = 10	Knockout NUR Implantat; n = 10	Knockout Implantat UND Ligatur; n = 10
Implantate in situ	4	0	4	0
Verlorene Implantate	6	9	6	10
Verstorbene Mäuse	0	1	0	0
Implantate gesamt	10	10	10	10

Tab. 4.3. Implantatüberleben in den unterschiedlichen Gruppen nach dem Beobachtungszeitraum von 6 Wochen

Ergebnisse

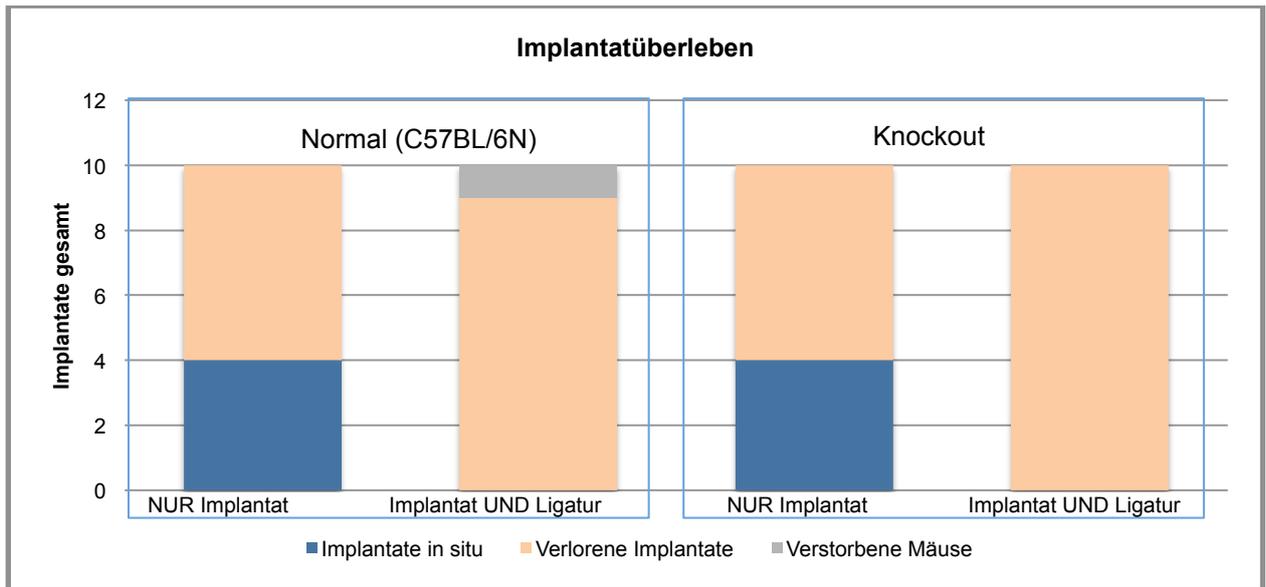


Abb. 4.3. Darstellung des Implantatüberlebens in den unterschiedlichen Gruppen nach dem Beobachtungszeitraum von 6 Wochen.

4.4. Histologische Ergebnisse

Die histologischen Präparate wurden hinsichtlich einer Entzündungsreaktion begutachtet.

4.4.1. Normal (C57BL/6N) NUR Implantat

Histologisch lässt sich in den Präparaten mit vorhandenem Implantat eine akute Entzündung erkennen, die unmittelbar unter dem keratinisierten mehrschichtigen Plattenepithel beginnt und bis in die Tiefe zur Implantatsspitze voranschreitet. Im Mittelpunkt dieser akuten Entzündung steht die Auswanderung der Leukozyten aus der kapillären Blutbahn in das durch die Noxe geschädigte Gewebe. Es sind vor allem neutrophile Granulozyten, die sich charakteristisch mit einem aus drei bis fünf Segmenten bestehenden Kern darstellen, nachweisbar. Der periimplantäre Knochen wird progressiv von marginal resorbiert, was zur Bildung von schüsselförmigen Knochendefekten führt.

In Abbildung 4.4.1a. ist ein kraterförmiger, osteolytischer Defekt des harten Gaumens und die Umwandlung des Knochengewebes in ein Granulationsgewebe, welches von polymorphkernigen Leukozyten durchsetzt ist, zu sehen. Eine Periimplantitis konnte induziert werden. Das Dünnschliff-Präparat 23-12 in Toluidinblau-Färbung stammt von einer Inzuchtmaus (C57BL/6N), bei der das Implantat ohne Ligatur gesetzt worden ist. Unter dem Implantat lassen sich Reste der hochkalorischen Tiernahrung vermuten. Unmittelbar daran grenzt die orale Mukosa des harten Gaumens. Das Implantat sitzt im oberen bis mittleren Drittel im Granulationsgewebe. Man kann von einem baldigen Verlust des Membrannagels ausgehen, da nur noch das apikale Drittel des Implantats im Knochen inseriert (siehe Abb.4.4.1.b.) In der Nähe des Implantatapex ist neugebildeter Knochen erkennbar.

Ergebnisse

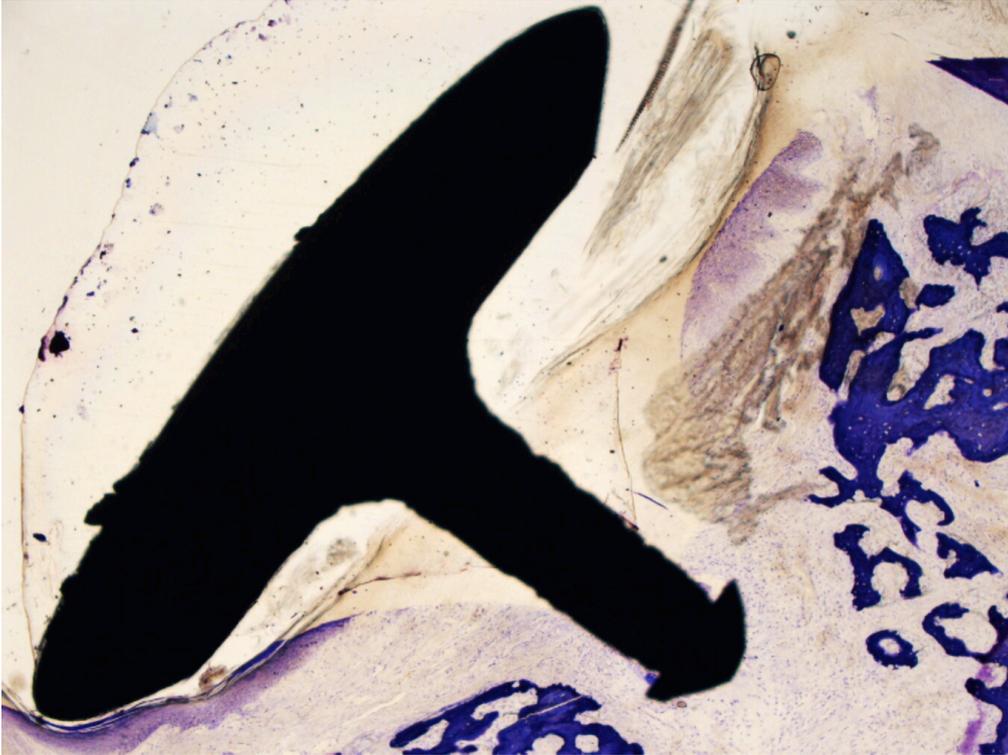


Abb. 4.4.1a. Histologisches Dünnschliff-Präparat 23-12 in Toluidinblau-Färbung in sagittaler Richtung. Es zeigt sich eine akute Entzündung. Das Implantat sitzt im Granulationsgewebe (50-fache Vergrößerung).

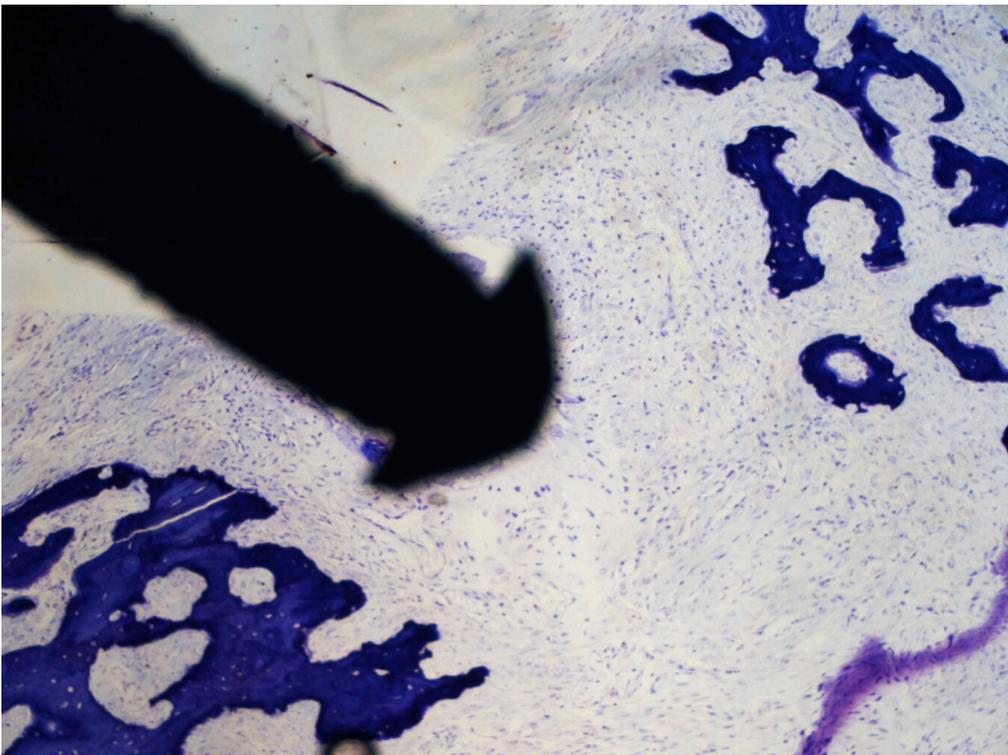


Abb. 4.4.1b. Ausschnitt aus histologischem Dünnschliff-Präparat 23-12 in Toluidinblau-Färbung in sagittaler Richtung. In dem 400-fach vergrößerten Bildausschnitt zeigen sich als Zeichen einer akuten Entzündung neutrophile Granulozyten zwischen dem Implantatapex und dem Knochen. Der schüsselförmige Defekt erstreckt sich bis ins apikale Implantatdrittel.

4.4.2. Normal (C57BL/6N) Implantat UND Ligatur

Bei allen Versuchstieren in dieser Gruppe gingen die Implantate, die zuvor mit Ligaturen versehen worden waren, verloren.

In den histologischen Bildern mit Toluidinbau-Färbung zeigte sich ein klinisch gesundes Weichgewebe im Oberkiefer. Das keratinisierte Plattenepithel ist unverschieblich mit dem Periost des Palatum durum verwachsen. Der Knochen des harten Gaumens weist nur noch teilweise kraterförmige Defekte auf (siehe Abb. 4.4.2a.), die vermuten lassen, dass hier das Implantat bereits vor längerer Zeit verloren ging.

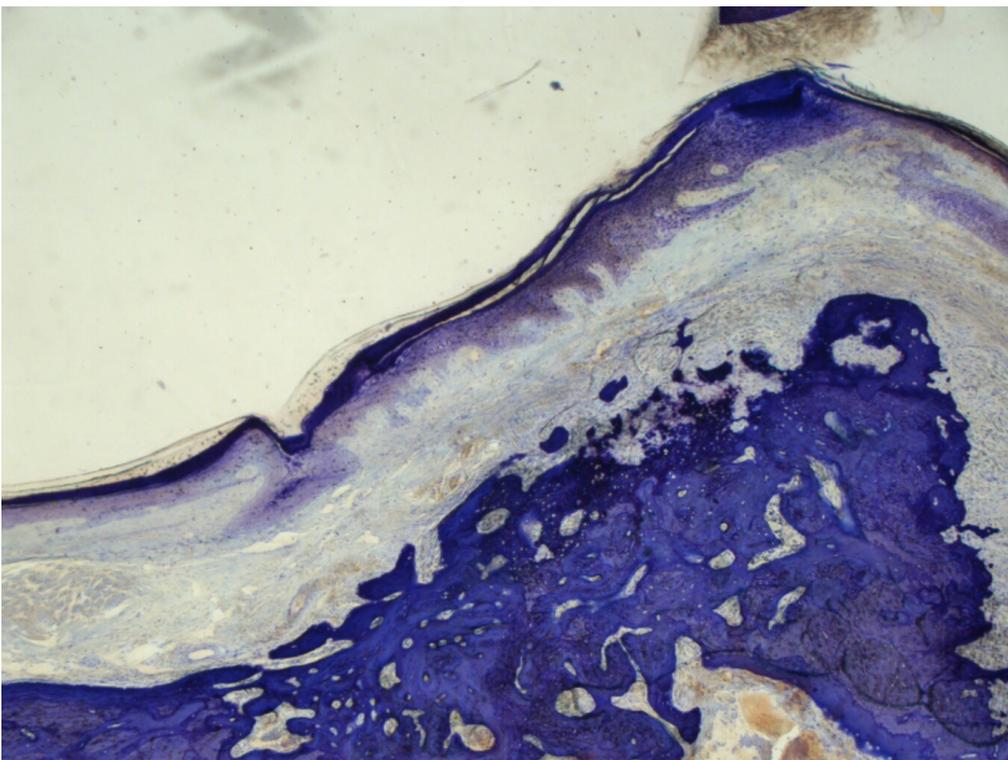


Abb. 4.4.2a. Histologisches Dünnschliff-Präparat 16-12 in Toluidinblau-Färbung in sagittaler Richtung. Es zeigt sich intaktes Weichgewebe. Der Knochen des harten Gaumens weist nur noch teilweise kraterförmige Defekte auf (siehe Abb. 4.4.2a.), die vermuten lassen, dass hier das Implantat bereits vor längerer Zeit verloren ging (50-fache Vergrößerung).

4.4.3. Knockout NUR Implantat

In den Präparaten mit vorhandenem Implantat aus dieser Gruppe lässt sich ebenfalls eine Entzündungsreaktion beginnend unter dem verhornendem Plattenepithel erkennen. Das Implantat in Abb. 4.4.3a. ist allseits von Granulationsgewebe umgeben. Ein direkter Knochenkontakt ist nicht erkennbar. Die periimplantäre Mukosa der Implantate ist von einem keratinisierten Epithel bedeckt, welches apikal des Margo mukosae in ein nicht keratinisiertes Saumepithel übergeht. Nach apikal verjüngt sich das Epithel und endet in 2 bis 4 Zellagen. Es sind vor allem neutrophile Granulozyten, die sich charakteristisch mit einem aus drei bis fünf Segmenten bestehenden Kern darstellen, als Marker der akuten periimplantären Entzündung, nachweisbar (siehe Abb.4.4.3b.). Somit konnte ebenfalls eine Periimplantitis induziert werden. Eine direkte Osseointegration ist nicht mehr erkennbar.

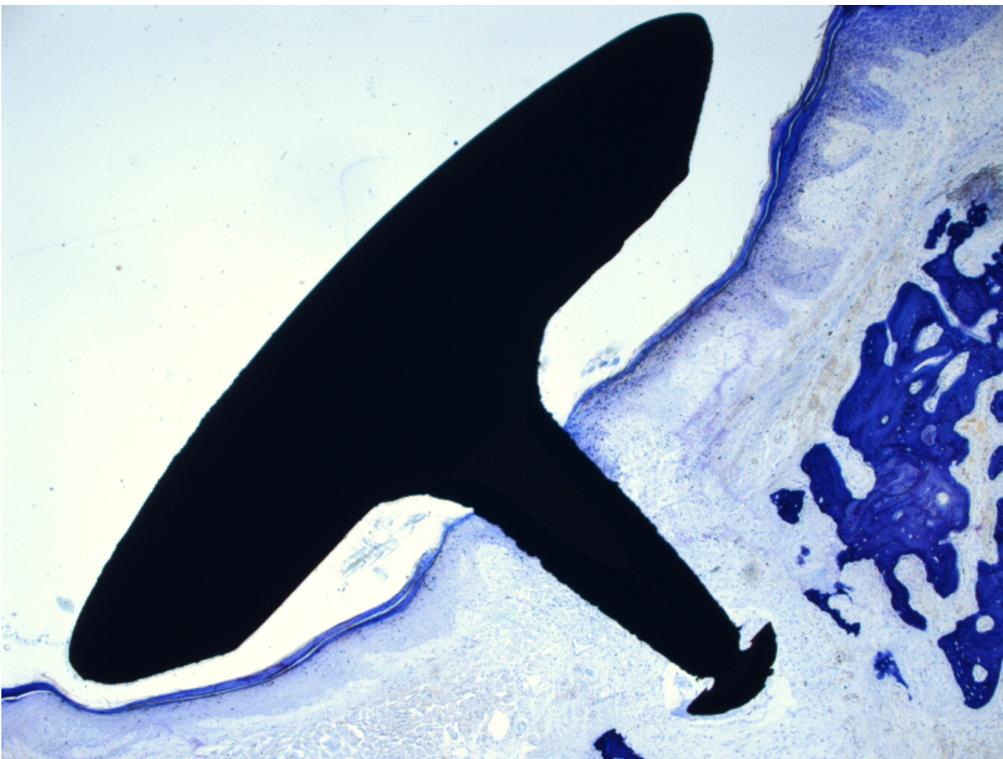


Abb. 4.4.3a. Histologisches Dünnschliff-Präparat 52-12 in Toluidinblau-Färbung in sagittaler Richtung. Der Membrannagel in Präparat ist allseits von Granulationsgewebe umgeben. Ein direkter Knochenkontakt ist nicht erkennbar. Das verhornte Epithel geht an der Kontaktfläche zum Implantat kontinuierlich in das Saumepithel über. Es sind neutrophile Granulozyten als Marker der akuten Entzündung nachweisbar (50-fache Vergrößerung).

Ergebnisse

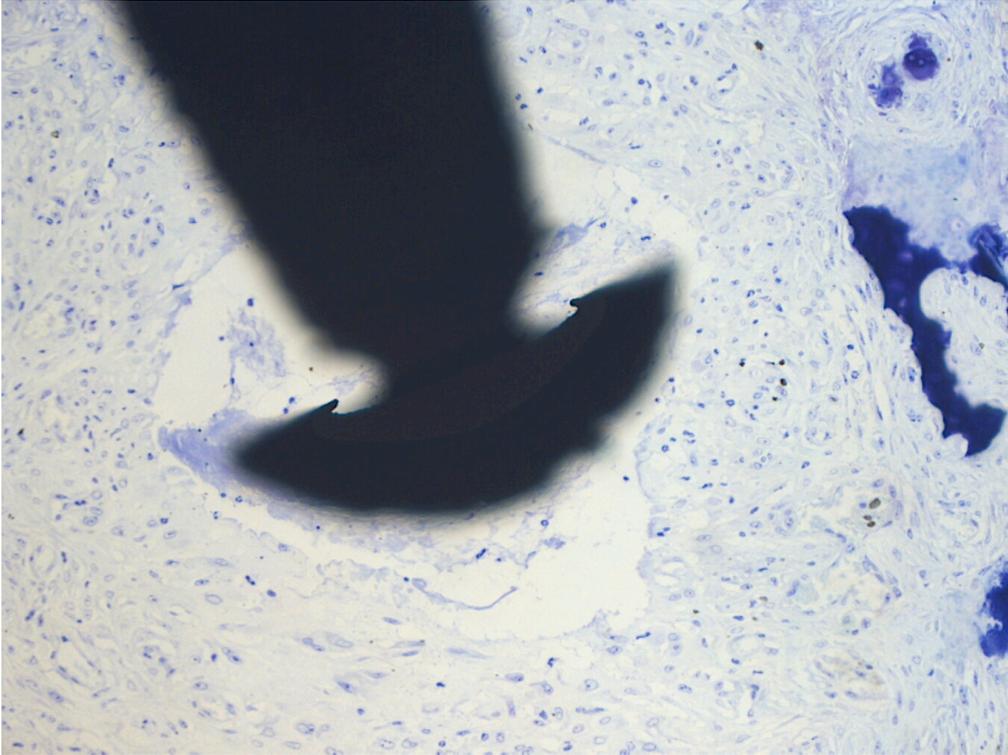


Abb. 4.4.3b. Ausschnitt aus histologischem Dünnschliff-Präparat 52-12 in Toluidinblau-Färbung in sagittaler Richtung. Der Membrannagel ist allseits von Granulationsgewebe umgeben. Ein direkter Knochenkontakt ist nicht erkennbar. Es sind neutrophile Granulozyten als Marker der akuten Entzündung nachweisbar (200-fache Vergrößerung).

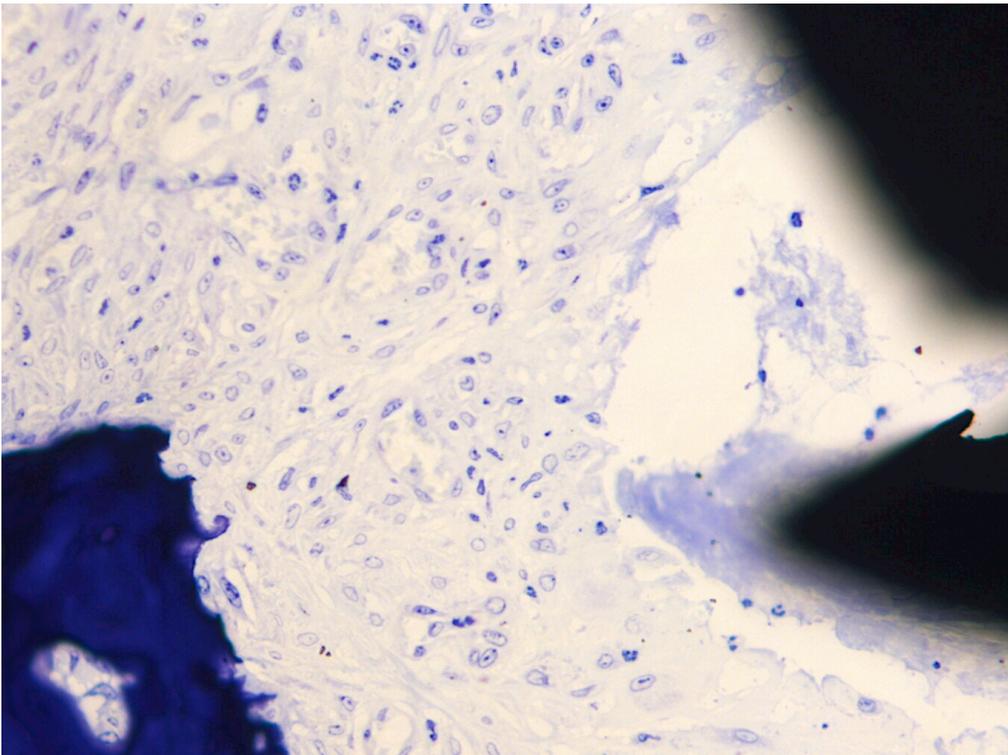


Abb. 4.4.3c. Ausschnitt aus histologischem Dünnschliff-Präparat 52-12 in Toluidinblau-Färbung in sagittaler Richtung. Es sind vor allem neutrophile Granulozyten, die sich charakteristisch mit einem aus drei bis fünf Segmenten bestehenden Kern darstellen, als Marker der akuten periimplantären Entzündung, nachweisbar (400-fache Vergrößerung).

4.4.4. Knockout Implantat UND Ligatur

Die Implantate der Versuchstiere aus dieser Gruppe gingen während des Untersuchungszeitraumes vollständig verloren. In dem histologischen Präparat 35-12 (siehe Abb. 4.4.4a.) lässt sich gesunde orale Mukosa aus mehrschichtigem verhornenden Plattenepithel erkennen. Der darunter befindliche harte Gaumen lässt noch den typischen kraterförmigen Defekt des Knochens im Bereich des ehemaligen Implantatlagers erkennen. Der Verlust des Membrannagels ist vermutlich noch nicht so lange her wie in Präparat 16-12. Als Zeichen einer akuten Entzündung treten auch hier wieder polymorphkernige Neutrophile in Erscheinung (siehe Abb.4.4.4b).

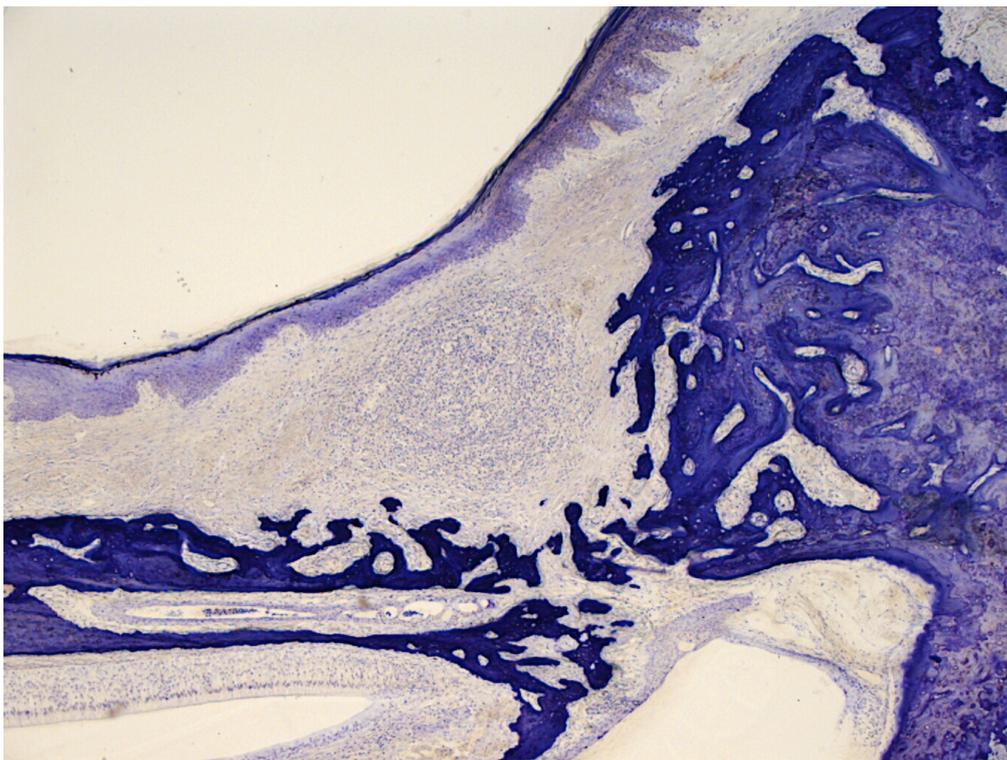


Abb.4.4.4a. Histologisches Dünnschliff-Präparat 35-12 in Toluidinblau-Färbung in sagittaler Richtung (50-fache Vergrößerung). Es lässt sich gesunde orale Mukosa mit einem typischen kraterförmigen Defekt des Knochens im Bereich des ehemaligen Implantatlagers erkennen.

Ergebnisse

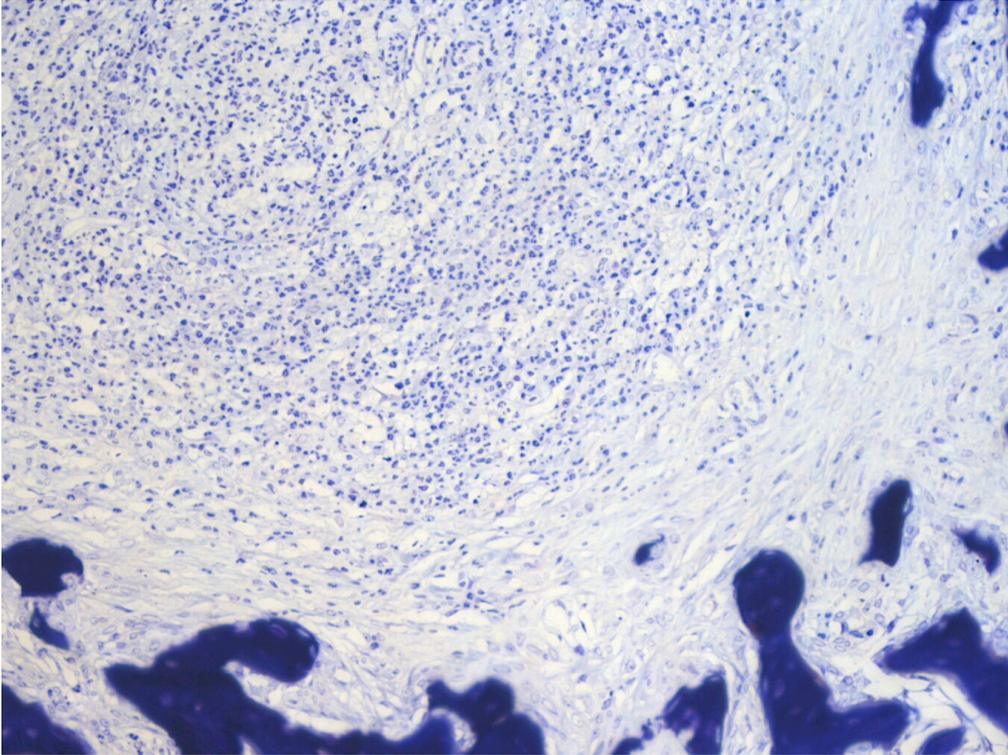


Abb.4.4.4b. Ausschnitt aus histologischem Dünnschliff-Präparat 35-12 in Toluidinblau-Färbung in sagittaler Richtung (200-fache Vergrößerung). Als Zeichen einer akuten Entzündung treten auch hier wieder polymorphkernige Neutrophile in Erscheinung.

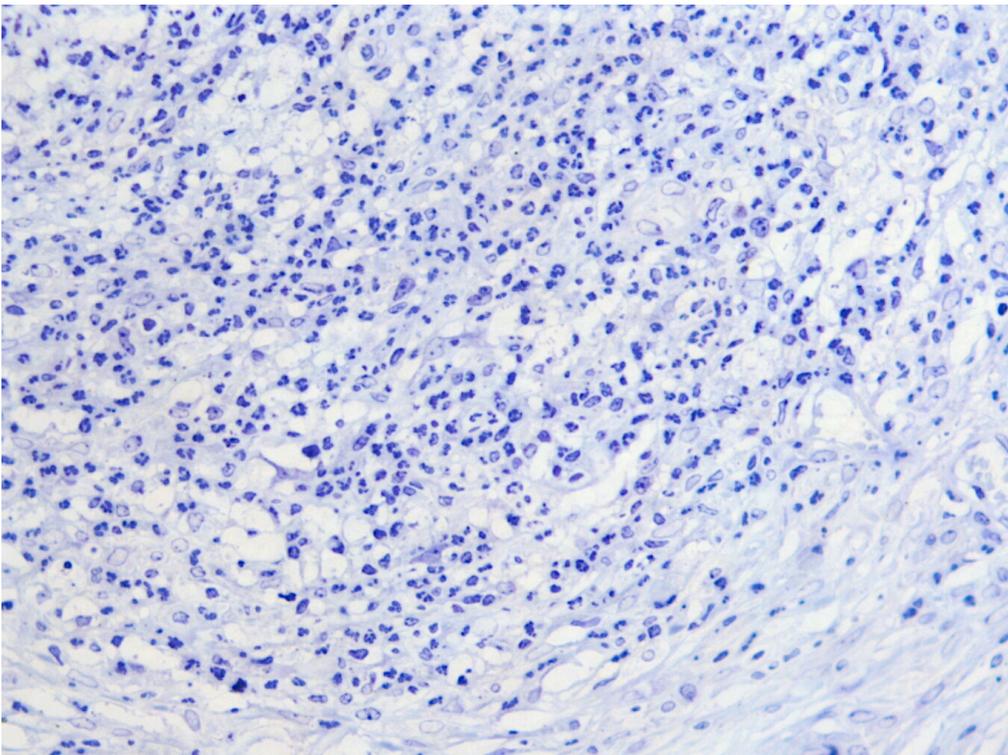


Abb.4.4.4c. Ausschnitt aus histologischem Dünnschliff-Präparat 35-12 in Toluidinblau-Färbung in sagittaler Richtung (400-fache Vergrößerung). Als Zeichen einer akuten Entzündung treten auch hier wieder polymorphkernige Neutrophile in Erscheinung.

4.5. Mikroradiologische Ergebnisse

4.5.1. Normal (C57BL/6N) NUR Implantat

Mikroradiologisch zeigte sich in sagittaler Schnitfführung bei den in situ verbliebenen Implantaten eine zirkuläre Aufhellung. Der Implantatapex ragt in Präparat 21-12 in die Nasenhaupthöhle. Um das Implantat lässt sich eine kraterförmige Osteolyse erkennen.

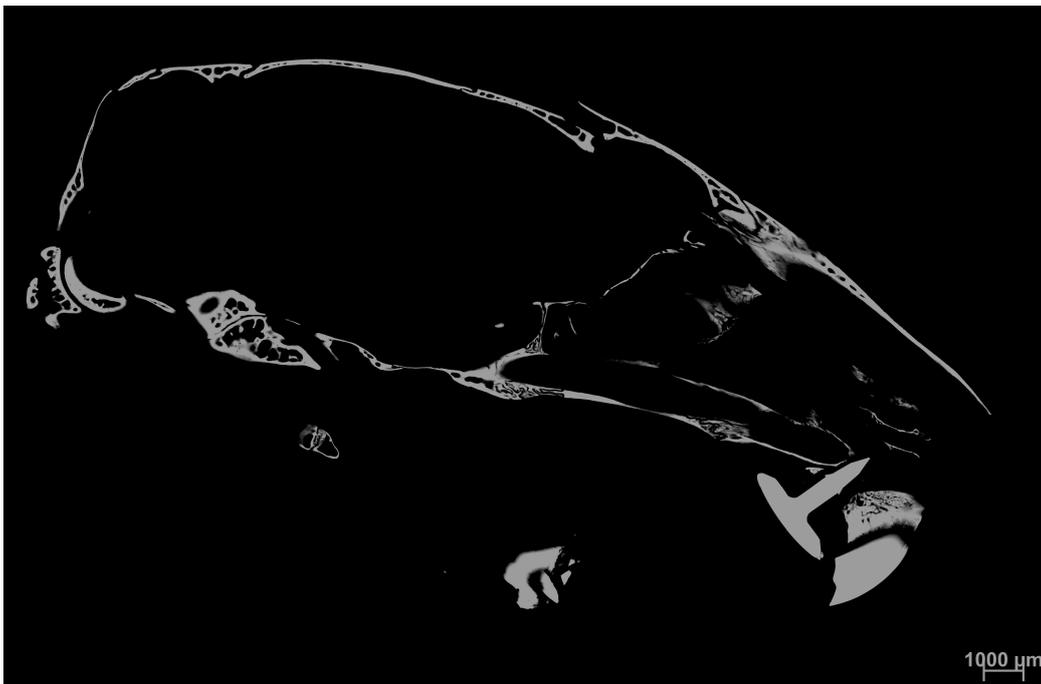


Abb. 4.5.1. Mikroradiographie von Präparat 21-12 einer Maus aus der Gruppe Normal (C57BL/6N) NUR Implantat. Der Membrannagel ragt in die Nasenhaupthöhle und hat keinen Knochenkontakt.

4.5.2. Normal (C57BL/6N) Implantat UND Ligatur

In der mikroradiologischen Darstellung zeigt sich in sagittaler Richtung der Mausschädel 19-12. Das Os palatum durum ist distal des oberen Inzisivus unversehrt in seiner Struktur. Der harte Gaumen stellt sich als röntgenopake dicke Schicht dar. Die Implantate dieser Versuchsgruppe sind vollständig zu einem unbestimmten Zeitpunkt verloren gegangen.

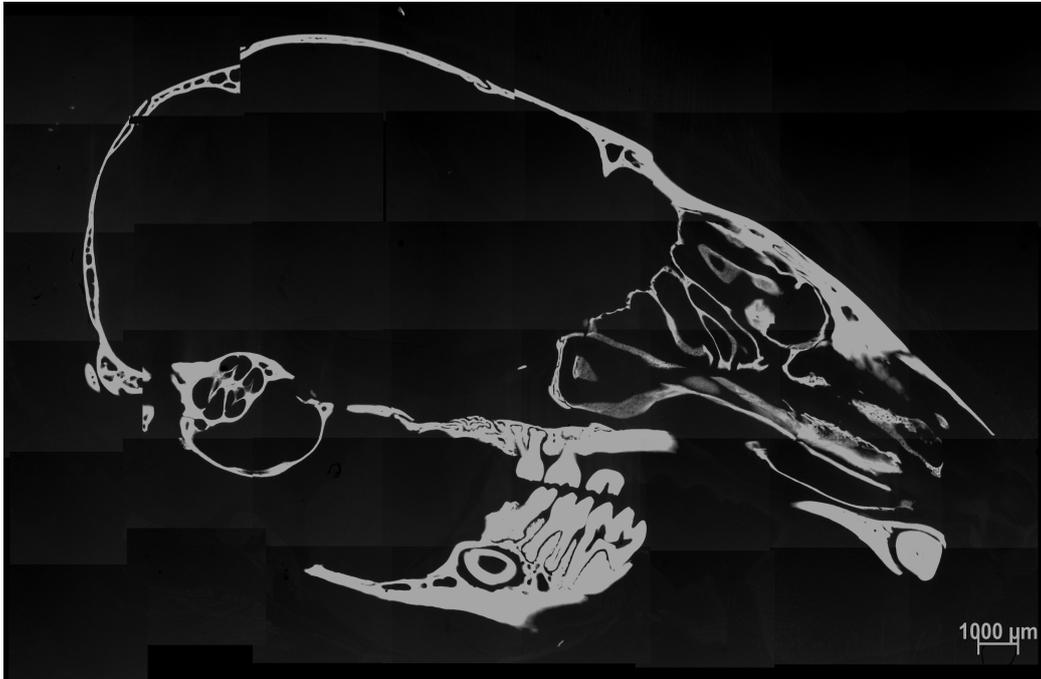


Abb. 4.5.2. Mikroradiologische Darstellung des Mausschädels in sagittaler Richtung. Der harte Gaumen stellt sich in Mikroradiographie 19-12 als intakte röntgenopake Schicht hinter dem oberen Schneidezahn dar.

4.5.3. Knockout NUR Implantat

Die Schädel der Versuchstiere zeigen in sagittaler Schnittführung bei den in situ verbliebenen Implantaten ebenfalls eine zirkuläre Aufhellung. Es besteht kein Knochenkontakt. Auch in Mikroradiographie 48-12 ist der Nasenboden durchstoßen und die Implantatsspitze ragt in die Nasenhaupthöhle.



Abb. 4.5.2. Mikroradiographie in sagittaler Richtung von Präparat 48-12 einer Maus aus der Gruppe Knockout NUR Implantat.

4.5.4. Knockout Implantat UND Ligatur

Bei allen Versuchstieren aus dieser Gruppe sind die Implantate verloren gegangen. Je nach Zeitpunkt des Implantatverlustes stellt sich das ehemalige Implantatbett als weitgehend intakter Knochen (siehe Abb. 4.5.4a) oder als osteolytische Zone (siehe Abb. 4.5.4b) dar.



Abb. 4.5.4a. Mikroradiographie 35-12 zeigt ein weitgehend intaktes Os palatum durum, was darauf deutet, dass das Implantat weiter zu Beginn des Untersuchungszeitraumes verloren gegangen sein könnte als in Mikroradiographie 44-12.

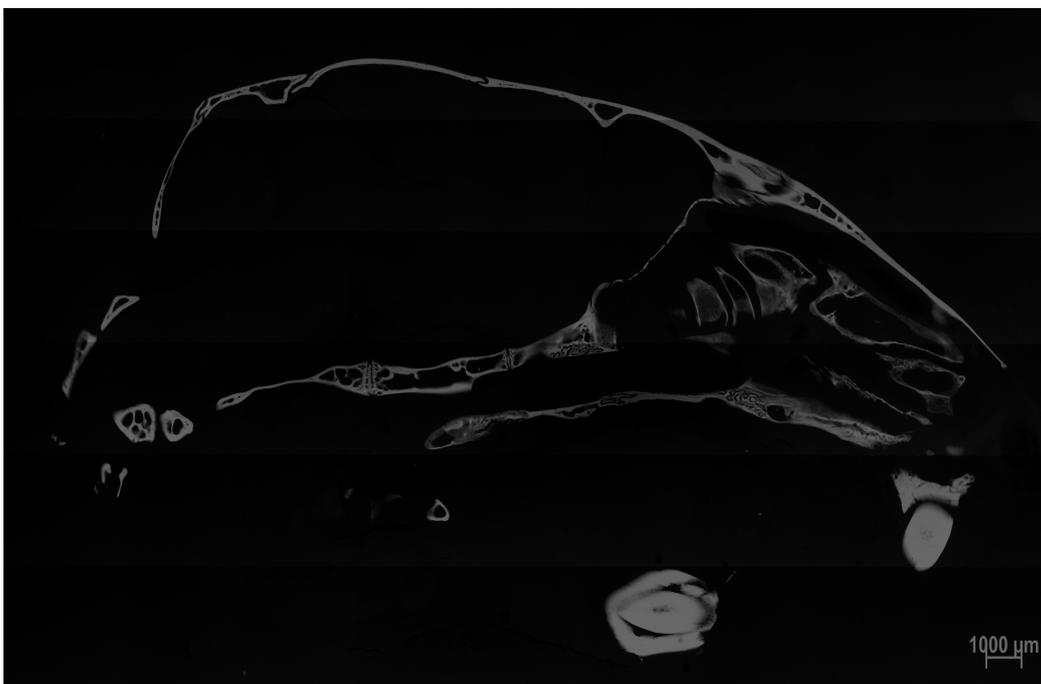


Abb. 4.5.4b. Mikroradiographie 44-12 zeigt sich mit osteolytisch darstellendem Os palatum. Der große Knochendefekt deutet daraufhin, dass das Implantat erst vor kurzem verloren gegangen sein könnte.

5. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit war es, ein Periimplantitismodell in Knockoutmäusen zu etablieren und weiter zu entwickeln, um verschiedene Wirtsfaktoren, die zur Entstehung der Periimplantitis beitragen, untersuchen zu können.

Die Erkenntnisse aus dieser Studie sollen als Grundlage für weitere Knockout-Mausstudien dienen können.

Die zahnärztliche Implantologie ist dank ihrer Fortschritte in den vergangenen 20 Jahren mehr und mehr zum Versorgungsstandard für die Rehabilitation von voll- und teilbezahnten Patienten herangereift. Klinische und technische Entwicklungen haben das Indikationsspektrum für Implantatbehandlungen erweitert. In der Bundesrepublik Deutschland setzten Zahnärztinnen und Zahnärzte sowie Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgen mittlerweile mehr als eine Million dentale Implantate pro Jahr, Tendenz steigend (Deutsche Gesellschaft für Implantologie e.V., 2015).

Doch die routinemäßig durchgeführten Implantatversorgungen scheinen trotz hoher Erfolgsraten nicht nur mit nutzbringenden Effekten für den Patienten verbunden zu sein (Carcuac & Jansson, 2010). Neue Formen der Erkrankungen oraler Weich- und Hartgewebe wie die der periimplantären Mukositis und/oder Periimplantitis werden durch die Inserteration von Implantaten gefördert (Belibasakis, 2014; Belibasakis et al., 2015).

Die Ursachen, die zu einem entzündlich bedingten Verlust periimplantärer Weich- und Hartgewebe führen, sind bis heute nicht definitiv geklärt (Pesce et al., 2014; Pirih et al., 2014). Offensichtlich ist die Identifizierung der entscheidenden Risikofaktoren durch die Komplexität der zugrunde liegenden Erkrankungsmechanismen sehr erschwert.

Die Prävalenz der Periimplantitis wird zum heutigen Zeitpunkt zwischen 10-16% und die einer Mukositis zwischen 40-48% eingeschätzt (Daubert et al., 2015; Mir-Mari et al., 2012; Swierkot et al., 2012). Noch sind nicht alle bei der Periimplantitis ablaufenden Prozesse abschließend geklärt.

5.1. Wahl des Studiendesigns

Um die Periimplantitis und den damit verbundenen Implantatverlust verstehen und behandeln zu können, erscheint es wichtig, den Pathomechanismus der Periimplantitis besser zu ergründen. Da in vitro-Untersuchungen eine starke Reduktion der Komplexität des Organismus darstellen und die Wirkweise von Substanzen nur in einzelnen Zellpopulationen erfassen, ist ein in vivo-Modell somit unerlässlich. Es existieren bisher Tiermodelle der Parodontitis für größere Tiere wie Primaten, Schweine, Schafe, Hunde und Kaninchen (Page & Schroeder, 1982; Madden & Caton, 1994; Berglundh et al., 2007). Die Anzahl der Individuen in diesen Testreihen war bedingt durch die Größe der Tiere oft sehr gering. Zwar konnten Schou et al. (Schou et al., 2003) mit periimplantären Ligaturen bei Affen eine Periimplantitis erzeugen. Ebenso gelang dies bei Hunden (Zitzmann et al., 2002), Schafen und Schweinen (Wang et al., 2007; Struillou et al., 2010). Dannan und Alkattan (Dannan und Alkattan 2008) verglichen 107 Tiermodelle zur Periimplantitis und Parodontitis. Dabei wurden am häufigsten Affen (15.58%) und Hunde (31.16%) verwendet. Im Hinblick auf die biologische Vergleichbarkeit erscheint die Nutzung von Primaten ideal. Allerdings besteht hier wie auch bei Hunden das Problem, dass Primaten zu groß sind um große Stückzahlen zu untersuchen und sich hieraus wiederum finanzielle und logistische Probleme ergeben.

Weiterhin ist aus dem Vergleich von wissenschaftlichen Studien zur Entstehung der Parodontitis von Menschen und verschiedenen Tierspezies bekannt, dass Erkenntnisse aus Tierstudien nur eingeschränkt auf den Menschen übertragen werden können (Page & Schroeder, 1982). Die morphologischen Ereignisse der Gingivitis und Parodontitis – und wahrscheinlich auch der periimplantären Mukositis und Periimplantitis – unterscheiden sich von Spezies zu Spezies. Page & Schroeder (1982) führen dafür folgende Gründe an: 1. die Art der infizierenden Bakterien, 2. die Art der Ernährung (über ihren Einfluss auf die mikrobiellen Wachstumsraten), 3. die Größe und die Konstruktion des Parodonts, 4. der Radius der Effektivität mikrobieller Plaque bezüglich der Induktion einer pathologischen Wirtsantwort, 5. die Stärke der entzündlichen Wirtsantwort und die Größe, Lokalisation und Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrates, 6. die Frequenz und Dauer der epithelialen Ulzeration und 7. die Lebensspanne, genetische Faktoren und tägliche Gewohnheiten des Wirtes.

Diskussion

Diese Faktoren müssen folglich bei der Interpretation der Ergebnisse aus Tierstudien berücksichtigt werden. Aufgrund ethischer Gesichtspunkte und der hohen Zahl an individuellen Einflussfaktoren führen Studien an Patienten aber zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen.

Daher erscheinen valide reproduzierbare Kleintiermodelle für das Verständnis der Periimplantitis unabdingbar. Vorteile von Mäusen als Versuchstiere sind das gut erforschte Genom, der schnelle Stoffwechsel, ein bekanntes Immunsystem, die geringen Kosten und die einfache Handhabung. Ein Mausmodell für das Verständnis von Entstehung und Fortschreiten der Periimplantitis erscheint daher wichtig. Durch die Induktion einer Periimplantitis im Mausmodell kann die Entwicklung und das Fortschreiten der Erkrankung untersucht und mit Hilfe von Knockout-Mäusen eingegrenzt werden. In Bezug auf genetische Fragestellungen scheinen Knockout-Mäuse Vorteile gegenüber anderen Spezies zu haben. Die dental-anatomischen Strukturen von Mäusen ähneln denen des Menschen. Das Gebiss von Nagern besteht aus einem Inzisivus und drei Molaren in jedem Quadranten. Die histopathologischen Vorgänge einer Parodontitis bei Mäusen sind bekannt.

Hierzu existieren bereits zahlreiche Tierstudien. Rovin et al. (1966) beschrieben erstmals das Modell der ligaturen-induzierten Gewebeerstörung an Ratten und zeigten, dass die parodontalen Läsionen nicht durch die Ligatur per se, sondern durch die Kombination von Ligatur und Mikroorganismen entstehen. Die ligaturen-induzierte Parodontitis erreicht früh eine starke Progredienz (Schroeder & Lindhe, 1975).

Kimura et al. (2000) legten um die ersten Molaren pathogen-freier C3H/HeN-Mäuse mit *Porphyromonas gingivalis* getränkte Ligaturen aus Seide, wiesen in Plaqueproben der behandelten Mäuse den Keim nach und zeigten einen mit der *Porphyromonas gingivalis*-Besiedelung korrelierenden Alveolarknochenverlust. Li und Amar (2007) führten einen ähnlichen Versuch durch und stellten vermehrten Alveolarknochenabbau bei den Mäusen fest, die mit einer mit *Porphyromonas gingivalis* getränkten Ligatur behandelt wurden. Bei den Mäusen, die eine nicht-infizierte Ligatur bekamen, konnte dies nicht gezeigt werden. In allen genannten Studien konnte nach der Gabe von *Porphyromonas gingivalis* Knochenabbau nachgewiesen werden. Wie dieser Knochenabbau entstanden sein soll, wird wenig diskutiert und bleibt offen.

Verschiedene Studien zeigten, dass durch Ligaturen auch eine Periimplantitis, ähnlich einer Parodontitis, provoziert werden kann. Lindhe et al. (1992) verglichen die Zerstörung der periimplantären versus parodontalen Gewebe, allerdings am Beaglehund, durch Applikation von Ligaturen über 6 Wochen. Die Ergebnisse ihrer Untersuchungen zeigten, dass die Zeichen der Gewebedestruktion an den Implantaten klinisch, radiologisch und histologisch ausgeprägter waren als an den Zähnen. Diese Ergebnisse von Lindhe et al. (1992) wurden durch weitere Untersuchungen über ligaturen-induzierte Periimplantitis bestätigt (Marinello et al. 1995).

5.2. Untersuchungszeitraum

Li und Amar (Li und Amar 2007) konnten zeigen, dass es sechs bis acht Wochen dauert bis sich eine Parodontitis bei Mäusen unter standardisierten Bedingungen künstlich erzeugen lässt. Der Verlust von Alveolarknochen ließ sich hierbei durch interdentale Ligaturen, die mit *Porphyromonas gingivalis* gezielt infiziert waren, verstärken (Li und Amar, 2007). In der vorangegangenen Pilotstudie von Becker et al. (Becker et. al, 2011) lag der Untersuchungszeitraum bei 9 Wochen. Hier wurde jedoch aufgrund der Ergebnisse vermutet, dass der Untersuchungszeitraum in aufbauenden Studien verkürzt werden sollte.

Anlehnend an die genannten Studien wurde in dieser tierexperimentellen Arbeit der Untersuchungszeitraum auf 42 Tage begrenzt. Die Ligaturen waren nicht mit speziellen parodontitis-assoziierten bakteriellen Leitkeimen getränkt. Es wurde jedoch eine spezielle hochkalorische, kohlenhydrathaltige Tiernahrung mit einem Kohlehydratanteil von 61% (ssniff AIN 93G) verwendet, die die Plaqueentstehung und das Bakterienwachstum fördert. Gleichzeitig wurde der Vergleich der Entstehung einer Periimplantitis von Implantaten ohne Ligatur und Implantaten, bei denen eine akute Destruktion mittels Vicryl-Ligaturen provoziert wurde, angestrebt. In Bezug auf genetische Fragestellungen und um die Ätiologie der Periimplantitis weiter zu erforschen, sollte weiterhin ein Vergleich zwischen normalen Mäusen und Knockout-Mäusen erfolgen. Hierzu wurden immundefiziente Mäuse der Art NOD2 gewählt.

Nach 6 Wochen erfolgte die Dokumentation der in situ verbliebenden Membrannägel. Sowohl in der Gruppe Normal (C57BL/6N) NUR Implantat als auch in der Gruppe Knockout NUR Implantat verblieben von ursprünglich jeweils 10 Implantaten 4

Implantate in situ (siehe Abb.4.3.). Bei jeweils 6 Mäusen aus beiden Gruppen waren die inserierten Implantate aus dem Oberkiefer herausgefallen. In beiden Gruppen, Normal (C57BL/6N) Implantat UND Ligatur sowie Knockout Implantat UND Ligatur, in denen die Implantate der Versuchstiere zuvor mit Ligaturen versorgt worden waren, gingen alle Implantate verloren. Es konnte ein signifikant höherer Implantatverlust ($P=0,0227$) in den Gruppen Normal (C57BL/6N) Implantat UND Ligatur sowie Knockout Implantat UND Ligatur im Vergleich zu den Gruppen Normal und Knockout NUR Implantat nachgewiesen werden. Allerdings gingen in beiden Gruppen der Versuchstiere mit unversehrten Implantaten, Normal und Knockout NUR Implantat, gleich viele Implantate verloren und es zeigte sich histologisch und radiologisch eine deutliche Osteolyse an der Implantatposition, die auf die Periimplantitis zurückzuführen zu sein scheint. Hieraus wurde geschlossen, dass während der sechs Wochen eine Periimplantitis erzeugt wurde, die jedoch vermutlich aufgrund des noch immer zu langen Beobachtungszeitraums zum hohen Implantatverlust geführt hat. In weiteren auf diesem Experiment aufbauenden Studien mit Knockout-Mäusen sollte daher der Beobachtungszeitraum noch weiter verkürzt werden. Es konnte bei keinem der verloren gegangenen Implantate aus allen Gruppen festgestellt werden, an welchem Beobachtungstag das Implantat verloren ging. Hierzu könnte in einem weiteren Versuch über eine Zwischenanalyse, beispielsweise mit Computertomographie, nachgedacht werden.

5.3. Inserteration der Implantate

Die Schwierigkeit einer verlässlichen und reproduzierbaren enossalen Insertion der Implantate in lebenden Mäusen konnte bereits in der Pilotstudie von Becker et al. (Becker et al. 2011) überwunden werden. Die Implantate wurden minimalistisch gewählt, um umgebende Gewebe so wenig wie möglich zu beschädigen. So wurden wie auch in dieser vorliegenden Arbeit FRIOS® Membrannägel (0,4mm x 1,6mm) der Firma Dentsply Friadent GmbH, Mannheim, aus einer Titanlegierung gefertigt, gammasterilisiert und damit biokompatibel verwendet. Für die Position der Titanannägel wurde die Region median am Gaumen direkt hinter den oberen Schneidezähnen gewählt. So bestand zum einen ein physiologischer Bezug zur Mundhöhle, zum anderen wurden keine wichtigen Strukturen, wie beispielsweise der Gesichtsschädel oder das Gehirn durch die Implantation zerstört. Dennoch kam es offensichtlich zum

Beispiel bei den Mäusen mit den Nummern 21-12, 44-12 und 48-12 zu einer in den zugehörigen Mikroradiographien erkennbaren Perforation der Nasenhaupthöhle. Als Grund hierfür sind die engen anatomischen Strukturen zu nennen. Die physiologische Dicke des Gaumens beträgt bei Mäusen nur ca. 1mm. Als alternativer Implantationsort wäre die leere Alveole des Inzisivus denkbar gewesen. Die Entfernung eines Zahnes allerdings und die Implantation in die verbliebene leere Alveole zeigte in vorangegangenen Untersuchungen an toten Mäusen, dass dies ebenfalls nicht ohne Beschädigung der umgebenden Strukturen möglich ist. Außerdem könnte der Zug der Oberlippe bei Einbringen der Membrannägel in die leere Alveole zur Verminderung des Knochenimplantatkontakts und damit zu einem frühzeitigen Verlust der Implantate führen. Zudem zeigten die Versuchstiere nach palatinaler Implantation keinerlei Veränderungen bei der gewohnten Nahrungsaufnahme und in ihrem Verhalten. Jedoch ist auch an dem palatinal gewählten Implantationsort nicht auszuschließen, dass die Zunge zu einer mechanischen Irritation und somit zur Beeinflussung der Osseointegration des Implantats geführt haben könnte.

5.4. Wahl des Implantatdesigns und –materials

Durch die Interaktion von Implantatoberfläche und Wirtsgewebe entsteht ein unterschiedlicher anatomischer Aufbau zwischen gesundem Parodontium und einem osseointegrierten Implantat. Bei Implantaten verlaufen die Kollagenfasern parallel zur Implantatoberfläche, bei natürlichen Zähnen hingegen senkrecht zur Zahnoberfläche. Außerdem besteht eine geringere vaskuläre Versorgung des periimplantären Gewebes (Marinello et al., 1995). Besonders die Oberfläche des Implantates spielt beim Fortschreiten der Periimplantitis eine entscheidende Rolle (Albouy et al., 2010; Grössner-Schreiber et al., 2009). Handelsübliche humane enossale Implantate bestehen heutzutage daher aus Titan, das sich durch eine hervorragende Biokompatibilität auszeichnet (Lautenschlager und Monaghan, 1993). Anwendung finden vor allem Titanlegierungen, bei denen es durch Zulegieren von anderen Metallen zur Verfestigung des Titans kommt. Außerdem nutzen diverse Hersteller die Möglichkeit der Oberflächenaktivierung um die Knochenapposition rund um das Implantat weiter zu beschleunigen. Einige prospektive humanhistologische Studien

Diskussion

weisen darauf hin, dass raue Titanoberflächen einen höheren initialen Knochenimplantatkontakt (KIK) ermöglichen als glatte Titanoberflächen.

Ein höherer Knochenimplantatkontakt für raue Titanoberflächen wurde auch von Trisi et al. (1999) in einer histometrischen Studie gefunden. Nach 3, 6 und 12 Monaten betrug der KIK der glatten Oberfläche 6,2%, 3,6% und 6,7%. Die korrespondierenden Werte für die raue Oberfläche waren 58,9%, 72,9% und 76,8%.

Für diese Studie stand aufgrund der geringen Größe der Mäuse ein handelsübliches Implantat mit vorbehandelter Oberfläche oder Schrauben mit vergleichbaren Eigenschaften nicht zur Verfügung. Die verwendeten FRIOS Implantatnägel wurden aus einer Titanlegierung gefertigt, gammasterilisiert und ließen sich sicher inserieren. Das Design der Membrannägel imitiert nicht die im Handel befindlichen enossalen Implantate. Der relativ große Implantatkopf fördert die Plaqueakkumulation und die physiologische Reinigung der Zunge am Eintrittsort des Implantats durch die Mukosa konnte somit nicht genutzt werden. In einer auf diesem Tierexperiment aufbauenden Studie wäre es daher sinnvoll, Mikroimplantate mit unterschiedlichen Oberflächen und in einem den humanen enossalen Implantaten nachempfundenen Design zu entwickeln und zu verwenden.

Die Membrannägel in allen Gruppen wurden bei der Implantatinsertion mit der Implantatschulter auf Knochenniveau inseriert. Nach Tarnow et al. (2000) stellen mikrobielle und mechanische Noxen Verletzungen der biologischen Breite dar, die zu einer Knochenresorption führen. Da die physiologische Breite des Gaumens bei Mäusen nur circa 1mm beträgt, könnte ein chirurgisches Trauma bei der Insertion der Membrannägel durch das Membrannägel-Setzinstrument in besonderem Maße entstanden sein. Eine zu geringe Höhe der periimplantären Mukosa stellt möglicherweise ebenfalls eine Verletzung der biologischen Breite dar, die zu einer Knochenresorption führt. Dies folgerten Berglundh & Lindhe (1992) in einer Studie mit zweiteiligen Implantaten am Beaglehund. In der vorliegenden Untersuchung wurde keine Schleimhautdickenmessung vorgenommen.

5.5. Histologische Aufbereitung

Die histologische Aufbereitung der Implantate erfolgte nach der Trenn-Dünnschliff-Technik (Donath & Breuner, 1982). Diese Methode erlaubt die Herstellung von nicht entkalkten Präparaten. Dies ermöglicht, Implantate in direktem Kontakt zum Hart- und Weichgewebe darzustellen.

Ein Nachteil der Trenn-Dünnschliff-Technik ist allerdings die relativ große Dicke der Präparate (50–80 μm). Die Schichtdicke histologischer Präparate beeinflusst die Genauigkeit histometrischer und histomorphometrischer Messungen erheblich (Johansson & Morberg, 1995). Bei zunehmender Schichtstärke der Präparate wird der bestimmbare Knochenimplantatkontakt vergrößert. Dabei ist schon ein Unterschied zwischen Präparaten von 30 und 50 μm statistisch signifikant. Aufgrund des Vorgehens mit der Dünnschliff-Technik war eine morphometrische Auswertung der periimplantären Weichgewebe bezüglich der Dichte an Fibroblasten, vaskulären Strukturen, Entzündungszellen, Kollagenfasern und Residualmatrix nicht möglich. Für eine detaillierte morphometrische Analyse sollten nach Berglundh et al. (1991) die Schnitte dünner als 1 μm sein und elektronenmikroskopisch ausgewertet werden. Wilensky et al. (2005) verglichen in ihrer Studie die morphometrische Methode mit den Messungen am Mikro-Computer-Tomogramm ($\mu\text{-CT}$). In diesem Experiment wurden sieben bis acht Wochen alte BALB/c-Mäuse nach der von Baker et al. (1994) vorgestellten Methode mit *Porphyromonas gingivalis* behandelt und nach 42 Tagen der Alveolarknochenverlust untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich die mit morphometrischer Methode gewonnenen Werte zwischen unbehandelten und behandelten Mäusen statistisch nicht unterschieden. Die Messungen mit dem $\mu\text{-CT}$ wiesen jedoch signifikant größeren Knochenverlust bei der mit *Porphyromonas gingivalis* behandelten Gruppe auf.

5.6. Wahl der Immundefizienz

In Bezug auf genetische Fragestellungen und um die Ätiologie der Periimplantitis weiter zu erforschen, wurde in diesem Tierexperiment ein Vergleich zwischen normalen Mäusen und Knockout-Mäusen angestrebt. Verschiedene Arten von Knockout-Mäusen, die für die Untersuchung von Entzündungskaskaden relevant sind, stehen heutzutage zur Verfügung.

Diskussion

In dieser Studie wurden NOD2-defiziente Mäuse gewählt. Bei dem Protein NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2) handelt es sich um einen intrazellulären Rezeptor für Fremdstoffe im angeborenen Immunsystem der Säugetiere (Ogura et al., 2001 a), der hauptsächlich zytosolisch von Monozyten, Makrophagen (Ogura et al., 2001 b), aber auch von dendritischen Zellen, Granulozyten (Gutierrez et al., 2002) und intestinalen Epithelzellen exprimiert wird (Lala et al., 2003). NOD2 erkennt insbesondere das bakterielle Muramyl-Dipeptid (MDP) (Girardin et al., 2003), welches in der Zellwand einer Vielzahl gram-negativer und gram-positiver Bakterien zu finden ist. Nach Stimulation von NOD2 mit MDP kommt es zu einer Aktivierung des NF-Kappa-B-Signalweges. Dieser evolutionär konservierte Signalweg spielt eine essentielle Rolle in der Regulation diverser Gene, die mit der Entwicklung angeborener und adaptiver Reaktionen zur Erkennung und immunologischen Kontrolle pathogener Organismen assoziiert sind. Es kommt zu einer erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin-1 β , Interleukin-12 und Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha. Neuere Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass NOD2 neben bakteriellen auch virale Muster erkennt und als Folge dessen die virale Immunkaskade aktiviert (Sabbah & Chang, 2009). Bei der Pathogenese der marginalen Parodontitis spielen Monozyten und Makrophagen mit ihren Entzündungsmediatoren TNF- α bzw. IL-1 β eine entscheidende Rolle (Shapira et al., 2001). Zur Erkennung der bakteriellen Toxine und der damit verbundenen Mediatorfreisetzung sind die im Zytosol gelegenen Rezeptoren NOD1 und NOD2 von besonderer Wichtigkeit (Ogura et al.; 2001 a).

Bei der Entstehung von marginalen Parodontitiden ist zu vermuten, dass eine verminderte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine das Bakterienwachstum infolge geschwächter Immunabwehr begünstigen könnte (Van Heel et al., 2001). Die Verbesserung der Lebensbedingungen könnte es den Bakterien erleichtern, neue, möglicherweise aggressivere Virulenzfaktoren zu entwickeln, die zur Umgehung der Wirtsabwehr oder direkt zur Gewebsdestruktion führen. Bezogen auf das zytosolische NOD2 ist denkbar, dass ein Defekt zu einer fehlenden Reaktion auf spezifische Toxine führen und somit das bakterielle Wachstum gefördert werden könnte (Inohara et al., 1999).

Nachdem die Destruktion parodontalen Stützgewebes vor allem über proinflammatorische Zytokine vermittelt wird, könnte eine NOD2-Defizienz auch im Zusammenhang mit der Pathogenese der Periimplantitis stehen.

Diskussion

Daher wurde in der vorliegenden Studie ein möglicher Zusammenhang zwischen der NOD2/CARD15-Mutation und einer Periimplantitis im Mausmodell untersucht.

Somit wurden in 40 Mäusen Titannägel (FRIOS®, Abb. 1) median am Gaumen direkt hinter den oberen Schneidezähnen inseriert. Davon gehörten 20 Mäuse dem Inzuchtstamm der Art C57BL/6N (Normal) an. Weitere 20 Mäuse waren Knockoutmäuse (NOD2-defizient). Bei 20 Versuchstieren, jeweils bei 10 Mäusen der Art C57BL/6N und bei 10 Knockoutmäusen der Art NOD2, wurden die Membran-Nägel zusätzlich mit einer Ligatur versehen. Die Ergebnisse zeigen, dass Implantate mit Ligaturen klinisch, radiologisch sowie histologisch eine signifikant höhere periimplantäre Destruktion mit Implantatverlust induzieren, als die jeweiligen Kontrollgruppen. Sowohl in der Gruppe Normal als auch in der Gruppe Knockout NUR Implantat verblieben von ursprünglich jeweils 10 Implantaten 4 Implantate in situ. In beiden Gruppen, Normal Implantat UND Ligatur sowie Knockout Implantat UND Ligatur, in denen die Implantate der Versuchstiere zuvor mit Ligaturen versehen worden waren, gingen alle Implantate verloren. In beiden Gruppen, in denen die Implantate nicht mit einer Ligatur versehen worden waren (Normal NUR Implantat sowie Knockout NUR Implantat), gingen gleich viele (jeweils 6) Implantate verloren. Dies lässt darauf schließen, dass der gewählte genetische Defekt NOD2 der Knockoutmäuse keinen signifikanten Einfluss auf die Periimplantitis hat. Genetische Defekte sollten aber nicht nur isoliert betrachtet, sondern auch in Verbindung mit Umweltfaktoren gebracht werden. Weitere Untersuchungen können sich daher weiter auf Besonderheiten im genetisch veränderten Organismus konzentrieren.

6. Zusammenfassung

Dentale Implantate sind dank der medizinischen Fortschritte in den vergangenen zwei Jahrzehnten mehr und mehr zum Versorgungsstandard für die Rehabilitation von voll- und teilbezahnten Patienten herangereift. Doch die routinemäßig durchgeführten Implantatversorgungen scheinen trotz hoher Erfolgsraten nicht nur einen nutzbringenden Effekt für den Patienten zu haben (Carcuac & Jansson, 2010). Im bezahnten Gebiss ist die chronische Entzündung des Zahnhalteapparates mit Verlust desselben unter dem Begriff der Parodontitis seit langem bekannt. An Implantaten kann in Analogie dazu ebenfalls eine Erkrankung oraler Weich- und Hartgewebe wie die der periimplantären Mukositis und/oder der Periimplantitis entstehen. Die Ursachen, die zu einem entzündlich bedingten Verlust der implantatumgebenden Gewebe führen, sind bis heute nicht eindeutig geklärt (Pesce et al., 2014; Pirih et al., 2015). In klinischer Hinsicht erscheint es verständlicherweise naheliegend von ähnlichen Erkrankungsmechanismen wie bei Gingivitiden und Parodontitiden auszugehen. Während die Pathophysiologie der Parodontitis gut erforscht ist (Rateitschak, 1985), gibt es bei der Periimplantitis nur wenige Erkenntnisse über die Entstehung und das Fortschreiten der Erkrankung.

Aufbauend auf der wissenschaftlichen Pilotstudie von Becker et al. aus dem Jahr 2011 „Induktion der Periimplantitis mit dentalen Implantaten“ an Mäusen, wurde in der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit daher versucht, ein Knockoutmausmodell für die Untersuchung der Periimplantitis zu etablieren und damit zur Verbesserung der Fachkenntnisse zu Entstehung und Verlauf der periimplantären Entzündung beitragen zu können.

Basierend auf der Theorie, dass die Periimplantitis von genetischen und epigenetischen Faktoren beeinflusst wird, wurde in diesem Tierexperiment ein Vergleich zwischen normalen und immundefizienten Tieren angestrebt. Im Knockout-Mausmodell mit festgelegten genetischen Defekten dienten NOD2-defiziente Mäuse. Das Protein NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2) ist ein intrazellulärer Rezeptor für Fremdstoffe im angeborenen Immunsystem der Säugetiere (Ogura et al., 2001 a). Er erkennt Pathogene anhand charakteristischer Muster und fungiert als Auslöser einer komplexen Signalkaskade, die wesentlich an der Einleitung der Immunantwort beteiligt ist. Nach Stimulation von NOD2 kommt es zu einer erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine (Rosenstiel et al., 2003)

Zusammenfassung

durch eine Aktivierung des NF-Kappa-B-Signalweges, welche als kritisch für die Entstehung von Entzündungen gilt. Nachdem die Destruktion parodontalen Stützgewebes vor allem über proinflammatorische Zytokine vermittelt wird, könnte die Mutation des NOD2 Gens auch im Zusammenhang mit der Pathogenese der Periimplantitis stehen.

Im Versuchsaufbau wurden daher in 40 Mäusen Titannägel (FRIOS®) median am Gaumen direkt hinter den oberen Schneidezähnen inseriert. 20 Mäuse gehörten dem Inzuchtstamm der Art C57BL/6N (Normal) an. Weitere 20 Mäuse waren Knockoutmäuse (NOD2-defizient). Jeweils bei 10 normalen Mäusen und bei 10 Knockoutmäusen wurden die Membran-Nägel zusätzlich mit einer Vicryl-Ligatur versehen. Die 40 Mäuse wurden unter stetiger Gewichtskontrolle über einen Zeitraum von 6 Wochen mit hochkalorischer Nahrung ernährt, anschließend schmerzfrei euthanasiert und die Proben histologisch sowie radiologisch aufgearbeitet. In unserem tierexperimentellen Versuch konnte eine reproduzierbare Implantatinseration mit dem Hervorrufen einer Periimplantitis im Knockoutmausmodell erreicht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass Implantate mit Ligaturen klinisch, radiologisch sowie histologisch eine signifikant höhere periimplantäre Destruktion mit Implantatverlust induzieren, als die jeweiligen Kontrollgruppen.

Sowohl in der normalen als auch in der Knockoutmausgruppe, in denen die Implantate der Versuchstiere zuvor mit Ligaturen versehen worden waren, gingen alle Implantate verloren. In beiden Gruppen, in denen die Implantate nicht mit einer Ligatur versehen worden waren (Normal sowie Knockout NUR Implantat), gingen gleich viele (jeweils 6) Implantate verloren. Die verwendeten Titannägel (Frios®) ließen sich einfach und sicher in den Gaumen der Versuchstiere inserieren. In einer aufbauenden Studie wäre eine Weiterentwicklung des Implantatdesigns mit unterschiedlichen Oberflächen, Rauigkeiten und Modifikationen des Implantatkopfes sinnvoll. Ein Rückschluss der gewählten Immundefizienz NOD2 der Knockoutmäuse auf die Periimplantitis konnte nicht gezogen werden. Weitere Untersuchungen können sich auf Besonderheiten im genetisch veränderten Organismus konzentrieren.

7. Literaturverzeichnis

Albrektsson T, I. F. (1994). Proceedings of the First European Workshop on Periodontology . Consensus report of session IV (S. 365-369). London: Quintessenz.

Al-Nsour, M., Chan, H., & Wang, H. (Jan 2012). Effect of the platform-switching technique on preservation of peri-implant marginal bone: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants* , 27 (1), S. 138-45.

Astasov-Frauenhoffer, M., Braissant, O., Hauser-Gerspach, I., Weiger, R., Walter, C., Zitzmann, N., et al. (Feb 2014). Microcalorimetric determination of the effects of amoxicillin, metronidazole, and their combination on in vitro biofilm. *J Periodontol* , 85 (2), S. 349-57.

Becker, S., Föge, M., Beck-Broichsitter, B., Gavrilova, O., Bolte, H., Rosenstiel, P., et al. (Jan 2013). Induction of periimplantitis in dental implants. *J Craniofac Surg* , 24 (1), S. e15-8.

Belibasakis, Belibasakis , G. N., Charalampakis, G., Bostanci, N., & Stadlinger, B. (2015). Peri-implant infections of oral biofilm etiology. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (830), 69-84.

Belibasakis, G. N. (2014). Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. 59 (1), 66-72.

Berglundh, T., & Lindhe, J. (1996). Dimension of the periimplant mucosa. Biological width revisited. *J Clin Periodontol* , 23 (10), S. 971-3.

Berglundh, T., Gotfredsen, K., Zitzmann, N. U., Lang, N. P., & Lindhe, J. (2007). Spontaneous progression of ligature induced peri-implantitis at implants with different surface roughness: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants res* , 18, S. 655-661.

Branemark, P., Zarb, G., & Albrektsson, T. (1985). *Gewebeintegrierter Zahnersatz*. Berlin: Quintessenz.

Braun, R., & Willnow, E. (1996). Die Knockout-Maus als Krankheitsmodell: Prinzipien und klinische Relevanz. *Deutsches Ärzteblatt* , 93 (26), S. 1765.

Literaturverzeichnis

Brinkmann, E., & Hartmann, H.-J. (2000). Weißbuch Implantologie. Bonn: Jahrbuch-Verlag.

Carcuac, O., & Jansson, L. (2010). Peri-implantitis in a specialist clinic of periodontology. Clinical features and risk indicators. 34 (2), 53-61.

Charyeva, O., Altynbekov, K., Zhartybaev, R., & Sabdanaliev, A. (2012). Long-term dental implant success and survival--a clinical study after an observation period up to 6 years. Swed Dent J , 36 (1), S. 1-6.

Corbella, S., Del Fabbro, M., Taschieri , S., De Siena, F., & Francetti , L. (Aug 2011). Clinical evaluation of an implant maintenance protocol for the prevention of peri-implant diseases in patients treated with immediately loaded full-arch rehabilitations. Int J Dent Hyg , 9 (3), S. 216-22.

Costa, F., Takenaka-Martinez, S., Cota, L., Ferreira , S., Silva, G., & Costa, J. (Feb 2012). Peri-implant disease in subjects with and without preventive maintenance: a 5-year follow-up. J Clin Periodontol. , 39 (2), S. 173-81.

Dannan, A., & Alkattan, F. (2008). Animal Models in Periodontal Research: A Mini-Review of the Literature. The Internet Journal of Veterinary Medicine , 5 (1).

Daubert, D., Weinstein, B., Bordin, S., Leroux, B., & Flemming , T. (Mar 2015). Prevalence and predictive factors for peri-implant disease and implant failure: a cross-sectional analysis. J Periodontol , 86 (3), S. 337-47.

Deutsches Ärzteblatt. (1996). 93 , 26.

DGI - Deutsche Gesellschaft für Implantologie im Zahn-, Mund- und Kieferbereich e. V. (2016). Hannover.

Evans, M., Carlton, M., & Russ, A. (Sep 1997). Gene trapping and functional genomics. Trends Genet , 13 (9), S. 370-4.

Fischer, J., Kolk, A., Wolfart, S., Pautke, C., Warnke, P., Plank, C., et al. (Jan 2011). Future of local bone regeneration - Protein versus gene therapy. J Craniomaxillofac Surg , 39 (1), S. 54-64.

Gatti, C., Gatti, F., Chiapasco, M., & Esposito, M. (Spring 2008). Outcome of dental implants in partially edentulous patients with and without a history of periodontitis: a 5-year interim analysis of a cohort study. *Eur J Oral Implantol.*, 1 (1), S. 45-51.

Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., et al. (2003). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection.

Goto, T. (Feb 2014). Osseointegration and dental implants. *Clin Calcium*, 24 (2), S. 265-71.

Gutierrez, O., Pipaon, C., Inohara, N., Fontalba, A., Ogura, Y., Prosper, F., et al. (2002). Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem*, 277, S. 41701-41705.

Hsu, Y., Mason, S., & Wang, H. (Jan 2014). Biological implant complications and their management. *J Int Acad Periodontol*, 16 (1), S. 9-18.

Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., et al. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411, S. 599-603.

Huynh-Ba, G., Lang, N., Tonetti, M., Zwahlen, M., & Salvi, G. (Nov 2008). Association of the composite IL-1 genotype with peri-implantitis: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*, 19 (11), S. 1154-62.

Jepsen, S., Berglundh, T., Genco, R., Aass, A., Demirel, K., Derks, J., et al. (Apr 2015). Primary prevention of peri-implantitis: managing peri-implant mucositis. *J Clin Periodontol*, 42 (16), S. 152-7.

Khammissa, R., Feller, L., Meyerov, R., & Lemmer, J. (Apr 2012). Peri-implant mucositis and peri-implantitis: clinical and histopathological characteristics and treatment. *SADJ*, 67 (3), S. 122,4-6.

Kimura, S., Nagai, A., Onitsuka, T., Koga, T., Fujiwara, T., Kaya, H., et al. (2000). Induction of experimental periodontitis in mice with *Porphyromonas gingivalis*-adhered ligatures. *J Periodontol*, 71, S. 1167-73.

Literaturverzeichnis

Koldsland, O., Scheie, A., & Aass, A. (Mar 2011). The association between selected risk indicators and severity of peri-implantitis using mixed model analyses. *J Clin Periodontol* , 38 (3), S. 285-92.

Kornman, K., Page, R., & Tonetti, S. (1997 b). The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology 2000* , 14, S. 33-53.

Korsch , M., Obst, U., & Walther, W. (Jul 2014). Cement-associated peri-implantitis: a retrospective clinical observational study of fixed implant-supported restorations using a methacrylate cement. *Clin Oral Implants Res* , 25 (7), S. 797-802.

Korsch, M., & Walther, W. (Oct 2015). Peri-Implantitis Associated with Type of Cement: A Retrospective Analysis of Different Types of Cement and Their Clinical Correlation to the Peri-Implant Tissue. *Clin Implant Dent Relat Res* , 17 (2), S. e434-43.

Lüllmann-Rauch, R. (2003). *Histologie*. Thieme.

Lagervall, M., & Jansson, L. (Oct 2013). Treatment outcome in patients with peri-implantitis in a periodontal clinic: a retrospective study. *J Periodontol* , 84 (10), S. 1365-73.

Lala, S., Ogura, Y., Osborne, C., Hor, S. Y., Bromfield, A., Davies, S., et al. (2003). Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* , 125, S. 47-57.

Lautenschlager, E. P., & Monaghan, P. (1993). Titanium and titanium alloy as dental materials. *Int J Dent* , 43, S. 245-253.

Lorenz, B., & Klang, T. (Apr 2013). Treating peri-implantitis using a combined regenerative/resective procedure: a case report. *Compend Contin Educ Dent* , 34 (4), S. e57-61.

Müller, H.-P. (2006). *Parodontologie (Bd. 2)*. Stuttgart: Thieme.

Literaturverzeichnis

Madden, T. E., & Caton, J. G. (1994). Animal models for periodontal disease. *Methods Enzymol* , 235, S. 106-119.

Mak, T. (Dec 2007). Gene targeting in embryonic stem cells scores a knockout in Stockholm. *Cell* , 131 (6), S. 1027-31.

Mir-Mari, J., Mir-Orfila, P., Figueiredo, R., Valmaseda-Castellón, E., & Gay-Escoda, C. (May 2012). Prevalence of peri-implant diseases. A cross-sectional study based on a private practice environment. *J Clin Periodontol* , 39 (5), S. 490-4.

Mishler, O., & Shiau, H. (Jun 2014). Management of peri-implant disease: a current appraisal. *J Evid Based Dent Pract* , 14, S. 53-9.

Mombelli, A. (1997). Etiology, diagnosis, and treatment considerations in peri-implantitis. *Curr Opin Periodontol* , 4, S. 127-36.

Mombelli, A., van Oosten, M., Schurch, E., & Land, N. (Dec 1987). The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol* , 2 (4), S. 145-51.

Moore, W., & Moore, L. (Jun 1994). The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000* , 5, S. 66-77.

Nichols, T. C., Fischer, T. H., Efthymios, N. D., & Baldwin, A. S. (2001). Role of nuclear factor kappa B (NF- κ B) in inflammation, periodontitis, and atherogenesis. *Ann Periodontol* , 6, S. 20-29.

Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., et al. (2001 a). A frameshift mutation in Nod2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* , 411, S. 603-606.

Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F. F., Yamaoka, S., & Nunez, G. (2001 b). Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappa B. *J Biol Chem* , 276, S. 4812-4818.

Page, R. C., & Schroeder, H. E. (1982). Periodontitis in other mammalian animals. *Periodontitis in man and other animals, a comparative review.*

Literaturverzeichnis

- Pesce, P., Menini, M., Bevilacqua, M., Tealdo, T., Pera, F., & Pera, P. (2014). The International journal of prosthodontics, 27 (1), 15-25.
- Pirih, F. Q., Hiyari, S., Leung, H.-Y., Barroso, A. D., Jorge, A. C., Perussolo, J., et al. (2015). A Murine Model of Lipopolysaccharide-Induced Peri-Implant Mucositis and Peri-Implantitis. Journal of Oral Implantology, 41 (5), e158-e164.
- Renvert, S., Polyzois, I., & Persson, G. (Dec 2013). Treatment modalities for peri-implant mucositis and peri-implantitis. Am J Dent, 26 (6), S. 313-8.
- Renvert, S., & Persson, G. (Jul 2009). Periodontitis as a potential risk factor for peri-implantitis. J Clin Periodontol, 36 (10), S. 9-14.
- Rosenstiel, P., Fantini, M., & Bräutigam, K. (2003). TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of NOD2(CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. 124, S. 1001-1009.
- Rovin, S., Costich, E., & Gordon, H. (1966). The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. J Periodontal Res, 1 (3), S. 193-204.
- Sabbah, A., & Chang, T. H. (Oct 2009). Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. Nature immunology, 10 (10), S. 1073-1080.
- Salvi, G., Fürst, M., Lang, N., & Persson, G. (Mar 2008). One-year bacterial colonization patterns of Staphylococcus aureus and other bacteria at implants and adjacent teeth. Clin Oral Implants Res, 19 (3), S. 242-8.
- Schou, S., Holmstrup, P., Jørgensen, T., Skovgaard, L. T., Stoltze, K., Hjørting-Hansen, E., et al. (2003). Implant surface preparation in the surgical treatment of experimental peri-implantitis with autogenous bone graft and ePTFE membrane in cynomolgus monkeys. Clinical Oral Implants Research, 14 (4), S. 412-22.
- Schroeder, H., & Lindhe, J. (Dec 1975). Conversion of stable established gingivitis in the dog into destructive periodontitis. Arch Oral Biol, 20 (12), S. 775-82.
- Schwartz, Z., Goultschin, J., Dean, D. D., & Boyan, B. (1997). Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. Periodontology 2000, 14, S. 158-172.

Literaturverzeichnis

Schwarz, F., Sculean, A., Bieling, K., Ferrari, D., Rothamel, D., & Becker, J. (Jan 2008). Two-year clinical results following treatment of peri-implantitis lesions using a nanocrystalline hydroxyapatite or a natural bone mineral in combination with a collagen membrane. *J Clin Periodontol* , 35 (1), S. 80-7.

Serino, P., Turri, A., & Lang, N. (Aug 2015). Maintenance therapy in patients following the surgical treatment of peri-implantitis: a 5-year follow-up study. *Clin Oral Implants Res* , 26 (8), S. 950-6.

Shapira, L., Stabholz, A., Rieckmann, P., & Kruse, N. (2001). Genetic polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF)-alpha promotor region in families with localized early-onset periodontitis. *J Periodonol Res* , 36, S. 183-186.

Slot, J., & Taubermann, M. (1992). *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*. Oxford, United Kingdom: Mosby Inc., Elsevier Limited.

Smeets, R., El-Moawen, A., Jung, O., Hanken, H., Hartjen, P., Heiland, M., et al. (Oct 2014 b). From bench to application: current practices in tissue engineering and its realisation at maxillofacial units in Germany, Austria and Switzerland. *J Craniomaxillofac Surg* , 42 (7), S. 1128-32.

Smeets, R., Hennigsen, A., Jung, O., Heiland, M., Hammächer, C., & Stein, J. (Sep 2014 a). Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis--a review. *Head Face Med* , 10, S. 34.

Socransky , S., Ximénez-Fyvie , L., & Haffajee , A. (Oct 2000). Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol* , 27 (10), S. 722-32 .

Spiekermann, H. (1984). *Implantologie*. Stuttgart: Thieme.

Strub, J. R., Kern, M., Türp, J. C., Witkowski, S., Heydecke, G., & Wolfart, S. (2011). *Curriculum Prothetik* (Bd. 3). Berlin: Quintessenz.

Struillou, X., Boutigny, H., Soueidan, A., & Layrolle, P. (2010). Experimental animal models in periodontology: a review. *The Open Dentistry Journal* , 29 (4), S. 37-47.

Literaturverzeichnis

Swierkot, K., Lottholz, P., Flores-de-Jacoby, L., & Mengel, R. (Oct 2012). Mucositis, peri-implantitis, implant success, and survival of implants in patients with treated generalized aggressive periodontitis: 3- to 16-year results of a prospective long-term cohort study. *J Periodontol* , 83 (10), S. 1213-25.

Wang, S., Liu, Y., Fang, D., & Shi, S. (2007). The miniature pig: a useful large animal model for dental and orofacial research. *Oral Diseases* , 13 (6), S. 530-7.

Wilson, T. (Sep 2009). The positive relationship between excess cement and peri-implant disease: a prospective clinical endoscopic study. *J Periodontol* , 80 (9), S. 1388-92.

Wilson, V. (April 2013). An insight into peri-implantitis: a systematic literature review. *Prim Dent J* , 2 (2), S. 69-73.

Zitzmann, N. U., Abrahamsson, I., Berglundh, T., & Lindhe, J. (2002). Soft tissue reactions to plaque formation at implant abutments with different surface topography. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* , 29 (5), S. 456-61.

Zitzmann, N., & Berglundh, T. (Sep 2008). Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol* , 35 (8), S. 286-91.

8. Anhang

8.1. Tierversuchsantrag

Der Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens wurde beim Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt und läuft unter der Nummer V 312-72241.121-14.

Danksagung

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Jörg Wiltfang und der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie UKSH, Campus Kiel gilt mein Dank für die Genehmigung des Themas und alle Bemühungen, die zum Gelingen meines Vorhabens beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Stephan Becker für das Überlassen des Themas, seine geduldige und engagierte Betreuung sowie seine überaus schnelle und stetige Diskussionsbereitschaft bei Fragen und Problemen.

Herrn Prof. Dr. Acil, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie UKSH, Campus Kiel und Fr. Neßenius danke ich für die fachliche Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Präparate.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Klapper, Sektion Hämatopathologie im Institut für Pathologie UKSH, Campus Kiel und seinen Mitarbeitern Dr. Gontarewicz und Fr. Botz-von Drahten für die immer freundliche und tatkräftige Hilfe bei der Auswertung der histologischen Präparate.

Meiner besten Freundin Kristin Gipp danke ich herzlich für die kritische Durchsicht des Manuskripts als Außenstehende.

Ich danke meinem Mann Philip Stehling, dessen Motivation und Unterstützung mich stets begleiten.

Schließlich möchte ich meine liebevollen Eltern noch erwähnen, ohne deren Beitrag ich mein Studium und diese Arbeit nicht hätte bewältigen können. Ich danke euch von ganzem Herzen für den Rückhalt und das in mich gesetzte Vertrauen.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kathrin Stehling, geb. Liekfeld

Geburtsdatum/-ort: 12.04.1986 in Pasewalk

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulische Ausbildung

1992 - 1996 Grundschule Löcknitz

1996 - 2005 Deutsch-Polnisches-Gymnasium/Europaschule
Löcknitz

Schulabschluss

Juli 2005 Allgemeine Hochschulreife

Studium

August 2005 - September 2006 Duales Studium zur Diplomverwaltungswirtin
bei der deutschen Rentenversicherung Nord in
Neubrandenburg

Oktober 2006 - November 2011 Studium der Zahnmedizin an der Christian-
Albrechts-Universität zu Kiel

Berufliche Tätigkeit

Dezember 2011 - März 2012 Assistenz Zahnärztin in freier Praxis, Kiel

April 2012 - Juli 2013 Zahnärztliche Assistenzzeit im Universitätsklinik-
um Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Abteilung
für Zahnärztliche Prothetik bei Prof. Dr. M. Kern

August 2013 - Dezember 2015 Weiterbildungsassistentin in kieferorthopädischer
Praxis, Rendsburg

Januar 2016 - laufend Weiterbildungsassistentin in der Klinik für Kiefer-
orthopädie im Universitätsklinikum Schleswig-
Holstein, Campus Kiel, bei Prof. Dr. Fischer-
Brandies

11. Publikation

Liekfeld K, Beck-Broichsitter B, Gavrilova O, Wiltfang J, Becker ST:
Genetische Grundlagen der Periimplantitis: ein Knockoutmausmodell. Dtsch
Zahnärztl Z 2016; 68: 71 (2), D7.