

CERANANO

Untersuchung und Beurteilung nanopartikulärer Abriebe bei keramischen
Zahnimplantaten

Wien, 10.03.2025

Impressum

Medieninhaber, Verleger und Herausgeber:

Bundesministerium für Klimaschutz, Umwelt, Energie, Mobilität, Innovation und Technologie, Radetzkystraße 2, 1030 Wien

Autorinnen und Autoren: Anna Pavlicek MSc. MSc., Ass.Prof. Dr. Seta Küpcü, Priv. Doz. DI Dr. Florian Part, Ass.Prof. Mag. Dr. Christian Zafiu, Marius Koppler MSc., DI Dr. Andreas Breitwieser und Univ.Prof. Dr. Eva-Kathrin Ehmoser

Gesamtumsetzung: Univ. Prof. Dr. Eva-Kathrin Ehmoser

Barrierefreiheit: Barrierefrei PDF OG

Wien, 2025. Stand: 10. März 2025

Copyright und Haftung:

Auszugsweiser Abdruck ist nur mit Quellenangabe gestattet, alle sonstigen Rechte sind ohne schriftliche Zustimmung des Medieninhabers unzulässig. Es wird darauf verwiesen, dass alle Angaben in dieser Publikation trotz sorgfältiger Bearbeitung ohne Gewähr erfolgen und eine Haftung des Bundeskanzleramtes und der Autorin/des Autors ausgeschlossen ist. Rechtausführungen stellen die unverbindliche Meinung der Autorin/des Autors dar und können der Rechtsprechung der unabhängigen Gerichte keinesfalls vorgreifen.

Rückmeldungen: Ihre Überlegungen zu vorliegender Publikation übermitteln Sie bitte an empfaenger@bmk.gv.at.

Vorwort



Foto des Projektteams CERANANO, BOKU Innenhof. Erste Reihe: v. li.: Ass.Prof. Dr. Seta Küpcü, Univ.Prof. Dr. Eva-Kathrin Ehmoser, Anna Pavlicek MSc. MSc. Hintere Reihe: v.li.: DI Dr. Andreas Breitwieser, Marius Koppler MSc., Priv. Doz. DI Dr. Florian Part und Ass.Prof. Mag. Dr. Christian Zafiu (nicht auf dem Foto).

Keramische Zahnimplantate sind eine etablierte Alternative zu herkömmlichen Titanimplantaten. Historisch betrachtet haben sich die keramischen Materialien aus einem Nischendasein heraus entwickelt, wobei vor allem die Bruchfestigkeit durch Optimierung der Materialkomposition stetig verbessert werden konnte. Die Motivation, alternative Materialien zu den Titanimplantaten zu entwickeln, bestand in der Notwendigkeit, ein optimaleres bzw. allergie- und entzündungsfreieres Einwachsverhalten zu erreichen. Im Gegensatz zu titanbasierten Implantaten gibt es bei den keramischen Alternativen keine Literatur über die Auswirkungen von nanoskaligem Abrieb, welcher beispielsweise bei Unfällen oder bei der Entfernung eines Implantates entstehen kann.

Unser Projektteam bestand aus Expert:innen verschiedener Disziplinen, darunter Materialwissenschaften, Biochemie und Biophysik sowie Biologie. In dieser interdisziplinären Konstellation wurden die zell- und immunbiologischen Auswirkungen der nanoskaligen Keramikpartikel durch morphologische, zellbiologische und markerbasierte Studien untersucht. Zusätzlich wurde eine SWOT-Analyse, basierend auf Umfragedaten zur praktischen Anwendung, durchgeführt, um die Vor- und Nachteile sowie Chancen und Risiken von Keramikimplantaten näher darzustellen. Die Betrachtung potentieller Risiken über den Lebenszyklus eines Keramikimplantates hinweg wurde anhand von Expositionswegen dargestellt. Dieser umfassende Bericht leistet einen Beitrag zur Weiterentwicklung biokompatibler, langlebiger und sicherer Zahnimplantatmaterialien, wobei der Schwerpunkt auf nanoskalige Spezifika gelegt wurde, die bislang nicht im Fokus der Forschung standen.

Univ.Prof. Dr.rer.nat. Eva-Kathrin Ehmoser

Leiterin des Instituts für Synthetische Bioarchitekturen

Inhalt

Vorwort	3
Zusammenfassung	6
1 Einleitung – Keramische Zahnimplantate	8
1.1 Hintergrund, Aufbau, Eigenschaften und Verträglichkeit sowie mögliche Risiken innovativer Materialien.....	8
1.1.1 Hintergrund.....	8
1.1.2 Aufbau der Keramikimplantate.....	9
1.1.3 Eigenschaften und Verträglichkeit aktuell eingesetzter keramischer Zahnimplantate	12
1.1.4 Mögliche Risiken des Materialabriebes	14
1.1.5 Fazit	14
1.2 Betrachtung des <i>status quo</i> keramischer Zahnimplantate	15
1.3 Knochenhomöostase	17
1.4 Projektziele	18
2 Methodische Herangehensweise	22
2.1 Literaturrecherche	22
2.2 Mikroskopie und Analytik	22
2.2.1 Transmissionselektronenmikroskop (TEM).....	22
2.2.2 Rasterelektronenmikroskop (REM).....	23
2.2.3 Licht- und Fluoreszenzmikroskop.....	23
2.2.4 Dynamische Lichtstreuung.....	23
2.3 Antikörperstudie	24
2.4 Experimente in der Zellkultur	24
2.4.1 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)	25
2.4.2 Zytokin Assay.....	25
2.4.3 Zytotoxizität Assay	25
2.5 Stakeholdereinbindung mittels Onlineumfrage	26
2.6 SWOT-Analyse.....	26
2.7 Versuchsmaterial	27
2.7.1 ACERDenco G2.....	27
2.7.2 Nanotitandioxid	28
3 Ergebnisse	29
3.1 Materialuntersuchung der Hochleistungskeramik (ACERDenco G2)	29
3.2 Nanotitandioxid	30

3.3 Zelllinien Cl-huOB.....	32
3.4 Zellkultur	35
3.4.1 Zellkultur von Makrophagen in Anwesenheit keramischer Materialien	35
3.4.2 Zellkultur von humanen Osteoblasten in Anwesenheit keramischer Materialien.....	42
3.4.3 Fazit der Zellkulturexperimente	49
3.5 Antikörperstudie	50
3.6 Lebenszyklusbetrachtung und potenzielle Emissionen.....	52
3.7 Ergebnisse aus der Stakeholdereinbindung	54
3.7.1 Teilnehmer:innen der Onlineumfrage	54
3.7.2 Anzahl der Implantate pro Jahr.....	55
3.7.3 Verwendungszeitraum	55
3.7.4 Vorteile und Chancen von Implantaten aus Titan	57
3.7.5 Nachteile und Risiken bei Implantaten aus Titan	57
3.7.6 Vorteile und Chancen von Implantaten aus Keramik	58
3.7.7 Nachteile und Risiken bei Implantaten aus Keramik	58
3.7.8 Einschätzung von Kriterien bei der weiteren Entwicklung von Keramikimplantaten.....	61
3.7.9 Fazit.....	61
4 Schlussfolgerungen.....	63
Abbildungsverzeichnis.....	65
Literaturverzeichnis	69
Abkürzungen.....	73

Zusammenfassung

In der Zahnheilkunde lässt sich in den vergangenen Jahren ein Trend zur Verwendung metallfreier Zahnimplantate beobachten. Implantate aus Titan, denen über Jahrzehnte hinweg eine Vorreiterrolle als Zahnersatzmaterial zukam, können mittlerweile durch biokompatible Keramikimplantate ergänzt oder sogar ersetzt werden. Der positive ästhetische Aspekt eines solchen keramischen Zahnersatzes ist aufgrund der hellen Färbung ein weiterer Vorteil. Zudem zeigt sich bei Patient:innen, die allergisch gegen einzelne Bestandteile der Titanimplantate reagieren oder Vorerkrankungen wie Diabetes aufweisen, eine bessere Gewebeverträglichkeit. Keramische Zahnimplantate bestehen unter anderem aus Zirkonoxid (ZrO_2), welches sich durch eine hohe Beständigkeit und Lebensdauer auszeichnet. Im Vergleich zu Titanimplantaten zeigen sich zudem verbesserte Einheilungschancen in den Knochen (Osseointegration). In der Konsequenz eröffnet dieser innovative keramische Werkstoff neue Perspektiven und Chancen in der Zahnheilkunde. Aufgrund seiner Inertheit findet Keramik bereits seit längerer Zeit Verwendung in der Orthopädie, beispielsweise für Hüftimplantate, und gilt somit als biokompatibler Werkstoff. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass beim Tragen oder Ersetzen eines Zahnimplantates entweder Nanomaterialien, die in den Keramikkompositen eingesetzt werden, freigesetzt werden, und/oder dass nanoskaliger Abrieb in Form von "sekundären" Nanopartikeln entsteht. Der Abrieb kann danach auf unterschiedlichen Wegen in den menschlichen Körper gelangen, beispielsweise durch Verschlucken, Einatmen oder über Gewebeoberflächen und Blutgefäße. Bei der Zulassung innovativer Kompositwerkstoffe ist es daher unerlässlich, die möglichen Gesundheitsrisiken zu berücksichtigen und die spezifischen toxischen Effekte von Nanomaterialien näher zu untersuchen. Bislang sind keine negativen Wechselwirkungen im menschlichen Körper bekannt, jedoch gibt es bisher kaum Langzeitstudien zu möglichen Risiken für Mensch und Umwelt.

Im Projekt CERANANO wurden daher die Eigenschaften einer exemplarischen Keramiklegierung (ACERDenco G2 von MKM Engineering GmbH) in Bezug auf den nanoskaligen Abrieb in einer Zellkultur- sowie Immunisierungsstudie untersucht. Als Vergleichsmaterial wurde TiO_2 (Referenzmaterial NM-105, Joint Research Center) herangezogen. Potentielle keramische Abriebe wurden in der bildgebenden Darstellung durch hochauflösende Mikroskopien untersucht sowie mögliche „biochemische Konsequenzen“ durch die Messung von entzündungsrelevanten Parametern, den Zytokinen und Enzymen, analysiert.

Im Rahmen des Projektes gab es keine Hinweise auf entzündungs- oder immunaktivierende Reaktionen induziert durch Zugabe nanoskaligen Abriebes des Keramikmaterials G2, wobei das untersuchte Keramikmaterial ein geeignetes „Stellvertretermaterial“ für die Mehrheit der auf dem Markt befindlichen Keramiken darstellen sollte. Vor diesem Hintergrund müssen die Ergebnisse dieses Kurzprojektes zwar als Stichprobe gesehen werden, aber in diesem Rahmen ergab sich ein Unbedenklichkeitshinweis für die Verwendung keramischer Materialien in Bezug auf mögliche Abriebe im Nanobereich. Die Ergebnisse der Expert:innenbefragung im Rahmen der durchgeführten Onlineumfrage untermauern die Ergebnisse und weisen darauf hin, dass Keramiken insbesondere bei Patient:innen mit chronischen Vorerkrankungen von Zahntechnikern, Herstellern und Zahnärzten immer stärker verwendet werden, auch, weil sich das Material besser verträglich und weniger entzündungsfördernd verhält als das konventionelle Titanmaterial.

1 Einleitung – Keramische Zahnimplantate

1.1 Hintergrund, Aufbau, Eigenschaften und Verträglichkeit sowie mögliche Risiken innovativer Materialien

1.1.1 Hintergrund

Die älteste nachweisbare Verwendung eines Zahnimplantats wird der Kultur der Mayas zugeschrieben. In einem Unterkieferknochen wurden zugeschliffene Muschelstücke entdeckt, welche die Funktion von drei verlorenen Zähnen übernahmen. Untersuchungen des Knochenwachstums um diesen Zahnersatz bewiesen, dass die Implantate zu Lebzeiten eingepflanzt wurden. Demgegenüber wurden menschliche Zähne oder Zähne aus Elfenbein mittels Goldfäden an vorhandenen Zähnen befestigt, sodass keine Implantation im engeren Sinne stattfand. Die Ära der modernen Implantologie begann jedoch erst in den 1940er Jahren mit Manlio Formiggini, da die von ihm aus Edelstahl gefertigten spiralförmig aufgebauten Schrauben ein Knochenwachstum um das Metall ermöglichten. [1] In dieser Phase der sog. „wiederherstellenden Chirurgie“ konnten wesentliche Erkenntnisse zur Knochenheilung gewonnen werden. Ein weiterer Meilenstein in der Entwicklung der Implantologie ist die Entdeckung der Biokompatibilität von Titanoberflächen durch den schwedischen Wissenschaftler Brånemark im Jahr 1967. Die gezeigte biologische Verschmelzung von Fremdkörpern aus Titan mit Knochenmaterial (Osseointegration) ebnete den Weg für die moderne Zahnimplantologie. [2] Obwohl auch eine Vielzahl anderer Materialien (Gold, Platin, Porzellan) getestet wurden, setzte sich daraufhin Titan als Implantatmaterial durch. Dies ist auf die hohe Biokompatibilität, die hervorragende Stabilität sowie eine ähnliche Elastizität, wie sie auch Knochenmaterial aufweist, zurückzuführen. [3] Trotz der Eigenschaft von Titan als bioinert zu gelten, können allergische Reaktionen auftreten. Dies kann durch Zusätze oder Verunreinigungen im verwendeten Werkstoff oder durch die Bearbeitung bzw. Manipulation der Titanimplantate bedingt sein, wobei wiederum Abrieb entstehen kann. Eine weitere Modifikation der Titanimplantatoberfläche durch Oxidation kann zu einer rauen Oberfläche führen, was die Osseointegration begünstigt. Allerdings kann dies wiederum zu einem Partikelabrieb und in der Folge zu allergischen Reaktionen führen. [4] Dieses Phäno-

men ist auch für andere titanbasierte Implantate im menschlichen Körper beschrieben worden. [5] In der wissenschaftlichen Literatur wird zudem über Entzündungen des Zahnfleisches um das Implantat berichtet, die durch bakterielle Biofilme bedingt sind. Um die Biokompatibilität zu erhöhen und die Einheilungsrate zu verbessern, werden daher kontinuierlich Optimierungen der Titanoberfläche oder die Verwendung alternativer Materialien angestrebt. [6][7]

In den vergangenen Jahren manifestierte sich in der Zahnheilkunde ein gesteigertes Bedürfnis nach ästhetischen Lösungen und kürzeren Behandlungszeiten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Materialien wie Gold oder Titan die Zähne und ihre Umgebung oft als "dunkler" erscheinen lassen. Die dunkle Farbe von Titanimplantaten kann durch das Zahnfleischgewebe hindurchscheinen, was insbesondere bei Zähnen im Frontkieferbereich unerwünscht ist. Die teilweise gegebene Unverträglichkeit (0,6% weisen eine Titanallergie auf) steigerte das Interesse an Keramik als metallfreien, alternativen Werkstoff zusätzlich. [8] Seit der Markteinführung in den 1970er Jahren hat sich die Zahl der eingesetzten Keramikimplantate kontinuierlich erhöht und erreicht aktuell einen geschätzten Marktanteil von 3 - 5 %. Die erste Generation von Keramikimplantaten basierte auf Aluminiumoxid (Al_2O_3) und wies eine gute Osseointegration auf. Des Weiteren wies die Substanz eine weiße Färbung, eine hohe Bioverträglichkeit sowie eine geringe Affinität gegenüber bakteriellen Biofilmen auf. Aufgrund der im Vergleich zu Titan minderwertigen mechanischen Eigenschaften wurden diese Implantate jedoch in den frühen 1990er Jahren vom Markt genommen. In der Folge wurden wesentlich stabilere bzw. härtere Zirkonoxid-Keramiken als Verbesserung eingesetzt. Da in Toxizitätsstudien auch keine mutagene und karzinogene Effekte festgestellt wurden, erwiesen sich diese Keramikimplantate als vielversprechende Alternative zu den gängigen Titanimplantaten, insbesondere bei bekannten Prädispositionen wie Allergien oder Diabetes.

1.1.2 Aufbau der Keramikimplantate

Das Setzen von Implantaten ist eine beliebte und wirksame Strategie, um fehlende oder beschädigte Zähne zu ersetzen. Implantate bestehen aus einem Gewindestift und einer (keramischen) Krone, die nicht mit dem Kieferknochen in Kontakt steht. Der Gewindestift besteht klassischerweise aus Titan. Dieser Stift wird chirurgisch in den Kieferknochen eingedreht und dient dort als Ersatz für eine fehlende Zahnwurzel. Dieser Stift wird nach Einheilung über eine Anschlussgeometrie mit einer künstlichen, keramischen Zahnkrone versehen, die den natürlichen Zähnen ästhetisch angepasst wird.

In der Anfangsphase der Entwicklung keramischer Zahnimplantate erfolgte die Fertigung und Insertion einteiliger Varianten (sogenanntes Monoblock-Design). Diese einteiligen Implantate umfassen einen in den Kiefer eingesetzten Bereich, der als künstliche Zahnwurzel bezeichnet wird, sowie einen Abschnitt, auf dem eine prothetische Versorgung wie beispielsweise eine Krone befestigt werden kann (Abbildung 1, Implantatskizze links unten). Einige einteilige Keramikimplantate können während der Einheilungsphase Störungen aufweisen, insbesondere wenn sie durch die Schleimhaut (transgingival) oder durch das Zahnfleisch ragen. Diese Störungen können sich nachteilig auf die Osseointegration auswirken und somit den Heilungsprozess hinauszögern. [9] In den vergangenen Jahren lässt sich jedenfalls ein Trend zur Verwendung zweiteiliger keramischer Zahnimplantate beobachten, die auf dem sogenannten Hybridkonzept basieren. Die Verbindung zwischen Implantat und Zahnersatz erfolgt hierbei über ein sogenanntes Abutment, ein flexibel einschraubbarer, durch das Zahnfleisch ragender Teil (Abbildung 1, Implantatskizze rechts unten). Das Abutment erfüllt die Funktion eines Aufbau- und Befestigungselements und dient als Stützpfeiler für die Stabilität des Zahnersatzes. [10] In Abhängigkeit von der Indikation und den spezifischen Anforderungen erfolgt die Anpassung des Abutments aus Keramik im Dentallabor zur präzisen Umsetzung der individuellen Bedürfnisse der Patientinnen und Patienten. Dies liefert ein optimiertes Resultat und ist insbesondere in den für die Ästhetik relevanten Bereichen von Vorteil. Als Nachteil zweiteiliger Implantate kann die Notwendigkeit einer zweiten, wenn auch sehr kleinen Operation erachtet werden. Als weitere potenzielle Komplikationen einer zweiteiligen Implantatversorgung können eine mögliche bakterielle Besiedlung zwischen Implantat und Abutment, ein Bruch oder eine Lockerung der Abutmentverschraubung sowie ein höherer Materialaufwand und damit einhergehende Kosten genannt werden.

Obgleich eine bedeutende Anzahl von Fallstudien über einen ausgedehnten Beobachtungszeitraum für einteilige keramische Zahnimplantate mit vergleichbaren Resultaten zu Titanimplantaten existiert, stehen Daten für die zweiteilige Implantatversorgung noch aus. Folglich kann die Deutsche Gesellschaft für Implantologie (DGI) zum gegenwärtigen Zeitpunkt lediglich für einteilige Keramikimplantate eine uneingeschränkte Empfehlung aussprechen (Abbildung 1). [11]

RICHTLINIEN DER DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR IMPLANTOLOGIE

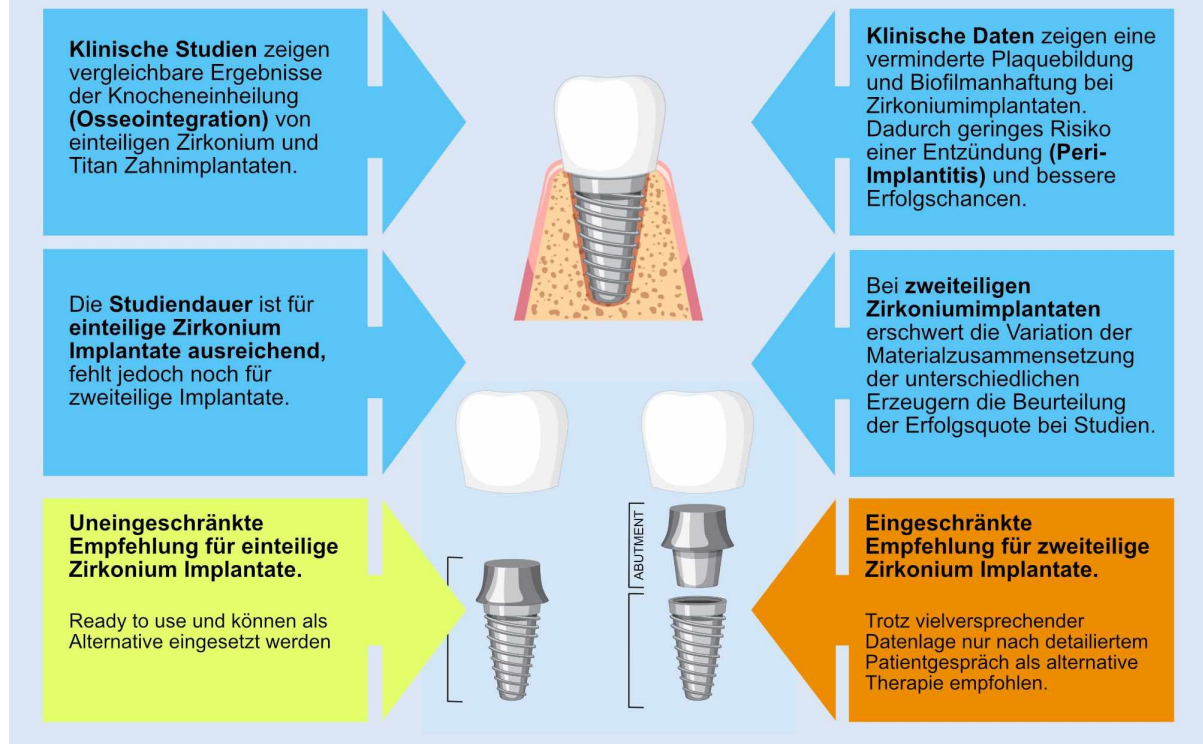


Abbildung 1 Zusammenfassende Empfehlungen der deutschen Gesellschaft für Implantologie betreffend der Verwendung von ein- und zweiteiligen Keramikzahnimplantaten (modifiziert nach [11]). Es wird der Unterschied zwischen ein- und zweiteiligen Keramikzahnimplantaten dargestellt. Abbildung Mitte links: Einteiliges Implantat mit künstlicher Zahnwurzel im Monoblock Design. Abbildung Mitte rechts: Aufbau eines zweiteiligen Zahnimplantates. Die Krone wird über ein Zwischenstück (ein sogenanntes Abutment) mit dem Zahnwurzelersatz verbunden. Zusammenfassend wird eine uneingeschränkte Empfehlung für einteilige und eine eingeschränkte Empfehlung für zweiteilige Zirkoniumzahnimplantate erteilt.

1.1.3 Eigenschaften und Verträglichkeit aktuell eingesetzter keramischer Zahnimplantate

Materialieigenschaften

Glaskeramiken, insbesondere solche, die mit Cerium und Aluminium verstärkt sind, weisen exzellente physikalische und mechanische Eigenschaften auf. Dies ist auf eine geringe Wärmeübertragung und eine hohe Korrosionsbeständigkeit zurückzuführen. Derzeit werden tetragonale Zirkonumpolykristalle, welche zusätzlich mit Yttriumoxid (Y_2O_3) stabilisiert werden, am häufigsten als Keramikmaterial verwendet. Diese Implantate zeichnen sich durch eine exzellente Festigkeit und Belastbarkeit aus, wodurch sie eine hohe Bruchsisicherheit aufweisen. Die hohe Biegefestigkeit kann durch den Zusatz weiterer Stoffe, beispielsweise Aluminiumoxid (Al_2O_3), modifiziert werden. [12]

Osseointegration

Die Osseointegration bezeichnet die feste Verbindung des Zahnersatzes mit dem Kieferknochen, welche durch den Selbstheilungsprozess des Knochens bedingt ist. Die knochenbildenden Zellen (Osteoblasten) bilden eine feste Verbindung zwischen Kieferknochen und Implantatoberfläche. Die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Osseointegration umfassen passgenaue Implantate aus hochwertigem Material mit osteoblastenfreundlicher Oberfläche, eine sterile und temperaturneutrale Bohrung in den Knochen, eine ausreichende Primärstabilität sowie eine adäquate Ruhigstellung des Implantats. Eine adäquate Blutzirkulation ohne Infektionen ist ebenfalls erforderlich. Unter der Voraussetzung der Erfüllung der genannten Parameter kann eine unbelastete Einheilphase von drei bis sechs Monaten erreicht werden. Die Osseointegration stellt folglich den entscheidenden Faktor für die Einheilung und damit für den Erfolg und die langfristige Stabilität des Implantats dar.

Entzündungen

Eine mögliche Komplikation nach der Implantation ist die Periimplantitis, eine bakterielle Infektion des Zahnfleisches und des Zahnbetts, die durch die Ansammlung von bakteriellen Belägen auf dem Implantat verursacht wird. Dieses Problem kann unter anderem durch eine unzureichende Mundhygiene begünstigt werden. Im fortgeschrittenen Stadium dieser Entzündung kann es zu einem Abbau der Knochenmasse und des Zahnfleischgewebes kommen. In der Konsequenz kann es zu einer Lockerung und letztendlich zum Verlust des Implantates kommen. Es gibt Hinweise darauf, dass Keramikimplantate weniger anfällig für die Anhaftung eines bakteriellen Biofilms sind als Titanimplantate. Entzündungen im Zusammenhang mit Titanimplantaten scheinen häufiger zu sein. [8] Zhou et al. beschreiben darüber hinaus eine langsame Abgabe von Titanpartikeln vom Implantat in das umliegende Gewebe bzw. in den Knochen, was zu einer erhöhten lokalen Titankonzentration oder mittels Transports über die Blutbahn sogar zur Anreicherung in entfernten Geweben führen kann. [13] In Kombination mit der Hypoallergenität des keramischen Werkstoffs lässt sich also eine im Vergleich bessere Bioverträglichkeit des keramischen Zahnersatzes ableiten.

Klinische Studien

In einer Vielzahl von Studien der vergangenen Jahre wurden Erfolgsquoten von Zirkonoxidimplantaten der neuen Generation ermittelt, die mit jenen der standardmäßig eingesetzten Titanimplantate vergleichbar sind.[14] Dennoch wird auf die Notwendigkeit weiterer Langzeitstudien hingewiesen, um mögliche noch nicht bekannte Langzeitfolgen ausschließen zu können. Obgleich Vorteile in der Osseointegration und Weichgewebeakzeptanz von einteiligen keramischen Zahnimplantaten im Vergleich zu Titanimplantaten beschrieben wurden [8], existieren auch kritische Stimmen, insbesondere in den USA, die trotz der erkannten Vorteile weiterhin die Verwendung von Titan als erste Wahl betrachten. [15] Die guten Erfahrungen mit Titanimplantaten, die bereits seit Jahrzehnten bestehen, sind ein wesentlicher Grund dafür. Des Weiteren werden keramische Implantate aufgrund fehlender Langzeitstudien sowie der höheren Kosten und des fehlenden Trainings bei der Implantation und Versorgung des neuartigen Materials von einigen Expert:innen noch nicht als erste Wahl betrachtet. Die kürzlich publizierten Langzeitstudien zu einteiligen keramischen Zahnimplantaten können die genannten Gegenargumente zunehmend entkräften. Für die neu auf dem Markt erhältlichen zweiteiligen Keramikimplantate müssen entsprechende Da-

ten jedoch noch nachgewiesen werden. Gegenwärtig lassen sich anhand klinischer Kurzzeitstudien keine Unterschiede zwischen den beiden beschriebenen keramischen Implantatdesigns feststellen. Beide Strategien resultieren in adäquaten Resultaten.[10] Die Evaluierung der Anwendbarkeit neuartiger Implantatmaterialien erfordert die Berücksichtigung zusätzlicher Schlüsselparameter, darunter der gute Kontakt zwischen Knochen und Implantat sowie die nötige Drehkraft, um ein Implantat wieder zu entfernen. In Tierversuchen konnte zumindest bislang kein signifikanter Unterschied zwischen Keramik- und Titanimplantaten festgestellt werden. [14] Die Deutsche Gesellschaft für Implantologie (DGI) erachtet einteilige Keramikimplantate mittlerweile als gleichwertige Alternative zu Titanimplantaten. Zudem bewertet sie die ständige Verbesserung der Materialien bei zweiteiligen Implantaten als positiv. Allerdings stehen Langzeitstudien für zweiteilige keramische Implantate noch aus, da diese Materialien einem fortlaufenden Entwicklungs- und Optimierungsprozess unterliegen. Infolgedessen erfolgt die Empfehlung keramischer Alternativen erst nach einer umfassenden Patientenberatung, in deren Rahmen sämtliche Vor- und Nachteile erörtert und abgewogen werden sollten.

1.1.4 Mögliche Risiken des Materialabriebs

Aus Studien im Tierversuch geht hervor, dass es bei Titanimplantaten zu einem Abrieb im mikro- und nanopartikulären Bereich kommt. Dieser Abrieb kann Entzündungsprozesse und einen verminderten Einheilungsprozess zur Folge haben. [13] Ein partikulärer Abrieb ist auch bei keramischen Materialien möglich und wurde in Kausimulationsstudien entsprechend beschrieben. Um die abgeriebene Menge abschätzen, ihre Partikelgröße, Form und Toxizität charakterisieren und somit evaluieren zu können, sind jedoch noch weitere Untersuchungen erforderlich. Im Rahmen der Risikobewertung innovativer Kompositmaterialien ist es unerlässlich, die Freisetzungsmechanismen (z. B. durch Bohren, Schleifen oder Zähneknirschen) sowie die potenziellen toxischen Auswirkungen der freigesetzten Mikro- und Nanopartikel eingehender zu untersuchen. Des Weiteren wäre es erforderlich, der Öffentlichkeit die Ergebnisse derartiger Studien zur Verfügung zu stellen, um das Vertrauen in neuartige Komposite zu fördern.

1.1.5 Fazit

Der Zahnersatz aus Titan als "Goldstandard" hat sich in der dentalen Implantologie etabliert. Das basiert auf jahrzehntelangen Erfahrungen hinsichtlich der langen Funktionstauglichkeit

und Verträglichkeit des Materials. Allerdings wurde in der wissenschaftlichen Literatur immer wieder über allergische Reaktionen und Entzündungen berichtet, die das Immunsystem nachhaltig belasten. Des Weiteren wurde das Durchschimmern des gräulichen, dunklen Implantatmaterials durch das Zahnfleischgewebe, insbesondere in ästhetisch relevanten Zahnbereichen, negativ bewertet, was den Ruf nach den weißgefärbten Implantaten aus innovativen Keramiken lauter werden ließ. Infolge der kontinuierlichen Weiterentwicklung keramischer Implantate erlangten Implantate auf Basis von Zirkonoxid zunehmendes Interesse. Die Materialeigenschaften von Keramiken, insbesondere hinsichtlich der Bruchfestigkeit, sind mittlerweile mit denen von Titan vergleichbar. In Bezug auf die Belastbarkeit, Stabilität und Biegefestigkeit ist kein Unterschied zu Titanimplantaten festzustellen. Die Osseointegration von Keramikimplantaten ist gleichwertig zu den von Titanimplantaten, zudem zeigen sie eine geringere Anhaftung von Bakterienfilmen. In der Konsequenz ist die Entzündungshäufigkeit und Plaquebildung geringer. Bislang konnten keine negativen Auswirkungen von Keramikimplantaten beobachtet werden, beispielsweise Entzündungen, die durch unbeabsichtigten Abrieb oder durch die Freisetzung von Bestandteilen der Kompositmaterialien ausgelöst werden können. Im Gegenteil, die gute biologische Integration bewirkt sogar eine bessere Durchblutung des Zahnfleischgewebes. Die reinweiße Farbe der künstlichen Zahnwurzel stellt jedoch nach wie vor eines der wichtigsten Argumente für einen keramischen Zahnersatz dar. Selbst bei einem Zurückgehen des Zahnfleisches ist das Implantat nicht von einem natürlichen Zahn zu unterscheiden. Während einteilige Implantate aus Zirkonoxidkeramiken mittlerweile als gleichwertiger Werkstoff anerkannt sind und als Alternative zu Titan gelten, fehlen aber noch Studien über zweiteilige Keramikimplantate, welche für die Bewertung des Langzeiterfolgs erforderlich wären. Da diese reversibel verschraubbaren Implantatsysteme den prothetischen Anwendungsbereich wesentlich erweitern, kann deren empfohlener Einsatz nur mehr als eine Frage der Zeit gesehen werden.

1.2 Betrachtung des *status quo* keramischer Zahnimplantate

Zunehmend werden Keramikimplantate mit einem Gewindestift aus Keramik als Alternative zu herkömmlichen Implantaten auf Titanbasis vorgeschlagen. Zu den Hauptvorteilen von Keramikimplantaten gehören die Verringerung der Zahl postimplantologischer, chirurgischer Eingriffe aufgrund einer nicht entzündlichen Osseointegration von Keramikimplantatmaterialien. [16] Die Keramiken mit Bestandteilen aus Yttrium und Zirkonium(IV)-oxid (ZrO_2), im weiteren Zirkonoxid genannt, sind den Halbmetallen zuzuordnen und sind bereits als stabile Alternative zu den Titanwerkstoffen etabliert. Zirkonium ist chemisch betrachtet

durchaus eng mit Titan verwandt jedoch besitzt Zirkonium eine höhere Korrosionsbeständigkeit als die meisten anderen Legierungssysteme, wie in vielen experimentellen Untersuchungen gezeigt wurde. [17] Zirkonium weist eine hohe Biokompatibilität in Verbindung mit lebendem Gewebe auf. Der Hauptvorteil von Keramikimplantaten gegenüber Titanimplantaten besteht neben der ästhetischen Komponente darin, dass sie nicht über einen (systemischen) Entzündungsstoffwechsel in den Knochen einheilen. [18] Sie versprechen damit hypoallergen zu sein, was sie zu einer guten Wahl für Patient:innen mit Metallallergien, Diabetes, aber auch grundsätzlich bei Autoimmunerkrankungen macht. Es gibt bereits Hinweise, dass es bei Titanimplantaten zu einem Abrieb im mikro- und nanopartikulären Bereich kommt, welcher negative Effekte hervorrufen kann. [19][20] Der Vergleich mit mikropartikulärem Zirkonium im Tierversuch zeigte, dass Titanpartikel inflammatorische Prozesse hervorrufen können. Was aber noch aussteht, ist eine Risikoabschätzung von keramischen Abrieben, vor allem derer, die auf neuen Materialkombinationen basieren (z.B. neue Hochleistungskeramiken als "advanced materials"). Aktuelle Literaturergebnisse beschreiben, dass Keramikimplantate im Einwachsverhalten mit Titanimplantaten vergleichbare Eigenschaften haben. Im Kontext der Periimplantitis scheinen Keramiken einen leichten Vorteil zu haben, allerdings ist das zugrundeliegende Literaturdatenmaterialien noch nicht sehr belastbar. [21] Daher war es wichtig zu klären, ob nanoskalige keramische Partikel, die während der Implantatsetzung oder durch Abrieb/Bruch eines schon gesetzten Implantats im Zuge der langjährigen Verwendung entstehen könnten, eine immunologische Antwort hervorrufen.

Ein *in vivo*-Vergleich der Biokinetik und Biokompatibilität von Titan- und Zirkonoxid-Mikropartikeln ergab eine Empfehlung für keramische Materialien in der Implantologie gegenüber den herkömmlichen Metalloxiden. [22][23] Olmedo et al. [22] stellten fest, dass die Biokinetik von Titan- und Zirkonoxidmaterialien von der jeweiligen Partikelgröße und -form und/oder -kristallstruktur abhängt, dass jedoch bei gleichen Dosen und Zeiten nach der Verabreichung der Titangehalt in murinen Organen durchwegs höher war als der Zirkoniumgehalt. Zusätzlich war der Verbrauch an antioxidativen Enzymen in der mit Titandioxid behandelten Gruppe höher als in der mit Zirkonoxid behandelten Vergleichsgruppe. Aus der Sicht der Implantologie beschreiben Henao et al. [24] in ihren Studien, dass sowohl Titan als auch Zirkonoxid als Implantatmaterial vergleichbar geeignet sei, während Degidi et al. [23] über eine positivere Knochen-Gewebe-Reaktion der Zirkoniumimplantate im Vergleich zu Titan berichten. Paparella et al. [20] fanden in Biopsien von Titanimplanatträgern metallische Partikel und entzündliche Prozesse in deren Umgebung.

In der Medizinprodukteverordnung (Medical Device Regulation (MDR)) [25], sind zwar neue Regelungen für Nanomaterialien genannt, diese beziehen sich aber auf die Verwendung von Nanopartikeln durch den Hersteller, bei denen ein hohes oder mittleres Potenzial für interne Exposition bestehen könnte, nicht aber auf den nanoskaligen Abrieb oder über lange Zeiträume auftretende Korrosionen von Materialien.

1.3 Knochenhomöostase

Unter Knochenhomöostase versteht man den Gleichgewichtszustand zwischen knochenbauenden und knochenabbauenden Prozessen im gesunden Körper. In diesem dynamischen Regelungsprozess wird sowohl die Stabilität des Skeletts als auch des Mineralstoffgehalts im Blut gewährleistet. Bei einer Reihe von Erkrankungen kommt es allerdings durch chronische Entzündungen oder Autoimmunprozesse zu Osteopenie oder sekundärer Osteoporose, also zu einer Verminderung der Knochendichte. Die Pathogenese des Knochenmasseverlustes bei entzündlichen Erkrankungen ist komplex. Einerseits müssen die Effekte von Immobilität, Ernährungsdefizit, medikamentöser Therapie (z.B. Glukokortikoide, Steroidhormone) und Malabsorption berücksichtigt werden, andererseits spielen auch Entzündungsprozesse in der Genese systemischer Osteoporose eine entscheidende Rolle. [26][27][28] Inflammatorische Prozesse (Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, Einwanderung von Immunzellen) können auch im Zusammenhang mit Zahnimplantaten auftreten und den Einheilerfolg beeinflussen. So können unter anderem infolge einer Implantatsetzung sterile Fremdkörpergranulome entstehen, die einen persistierenden Knochenverlust und verminderte Knochenneubildung bewirken.[29] Nach heutiger Vorstellung geht man davon aus, dass die bei einer Entzündung vermehrt gebildeten inflammatorischen Zytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) über die Zirkulation in den Knochen gelangen und dort zu einer vermehrten Knochenresorption und gleichzeitig zu einer verminderten Knochenneubildung führen. [30][31]

Für Interleukin-6 wurde gezeigt, dass es durch Osteoblasten (knochenbildende Zellen) unter Stimulation von Parathormon (Nebenschilddrüsenhormon) gebildet wird. Die resorptive Aktivität von Parathormon wird durch IL-6 vermittelt. [32] Im Gegensatz dazu hemmt Öst-

rogen die Bildung von Interleukin-6 und führt so zu einem osteoprotektiven Effekt. Der Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- α) induziert bei Osteoblasten in höherer Konzentration eine Apoptose (ein Effekt, der durch Vitamin D gehemmt wird). Niedrigere Konzentrationen von TNF- α hemmen die Proliferation von osteoblastenähnlichen Zellen. Weiterhin hemmt TNF- α die Kollagensynthese, die alkalische Phosphatase und Osteocalcinsynthese in Osteoblasten. [33]

Eine vermehrte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine kann folglich die Knochenhomöostase im Kiefer aus dem Gleichgewicht bringen und den Einheilerfolg von Zahnimplantaten gefährden. Um die Wahrscheinlichkeit einer Immunaktivierung durch keramische und titanbasierte Nanopartikel einschätzen zu können, sollen im Rahmen dieses Projektes ein für Implantate verwendetes Keramikmaterial und Titandioxid in einem Zellkulturmodell miteinander verglichen werden.

1.4 Projektziele

Ziel von CERANANO ist eine Schließung von Wissenslücken bei der Sicherheitsbeurteilung von nanopartikulären Abrieben von Zahnimplantatmaterialien aus Keramik über die gesamte Wertschöpfungskette.

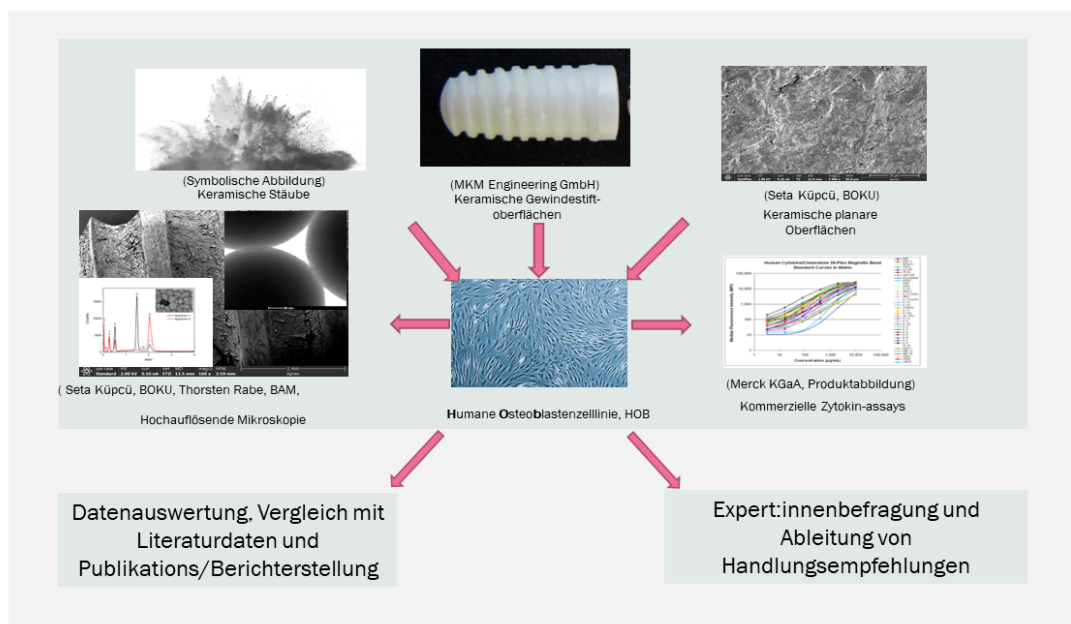


Abbildung 2 Diese Abbildung zeigt die Projektziele der Arbeitspakete von dem Projekt CERANANO über den Zeitraum von 12 Monaten. Analysiert wird ein möglicher, nanoskaliger Abrieb, welcher beim Eindrehen, Entfernen, durch Unfälle oder Zahnfleischerkrankungen entstehen kann. Durch die *in vitro* Untersuchung des keramischen Abriebs und planarer Oberflächen in einer Zellkultur, durch bildgebende Verfahren (Mikroskopie) und Assays die Entzündungsmarker bestimmen können, soll eine Risikoabschätzung eines möglichen Abriebs von keramischem Material ermöglicht werden. Weiters sind Befragungen von Expert:innen bezüglich der Verwendung von unterschiedlichen Implantatsmaterialien und eine umfassende Literaturstudie zu diesem Thema Teil des Projektes.

In CERANANO wird das Material des Gewindestiftes untersucht (Abbildung 1). Analysiert wird ein möglicher, nanoskaliger Abrieb, der beim Eindrehen und Tragen, aber vor allem auch beim Entfernen (Ausfräsen), durch Unfälle oder Zahnfleischerkrankungen entstehen kann.



Abbildung 3 Diese schematische Abbildung zeigt den Aufbau eines Zahnimplantates mit einem Gewindestift aus Titan (links) und einem keramischen Gewindestiftes (rechts). Adaptiert aus <https://www.zahnarzt-spilburg.de/zahnmedizin/zahnimplantate/>.

Es soll eine Aussage im Bezug auf mikro- und nanoskaligen Abrieb und dessen Verhalten im umliegenden Gewebe erhoben werden. Durch eine *in vitro* Analyse in einem kompakten, experimentellen Ansatz sollen keramische Partikel des Versuchsmaterials in der mikro- und der nanoskaligen Dimension analysiert werden, wobei die nanoskalige Dimension von Keramikabriebe bislang in der Literatur noch unbeschrieben ist.

Es werden sowohl das Mahlgut (Fräsabrieb), als auch gesinterte und planare (geschliffene) Oberflächen (Keramikplättchen) untersucht. Die Materialien der gesamten Produktionskette und damit die involvierten Morphologien und Oberflächen eines (werdenden) Implantates sind im Fokus der Zellkultur-Experimentserien, der bildgebenden Verfahren und der Zytokinassays. Die 'end of life' (EOL) Phase von Implantatmaterialien schliesst den Kreis der Wertschöpfung und wird vor dem Literaturhintergrund erarbeitet. Durch die langjährige Kooperation mit dem Keramikhersteller MKM Engineering GmbH, der die Materialien der Produktionskette zur Verfügung stellt, können „real world“ Materialproben vom Entstehungsprozess an untersucht und analysiert werden. Es werden die bei dem Eindrehen in den Kieferknochen eventuell auftretenden Materialabriebe beziehungsweise korrosionsbedingte Partikelbildungen simuliert. Bei dem Versuchsmaterial ACERDENCO G2 handelt es sich um Zirkonium (Zr) und seine Dotierung mit Yttrium (Y) und Cerium (Ce).

Das partikuläre Material wird sowohl morphologischen Analysen als auch zellbiologischen Analysen unterzogen. Die *in vitro* Experimente werden unter Standardzellkulturbedingungen durchgeführt, die mit geeigneten, bildgebenden Verfahren begleitet werden (Lichtmikroskopie, Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie). Aus dem Literaturstudium werden die eingehobenen und veröffentlichten Patientendaten aus klinischen Studien erfasst und zusammenfassend dargestellt. In Verbindung mit den experimentellen Ergebnissen können somit fundierte Aussagen über den Einfluss von mikro- und nanoskaligem Abrieb auf lebende Zellen getroffen werden. Somit leistet CERANANO einen sicherheitsrelevanten Beitrag zur zukünftigen Risikoabschätzung von keramischen Implantatmaterialien.

Zusätzlich soll eine Onlineumfrage mit Expert:innen (Zahnmediziner:innen, Herstellerbetrieben und anderen relevanten Stakeholdern), die sich in diesem hochdynamischen Feld der Implantologie bewegen, durchgeführt werden um Meinungen und Erfahrungen aus der Praxis einfließen zu lassen.

2 Methodische Herangehensweise

2.1 Literaturrecherche

Es wurde eine systematische Literatursuche durchgeführt um aktuelle Informationen über Materialeigenschaften, Aufbau, Studien und Akzeptanz von keramische Zahnimplantaten im Vergleich zu einem Zahnersatz aus Titan zu sammeln. Besonders wichtig für dieses Projekt war die Suche hinsichtlich eines möglichen mikro- und nanoskaligen Abriebs von keramischen Zahnimplantaten in der Literatur. Es wurde in Datenbanken nach den wichtigsten Keywords gesucht, um einen aktuellen Überblick zu erhalten. Ausgehend von den gefundenen und relevanten wissenschaftlichen Arbeiten wurde anschließend die Suche mit den dort angeführten Literaturstellen nach dem Schneeballprinzip verfeinert und qualitativ fortgesetzt. Die erhobene Literatur wurde nach den Schlagwörtern der Suche zusammengefasst und kategorisiert: 1) Abrieb, 2) Assays (Entzündungen), 3) Keramische Implantate und Immunsystem, 4) Eigenschaften keramischer Implantate, 5) Keramische Implantate vs andere Implantate, 6) Richtlinien zur Verwendung keramischer Implantate, 6) Geschichte, 7) Reviews, 8) Klinische Studien und 9) Zulassung.

Die Literaturrecherche diente zur Erhebung des *status quo* und als Hintergrundrecherche für das NanoTrust Dossier „Zahnimplantate aus Keramik“, welches in der NanoTrust-Dossierreihe der österreichischen Akademie der Wissenschaften veröffentlicht wurde.

2.2 Mikroskopie und Analytik

2.2.1 Transmissionselektronenmikroskop (TEM)

Im Rahmen des Projektes wurden sowohl das Mahlgut des Versuchsmaterials (ACERDENCO G2) als auch eines repräsentativen Nanomaterials (TiO₂ NM-105, JRC, Ispra Italien) mit einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) untersucht. Mit dieser Methode wurden die Größenverteilungen der Partikel bestimmt. Das TEM ist ein FEI Tecnai T20 (ThermoScientific, Eindhoven, The Netherlands) und wurde bei 160 kV betrieben.

Für die Probenpräparation wurden jeweils 20 µl ACERDenco G2 und TiO₂ Nanopartikelsuspension (7 mg/ml in MilliQ-Wasser) für 20 min auf TEM Cu-Grids (Science Services, Deutschland) adsorbiert und nach dem Abziehen des überschüssigen Probenmaterials zur Untersuchung herangezogen.

2.2.2 Rasterelektronenmikroskop (REM)

Das Mahlgut des Versuchsmaterials (G2), das Referenzmaterial (TiO₂) sowie die bereits auf dem ACERDenco G2 Plättchen angewachsenen Zellen wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht (ThermoScientific Apreo VS SEM, ThermoScientific, Eindhoven, The Netherlands). Dazu wurden die an der Luft getrockneten Keramikplättchen mit Zellmonoschicht auf leitfähigem doppeltem Klebeband auf Aluminiumtischchen befestigt und mit Gold besputtert, aber auch ungesputtert untersucht. Das REM wurde bei 10,0 kV mit einem Strahlstrom von 0,1 nA im A+B-Modus betrieben. Die Bilder wurden im Hochvakuum mit dem linseninternen Detektor für rückgestreute Elektronen (BSE) T1 und dem Sekundärelektronendetektor (SE) T2 aufgenommen.

2.2.3 Licht- und Fluoreszenzmikroskop

Ein Nikon Eclipse Ts2R ausgestattet mit einer Jenoptic Progres Gryphax Kamera und Software wurde zur Licht- und Fluoreszenzmikroskopischen Beurteilung der Osteoblasten- und Makrophagenzelllinien herangezogen.

2.2.4 Dynamische Lichtstreuung

Zur Beurteilung des hydrodynamischen Durchmessers der mikro- und nanoskaligen Partikel wurde die Dynamische Lichtstreuung (DLS, Dynamic Light Scattering). Mittels DLS (Malvern Panalytical Zetasizer Nano ZS) wurde die Größenverteilung von Partikeln in den wässrigen Medien gemessen. Hierbei streut das monochromatische Licht ($\lambda=633$ nm) an den Partikeln, die im Größenbereich zwischen ca. 0,6 nm und 6 µm detektiert werden können.

2.3 Antikörperstudie

Aus einer Fraktion von kleinsten Partikeln vom Hersteller MKM Engineering, durch Zermahlen von Keramikimplantaten in einer Kugelmühle erzeugt, wurden nanoskalige Partikel abgetrennt, indem 60 mg Mahlgutpulver in 13 ml sterilem MilliQ Wasser verteilt und 30 Minuten sedimentiert wurde. Größere und damit schwerere Partikel bewegten sich Richtung Boden des Gefäßes, wobei in der oberen Fraktion leichtere und kleinere Partikel verblieben. Von dieser Fraktion wurden 10 ml abgezogen und erneut für 30 Minuten sedimentiert. Wieder wurde die obere Fraktion abgezogen, in 2 ml Eppendorfer überführt und für 1 Minute bei 1500 g zentrifugiert. 1.5 ml des Überstandes wurden abgezogen und vereint. Anschließend wurde diese Fraktion mit dem Elektronenmikroskop untersucht, um die Größe der Partikel bestimmen zu können. Diese Nanopartikel wurden bei Thermo Fisher Scientific, Custom Antibody Development, 3747 N. Meridian Road, Rockford, IL 61101, USA, auf eine Antikörperantwort hin untersucht.

2.4 Experimente in der Zellkultur

Um die möglichen Auswirkungen eines implantatgenerierten Keramikabriebs auf umgebende Gewebe zu simulieren, wurde eine humane Osteoblasten Zelllinie (CI-huOB) und humane Makrophagen (differenziert aus der Monocytenzelllinie THP-1), mit nanoskaligem Keramikpartikeln beziehungsweise Titandioxidpartikeln (als Referenzmaterial) inkubiert. Das Zellwachstum und die Zellviabilität wurde mittels geeigneter Färbungen und anschließender Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Zur Abschätzung möglicher immunologischer Effekte wurden zelluläre Genexpressionsmuster (IL1B, IL6, TNFA, MMP3, ALP) aus dem Zellsediment und Messungen von Entzündungsmediatoren (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) und Matrix-Metalloproteasen (MMP-1, MMP-3, MMP-13) aus dem Zellkulturüberstand durchgeführt. Diese Metalloproteasen sind Enzyme, die eine wichtige Rolle im Knochenumbau, im Speziellen im Abbauprozess von Kollagen, dem Abbau der extrazellulären Matrix und der Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten spielen.

2.4.1 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die Quantitative Real-Time PCR (Polymerase Chain Reaction) wurde in diesem Projekt als Methode gewählt, um in den inkubierten Zellen (Zelllysat) die Expression derjenigen Gene, welche die Freisetzung von Zytokinen steuern, zu untersuchen. Diese Herangehensweise hat den Vorteil, dass proinflammatorische Prozesse, bereits auf genetischer Ebene detektiert werden können noch bevor die Zytokine im Zellkulturüberstand direkt gemessen werden können. Gerade bei den Zytokinen, die auf der Proteinebene nur schwer nachzuweisen sind, ist diese Vorgehensweise zu bevorzugen. Die Expression der Gene, welche für die Freisetzung der Entzündungsmediatoren IL-1 β , IL-6 und TNF- α beziehungsweise für die Matrix-Metalloproteinase 3 (MMP-3) verantwortlich sind, wurden mit der Expression eines sogenannten Haushaltsgens (eng. ‚house keeping gene‘), hier die Succinatdehydrogenase (SDHA) in Relation gesetzt. Ein ‚house keeping‘ Gen zeichnet sich dadurch aus, konstant, also unreguliert, im Leben einer Zelle hergestellt zu werden. Dieser Vergleich mit einem solchen Haushaltsgens ermöglicht die relative Quantifizierung der Expressionsregulation der zu untersuchenden Gene.

2.4.2 Zytokin Assay

Die direkte Messung der Zytokine (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) und ausgewählter Matrix-Metalloproteasen (MMP-1, MMP-3, MMP-13) aus dem Zellkulturüberstand wurde als zweite Schiene zur Beurteilung der Effekte der Nanopartikel (Mahlgut ACERDenco G2, TiO₂) auf die Versuchszellen gewählt. Erhöhte Werte können auf materialbedingte Entzündungsprozesse hindeuten. Verwendet wurde dazu das Human Luminex Discovery Assay (LXSAHM-02 2-Plex. BioTechne).

2.4.3 Zytotoxizität Assay

Ein klassischer Resazurin/Resorufin Assay (Alamar Blue™) wurde zur fluoreszenzmikroskopischen Quantifizierung der Zellviabilität herangezogen. AlamarBlue Reagenzien nutzen die natürliche Reduktionskraft lebenden Zellen aus, um Resazurin in fluoreszierendes Resorufin umzuwandeln. Die Fluoreszenzintensität wurde mit einer Anregungswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 595 nm in einem Plate-Reader Infinite F200 (TECAN Life Sciences Home) bestimmt.

2.5 Stakeholdereinbindung mittels Onlineumfrage

Für eine möglichst multiperspektivische Betrachtung wurden im Projekt verschiedene Stakeholder durch eine Onlineumfrage eingebunden. Die Ergebnisse trugen dazu bei, sowohl die aus der Literatur erhobenen Daten, als auch die experimentellen Daten umfassend zu analysieren.

Die quantitative Erhebung bot eine Möglichkeit, die aus der Literatur gewonnen Erkenntnisse empirisch zu validieren. Für die Umfrage wurde ein Kurzfragebogen mit einer Kombination aus Single- und Multiple-Choice-Fragen, sowie offenen Fragen mithilfe des Online-Tools Mentimeter® erstellt, welcher von Mitte November 2023 – Mitte März 2024 online verfügbar war. Die automatisch erstellte Auswertung der Software Mentimeter® befindet sich als pdf im Anhang.

Der Link zur Onlineumfrage wurde über E-Mail-Verteiler der Konsortiumpartner:innen versandt, mit der Bitte um Verteilung an passende Personengruppen, und öffentlich auf den Forscherprofilen auf LinkedIn veröffentlicht. Entsprechend sind die Grundgesamtheit und ihre Zusammensetzung der Personen, die potenziell Zugriff auf die Umfrage hatten, unbekannt. Allerdings bot die Umfrage den Teilnehmer:innen gleich anfangs die Möglichkeit, sich in Bezug auf Berufsfeld und Tätigkeit den Kategorien Zahnarzt:in, Zahntechniker:in, Hersteller:in, Händler:in und Sonstige zuzuordnen. Aufgrund der Spezifität der Fragen ist davon auszugehen, dass nur Expert:innen teilgenommen haben.

2.6 SWOT-Analyse

Die SWOT-Analyse gilt als Methode zur systemischen Situationsanalyse. Dabei steht S für Strengths (Stärken), W für Weaknesses (Schwächen), O für Opportunities (Chancen) und T für Threats (Risiken). Die SWOT-Analyse wird in einer Matrix dargestellt und soll der weiteren Ableitung übergeordneter Maßnahmenvorschläge/Empfehlungen dienen.

2.7 Versuchsmaterial

2.7.1 ACERDenco G2

Das Implantatmaterial ACERDenco G2 besteht hauptsächlich aus Zirkonoxid (ZrO_2). Damit ist es geeignet, um stellvertretend für die meisten keramischen Implantatmaterialien aus dem Keramiksektor zu fungieren, die in mehr oder weniger schwankenden Gewichtsanteilen aus yttriumstabilisiertem Zirkonoxid bestehen.

Zirkonoxid existiert in verschiedenen Kristallstrukturen, wobei die tetragonale Phase bei Raumtemperatur durch Dotierung mit yttriumstabilisiertem Zirkonoxid (Y-TZP) erreicht wird. Zirkonium an sich ist, wie auch Titan, ein Metall. Durch einen Oxidationsprozess wird Zirkonium zu Zirkonoxid, was einen Übergang weg von den metallischen Materialien zu den keramischen, nicht-metallischen Werkstoffen darstellt. Um die mechanische Festigkeit zu erhöhen, wird Yttriumoxid in diesen Umwandlungsprozess beigemischt. Dieses verlangsamt die Phasenumwandlung von der bruchsischeren tetragonalen zur monoklinen Phase des Zirkoniums – Zirkonoxids. [34]

Keramikwerkstoffe sind momentan noch in einem ständigen Optimierungsprozess, was die Entwicklung bei den Herstellern betrifft. Der Projektpartner, MKM-Engineering GmbH, hat uns als Ausgangsmaterialien sowohl gesintertes Material in Form von Plättchen, als auch gemahlenes Material zur Verfügung gestellt.

Bisher wurden vom Projektpartner Charakterisierungen des Keramikmaterials nach ISO 10993-18 und ISO 10993-12 durchgeführt. Hierzu wurde die BMP GmbH (Aachen, Deutschland) beauftragt, welche bei der ZLG (Zentralstelle der Länder für Gesundheitsschutz bei Arzneimitteln und Medizinprodukten, Bonn, Deutschland) akkreditiert ist. Die Materialproben wurden auf das Vorhandensein semi-volatiler organischer Komponenten mittels GC-MS getestet, wobei keine erhöhten Werte gemessen wurden. Eine ICP-OES Messung auf anorganische Ionen ergab leicht erhöhte, aber unbedenkliche Werte nahe der Nachweisgrenze.

2.7.2 Nanotitandioxid

Um potentielle proinflammatorische Effekte des ACERDenco G2 Keramikmaterials mit den Effekten eines titanbasierten Materials vergleichen zu können, wurde auf das Nanomaterial „NM-105“ vom Joint Research Center (JRC, Ispra Italien) zurückgegriffen. Ein Vergleich mit nanoskaligem, metallischen Titanpulver konnte im Rahmen dieses Projektes leider aufgrund mangelnder Verfügbarkeit nicht durchgeführt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Materialuntersuchung der Hochleistungskeramik (ACERDenco G2)

Das Versuchsmaterial ACERDenco G2 der Firma MKM Engineering GmbH (Mannheim, Deutschland) bestand zum Großteil (92 %) aus Zirkonoxid und Hafniumoxid und zu kleineren Anteilen aus Yttriumoxid (5 %), Aluminiumoxid und Ceroxid. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden einerseits sterilisierte ACERDenco G2 Plättchen als Wachstumsunterlage für Osteoblasten und andererseits gemahlenes Material zur Inkubation von Osteoblasten und Makrophagen verwendet. Das vom Hersteller zur Verfügung gestellte Keramikpulver wurde mittels mehrerer Zentrifugationsschritte in unterschiedliche Größenfraktionen aufgetrennt. Für die Zellkulturexperimente wurden die mikro- bzw. nanoskaligen Fraktionen verwendet. Untersuchungen des hydrodynamischen Durchmessers (DLS) ergaben einen Z-Average von 96 nm und Peaks bei 379 nm (Distribution by number, siehe Abbildung 4), 1306 nm (Distribution by intensity) und 333 nm bzw. 1450 nm (Distribution by volume). Elektronenmikroskopische Aufnahmen (TEM) der gleichen Fraktion zeigten kleinere Aggregate mit einzelnen Partikeln in der Größenordnung von 50 bis 500 nm. Diese Keramikpartikel erschienen in hoher Vergrößerung gerundet, ohne besonders scharfkantige oder nadelartige Strukturen (Abbildung 6 links).

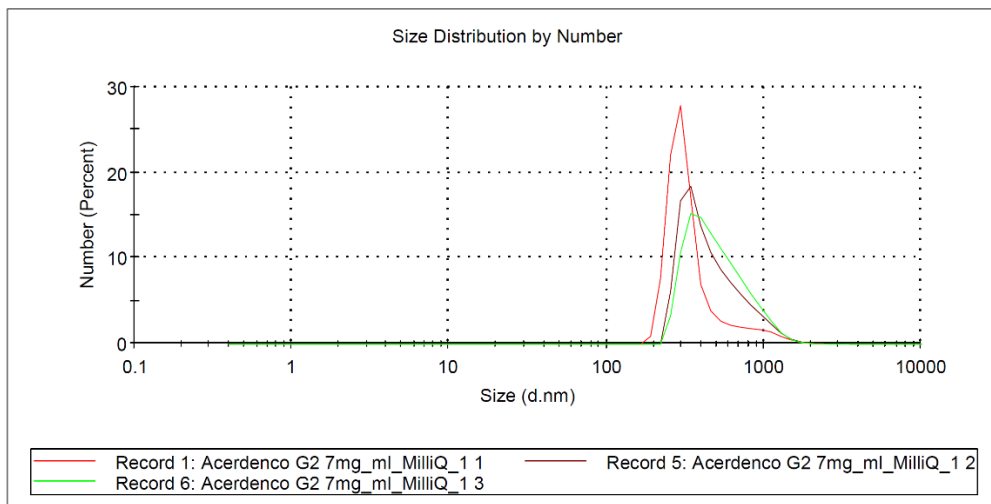


Abbildung 4 Größenverteilung (hydrodynamischer Durchmesser, Distribution by number) der ACERDenco G2 Fraktion, welche nachfolgend in den Antikörper- und Zellkulturexperimenten verwendet wurde. Die Analysen zeigen einen Peak von 379nm bei einem Polydispersity Index von 0,242 auf.

3.2 Nanotitandioxid

Um potenzielle proinflammatorische Effekte des ACERDenco G2 Keramikmaterials mit den Effekten eines titanbasierten Materials vergleichen zu können, wurde auf ein referenziertes Nanomaterial zurückgegriffen. Versuche an Osteoblasten und Makrophagen wurden in der Folge mit beiden dieser Partikel durchgeführt. Die Messung des hydrodynamischen Durchmessers des Titandioxids (Abbildung 5) ergab einen Z-Average von 167 nm und Peaks bei 40 nm (Verteilung nach Partikelanzahl), 279nm (Verteilung nach Intensität) und 58 nm bzw. 476 nm (Verteilung nach Volumen). Elektronenmikroskopische Aufnahmen (TEM) der Probe zeigten Aggregate in der Größenordnung von 40 bis 400nm. Im Vergleich zu dem keramischen Nanomaterial wiesen die Titandioxidaggregate eine etwas weniger massive, ansatzweise flockige Struktur auf (Abbildung 6 rechts).

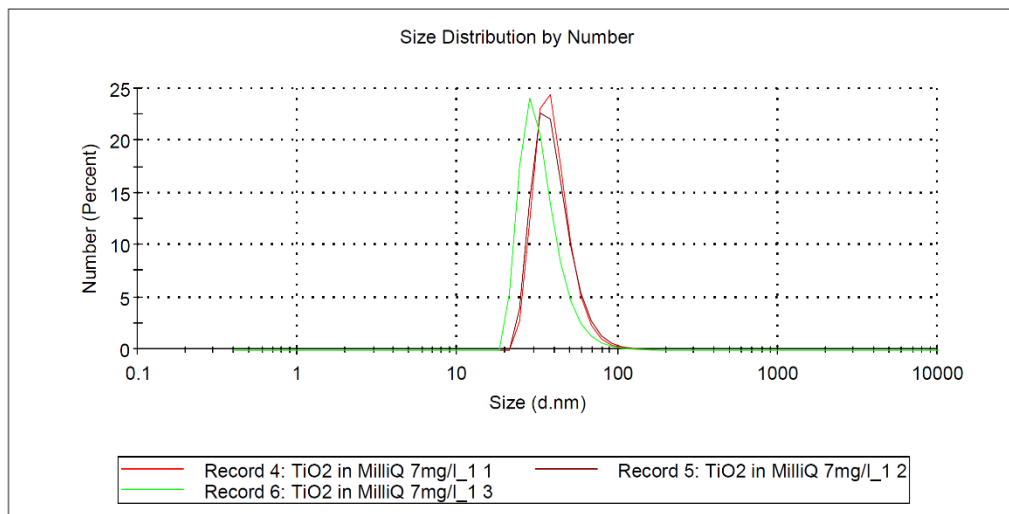


Abbildung 5 Größenverteilung (hydrodynamischer Durchmesser, Distribution by number) des Referenzmaterials Nanotitandioxid NM-105, welches nachfolgend in den Zellkulturexperimenten verwendet wurde. Die Analysen zeigen einen Peak von 40nm bei einem Polydispersity Index von 0,388 auf.

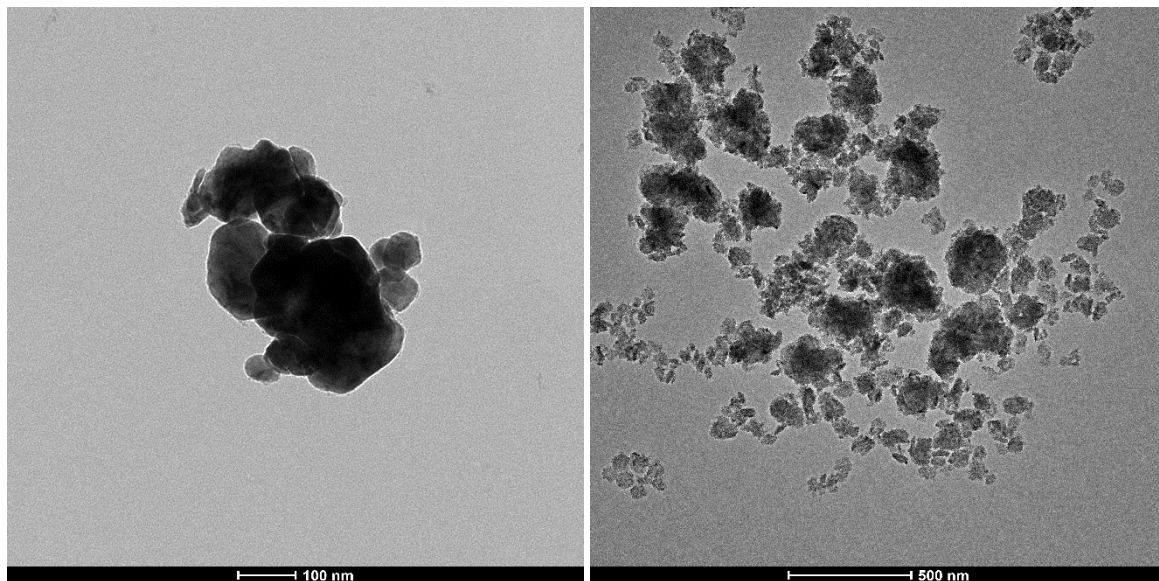


Abbildung 6 Elektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen vom Versuchsmaterial ACERDenco G2 (links) beziehungsweise Titandioxid Referenzmaterial NM-105 (rechts). Beide TEM-Aufnahmen zeigen Aggregate, die sich auch aus Nanopartikeln in der Größe zwischen 10 und 100 nm zusammensetzen.

3.3 Zelllinien CI-huOB

Im Rahmen des CERANANO-Projektes wurde mit der menschlichen Osteoblastenzelllinie CI-huOB (InSCREENeX GmbH, Braunschweig, Deutschland) gearbeitet. Diese Zelllinie wurde (aus Zeit- und Kostengründen) als Ersatz zu den bisher verwendeten humanen Osteoblastenprimärzellen (HOBc, PromoCell C-1272) Zellen gewählt. Die Forschung am Institut für Synthetische Bioarchitekturen (BOKU University) im Bereich der Keramikimplantate wurde in der Vergangenheit (Projekt ZIM (Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand)-Hybrid-Dentalimplantate) hauptsächlich mit HOBc Zellen durchgeführt. Die zuvor gewonnenen Ergebnisse bildeten die wissenschaftlichen bzw. zellkulturtechnischen Grundlagen des CERANANO Projektes.

Zum Standardnachweis einer osteoblastären Differenzierung (*in vitro*, aus humanen mesenchymalen Stammzellen), gehört einerseits der Kalziumnachweis in der extrazellulären Matrix (ECM) und andererseits der Nachweis der Alkalischen Phosphatase (ALP)¹Enzymaktivität, die als osteogener Differenzierungsmarker dient.

Vor Beginn des CERANANO Projekts war in einem Schlüsselversuch geklärt worden, ob CI-huOB Zellen (ebenso wie HOBc Zellen) auf ACERDENCO G2 Keramik Plättchen kultiviert werden können und ob Differenzierungsmarker nachgewiesen werden können. Die Untersuchungen bestätigten, dass die CI-huOB Zellen auf der Wachstumsunterlage ein typisches Zellmonolayer bilden (Abbildung 7 a,b). Die typischen osteoblastären Differenzierungsmerkmale, wie Kalziumeinlagerungen in der ECM (Abbildung 7 c,d,f) und ALP-Aktivität (Abbildung 7 e) konnten nachgewiesen werden. Im Laufe des Projektes CERANANO wurde daher ausschließlich diese Zelllinie verwendet.

¹ https://promocell.com/at_de/osteoblast-differentiation-and-mineralization.html

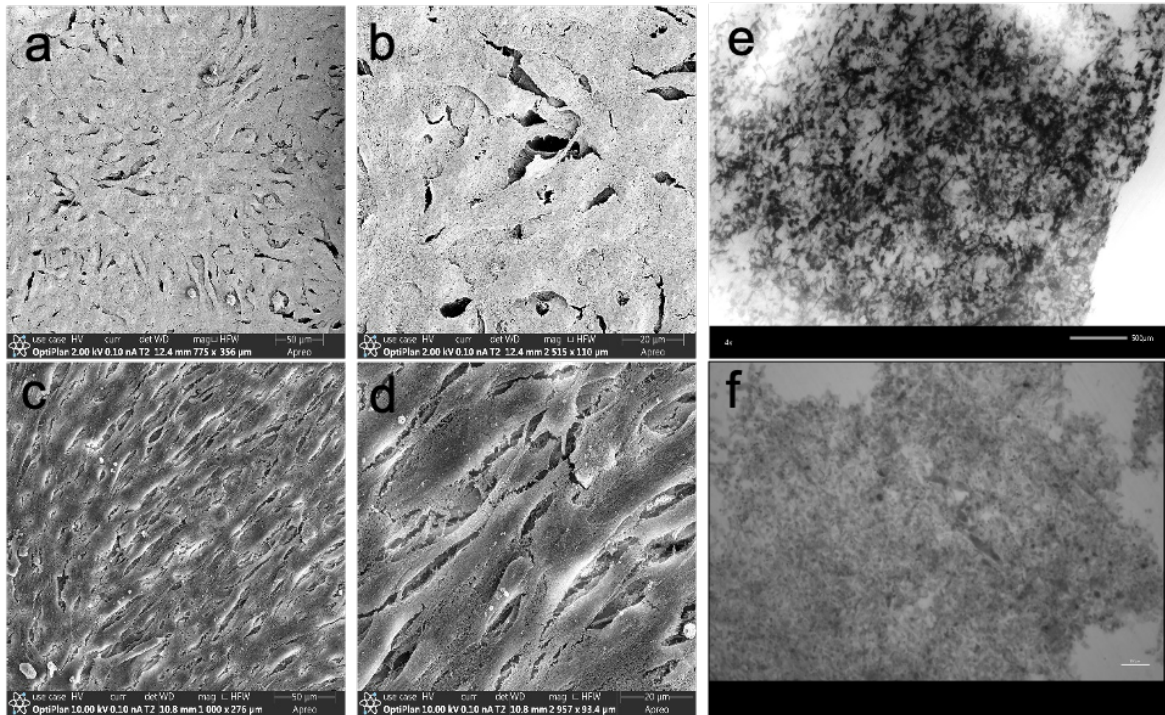


Abbildung 7 Rastermikroskopische Aufnahmen von humanen Osteoblastenzellen (CI-huOB). Aufnahmen a) und b) zeigen auf ACERDENC0 G2 Keramikplättchen als Monoschicht und konfluent gewachsene Zellen. Bilder c) und d) stellen die Zellen, die für 21 Tage in Mineralisierungsmedium kultiviert wurden, dar (Kalzium Ablagerung in der ECM). Die Aktivität von Alkalischer Phosphatase (ALP) in den Zellen wurde durch Verwendung BCIP/NBT als Substrat detektiert (Bild e). ALP-positive Zellen zeigen eine schwarze Färbung. Im Bild f) wird die Alizarin Red S Färbung (im Bild dunkelgrau) als Nachweis von Kalziumablagerung in den Zellen dargestellt. Zusammenfassend ist die erfolgreiche Differenzierung der humanen Osteoblastenzellen zu sehen.

3.4 Zellkultur

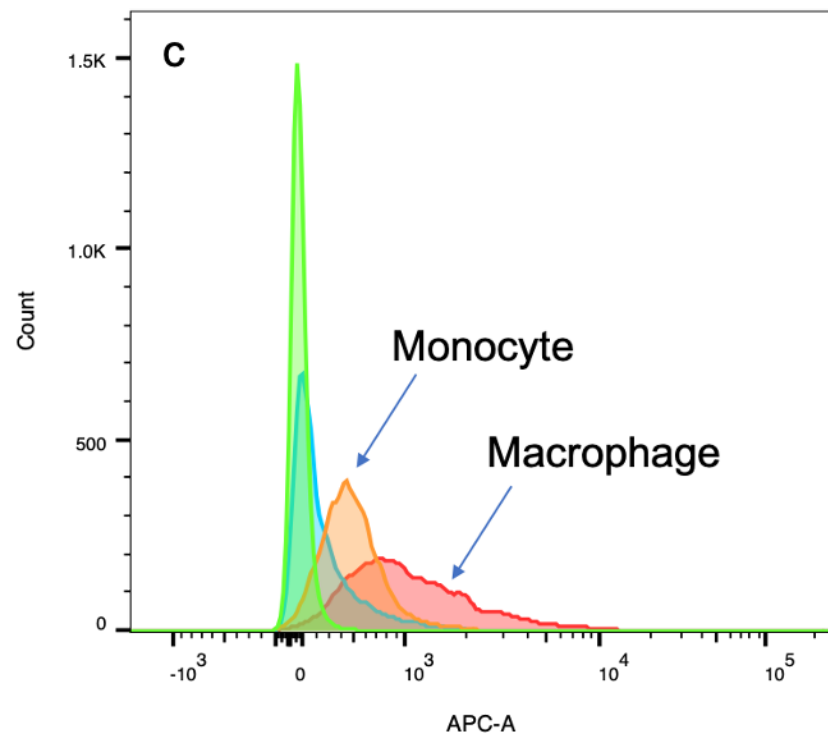
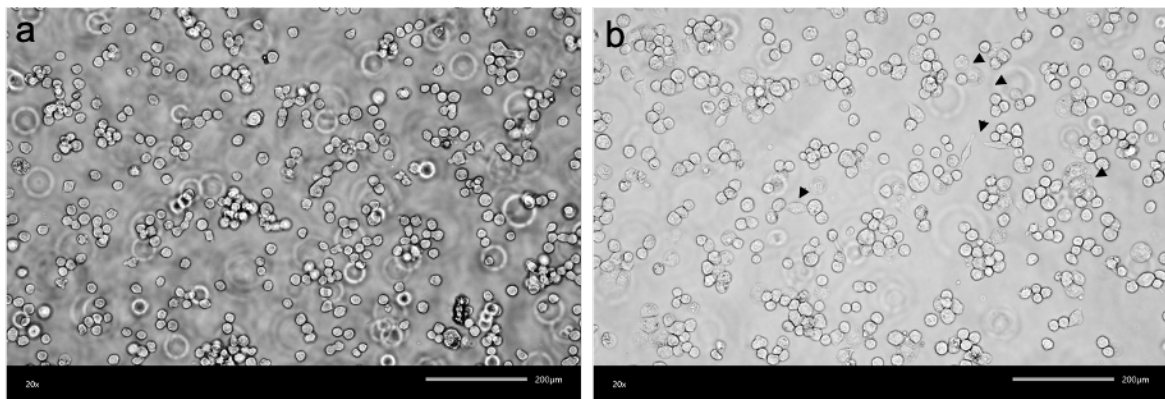
3.4.1 Zellkultur von Makrophagen in Anwesenheit keramischer Materialien

3.4.1.1 Differenzierung zwischen Monozyten und Makrophagen

Die THP-1 Zelllinie (Cytion, CLS-3000356, DE) ist eine menschliche monozytäre Leukämie-zelllinie. Diese Zellen sind in der Lage, sich in makrophagenähnlichen Zellen zu differenzieren. Diese differenzierten THP-1 Makrophagen behalten unter anderem die Funktion der Zytokinproduktion bei. Differenzierung von THP-1 Monozyten in Makrophagen erfolgt in Gegenwart von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA).

Die THP-1 Zellen wurden in RPMI 1640 Basis Medium (Cytion, Produktnummer: 820700a) ergänzt mit 10 % FBS (A5256801, Gibco, Thermo Fisher Scientific, US) und 1 % Penicillin-Streptomycin Antibiotika, als Suspensionskultur gehalten. Kultivierung erfolgte in einem Inkubator mit einem 5 %igen CO₂-Gehalt bei 37°C.

Eine dichte THP-1 Monozytenzellsuspension ($6,5 \times 10^5$ /ml) in 15 ml Medium (T-75 Kulturflasche) wurde mit 120 nmol PMA in DMSO (P2585, Sigma- Aldrich, Merck US) angesetzt, um die Differenzierung zu Makrophagen einzuleiten (Abbildung 8a). Der Fortschritt der Zelldifferenzierung konnte im Lichtmikroskop beobachtet werden, da eine morphologische Veränderung und eine Adhäsion am Boden der Kulturflasche beobachtet wurde (Abbildung 8b). Weiters wurde die Entstehung einer Makrophagenpopulation mit dem FACS (fluorescence-activated cell sorting) nach der Markierung der Zellen mit einem anti CD14 Antikörper detektiert (Abbildung 8c).



	Sample Name	Subset Name	Count
	Specimen_001_Monocyte.fcs	Ungated	10000
	Specimen_001_Monocyte - CD14-APC.fcs	Ungated	10000
	Specimen_001_Macrophage.fcs	Ungated	10000
	Specimen_001_Macrophage - CD14-APC.fcs	Ungated	10000

Abbildung 8 Lichtmikroskopische Aufnahmen von THP-1 Zellen in Zellkultur. a) Suspensionszellen THP-1 Monozyten. b) Anfang der langsamen Adhärenz (mit Pfeil hervorgehoben) der Monozyten in Gegenwart von PMA, Differenzierung der Makrophagen aus Monozyten. c) Die im Lichtmikroskop visualisierte Zellkultur wurde mit Fluoreszenzmarker APC konjugiert und mit anti CD14 markiert und im FACS detektiert.

Sowohl THP-1 Monocyten als auch Makrophagen exprimieren das CD14 Oberflächenprotein.

3.4.1.2 Lichtmikroskopische Untersuchung der Viabilität der Makrophagen in Gegenwart von Nanopartikeln

In diesem Kapitel wurde die Lebensfähigkeit (Viabilität) von Makrophagenzellen in Anwesenheit von keramischen, sowie alternativen Nanopartikeln untersucht. Die Anwesenheit beider Materialien (ACERDenco G2, JRC TiO₂ NM-105) in nanoskaliger Form hatte keine morphologische Veränderung dieser immunrelevanten Zellspezies bewirkt, wie in den exemplarisch dargestellten, lichtmikroskopischen Bildern zu sehen ist (Abbildungen 9, 10 und 11). Da die Makrophagen in Kultur grundsätzlich eine Verringerung der Zellzahl über die Zeit aufwiesen, wurde als das entscheidende Kriterium einer Auswertung nicht die absolute Zellzahl, sondern vielmehr die Morphologie der Zellen und die grundsätzliche Viabilität gewählt.

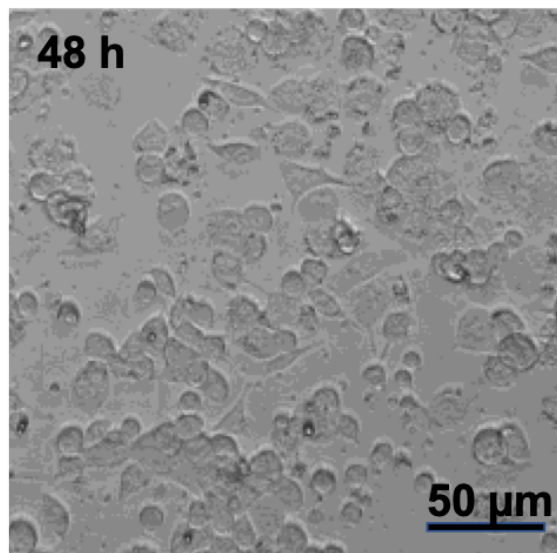


Abbildung 9 Lichtmikroskopische Aufnahme von THP-1 Makrophagen nach 48 Stunden ohne Zugabe von Nanopartikeln. Man erkennt die für Makrophagen typische Morphologie,

die sich durch flach am Substrat anhaftende, teils mit Fortsätzen (Pseudopodien) ausgestattete, vesikelreiche Zellen auszeichnet.

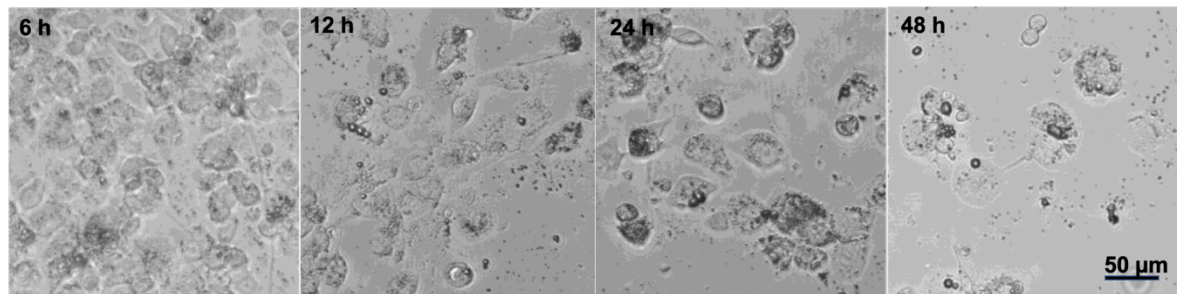


Abbildung 10 Lichtmikroskopische Aufnahmen einer Zeitreihe (6, 12, 24 und 48 Stunden) von THP-1 Makrophagen in Gegenwart von 10 µg ACERDenco G2 Keramikpulver.

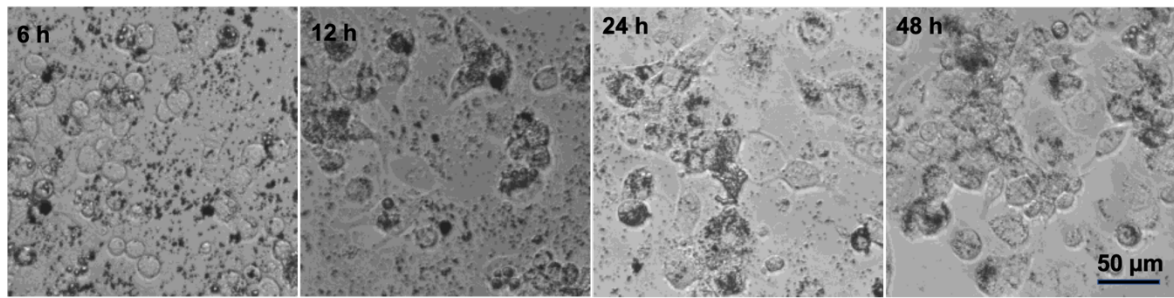


Abbildung 11 Lichtmikroskopische Aufnahmen einer Zeitreihe (6, 12, 24 und 48 Stunden) von THP-1 Makrophagen in Gegenwart von 10 µg nanoskaligem TiO₂ Pulver.

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass in der morphologischen Analyse keine Hinweise auf einen negativen Einfluss des keramischen Nanopulvers auf die Viabilität der Zellen zu erkennen war. Auch das TiO₂ Pulver ergab keinen nennenswerten Einfluss auf Zellzahl, bzw. Morphologie, der sich von der Referenzmessung wesentlich unterschieden hätte (Referenz: Zellen ohne nanoskalige Materialien unter identischen Zellkulturbedingungen).

Da nun die Morphologie der Zellen alleine kein ausreichendes Evaluationskriterium bot, wurden zusätzlich Entzündungsmarker, sowohl auf genetischer als auch auf Proteinebene, gemessen.

3.4.1.3 Genexpression der Makrophagen

Zur Beurteilung möglicher immunologischer Effekte in Makrophagen wurden zelluläre Genexpressionsmuster (IL1B, TNFA) mittels quantitativer Real-Time PCR bestimmt. Die Expression der Interleukin-1 β steuernden Gene stieg sowohl in den mit ACERDENC0 G2 als auch in den mit TiO₂ inkubierten Zellen an. Hierbei konnte der stärkste Anstieg in den mit 10 µg (pro 200 µl Zellkulturmedium im Probenbehältnis) TiO₂ behandelten Zellen nach 24 Stunden Inkubationsdauer gemessen werden. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, verfünffachte sich die IL1B Expression in der ACERDENC0 G2-Gruppe, während sie sich in der TiO₂-Gruppe verachtffachte (jeweils 10 µg, 24 Stunden). Bezogen auf die TNFA Expression konnte eine dosisabhängige Steigerung beobachtet werden, die in der TiO₂-Gruppe deutlich (18-fach; 100 µg, 6 Stunden) und in der ACERDENC0-Gruppe im Vergleich moderat (3-fach;

100 µg, 6 Stunden) ausfiel (Abbildung 12). Die in der Abbildung 12 gezeigten lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine Verminderung der THP-1 Makrophagen-Zelldichte über den 24-stündigen Beobachtungszeitraum.

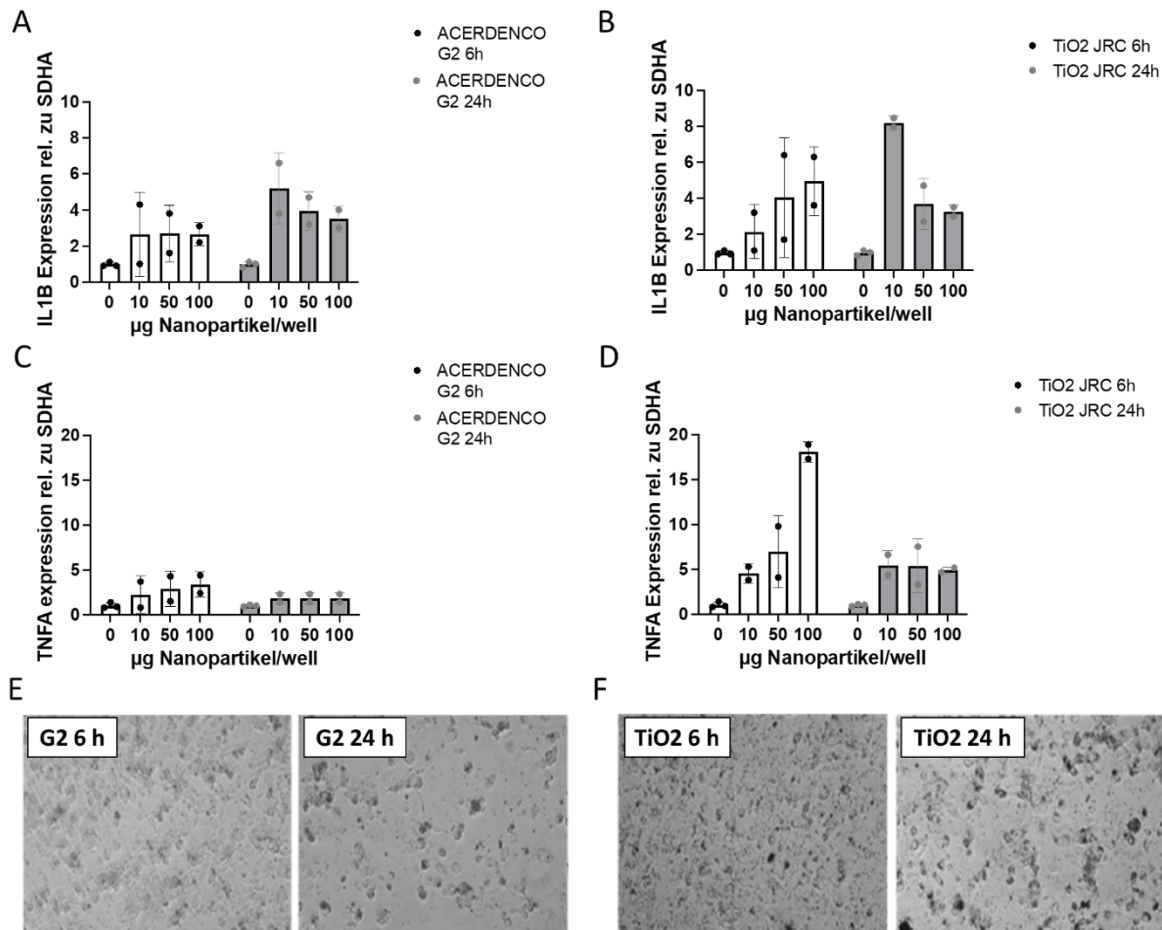


Abbildung 12 Genexpressionen von IL1B und TNFA in THP-1 Makrophagen. Konzentrationsabhängige Steigerung der Genexpression nach Zugabe von ACERDENC G2 (A: IL1B, C: TNFA) bzw. nach Titandioxid (B: IL1B, D: TNFA) über 6 und 24 Stunden. Titandioxidpartikel bewirkten bei fast allen Partikelkonzentrationen eine höhere Genexpression als die Anwesenheit der ACERDENC G2-Partikel. Der stärkste Anstieg (18-fach bezogen auf die unbehandelte Kontrolle) wurde in der TNFA -Expression (100 µg TiO₂, 6 Stunden Inkubationszeit) beobachtet. In den lichtmikroskopischen Aufnahmen wird die

Veränderung der Zellmorphologie und -dichte für die mit ACERDENC O G2 (G2 6h, G2 24h) und mit Titandioxid (TiO₂ 6h, TiO₂ 24h) behandelten Makrophagen demonstriert.

3.4.1.4 Zytokinausschüttung der Makrophagen

Um die Genexpressionsänderungen nach Nanopartikelzugabe mit möglichen Veränderungen auf Proteinebene zu vergleichen, wurden die Überstände der mit ACERDENC O G2 und TiO₂ Nanopartikeln inkubierten Zellen abgezogen und mit einem Zytokin Assay ausgewertet. Wie in Abbildung 13 ersichtlich, konnte der konzentrationsabhängige Anstieg von den in den Zellkulturüberstand abgegebenen Zytokinen IL-1 β und TNF- α mit ähnlichen, allerdings deutlicheren Verlaufsmustern wie in der mRNA-Expression bestätigt werden. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe stieg die IL-1 β Freisetzung in mit TiO₂ behandelten Zellen am stärksten an und war um ein Vielfaches höher als in den mit ACERDENC O G2 inkubierten Zellen (Abbildung 13 A). Die TNF- α Freisetzung war in den titandioxidbehandelten Zellen ebenso höher als in den mit keramischen Nanopartikeln behandelten (Abbildung 13 B). Die Titandioxidpartikel bewirkten in diesem THP-1-Modell eine deutlich gesteigerte Zytokinfreisetzung. Diese Aktivierung im Zellkulturmodell könnte ein Signal einer möglichen titanbasierten Immunaktivierung *in vivo* darstellen, müsste aber in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden. Im Gegensatz dazu war die durch ACERDENC O G2 Partikel mediierte IL-1 β und TNF- α Freisetzung deutlich geringer. Ausdrücklich möchten wir aber an dieser Stelle festhalten, dass die Versuche nicht statistisch valide in Zahl und Setting durchgeführt werden konnten, da die zeitlichen und budgetären Ressourcen limitiert waren. Insofern

sind die Ergebnisse lediglich als Hinweise auf einen Unterschied der inflammatorischen Wirkungen zwischen Titandioxidpartikeln, bzw. keramischen Partikeln zu interpretieren.

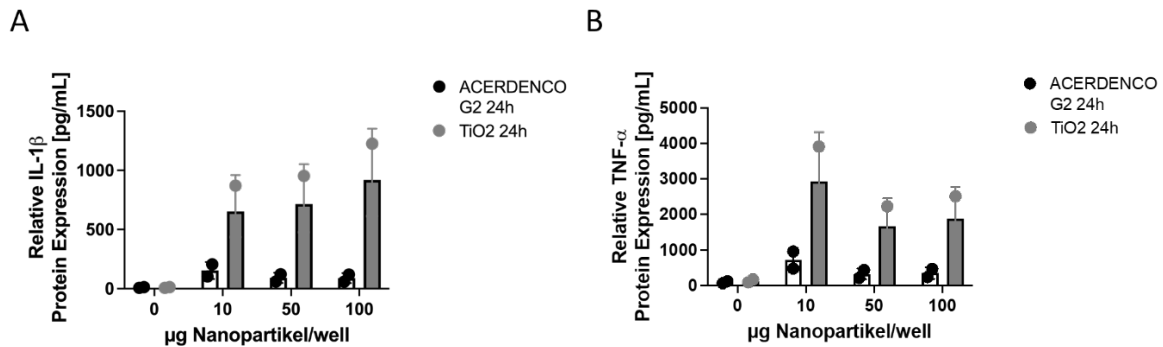


Abbildung 13 Ausschüttung der Zytokine IL-1 β (A) und TNF- α (B) bei THP-1 Makrophagen. Die graphische Darstellung zeigt die Zytokinausschüttung nach 24 Stunden in Abhängigkeit der Partikelkonzentration von ACERDENCOC2 und TiO₂ (jeweils 0, 10, 50, 100 μ g pro 200 μ l Zellkulturvolumen).

3.4.2 Zellkultur von humanen Osteoblasten in Anwesenheit keramischer Materialien

Neben den Studien an humanen Makrophagen als immunrelevantem Zellmodell, wurden auch humane Osteoblasten (CI-huOB) in der Zellkultur herangezogen, um eine Aussage über einen potentiellen Einfluss nanoskaliger Keramikstäube zu machen. Dabei wurde wieder sowohl die Lebensfähigkeit (Viabilität), als auch der mögliche Anstieg von ausgewählten Entzündungsmarkern auf genetischer, wie auch auf Proteinebene untersucht. Die Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

3.4.2.1 Viabilität der CI-huOB Zellen

Immortalisierte menschliche Osteoblasten CI-huOB Zellen (INS-CL-1005, Inscreenex, DE) wurden in Wachstumsmedium (INS-ME-1006, Inscreenex, DE) mit 6 % Supplement und 1 % Penicilin-Streptomycin Antibiotika (P4333, Sigma-Aldrich, USA) im Inkubator bei 37°C und einer 5 %igen CO₂ Atmosphäre kultiviert. Für die Zytotoxizitätsexperimente wurden 200 μ l

CI-huOB Zellsuspension mit einer Aussaatdichte von 0.4×10^5 in 96 Well Platten (Greiner, CELLSTAR) ausgesät. Nach drei Tagen erreichten die Zellen eine Konfluenz von 80 %. Konfluenz ist der Fachbegriff für die Dichte an Zellen auf einer Oberfläche. Die adhärent wachsenden CI-huOB Zellen wurden daraufhin mit 5, 10 und 20 μg ACERDENCOC G2 bzw. TiO_2 Nanopartikel in jeweils 200 μl Kulturmedium für 6, 12, 24 und 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Am Ende der Einwirkzeit wurden 20 μl AlamarBlue Reagent pro 200 μl Zellkulturvolumen zugegeben und die Inkubation für zwei Stunden weitergeführt. Die Fluoreszenzintensität wurde im Plate-Reader gemessen. Sowohl die mit ACERDENCOC G2 als auch die mit Titandioxid behandelten Zellen wiesen eine gute Viabilität über die gesamte Versuchsdauer auf (Abbildung 14).

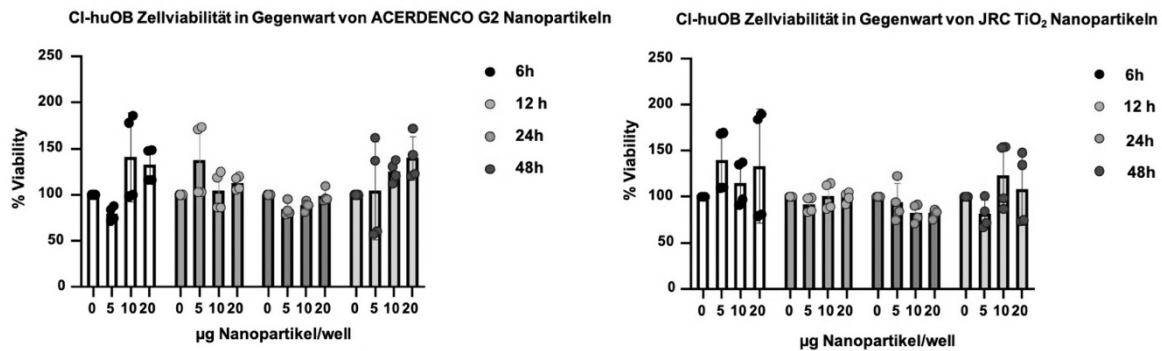


Abbildung 14 Vergleich der Viabilität der Osteoblastenzelllinie CI-huOB unter verschiedenen Konzentrationen von ACERDENCOC G2 (links) und TiO_2 Nanopartikeln (rechts) über eine Expositionsdauer von 48 Stunden.

Die Viabilität der CI-huOB Zellen wurde zusätzlich im Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse Ts2R; Filtersatz: GFP F36-525 und TRITC C-FL-C) untersucht. Dafür wurden die Zellen nach der Inkubation mit ACERDENCOC G2 und JRC TiO_2 Nanopartikeln (bei gleicher Partikelmenge und Inkubationszeit) mit einem Live/Dead Cell Imaging Kit, (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, US) untersucht. Lebensfähige Zellen fluoreszieren grün, die rote Fluoreszenz weist auf tote Zellen hin (Abbildung 15 und 16).

Die Viabilität der CI-huOB Zellen in Gegenwart von ACERDENCOC G2 konnte mit nahezu 100 % (ersichtlich an der starken grünen Fluoreszenz) beschrieben werden. Die über 6-, 12-, 24- und 48-Stunden Inkubationszeit untersuchten Osteoblasten weisen in keiner der verwen-

deten Partikelkonzentrationen (5, 10 und 20 µg) eine nennenswerte Anzahl an abgestorbenen Zellen (ersichtlich an der roten Fluoreszenz) auf. Eine zytotoxische Wirkung der Keramikpartikeln auf CI-huOB Zellen war also nicht zu beobachten (Abbildung 15).

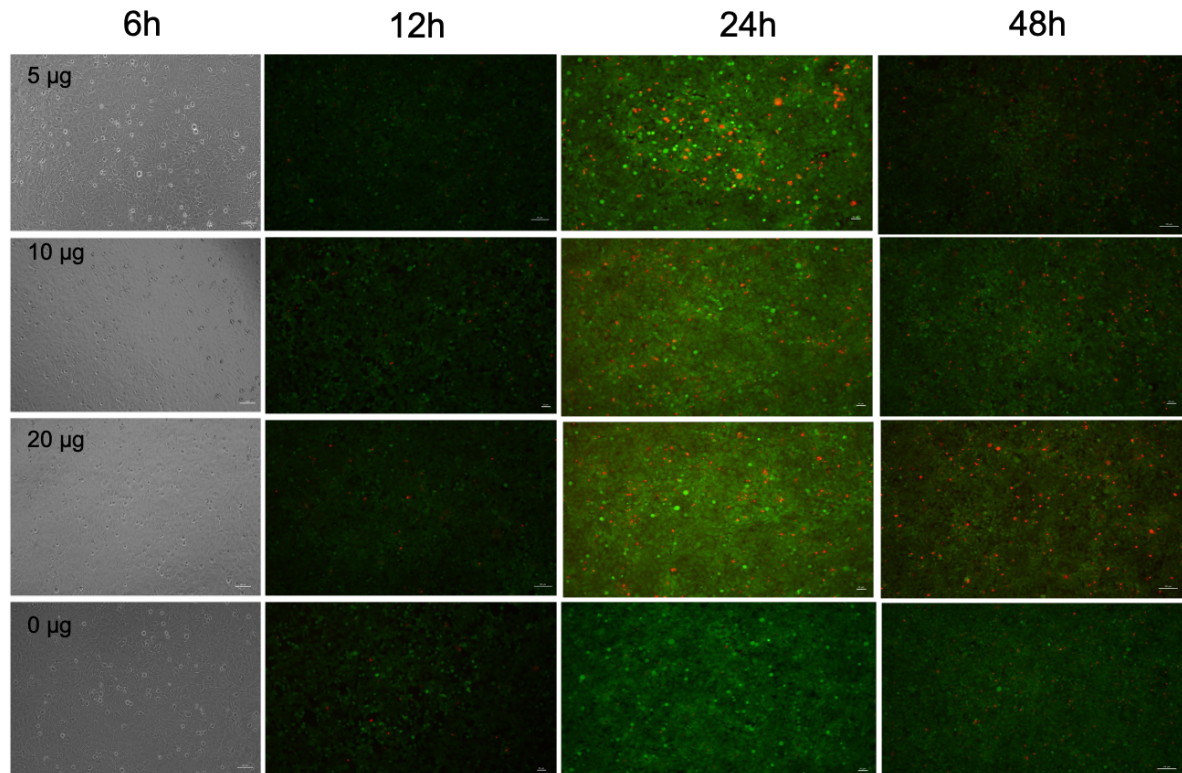


Abbildung 15 Viabilität von CI-huOB Zellen nach der Inkubation mit ACERDENC G2 Nanopartikeln. Einfluss der Nanopartikelkonzentration und Einwirkungszeit (6, 12, 24 und 48 Stunden) wurde im Fluoreszenzmikroskop nach der Färbung der Zellen durch Verwendung des LIVE/DEAD Markierungs Kits dargestellt. Grüne Fluoreszenz stellt lebendige und rote Fluoreszenz tote Zellen dar (Filtersatz; GFP F36-525 und TRITC C-FL-C).

Die Viabilität der mit Titandioxidpartikeln behandelten Zellen erschien im Vergleich mit der Anwesenheit keramischen Materials unverändert gegenüber der Kontrolle. In der mikroskopischen Analyse war die Anzahl an toten Zellen (rote Fluoreszenz, Abbildung 16; 48 Stunden) leicht erhöht im Vergleich mit der mit ACERDENC behandelten Vergleichsgruppe (Abbildung 15). Der Großteil des TiO₂ behandelten Zellmonolayers wies eine grüne Fluoreszenz auf und ist daher als lebendig und stoffwechselaktiv zu bezeichnen, da nur lebende Zellen den zugegebenen Farbstoff in die grün fluoreszierende Form umwandeln können.

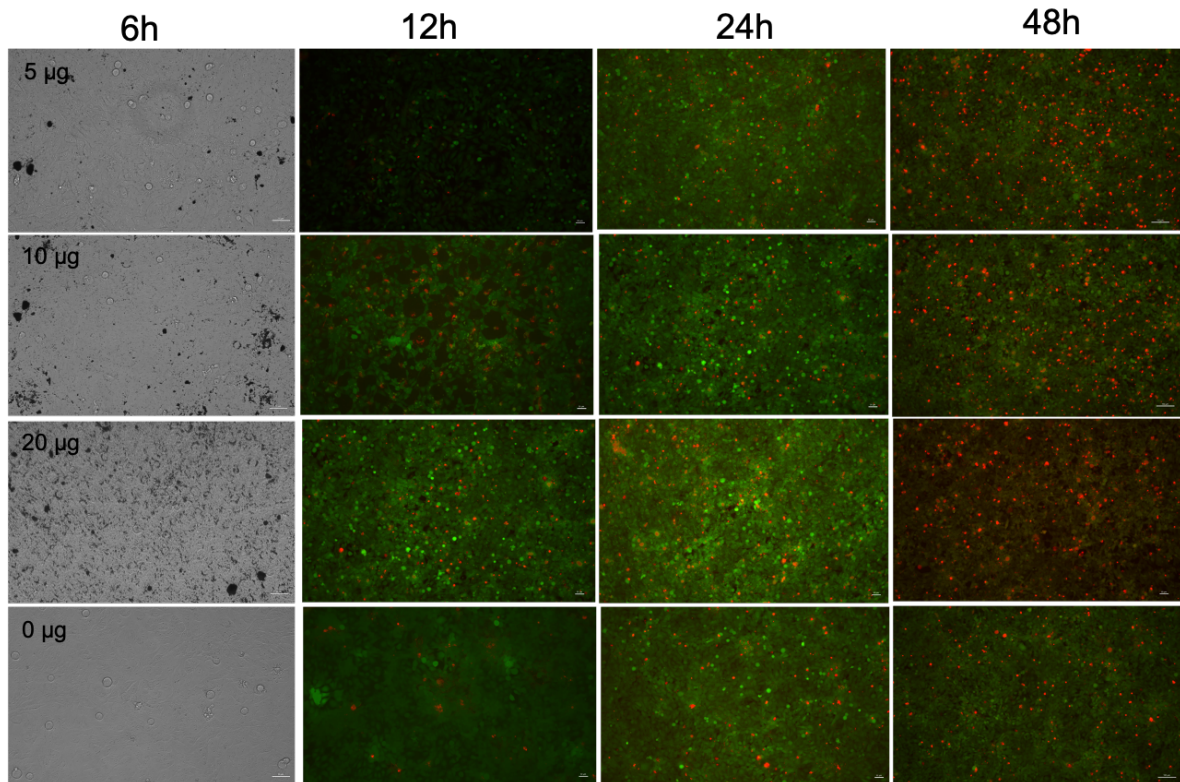


Abbildung 16 Viabilität von CI-huOB Zellen nach der Inkubation mit Nanotitandioxidpartikeln Der Einfluss der Nanopartikelkonzentration und Einwirkungszeit wurde im Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Zell-Viabilität wurde durch Verwendung einer LIVE/DEAD Markierung dargestellt. Grüne Fluoreszenz trat bei lebenden, rote Fluoreszenz bei toten Zellen auf (Filtersatz; GFP F36-525 und TRITC C-FL-C).

In den durchgeführten Viabilitätsstudien ließ sich zusammenfassend feststellen, dass sowohl der Alamar Blue Assay als auch der Live/Dead Cell Imaging Kit eine positive Verträglichkeit sowohl von Nanotitandioxid (JRC) als auch von ACERDenco G2 aufwiesen. Lediglich durch Zugabe vergleichsweise hoher Mengen an nanoskaliger Keramik bzw. titanhaltigen Materials konnte eine moderate, zytotoxische Wirkung beobachtet werden. Hierbei schien die Anwesenheit keramischen Materials im Vergleich zu titanhaltigem Material für den untersuchten Zelltyp geringfügig verträglicher zu sein. Für eine verlässliche Aussage bräuchte es jedoch ein deutlich größeres Spektrum an Experimenten.

3.4.2.2 Genexpression der CI-huOB Zellen

Zur Beurteilung der möglichen Aktivierung proinflammatorischer Prozesse in Osteoblasten wurden die Genexpressionsmuster für IL6, ALP und MMP3 mittels quantitativer Real-Time PCR ermittelt. Hierfür wurden die Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen (0, 5, 10 und 20 µg / 200µl) der keramischen und titanbasierten Testpartikel für 6 und 24 Stunden inkubiert. Bezogen auf das proinflammatorische Zytokin Interleukin-6 zeigte sich nach 24 Stunden Einwirkzeit eine moderate Erhöhung (2- bis 3-fach) unter ACERDenco G2 Stimulation und eine marginale Erhöhung unter Titandioxidstimulation. Die Expression der ALP-steuernenden Gene verhielt sich unauffällig, da sich die gemessenen Werte innerhalb der Schwankungsbreite der unbehandelten Kontrolle bewegten. Für die Matrix-Metalloprotease 3 stiegen die gemessenen Werte nach 24-stündiger Inkubation unter ACERDenco G2 auf das 4-

bis 6-fache bzw. auf das 3- bis 4-fache unter den Einfluss der Titandioxidpartikel (Abbildung 17).

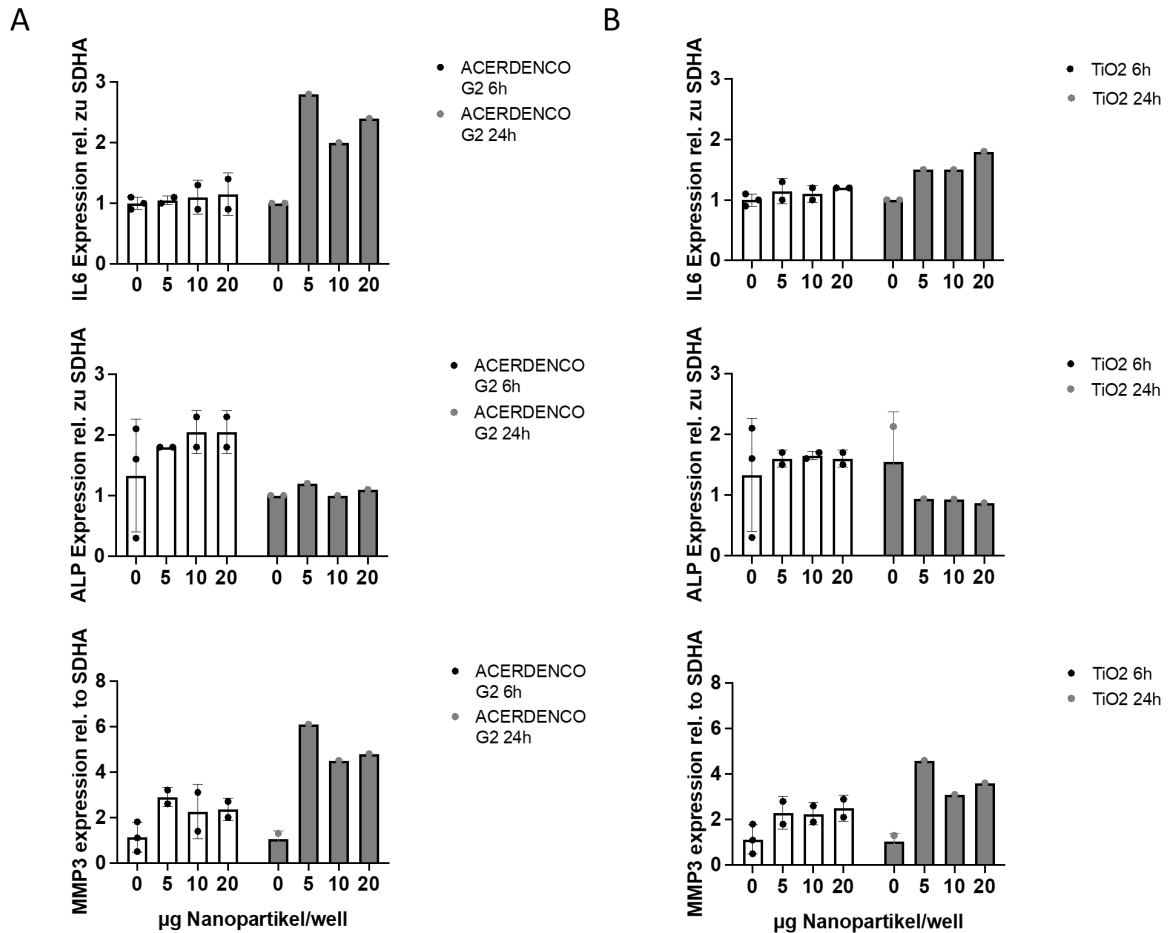


Abbildung 17 Die Genexpression von IL6, ALP und MMP3 in CI-huOB Zellen wurde nach der qPCR-Methode ermittelt. A) Nach 24-stündiger Inkubation mit ACERDENC G2 Nanopartikeln war die Genexpression von IL6 etwa um das 2- bis 3-fache und für MMP3 um das 4- bis 6-fache erhöht. B) Nach 24-stündiger Inkubation mit TiO₂-Nanopartikeln war die IL6-Expression nur geringfügig erhöht und die MMP3- Expression um das 3- bis 4-fache. Die Expression der Alkalischen Phosphatase war in beiden Experimenten unverändert.

3.4.2.3 Zytokinausschüttung der CI-huOB Zellen

Um eine mögliche Aktivierung des Immunsystems auf Keramikpartikel bzw. Titandioxidpartikel beurteilen zu können, wurden CI-huOB Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen (0,

5, 10, 20 µg / 200 µl Zellkulturmedium) der Nanopartikel für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden die Freisetzung der Entzündungsmediatoren IL-6 und IL-8 bzw der Matrix-Metalloproteasen MMP1, MMP-3 und MMP-13 gemessen. Hierbei wurden nur leicht erhöhte Zytokinwerte festgestellt, die kein deutliches proinflammatorisches Signal darstellen (Abbildung 18 D, E). In Bezug auf die Metalloproteasen zeigten sich leicht bis moderat erhöhte Werte von MMP-1 und MMP-3 in den mit Titandioxid behandelten Zellen (Abbildung 18 A, B). Im Vergleich zu nichtbehandelten Zellen stieg die Konzentration von MMP-1 unter 20 µg / 200 µl TiO₂ um das rund 1,6-fache.

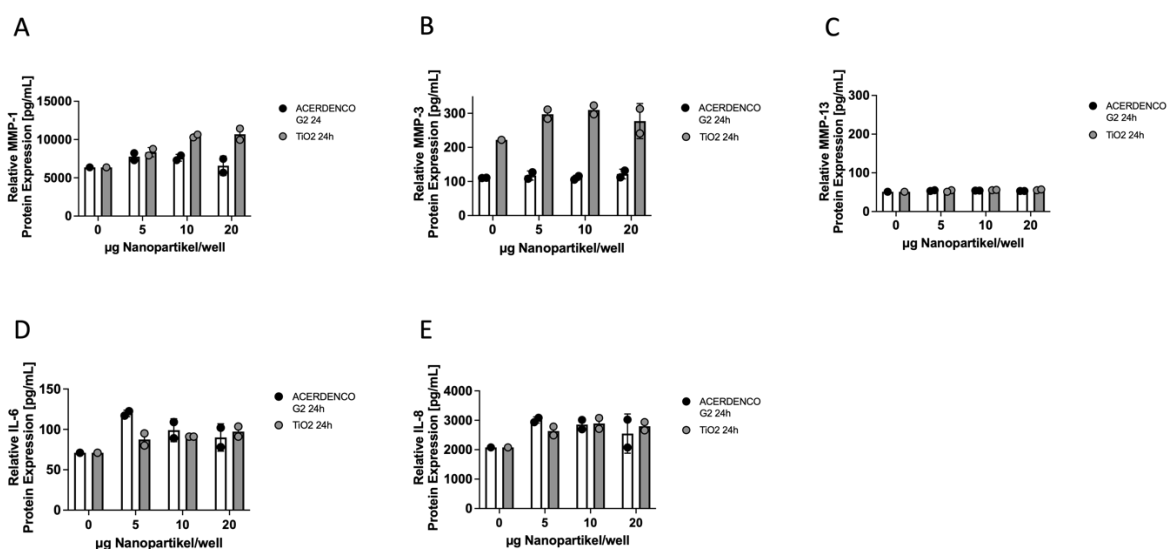


Abbildung 18 Matrix-Metalloproteasen- und Zytokinausschüttung der mit aufsteigenden Konzentrationen von ACERDENCOC2 und TiO₂ Nanopartikeln behandelte CI-huOB Zellen. Die Osteoblasten wurden für 24 Stunden exponiert und die Zellüberstände im Anschluss auf MMP-1 (A), MMP-3 (B), MMP-13 (C), IL-6 (D) und IL-8 (E) Freisetzung analysiert. Im Vergleich der beiden Substanzklassen sieht man kaum erhöhte Freisetzung der Zytokine bzw. der Metalloproteasen. Nur die mit Titandioxid behandelte Probe zeigt im Vergleich zu der mit ACERDENCOC2 behandelten leicht erhöhte MMP-1 und MMP-3 Werte.

3.4.3 Fazit der Zellkulturexperimente

In Bezug auf die Experimente an den THP-1 Makrophagen wurde festgestellt, dass diese Immunzellen sehr schnell auf externe Stimuli reagierten und nicht lange in Kultur überlebten. Letzteres wurde ersichtlich in der Ausdünnung der Zellen über die Kultur- und Partikelexpositionszeit. Bereits nach 6 Stunden Inkubationszeit der Nanopartikel stieg die Expression der Gene, die für IL-1 β und TNF- α kodieren, deutlich an (Abbildung 12). Auch die direkte Messung der Entzündungsmediatoren aus dem Zellkulturüberstand ergab eine verstärkte Freisetzung von Interleukin 1-beta und dem Tumornekrosefaktor-alpha. Titandioxidzugabe bewirkte hierbei eine deutlich stärkere Freisetzung als die Behandlung mit ACERDENC G2-Partikeln. Ob diese gesteigerte Freisetzung *in vitro* auch ein Indiz für eine Immunaktivierung *in vivo* sein könnte, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Die durch ACERDENC G2 Partikel mediierte IL-1 β und TNF- α Freisetzung war jedenfalls deutlich geringer (Abbildung 13).

Im Kontext der humanen Osteoblastenzelllinie ließ sich festhalten, dass es keinen wesentlichen Unterschied durch die Anwesenheit nanoskaliger Keramik, bzw. titanhaltiger Stäube gab, da die Zellen weder morphologisch noch auf Gen- bzw. Proteinexpressionsebene auf die Anwesenheit sonderlich reagierten. Einzig eine leicht bis moderat erhöhte Expression der IL-6 bzw. MMP-3 steuernden Gene unter Einfluss von Keramikpartikeln (Abbildung 17) konnte beobachtet werden. Die direkte Messung von IL-6 und MMP-3 aus dem Zellkulturüberstand zeigten hingegen keine bis nur minimal erhöhte Werte (Abbildung 18). Ein klares proinflammatorisches Signal konnte aus dieser Experimentalreihe also nicht abgeleitet werden.

Generell ist es so, dass Zellkulturmodelle im Vergleich zur *in vivo* Situation grundsätzlich nur eingeschränkte Aussagen zulassen. Etwaige Wiederholungen der durchgeführten Experimente unter gleichen bzw. moderat veränderten Rahmenbedingungen (längere Inkubationszeiten und Messreihen, zusätzliche Metabolite, Kokultur mit primären humanen Osteoblasten etc.) könnten angedacht werden, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen. Unter Berücksichtigung der Limitationen dieser Zellkulturstudie, konnten keine Signale beobachtet werden, die auf eine zytotoxische Eigenschaft der eingesetzten Nanomaterialien auf Osteoblasten hindeuten.

3.5 Antikörperstudie

Eine wichtige Frage galt der immunologischen Wirkung nanoskalige Partikel, die wir in Kooperation mit einem auf Antikörperproduktion spezialisierten Partner (Thermo Fisher Scientific, Custom Antibody Development, 3747 N. Meridian Road, Rockford, IL 61101, USA) beantworten konnten. Thermo Fisher hat mit einer G2 Partikelfraktion in einem parallelen Projekt zu CERANANO eine Immunisierung im Tiermodell Kaninchen durchgeführt. Im Rahmen dieses Projektes konnten wir damit eine Antwort auf die Frage geben, ob keramische Nanopartikel, die durch Abrieb oder beim Einsetzen bzw. Entfernen des Implantates entstehen könnten, eine Immunantwort bewirken und in weiterer Folge Entzündungen oder Allergien induzieren könnten.

Ausgangsmaterial für die Immunisierung war Mahlgut aus keramischen Implantatmaterialien (Bereitgestellt von MKM Engineering GmbH) welches mittels Kugelmühle vom Hersteller zerkleinert wurde. Um die größeren Partikel vom nanoskaligen Mahlgut zu trennen, wurde nach Sedimentationsschritten der Überstand abgezogen und durch weitere Sedimentations- und Zentrifugations-Schritte schlussendlich Fraktionen gewonnen, in denen hauptsächlich keramische Partikel im Nanometerbereich vorlagen. Die ersten Kontrollen erfolgten mittels Lichtmikroskop (Abbildung 19).

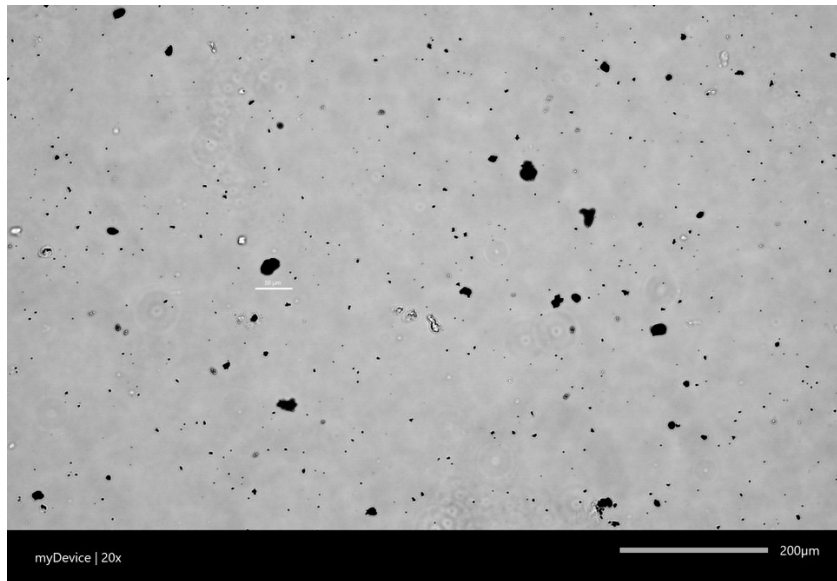


Abbildung 19 Lichtmikroskopische Untersuchungen nach dem ersten Sedimentationsschritt zeigen noch eine große Größenverteilung des keramischen Mahlgutes.

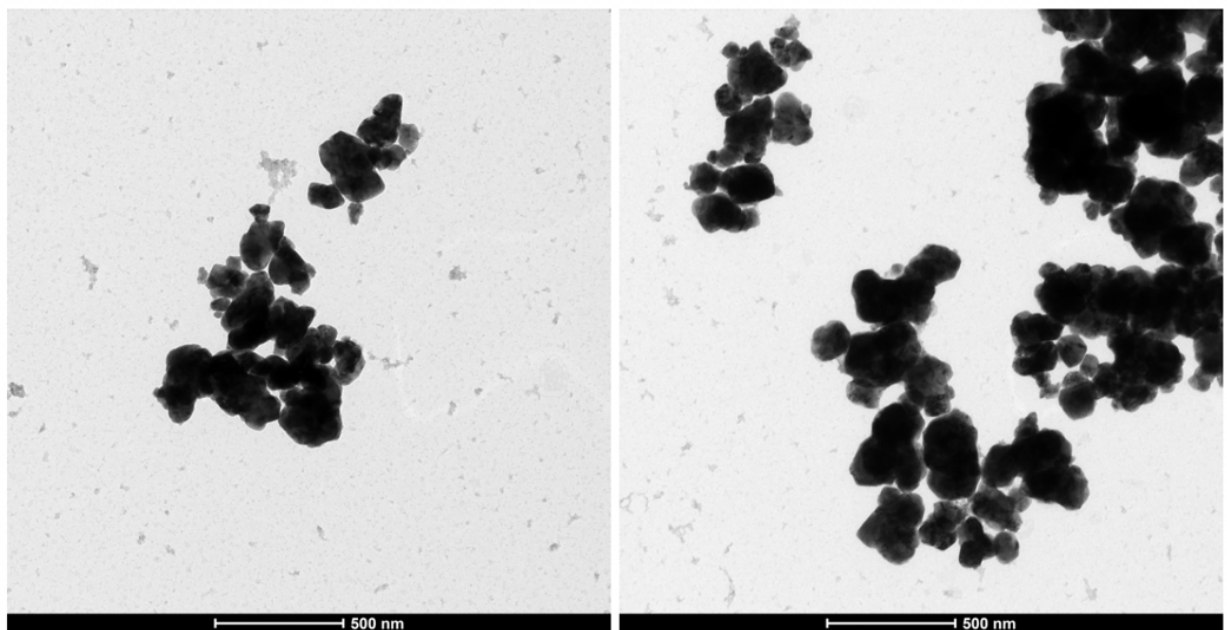


Abbildung 20 Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten Partikel mit einem Durchmesser in der Größenordnung von $d = 200 \text{ nm}$. Fraktion des keramischen Mahlguts, welches zur Antikörpergewinnung übermittelt wurde.

Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen (TEM) konnte gezeigt werden, dass es möglich war, mit der Methode Nanopartikel mit einem Durchmesser von 200 nm anzureichern. (Abbildung 20; Protokoll zur Abtrennung nanoskaliger Partikel des Mahlguts im Methodenteil).

Es konnten von uns keine Antikörpermoleküle gegen Keramikpartikel aus dem von Thermo Fisher bereitgestellten Serum an keramische Plättchen in entsprechenden Assays nachgewiesen werden.

Somit ist auch nicht davon auszugehen, dass keramische Partikel im Menschen eine Immunantwort hervorrufen, die in der Folge zu Entzündungen oder Allergien führen können.

3.6 Lebenszyklusbetrachtung und potenzielle Emissionen

Die durchgeführte Literaturrecherche hat gezeigt, dass derzeit noch wenig zur Freisetzung und zum Verbleib von nanoskaligem Abrieb entlang des gesamten Lebenszyklus von Keramikimplanten bekannt ist. Entlang des Lebenszyklus eines Zahnimplantates können Emissionen jedoch nicht ausgeschlossen werden. Potenzielle Emissions- und Expositionspfade, die im Rahmen des Projekts identifiziert wurden, sind in Abbildung 21 dargestellt. Bereits während der Produktion des Rohmaterials, der Transport- und Lieferkette, der Produktherstellung sowie der finalen Zahnimplantatherstellung kann es zu einer Freisetzung in die Umwelt kommen. Hier kann davon ausgegangen werden, dass bis zu diesem Schritt die Arbeitsabläufe in geschlossenen Systemen stattfinden und die Exposition am Arbeitsplatz eine minimale ist. Des Weiteren kann auch im Handel und Vertrieb und während der Handhabung in einer Zahnklinik bzw. Ordination eine Exposition von unbeabsichtigt freigesetzten nanoskaligen Emissionen stattfinden. In diesem Fall sind bereits mehrere Arbeitsplätze sowie die Patient:innen selber potentiell exponiert. Auch während der Nutzungsphase sind die Patient:innen potentiell einem dauernden keramischen Abrieb ausgesetzt. Im Falle einer Reparatur oder eines Ersatzes ist die Exposition allerdings am größten, sowohl für Zahnärzt:innen und Patient:innen als auch für alle anderen Personen welche involviert sein könnten (Assistent:innen, Reinigungskräfte, etc.). Die Abbildung 21 zeigt auch mögliche Entsorgungswege für Keramikimplante auf, die gegebenenfalls entfernt werden und somit sachgerecht entsorgt werden müssen.

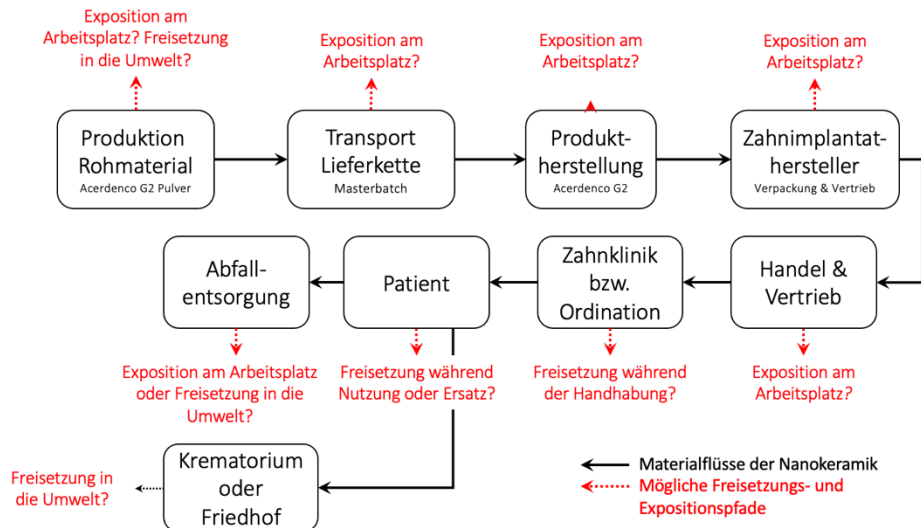


Abbildung 21 Schematischer Ablauf der Expositionsszenarien keramischer Zahnimplantate entlang des Lebenszyklus von der Herstellung bis hin zur finalen Entsorgung.

Die Entsorgung von betrieblichen Abfällen in Arztpraxen, zu denen auch Zahnarztpraxen zählen, werden gewöhnlich in 1) Abfälle, die weder innerhalb noch außerhalb des medizinischen Bereiches eine Gefahr darstellen, und 2) Abfälle, die nur innerhalb des medizinischen Bereiches eine Infektions- oder Verletzungsgefahr darstellen können, jedoch nicht wie gefährliche Abfälle entsorgt werden müssen, aufgeteilt. Die Abfallschlüsselnummern (jede Abfallkategorie erfordert entsprechende Sammelbehälter) geben in weiterer Folge die Entsorgungs- bzw. Behandlungsweise ("Behandlungspflicht") vor.

Zu 1) gehören Restmüll (SN91101), welcher einer Entsorgung über die Restmülltonne zugeführt wird.

Zu 2) gehören Abfälle ohne Verletzungsgefahr (SN 97104) z.B. Wundverbände oder Einmalartikel (z.B. Tupfer, Handschuhe, Einmalspritzen ohne Kanüle). Sie werden als „haus-

müllähnlicher Restmüll“, wenn in flüssigkeitsdichten, undurchsichtigen, verschlossenen Säcken verpackt, über die Restmülltonne entsorgt. Dazu zählen auch Titan- oder Drahtabfälle von Zahnsparungen oder ähnlichem, da die Mengen verhältnismäßig klein sind. Nur die Amalgamfüllungen und Spritzen kommen in einen gelben Spezialbehälter für gefährliche Abfälle, da diese zu Abfällen mit Verletzungsgefahr (SN 97105) zählen. Diese werden innerhalb der Ordination in ausreichend stich- und bruchfesten, flüssigkeitsdichten, festverschließbaren und undurchsichtigen Behältern gesammelt. Bei gefährlichen bzw. infektiösen Abfällen sind auch gesonderte Aufzeichnungen über die Entsorgung zu führen. Die Verordnung zum Schutz der Arbeitnehmer:innen vor Verletzungen durch scharfe oder spitze medizinische Instrumente (Nadelstichverordnung-NastV), BGBl. II Nr. 16/2013, ist zu beachten. Nassabfälle (SN 97104), wie z.B. nicht restentleerte mit Absaugsekreten gefüllte Einwegsysteme, bei denen zu befürchten ist, dass durch den Transport die Möglichkeit des Flüssigkeitsaustritts gegeben ist, müssen in ausreichend dichten Gebinden gesammelt und transportiert werden. Die Gebinde sind über einen konzessionierten Abfallentsorger einer thermischen Behandlung zuzuführen. Plasma, Infusionslösungen, Blut und Urin sind unter Berücksichtigung der wasserrechtlichen Bestimmungen wie Abwasser zu behandeln.

In einem persönlichen Gespräch mit einem Zahnarzt wurde dem Projektteam mitgeteilt, dass Implantathersteller in der Regel ihre Produkte auch selbst zurücknehmen (z.B. bei fehlendem Einheilen oder versehentlicher Kontamination). Implantate von Fremdherstellern, werden zumeist über den Restmüll entsorgt.

3.7 Ergebnisse aus der Stakeholdereinbindung

3.7.1 Teilnehmer:innen der Onlineumfrage

Insgesamt wurde die Umfrage von 59 Teilnehmer:innen abgeschlossen, wobei einzelne Fragen von manchen Personen übersprungen (nicht beantwortet) wurden. 83 % alle Teilnehmer:innen ordneten sich dem Berufsfeld der Zahnärzte:innen zu (49 Personen), 2 % den Zahntechniker:innen (1 Person), 3 % den Hersteller:innen (2 Personen), niemand zu Händler:innen und 12 % zu Sonstige zu (7 Personen). Dies zeigt einen eindeutigen Tätigkeitsschwerpunkt der Teilnehmer:innen im Bereich der praktischen Anwendung bzw. Umsetzung von keramischen Implantatsystemen am Patienten.

3.7.2 Anzahl der Implantate pro Jahr

Die erste inhaltliche Frage nach der Anzahl der verwendeten Implantate pro Jahr beantworteten die Mehrheit mit >100 Stück, wobei nur ein Viertel der Teilnehmer auch >100 Implantate aus Keramik pro Jahr verwenden. Diese Diskrepanz könnte sich daraus ergeben, dass Titanimplantate immer noch als „Goldstandard“ gesehen werden, schon viel länger in der Anwendung sind und viel mehr Erfahrung in der praktischen Umsetzung vorhanden ist und diese daher nach wie vor bevorzugt werden. Keramische Werkstoffe erfordern ebenfalls spezielle Werkzeuge und Gerätschaften wie wahrscheinlich auch Fortbildungen und Schulungen zur praktischen Umsetzung (z.B. Operationstechniken). Ebenfalls sind Keramikimplantate teurer als Titanimplantate und werden auch nicht durch Krankenkassenleistungen abgedeckt.

3.7.3 Verwendungszeitraum

Bei der Frage nach dem Zeitraum in welchem keramische Implantate verwendet werden, gaben die meisten Teilnehmer:innen (16) einen Zeitraum von 1-5 Jahre an, von 14 Teilnehmer:innen wurde ein Zeitraum von 5-10 Jahre genannt. 8 Teilnehmer:innen gaben an keramische Implantate erst seit kurzem (< 1 Jahr) zu verwenden und 9 Teilnehmer:innen gaben an schon seit über 10 Jahren mit keramischen Implantaten zu arbeiten. (siehe Abbildung 22). Daraus wird ersichtlich, dass keramische Implantatsysteme seit den letzten 10 Jahren vermehrt eingesetzt werden.

Wie lange setzten bzw. stellen Sie schon Zahnimplantate aus Keramik her?

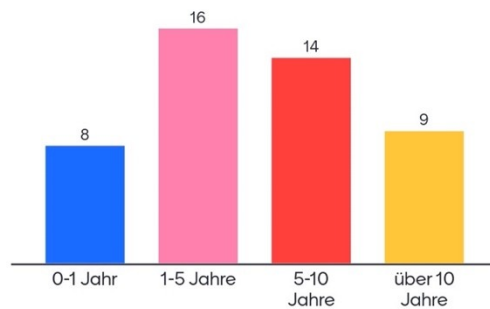


Abbildung 22 Grafische Darstellung der im Text beschriebenen Zeiträume in welchen von den Teilnehmer:innen der Onlineumfrage keramische Zahnimplantate gesetzt bzw. hergestellt werden.

Im Gegensatz dazu gab die Mehrheit der Teilnehmer:innen (16) an, schon über 20 Jahre mit Implatatsystemen aus Titan zu arbeiten, welche nach wie vor aus vielen Gründen bevorzugt werden und als „Gold-Standard“ gelten. 12 Teilnehmer:innen gaben an erst seit kurzem (< 1 Jahr) mit Titanimplantaten zu arbeiten, 3 gaben einen Zeitraum von 1-5 Jahren, 5 einen Zeitraum von 5-10 Jahren und 10 einen Zeitraum von 10-20 Jahren an. (Abbildung 23)

Wielange arbeiten Sie mit Implantaten aus Titan?

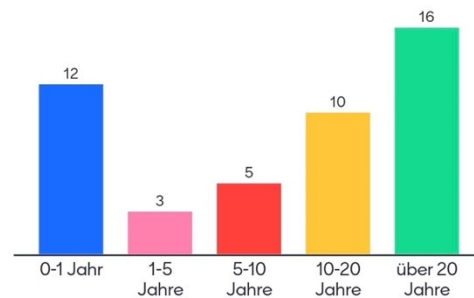


Abbildung 23 Grafische Darstellung der im Text beschriebenen Zeiträume in welchen die Teilnehmer:innen der Onlineumfrage bereits mit Titanimplantaten arbeiten.

3.7.4 Vorteile und Chancen von Implantaten aus Titan

Diese Frage war als offene Frage gestellt und alle angeführten Punkte sind im Anhang zu finden.

Es wurde ersichtlich, dass Implantate aus Titan als vollständig entwickelte Technologie angesehen werden. Sie gelten als derzeitiger „Standard“ und es gibt langjährige Erfahrung und wissenschaftliche Dokumentationen aus vielen Jahrzehnten rund um das Thema Titanimplantate. Momentan gibt es daher eine größere Vielfalt beim Implantatdesign bzw. Kombinationsmöglichkeiten bei Hybridprothetik (Vorteile bei Zahnersatz mit Locatoren, Stegkonstruktionen, verschraubte Brücken mit 4-6 Implantaten).

3.7.5 Nachteile und Risiken bei Implantaten aus Titan

Diese Frage war als offene Frage gestellt und alle angeführten Punkte sind im Anhang zu finden.

Bezugnehmend auf den oberen Absatz, kann aber festgestellt werden, dass es eine abnehmende Patient:innenakzeptanz aufgrund von ästhetischen Aspekten gibt, da das Titanimplantat einen gräulichen Schimmer des umliegenden Gewebes verursachen kann und heutzutage die Ästhetik immer wichtiger wird. Ebenfalls ist mittlerweile wissenschaftlich bewiesen, dass Titan mit Restlegierungsbestandteilen wie z.B. Chrom oder Nickel versehen sein kann, was bei sensiblen Patienten allergische Reaktionen bis zum Implantatverlust hervorrufen kann. Ebenfalls kann es auch zu anderen immunologischen Reaktionen auf Titanpartikel kommen, z.B. (permanente) Periimplantitis oder schlechte Osseointegration. Metall kann auch als Resonanzkörper für Strahlung dienen und muss z.B. im Falle einer Krebstherapie mit Bestrahlung entfernt werden, was eine erhöhte psychische Belastung so wie Einschränkung im Alltag der Patient:innen bedeutet.

3.7.6 Vorteile und Chancen von Implantaten aus Keramik

Diese Frage war als offene Frage gestellt und alle angeführten Punkte sind im Anhang zu finden.

Aufgrund der besseren Biokompatibilität (bioinert, metallfrei) von Implantaten aus Keramik werden diese vorallem zur Versorgung der keramikaffinen Patient:innengruppen, die Vorbehalte gegen Titan haben, verwendet. Es ist ein optimaler Farbabgleich möglich und die bestmögliche Ästhetik gewährleistet, weshalb die Akzeptanz zunimmt. Aber auch eine geringe Gefahr von allergischen Reaktionen, ein besseres Einheilverhalten, weniger Periimplantitis, eine hervorragende Gingivakompatibilität und bessere Verträglichkeit auch für besondere Patient:innengruppen, wie Allergiker oder Personen mit Vorerkrankungen, werden als klare Vorteile der Keramikimplantate gesehen.

3.7.7 Nachteile und Risiken bei Implantaten aus Keramik

Diese Frage war als offene Frage gestellt und alle angeführten Punkte sind im Anhang der Umfrage zu finden.

Trotz der vielfältigen Vorteile der Keramikimplantate bestehen nach wie vor Nachteile bzw. Forschungsbedarf, z.B. im Bezug auf die Materialkombination. Keramische Materialien haben ein erhöhtes Frakturrisiko, wobei bei einer späteren Demontage Schwierigkeiten bei der Unterscheidung von Implantat und Suprakonstruktion auftreten können, wobei zur den

Karmiken die Datenlage derzeit noch gering ist. Ebenfalls kann eine falsche Handhabung beim Einsetzen (Überhitzung beim Eindrehen) oder eine Fehlbelastung beim Einheilen zu einem erschwerten Einheilen führen und somit die Langlebigkeit beeinflussen. Beim Einsetzen ist daher einem strikten Protokoll zu folgen, da spätere Korrekturen nur erschwert möglich sind. Derzeit ist ein großer Nachteil, dass Keramik sich nicht für herausnehmbaren Zahnersatz und Hybridprothetik eignet, generell eine längere Einheilzeit angegeben wird und natürlich der Kostenaufwand für die Patient:innen ein höherer ist.

Die Vorteile und Chancen, sowie Nachteile und Risiken der Implantatmaterialien (Titan, Keramik) im Vergleich, ergänzen sich in der Umfrage größtenteils und die wichtigsten Punkte sind daher in einer SWOT-Matrix zusammengefasst (Abbildung 24). Zu den klaren Stärken der keramischen Implantate zählen die Ästhetik, die geringe Gefahr immunologischer Reaktionen, das bessere Einheilverhalten aufgrund der Biokompatibilität (metallfrei) und einer geringeren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Periimplantitis. Bis dato sind Keramikimplantate kein „Goldstandard“, wobei dies von vielen als Schwäche identifiziert wird. Ebenfalls sind ein höherer Kostenaufwand und eine eventuell kürzere Lebensdauer anzumerken, wobei dazu Langzeitstudien noch fehlen. Eine häufig genannte Schwäche ist jedoch, dass sie nicht mit herausnehmbarem Zahnersatz wie z.B. Brücken kombiniert werden können. Klare Chancen haben die keramischen Implantate jedenfalls, da die Nachfrage steigt, die Studienlage sich verbessert und auch die Materialforschung in rasantem Tempo weitergeht. Abgesehen davon ist es immernoch das Material der Wahl für Patient:innen mit Vorerkrankungen.



Abbildung 24 SWOT-Matrix zur überblicksmäßigen Darstellung der Stärken, Schwächen, Chancen und Risiken von Keramikimplantanten.

Im Bezug auf die Handhabung der unterschiedlichen Implantatmaterialien wurden schon in der SWOT-Analyse einige Punkte angesprochen. Obwohl neuartige Keramiken als vielversprechend angesehen werden, wurde die komplizierte Handhabung mehrfach hervorgehoben. Im Gegensatz zu Titan hat Keramik unterschiedliche mechanische Eigenschaften. Das Setzen erfordert die Vorgehensweise nach Knochenaufbereitungsprotokoll und Bohrprotokoll und muss vom Behandler erlernt und beherrscht werden, um einen langfristigen Erfolg zu gewährleisten, z.B. ist die Tiefe der Implantation von großer Relevanz. Implantate aus Titan sind stärker vorhersagbar, da die Datenlage und Erfahrung mit dem Material höher sind.

Zur Lebensdauer der unterschiedlichen Implantatmaterialien muss man sagen, dass es nur für Titanimplantate Langzeitdaten gibt, die eine Lebensdauer von ca. 25 Jahren angeben. Diese Daten fehlen bislang für Keramik, da dieses Material noch nicht so lange im Einsatz ist. Dennoch sind die Angaben der Teilnehmer:innen ambivalent, denn obwohl Langzeitdaten zu Keramik fehlen, sehen viele klare Vorteile aufgrund besserer Osseointegration, weniger Periimplantitis und weniger immunologischer Reaktionen. Titan wird nach wie vor als klarer „Goldstandard“ angeführt. Durch die bessere Ästhetik von Keramikimplantaten wird jedoch eine „längere“ Haltbarkeit auch anhand einer besseren Toleranz durch die Patienten definiert, wobei ersichtlich wird, dass auch die psychische Akzeptanz eine Rolle spielen kann. Aufgrund der verbesserten Ästhetik wird Keramik daher bevorzugt im Frontzahnbereich des Oberkiefers eingesetzt. Für die Seiten- und Backenzahnregionen wird Titan bevorzugt, wobei laut Teilnehmer:innen nichts dagegenspricht, beim selben Patienten sowohl Keramik als auch Titanimplantate, je nach Region und Knochenbeschaffenheit, einzusetzen. Jedoch wird bei Patient:innengruppen mit chronischen Vorerkrankungen zu Keramik tendiert, da die Bioverträglichkeit besser ist und weniger entzündliche Reaktionen auftreten, was besser für die Patient:innengesundheit bzw. das Immunsystem ist.

3.7.8 Einschätzung von Kriterien bei der weiteren Entwicklung von Keramikimplantaten

Keramische Werkstoffe im Dentalbereich sind sehr vielversprechend, es gibt jedoch sowohl Forschungs- als auch Entwicklungsbedarf. Dieser wird vor allem im Oberflächendesign bzw. der Oberflächenfunktionalisierung, sowie in der Erhöhung des Frakturwiderstandes gesehen. Auch das Handling und die Vielseitigkeit der verfügbaren Teile sollte verbessert werden. Vor allem wird hier die Erweiterung des prothetischen Spektrums genannt.

3.7.9 Fazit

Die Ergebnisse dieser explorativen Onlineumfrage könnte Biases beinhalten, da wahrscheinlich ein überwiegender Anteil der Teilnehmer:innen Keramikmaterialien positiv gegenüberstehen. Dennoch konnten die Ergebnisse der literaturbasierten Analyse bestätigt werden bzw. einige zusätzliche Inputs in den offenen Fragen erlangt werden.

Die Ergebnisse der Umfrage zeigen, dass Keramikimplantate sowohl hinsichtlich möglicher negativer immunologischer Reaktionen (Allergien, Entzündungen) als auch hinsichtlich ihrer

Ästhetik, den Titanimplantaten, zumindest im Frontzahnbereich, vorzuziehen sind. Das Zukunftspotential der Keramikimplantate wird als sehr hoch eingeschätzt, auch wenn noch Bedarf in der Forschung bezüglich der Verbesserung der Materialeigenschaften gesehen wird. Die Anwendungsfelder der Keramikimplantate sind momentan noch eingeschränkt. So lassen keramische Materialien z.B. weniger komplexe prothetische Versorgung größerer Abschnitte zu. Nachdem die Materialentwicklung derzeit rasant voranschreitet, sind zukünftig erweiterte Anwendungsfelder und verbesserte Eigenschaften zu erwarten.

Herausforderungen bestehen noch hinsichtlich der Langlebigkeit und Stabilität von Keramikimplantaten. Da Langzeitstudien momentan noch nicht zur Verfügung stehen, können bezüglich der Beständigkeit noch keine definitiven Aussagen getroffen werden. Während in Bezug auf die Verträglichkeit v.a. das geringe Potential immunologischer Reaktionen hervorgehoben wurde, wurde die Patient:innenakzeptanz als sehr positiver Aspekt einer kieferchirurgischen Versorgung mit keramischen Implantaten angeführt.

4 Schlussfolgerungen

Die Untersuchungsergebnisse der Studien an unterschiedlichen Implantatmaterialien aus Keramik und Titan haben gezeigt, dass Keramiken durchaus mit den Vorteilen der Titanmaterialien in Bezug auf mechanische Parameter vergleichbar sind. Keramiken stellen auch eine Therapiealternative dar, wenn es um die Entzündungsparameter beim Einwachsverhalten geht. Titanimplantate gelten aufgrund ihrer langjährigen Verwendung und umfangreichen Datenbasis als der „Goldstandard“ in der Implantologie. Sie bieten langanhaltende Stabilität und sind daher gut für den Einsatz in Bereichen mit hoher Belastung, wie den Seiten- und Backenzähnen, geeignet. Die über Jahrzehnte gesammelten Langzeitdaten bescheinigen Titanimplantaten eine Lebensdauer von etwa 25 Jahren. Diese Vorteile wurden auch in den Umfrageergebnissen und der aktuellen Literatur bestätigt.

Keramikimplantate bieten hingegen Vorteile hinsichtlich Ästhetik und geringer Allergenität. Aufgrund ihrer entzündungsarmen Osseointegration und damit einer geringeren Gefahr von Periimplantitis und allergischen Reaktionen, werden sie im Speziellen bei diabetischen Patient:innen verwendet. Keramikimplantate werden aufgrund ihrer weissen Färbung immer häufiger bei der implantologischen Versorgung im Frontzahnbereich herangezogen, wo das ästhetische Erscheinungsbild von hoher Bedeutung ist. Die Ergebnisse der Onlineumfrage in dieser Studie unterstreichen diese Präferenzen und weisen darauf hin, dass Keramiken insbesondere bei Patient:innen mit chronischen Vorerkrankungen vorzuziehen sind, da das Material besser verträglich und weniger entzündungsfördernd ist.

Die Untersuchung hat jedoch auch Schwachstellen und Entwicklungsbedarf bei Keramikimplantaten aufgezeigt: Aktuell fehlen noch Langzeitstudien, die eine definitive Aussage über die Lebensdauer und Stabilität von Keramikimplantaten ermöglichen, aber auch nanoskopische Betrachtungen fehlen, wie sie bereits bei den Titanimplantaten durchgeführt wurden.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass Keramikimplantate ein großes Zukunftspotential besitzen. Trotz der noch bestehenden Herausforderungen bezüglich Langlebigkeit und Stabilität wird erwartet, dass die rasante Materialentwicklung zu erweiterten Anwendungsfeldern und verbesserten Eigenschaften führen wird.

Die Umfrageergebnisse deuteten darauf hin, dass für eine fundierte Entscheidung zwischen Keramik und Titan eine individuelle Abwägung der spezifischen Bedürfnisse und gesundheitlichen Voraussetzungen der Patient:innen erforderlich ist.

Im Rahmen des Projektes CERANANO wurde exemplarisch eine Hochleistungskeramik untersucht, die als gesinterte Oberflächen, aber auch als Rohmaterial bzw. künstlich hergestelltem Abrieb zur Verfügung standen. Zahlreiche Versuchsreihen wurden durchgeführt, die sowohl die Wirkung auf lebende Zellen im *in vitro* Versuch, aber auch die immunogene Wirkung im Tiermodell untersucht haben. Bei den Zellkulturstudien wurden mehrere kritische Entzündungsmarker auf Gen- und Proteinebene untersucht. In keinem Experiment haben sich Hinweise auf negative Einflüsse in der Zellkultur ergeben, die durch die Anwesenheit der keramischen Partikel ausgelöst wurden. Zum Vergleich mit herkömmlichen Zahnimplantaten aus Titan wurden Nanotitandioxidpartikel verwendet, wobei auch hier keine wesentliche ‚Aktivierung‘ der Entzündungsmarker im *in vitro* Modell festgestellt werden konnte. Mit den durchgeführten Versuchen konnten existierende Studien zu Titanimplantaten sowie im Vergleich mit dem keramischen Material die Unbedenklichkeit beider Materialklassen bestätigen werden.

In diesem Projekt wurde eine ausgewählte Gruppe an Entzündungsmarkern sowohl auf Protein- als auch Genebene untersucht. In zukünftigen Risikobewertungen bzw. Zulassungsverfahren sollte dieses Spektrum ausgeweitet werden. Des Weiteren sollten Langzeitstudien von bereits in Verwendung befindlicher Keramiken berücksichtigt werden. Es wäre auch eine Risikobeurteilung auf Basis eines 3D-Gewebemodells hinsichtlich Bioverträglichkeit hilfreich. Ein solches Gewebemodell würde es ermöglichen, den Einfluss von Nanopartikeln auf Vaskulationsprozesse näher zu untersuchen. Damit könnte beispielsweise auch untersucht werden, ob und in welcher Größe die gebildeten Aggregate Blutgefäße passieren. Positiv betrachtet gibt es im Rahmen dieser durchgeführten Studie keinen Hinweis auf eine Aggregation nanoskaliger Keramikpartikel zu mikroskaligen, gefäßverschliessenden Gebilden, noch Hinweise auf eine starke immunaktivierende Wirkung, die zu einem deutlichen Anstieg von gewählten Entzündungsparametern im verwendeten *in vitro* Modell geführt hätten.

Zukünftige Forschungen und Langzeitstudien werden entscheidend sein, um eine datenbasierte Grundlage für die Wahl eines der beiden Materialien festzustellen und die Einsatzmöglichkeiten weiter auszudehnen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Zusammenfassende Empfehlungen der deutschen Gesellschaft für Implantologie betreffend der Verwendung von ein- und zweiteiligen Keramikzahnimplantaten (modifiziert nach [11]). Es wird der Unterschied zwischen ein- und zweiteiligen Keramikzahnimplantaten dargestellt. Abbildung Mitte links: Einteiliges Implantat mit künstlicher Zahnwurzel im Monoblock Design. Abbildung Mitte rechts: Aufbau eines zweiteiligen Zahnimplantates. Die Krone wird über ein Zwischenstück (ein sogenanntes Abutment) mit dem Zahnwurzelersatz verbunden. Zusammenfassend wird eine uneingeschränkte Empfehlung für einteilige und eine eingeschränkte Empfehlung für zweiteilige Zirkoniumzahnimplantate erteilt. 11

Abbildung 2 Diese Abbildung zeigt die Projektziele der Arbeitspakete von dem Projekt CERANANO über den Zeitraum von 12 Monaten. Analysiert wird ein möglicher, nanoskaliger Abrieb, welcher beim Eindrehen, Entfernen, durch Unfälle oder Zahnfleischerkrankungen entstehen kann. Durch die *in vitro* Untersuchung des keramischen Abriebes und planarer Oberflächen in einer Zellkultur, durch bildgebende Verfahren (Mikroskopie) und Assays die Entzündungsmarker bestimmen können, soll eine Risikoabschätzung eines möglichen Abriebs von keramischem Material ermöglicht werden. Weiters sind Befragungen von Expert:innen bezüglich der Verwendung von unterschiedlichen Implantatsmaterialien und eine umfassende Literaturstudie zu diesem Thema Teil des Projektes..... 19

Abbildung 3 Diese schematische Abbildung zeigt den Aufbau eines Zahnimplantates mit einem Gewindestift aus Titan (links) und einem keramischen Gewindestiftes (rechts). Adaptiert aus <https://www.zahnarzt-spilburg.de/zahnmedizin/zahnimplantate/>. 20

Abbildung 4 Größenverteilung (hydrodynamischer Durchmesser, Distribution by number) der ACERDENCO G2 Fraktion, welche nachfolgend in den Antikörper- und Zellkulturexperimenten verwendet wurde. Die Analysen zeigen einen Peak von 379nm bei einem Polydispersity Index von 0,242 auf. 30

Abbildung 5 Größenverteilung (hydrodynamischer Durchmesser, Distribution by number) des Referenzmaterials Nanotitandioxid NM-105, welches nachfolgend in den Zellkulturexperimenten verwendet wurde. Die Analysen zeigen einen Peak von 40nm bei einem Polydispersity Index von 0,388 auf. 31

Abbildung 6 Elektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen vom Versuchsmaterial ACERDenco G2 (links) beziehungsweise Titandioxid Referenzmaterial NM-105 (rechts). Beide TEM-Aufnahmen zeigen Aggregate, die sich auch aus Nanopartikeln in der Größe zwischen 10 und 100 nm zusammensetzen..... 32

Abbildung 7 Rastermikroskopische Aufnahmen von humanen Osteoblastenzellen (CI-huOB). Aufnahmen a) und b) zeigen auf ACERDenco G2 Keramikplättchen als Monoschicht und konfluent gewachsene Zellen. Bilder c) und d) stellen die Zellen, die für 21 Tage in Mineralisierungsmedium kultiviert wurden, dar (Kalzium Ablagerung in der ECM). Die Aktivität von Alkalischer Phosphatase (ALP) in den Zellen wurde durch Verwendung BCIP/NBT als Substrat detektiert (Bild e). ALP-positive Zellen zeigen eine schwarze Färbung. Im Bild f) wird die Alizarin Red S Färbung (im Bild dunkelgrau) als Nachweis von Kalziumablagerung in den Zellen dargestellt. Zusammenfassend ist die erfolgreiche Differenzierung der humanen Osteoblastenzellen zu sehen..... 34

Abbildung 8 Lichtmikroskopische Aufnahmen von THP-1 Zellen in Zellkultur. a) Suspensionszellen THP-1 Monozyten. b) Anfang der langsamen Adhärenz (mit Pfeil hervorgehoben) der Monozyten in Gegenwart von PMA, Differenzierung der Makrophagen aus Monozyten. c) Die im Lichtmikroskop visualisierte Zellkultur wurde mit Fluoreszenzmarker APC konjugiert und mit anti CD14 markiert und im FACS detektiert. Sowohl THP-1 Monocyten als auch Makrophagen exprimieren das CD14 Oberflächenprotein..... 36

Abbildung 9 Lichtmikroskopische Aufnahme von THP-1 Makrophagen nach 48 Stunden ohne Zugabe von Nanopartikeln. Man erkennt die für Makrophagen typische Morphologie, die sich durch flach am Substrat anhaftende, teils mit Fortsätzen (Pseudopodien) ausgestattete, vesikelreiche Zellen auszeichnet..... 37

Abbildung 10 Lichtmikroskopische Aufnahmen einer Zeitreihe (6, 12, 24 und 48 Stunden) von THP-1 Makrophagen in Gegenwart von 10 µg ACERDenco G2 Keramikpulver..... 38

Abbildung 11 Lichtmikroskopische Aufnahmen einer Zeitreihe (6, 12, 24 und 48 Stunden) von THP-1 Makrophagen in Gegenwart von 10 µg nanoskaligem TiO₂ Pulver..... 39

Abbildung 12 Genexpressionen von IL1B und TNFA in THP-1 Makrophagen. Konzentrationsabhängige Steigerung der Genexpression nach Zugabe von ACERDenco G2 (A: IL1B, C: TNFA) bzw. nach Titandioxid (B: IL1B, D: TNFA) über 6 und 24 Stunden.

Titandioxidpartikel bewirkten bei fast allen Partikelkonzentrationen eine höhere Genexpression als die Anwesenheit der ACERDENCO G2-Partikel. Der stärkste Anstieg (18-fach bezogen auf die unbehandelte Kontrolle) wurde in der TNF- α -Expression (100 $\mu\text{g TiO}_2$, 6 Stunden Inkubationszeit) beobachtet. In den lichtmikroskopischen Aufnahmen wird die Veränderung der Zellmorphologie und -dichte für die mit ACERDENCO G2 (G2 6h, G2 24h) und mit Titandioxid (TiO_2 6h, TiO_2 24h) behandelten Makrophagen demonstriert..... 40

Abbildung 13 Ausschüttung der Zytokine IL-1 β (A) und TNF- α (B) bei THP-1 Makrophagen. Die graphische Darstellung zeigt die Zytokinausschüttung nach 24 Stunden in Abhängigkeit der Partikelkonzentration von ACERDENCO G2 und TiO_2 (jeweils 0, 10, 50, 100 μg pro 200 μl Zellkulturvolumen). 42

Abbildung 14 Vergleich der Viabilität der Osteoblastenzelllinie CI-huOB unter verschiedenen Konzentrationen von ACERDENCO G2 (links) und TiO_2 Nanopartikeln (rechts) über eine Expositionsdauer von 48 Stunden..... 43

Abbildung 15 Viabilität von CI-huOB Zellen nach der Inkubation mit ACERDENCO G2 Nanopartikeln. Einfluss der Nanopartikelkonzentration und Einwirkungszeit (6, 12, 24 und 48 Stunden) wurde im Fluoreszenzmikroskop nach der Färbung der Zellen durch Verwendung des LIVE/DEAD Markierungs Kits dargestellt. Grüne Fluoreszenz stellt lebendige und rote Fluoreszenz tote Zellen dar (Filtersatz; GFP F36-525 und TRITC C-FL-C). 44

Abbildung 16 Viabilität von CI-huOB Zellen nach der Inkubation mit Nanotitandioxidpartikeln Der Einfluss der Nanopartikelkonzentration und Einwirkungszeit wurde im Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Zell-Viabilität wurde durch Verwendung einer LIVE/DEAD Markierung dargestellt. Grüne Fluoreszenz trat bei lebenden, rote Fluoreszenz bei toten Zellen auf (Filtersatz; GFP F36-525 und TRITC C-FL-C). 45

Abbildung 17 Die Genexpression von IL6, ALP und MMP3 in CI-huOB Zellen wurde nach der qPCR-Methode ermittelt. A) Nach 24-stündiger Inkubation mit ACERDENCO G2 Nanopartikeln war die Genexpression von IL6 etwa um das 2- bis 3-fache und für MMP3 um das 4- bis 6-fache erhöht. B) Nach 24-stündiger Inkubation mit TiO_2 -Nanopartikeln war die IL6-Expression nur geringfügig erhöht und die MMP3- Expression um das 3- bis 4-fache. Die Expression der Alkalischen Phosphatase war in beiden Experimenten unverändert. 47

Abbildung 18 Matrix-Metalloproteasen- und Zytokinausschüttung der mit aufsteigenden Konzentrationen von ACERDenco G2 und TiO ₂ Nanopartikeln behandelte CI-huOB Zellen. Die Osteoblasten wurden für 24 Stunden exponiert und die Zellüberstände im Anschluss auf MMP-1 (A), MMP-3 (B), MMP-13 (C), IL-6 (D) und IL-8 (E) Freisetzung analysiert. Im Vergleich der beiden Substanzklassen sieht man kaum erhöhte Freisetzung der Zytokine bzw. der Metalloproteasen. Nur die mit Titandioxid behandelte Probe zeigt im Vergleich zu der mit ACERDenco G2 behandelten leicht erhöhte MMP-1 und MMP-3 Werte.	48
Abbildung 19 Lichtmikroskopische Untersuchungen nach dem ersten Sedimentationsschritt zeigen noch eine große Größenverteilung des keramischen Mahlgutes.	51
Abbildung 20 Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten Partikel mit einem Durchmesser in der Größenordnung von d = 200 nm. Fraktion des keramischen Mahlgutes, welches zur Antikörpergewinnung übermittelt wurde.....	51
Abbildung 21 Schematischer Ablauf der Expositionsszenarien keramischer Zahnimplantate entlang des Lebenszyklus von der Herstellung bis hin zur finalen Entsorgung.	53
Abbildung 22 Grafische Darstellung der im Text beschriebenen Zeiträume in welchen von den Teilnehmer:innen der Onlineumfrage keramische Zahnimplantate gesetzt bzw. hergestellt werden.	56
Abbildung 23 Grafische Darstellung der im Text beschriebenen Zeiträume in welchen die Teilnehmer:innen der Onlineumfrage bereits mit Titanimplantaten arbeiten.	57
Abbildung 24 SWOT-Matrix zur überblicksmäßigen Darstellung der Stärken, Schwächen, Chancen und Risiken von Keramikimplantaten.	60

Literaturverzeichnis

1. Linkow, L.; Dorfman, J. Implantology in dentistry: A brief historical perspective. *N. Y. State Dent. J.* **1991**, *57*.
2. Branemark, P.-I. Osseointegration and its experimental background. *J. Prosthet. Dent.* **1983**, *50*, 399–410, doi:10.1016/S0022-3913(83)80101-2.
3. Saini, M. Implant biomaterials: A comprehensive review. *World J. Clin. Cases* **2015**, *3*, 52, doi:10.12998/wjcc.v3.i1.52.
4. Pettersson, M.; Pettersson, J.; Johansson, A.; Molin Thorén, M. Titanium release in peri-implantitis. *J. Oral Rehabil.* **2019**, *46*, 179–188, doi:https://doi.org/10.1111/joor.12735.
5. Chen, A.; Kurmis, A.P. Understanding immune-mediated titanium allergy to in situ orthopaedic implants: a narrative review of the current literature. *ANZ J. Surg.* **2024**, *94*, 1925–1934, doi:https://doi.org/10.1111/ans.19167.
6. Silva, R.C.S.; Agrelli, A.; Andrade, A.N.; Mendes-Marques, C.L.; Arruda, I.R.S.; Santos, L.R.L.; Vasconcelos, N.F.; Machado, G. Titanium Dental Implants: An Overview of Applied Nanobiotechnology to Improve Biocompatibility and Prevent Infections. *Materials (Basel)*. **2022**, *15*, doi:10.3390/ma15093150.
7. Müller-Heupt, L.K.; Schiegnitz, E.; Kaya, S.; Jacobi-Gresser, E.; Kämmerer, P.W.; Al-Nawas, B. The German S3 guideline on titanium hypersensitivity in implant dentistry: consensus statements and recommendations. *Int. J. Implant Dent.* **2022**, *8*, 51, doi:10.1186/s40729-022-00451-1.
8. Cionca, N.; Hashim, D.; Mombelli, A. Zirconia dental implants: where are we now, and where are we heading? *Periodontol. 2000* **2017**, *73*, 241–258, doi:10.1111/prd.12180.
9. Mellinghoff, J.; Cacaci, C.; Detsch, F. Einteilige Keramikimplantate: Eine Longitudinalstudie über zwei Jahre Beobachtungsdauer. *Implantologie* **2015**, *23*, 89–100.
10. Bollen, C.; Hakobayan, G.; Jörgens, M. One-piece versus two-piece ceramic dental implants. *Br. Dent. J.* **2024**, *236*, 383–387, doi:10.1038/s41415-024-7123-3.
11. Thiem, D.G.E.; Stephan, D.; Kniha, K.; Kohal, R.J.; Röhling, S.; Spies, B.C.; Stimmelmayr, M.; Grötz, K.A. German S3 guideline on the use of dental ceramic implants. *Int. J. Implant Dent.* **2022**, *8*, 1–4, doi:10.1186/s40729-022-00445-z.
12. Pereira, R.M.; Ribas, R.G.; Montanheiro, T.L.D.A.; Schatkoski, V.M.; Rodrigues, K.F.; Kito, L.T.; Kobo, L.K.; Campos, T.M.B.; Bonfante, E.A.; Gierthmuehlen, P.C.; et al. An

engineering perspective of ceramics applied in dental reconstructions. *J. Appl. Oral Sci.* **2023**, *31*, 1–20, doi:10.1590/1678-7757-2022-0421.

13. Zhou, Z.; Shi, Q.; Wang, J.; Chen, X.; Hao, Y.; Zhang, Y.; Wang, X. The unfavorable role of titanium particles released from dental implants. *Nanotheranostics* **2021**, *5*, 321–332, doi:10.7150/ntno.56401.
14. Hashim, D.; Cionca, N.; Courvoisier, D.S.; Mombelli, A. A systematic review of the clinical survival of zirconia implants. *Clin. Oral Investig.* **2016**, *20*, 1403–1417, doi:10.1007/s00784-016-1853-9.
15. Prakash, M.; Audi, K.; Vaderhobli, R.M. Long-term success of all-ceramic dental implants compared with titanium implants. *J. Long. Term. Eff. Med. Implants* **2021**, *31*, 73–89, doi:10.1615/JLongTermEffMedImplants.2021037400.
16. Denry, I.; Holloway, J.A. Ceramics for dental applications: A review. *Materials (Basel)*. **2010**, *3*, 351–368, doi:10.3390/ma3010351.
17. Yau, T.-L. Corrosion Comparisons between zirconium and titanium. *Mater. Corros.* **1992**, *43*, 358–363, doi:https://doi.org/10.1002/maco.19920430705.
18. Rafikova, G.; Piatnitskaia, S.; Shapovalova, E.; Chugunov, S.; Kireev, V.; Ialiukhova, D.; Bilyalov, A.; Pavlov, V.; Kzhyshkowska, J. Interaction of Ceramic Implant Materials with Immune System. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1–26, doi:10.3390/ijms24044200.
19. Müller, F.; Müller, J.; Schmidt-Breitung, M. Entstehung und Nachweis von Nanopartikeln durch Abrieb von Titanimplantaten. *Dtsch. Zahnärztl. Z.* **2019**, *74*, 36–43.
20. Paparella, M.L.; Domingo, M.G.; Puia, S.A.; Jacobi-Gresser, E.; Olmedo, D.G. Titanium dental implant-related pathologies: A retrospective histopathological study. *Oral Dis.* **2021**, *28*, 503–512, doi:10.1111/odi.13794.
21. Bienz, S.P.; Hilbe, M.; Hüsler, J.; Thoma, D.S.; Hämmerle, C.H.F.; Jung, R.E. Clinical and histological comparison of the soft tissue morphology between zirconia and titanium dental implants under healthy and experimental mucositis conditions—A randomized controlled clinical trial. *J. Clin. Periodontol.* **2021**, *48*, 721–733, doi:10.1111/jcpe.13411.
22. Olmedo, D.G.; Tasat, D.R.; Evelson, P.; Rebagliatti, R.; Guglielmotti, M.B.; Cabrini, R.L. *In vivo* comparative biokinetics and biocompatibility of titanium and zirconium microparticles. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2011**, *98A*, 604–613, doi:10.1002/jbm.a.33145.
23. Degidi, M.; Artese, L.; Scarano, A.; Perrotti, V.; Gehrke, P.; Piattelli, A. Inflammatory Infiltrate, Microvessel Density, Nitric Oxide Synthase Expression, Vascular Endothelial

Growth Factor Expression, and Proliferative Activity in Peri-Implant Soft Tissues Around Titanium and Zirconium Oxide Healing Caps. *J. Periodontol.* **2006**, 77, 73–80, doi:10.1902/jop.2006.77.1.73.

24. Ruiz Henao, P.A.; Caneiro Queija, L.; Mareque, S.; Tasende Pereira, A.; Liñares González, A.; Blanco Carrión, J.; Gonzalez, A.; Carrion, J.C. Titanium vs ceramic single dental implants in the anterior maxilla: A 12-month randomized clinical trial. *Clin. Oral Implants Res.* **2021**, 32, 951–961, doi:10.1111/clr.13788.
25. European Parliament and Council Regulation (EU) 2017/745 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on medical devices, amending Directive 2001/83/EC, Regulation (EC) No 178/2002 and Regulation (EC) No 1223/2009 and repealing Council Directives 90/385/EEC and 93/42/EE. *Off. J. Eur. Union* **2017**, 60, 1–175, doi:10.1080/21548331.1992.11705401.
26. Scharla, S.H. Bedeutung der Zytokine für den Knochenverlust – gibt es Interventionsmöglichkeiten? *Z. Rheumatol.* **2001**, 60, 104–106, doi:10.1007/s003930170083.
27. Ginaldi, L.; Di Benedetto, M.C.; De Martinis, M. Osteoporosis, inflammation and ageing. *Immun. Ageing* **2005**, 2, 14, doi:10.1186/1742-4933-2-14.
28. Zhang, W.; Gao, R.; Rong, X.; Zhu, S.; Cui, Y.; Liu, H.; Li, M. Immunoporosis: Role of immune system in the pathophysiology of different types of osteoporosis. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2022**, 13, 1–14, doi:10.3389/fendo.2022.965258.
29. Minne, H.; Pfeilschifter, J.; Scharla, S.; Mutschelknauss, S.; Schwarz, A.; Krempien, B.; Ziegler, R. Inflammation-Mediated Osteopenia in the Rat: A New Animal Model for Pathological Loss of Bone Mass*. *Endocrinology* **1984**, 115, 50–54, doi:10.1210/endo-115-1-50.
30. Algan, S.M.; Purdon, M.; Horowitz, S.M. Role of tumor necrosis factor alpha in particulate-induced bone resorption. *J. Orthop. Res.* **1996**, 14, 30–35, doi:https://doi.org/10.1002/jor.1100140107.
31. Zhang, D.; Wang, Z.; Qi, W.; Lei, W.; Zhao, G. Cordycepin (3'-deoxyadenosine) Down-Regulates the Proinflammatory Cytokines in Inflammation-Induced Osteoporosis Model. *Inflammation* **2014**, 37, 1044–1049, doi:10.1007/s10753-014-9827-z.
32. Onyia, J.E.; Libermann, T.A.; Bidwell, J.; Arnold, D.; Tu, Y.; McClelland, P.; Hock, J.M. Parathyroid hormone (1-34)-mediated interleukin-6 induction. *J. Cell. Biochem.* **1997**, 67, 265–274, doi:10.1002/(SICI)1097-4644(19971101)67:2<265::AID-JCB12>3.0.CO;2-E.
33. Nanes, M.; Rubin, J.; Louisa, T.; Hendy, G.; Catherwood, B. Tumor Necrosis Factor- α

Inhibits 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Stimulated Bone Gla Protein Synthesis in Rat Osteosarcoma Cells (ROS 17/2.8) by a Pretranslational Mechanism. *Endocrinology* **1991**, *128*, 2577–2582, doi:10.1210/endo-128-5-2577.

34. Luthardt, R.G.; Holzhüter, M.; Sandkuhl, O.; Herold, V.; Schnapp, J.D.; Kuhlisch, E.; Walter, M. Reliability and Properties of Ground Y-TZP-Zirconia Ceramics. *J. Dent. Res.* **2002**, *81*, 487–491, doi:10.1177/154405910208100711.

Abkürzungen

Ab	Antikörper (Antibody)
ACERDenco G2	Keramikmaterial (Implantatmaterial)
Al ₂ O ₃	Aluminiumoxid
ALP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
BCIP NBT	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat Nitroblautetrazoliumchlorid
BGBI	Bundesgesetzblatt
BSA	Bovines Serumalbumin
BSE	Backscattered Electrons
CD14	Cluster of Differentiation 14 (Glycoprotein 14)
Ce	Cerium
CI-huOB	Immortalisierte humane Osteoblasten Zelllinie
CO ₂	Kohlendioxid
Cu	Kupfer
DLS	Dynamic Light Scattering (Dynamische Lichtstreuung)
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extrazelluläre Matrix
EOL	End Of Life
Fab	Antigenbindendes Fragment eines Antikörpers
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fc	Fragment eines Antikörpers (crystallisable fragment) mit Effektorfunktion
FBS	Fetal Bovine Serum (Fötales Kälberserum)
g	Fallbeschleunigung
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
GFP F36-525	Green Fluorescent Protein Fiter (525nm)
ICP-OES	Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
IL-1 β	Interleukin 1beta Zytokin
IL1B	Interleukin 1B-Gen

IL-6	Interleukin 6 Zytokin
IL6	Interleukin 6 Gen
IL-8	Interleukin 8 Zytokin
IL8	Interleukin 8 Gen
IgG	Immunoglobulin G
ISO	Internationale Organisation für Normung
JRC	Joint Research Center, Ispra, Italien
kV	Kilovolt
λ	Lambda (Formelzeichen für die Wellenlänge)
MDR	Medical Device Regulation, Medizinprodukteverordnung
MMP-1	Matrix-Metalloprotease 1
MMP1	Matrix-Metallprotease 1 Gen
MMP-3	Matrix-Metalloprotease 3
MMP3	Matrix-Metalloprotease 3 Gen
MMP-13	Matrix-Metalloprotease 13
MMP13	Matrix-Metalloprotease 13 Gen
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
MilliQ-Wasser	Hochreines Wasser
MKM	MKM Engineering GmbH
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
nA	Nanoampere
nm	Nanometer
NM-105	Nanomaterial-105
pg	Pikogramm
pH	pondus hydrogenii
%	Prozent
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat

Protein G	Bakterienzellwandprotein
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
REM (SEM)	Rasterelektronenmikroskop (Scanning Electron Microscope)
SDHA	Succinate Dehydrogenase Complex A Gene (ein Haushaltsgen der Atmungskette)
SE	Sekundärelektronendetektor
SN	Schlüsselnummer für Abfallart
SWOT-Analyse	Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats -Analyse
TiO ₂	Titandioxid, Titan(IV)-oxid
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
THP-1	Monocytenzelllinie
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha Zytokin
TNFA	Tumornekrosefaktor A Gen
TRITC C-FL-C	Tetramethylrhodamin Filtersatz
Y	Yttrium
Y ₂ O ₃	Yttriumoxid
Y-TZP	Yttriumstabilisiertes Zirkonium
Zr	Zirkonium
ZrO ₂	Zirkonoxid, Zirkonium(IV)-oxid, Zirkoniumdioxid
"	Zoll (Längenmaß)

Bundesministerium für Klimaschutz, Umwelt, Energie, Mobilität, Innovation und Technologie

Radetzkystraße 2, 1030 Wien

+43 1 711 62 65-0

email@bmk.gv.at

bmk.gv.at