

Aus der Poliklinik für Kieferorthopädie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Wirkung der low-level-Lasertherapie auf mechanisch stimulierte Zellen des  
parodontalen Ligaments unter Berücksichtigung des RANKL/OPG-Systems:  
Eine in vitro Studie.

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Zahnmedizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Thomas Peter Skarka  
aus Mainz

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 03. April 2025

Für meine Eltern

# INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
2	Übersicht über den Wissensstand .....	2
2.1	Aufbau des Parodontiums .....	3
2.1.1	Parodontales Ligament (PDL).....	3
2.1.2	Parodontale Ligament Fibroblasten (HPdLF).....	4
2.1.3	Extrazelluläre Matrix des PDL.....	5
2.1.4	Alveolarknochen .....	6
2.2	Orthodontische Zahnbewegung .....	7
2.3	Kraftapplikation <i>in vitro</i> .....	9
2.4	<i>Low-level</i> -Lasertherapie .....	10
2.4.1	Physikalische Grundlagen.....	11
2.4.2	Diodenlaser .....	13
2.4.3	Biologische Wirkung .....	14
2.4.4	Auswirkungen der LLLT auf die Zahnbewegung.....	15
3	Ziele der Dissertation.....	17
3.1	Fragestellungen.....	17
4	Material und Methoden .....	18
4.1	Untersuchungsdesign.....	18
4.1.1	Zelllinie und Zellkultur .....	18
4.1.2	Zellmedium .....	18
4.1.3	Subkultivierung .....	18
4.1.4	Einteilung der Versuchsgruppen .....	19
4.1.5	Versuchsaufbau .....	21
4.1.6	Applikation der statischen Druckbelastung .....	21

4.1.7	<i>Low-level-Laserbestrahlung</i> .....	22
4.1.8	<i>Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)</i> .....	22
4.1.9	Statistische Auswertung.....	24
5	Ergebnisse.....	25
5.1	Ergebnisse der RT-PCR.....	25
5.1.1	Genexpression von OPG .....	26
5.1.2	Genexpression von RANKL .....	27
5.1.3	RANKL/OPG- <i>ratio</i> .....	28
6	Diskussion .....	29
6.1	Eigene Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur.....	29
6.2	Bewertung des Studiendesigns .....	32
6.3	Schlussfolgerung und klinische Relevanz .....	33
7	Zusammenfassung .....	34
8	Literatur .....	36
9	Anhänge .....	45
9.1	Tabellen.....	45
9.2	Abbildungsverzeichnis.....	46
9.3	Abkürzungen .....	47
9.4	Liste verwendeter Materialien.....	49
9.5	Danksagung .....	51
10.	Tabellarischer Lebenslauf.....	52

## Einleitung

Das Parodontium stellt ein heterogenes Gewebe dar und setzt sich aus dem Wurzelzement, dem Alveolarknochen, der Gingiva und dem parodontalen Ligament (PDL) zusammen (Cho et al., 2011). Innerhalb des parodontalen Ligaments bilden die parodontalen Fibroblasten (HPdLF) den vorrangigen Zelltyp und spielen bei der Aufnahme und Anpassung an externe Kräfte eine wesentliche Rolle (Lekic et al., 1996). Orthodontische Kräfte, die im Rahmen einer kieferorthopädischen Therapie auf das Parodontium einwirken, führen dabei zu zellulären und strukturellen Anpassungsprozessen innerhalb des Gewebes (Pavasant et al., 2011). Eine durch mechanische Kraftapplikation erzeugte Veränderung der Genexpression und Proteinsynthese in den HPdLF konnte in zahlreichen Studien belegt werden (Jacobs et al., 2013; Proff et al., 2014; Basdra et al., 1995). Die veränderten zellulären Reaktionen führen zu Umbauprozessen im Knochen und im Parodontium und ermöglichen die kieferorthopädische Zahnbewegung.

Idealerweise läuft eine kieferorthopädische Behandlung zügig ab, um möglichst wenig Wurzelresorptionen, Entkalkungen und negative Begleiterscheinungen zu verursachen. Als Unterstützung und Beschleunigung der kieferorthopädischen Therapie wird daher die *low-level*-Lasertherapie (LLLTL) zur Beschleunigung der Zahnbewegung in vielen neuen klinischen Studien diskutiert. Die zellulären Prozesse sind jedoch *in vitro* bisher sehr wenig untersucht.

Die vorliegende *in vitro* Studie soll die Interaktion zwischen mechanischer Druckbelastung und der LLLTL untersuchen und Aufschlüsse über das Zusammenspiel der beiden Komponenten liefern. Beide Faktoren haben nachgewiesener Weise einen Einfluss auf den Stoffwechsel der HPdLF, welche die Zahnbewegung ermöglichen. Unklar ist, in wie weit sich die Faktoren gegenseitig beeinflussen.

## Übersicht über den Wissensstand

Bereits im Jahr 2008 stellte eine klinische Pilotstudie von Youssef (Youssef et al., 2008) eine beschleunigte Zahnbewegung durch den Einsatz einer *low-level*-Lasertherapie fest. Daraufhin folgten zahlreiche Studien sowohl am Tiermodell als auch im klinischen Bereich, welche die beschleunigte Zahnbewegung bestätigten (Shirazi et al., 2015; Doshi-Mehta and Bhad-Patil, 2012). Bisher sind die Prozesse auf zellulärer Ebene unzureichend untersucht.

Die kieferorthopädische Zahnbewegung resultiert aus der Übertragung von Zug- und Druckkräften auf das parodontale Ligament. Die dort vorherrschenden Zellen (*human periodontal ligament fibroblasts*, HPdLF) sind mechanoresponsiv und reagieren mit Änderungen in ihrer Gen- und Proteinexpression. Diese lokal produzierten Faktoren wie Prostaglandine und pro-inflammatorische Zytokine induzieren wiederum Umbauprozesse des Knochens sowie des umliegenden Weichgewebes (Mabuchi et al., 2002; Meikle, 2006).

Der Knochenumbau wird in großen Teilen über das RANKL (*Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand*) -RANK (*Receptor Activator of NF- $\kappa$ B*) -OPG (*Osteoprotegerin*)-System gesteuert. RANKL und OPG werden von Osteoblasten synthetisiert und agieren als Gegenspieler. Ein Anstieg des RANKL/OPG-Verhältnisses führt zu einer erhöhten RANK-abhängigen Osteoklastenaktivierung und Differenzierung, ein Abfall hingegen zur verstärkten Knochenneubildung durch Hemmung der Osteoklastenaktivierung (Yamaguchi et al., 2009). Jawad et al. untersuchten den Einfluss einer 940 nm LLL-Therapie auf die Osteogenese junger Osteoblasten und konnten eine Steigerung der Proliferation und Differenzierung zeigen (Jawad et al., 2013). Kiyosaki et al. erreichten mittels LLL-Therapie *in vitro* einen Anstieg von Mineralisationsfaktoren in Osteoblasten (Kiyosaki et al., 2010). HPdLF gehören zu den Fibroblasten, können jedoch unter bestimmten Bedingungen osteogenes Potential entwickeln. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass Zugbelastung auf HPdLF zu einer Aktivierung des Knochenumbausystems zugunsten des Knochenaufbaus führt (Wescott et al., 2007). Interessant ist, ob die LLLT die osteogene Differenzierung der HPdLF induzieren kann und ob dieser Effekt durch

mechanische Belastung weiter verstärkt wird. Erkenntnisse in diesem Bereich könnten Erklärungen für die beschleunigte Zahnbewegung *in vivo* liefern.

Um den Ablauf einer orthodontischen Zahnbewegung zu verstehen, sollen zunächst Kenntnisse über die anatomischen und physiologischen Gegebenheiten des Zahnhalteapparates unter besonderer Berücksichtigung der Faktoren für die orthodontische Geweberemodellierung dargestellt werden.

## **1.1 Aufbau des Parodontiums**

Der Zahnhalteapparat (Parodontium) besteht aus der Gingiva, dem Wurzelzement, dem Alveolarknochen und dem parodontalen Ligament (Desmodont) (Nanci et al., 2006). Neben der dynamischen Verankerung des Zahnes in der Alveole sorgt das Parodontium bei mechanischer Belastung für Widerstand gegen und Anpassung an die auftretenden Kräfte (Reitemeier et al., 2006). Die Adaptation an eine orthodontische Therapie und eine veränderte kaufunktionelle Belastung ist dabei durch permanente Umbauprozesse des Gewebes (*“turnover”*) gewährleistet. Das Desmodont stellt dabei das am stärksten remodellierte Gewebe im Körper dar. Der Gewebe-*turnover* hängt jedoch von der einwirkenden Kraft ab und kann stark variieren (Wolf et al., 2003).

Der Schwerpunkt der Umbauprozesse auf zellulärer Ebene während der kieferorthopädischen Zahnbewegung betrifft vorwiegend das parodontale Ligament mit seinen zellulären und extrazellulären Bestandteilen sowie den angrenzenden Alveolarknochen. Es soll daher im Folgenden besonders auf diese Anteile des Zahnhalteapparates eingegangen werden.

### **1.1.1 Parodontales Ligament (PDL)**

Das parodontale Ligament (PDL, Desmodont) ist ein Bindegewebe, welches den Raum zwischen dem Alveolarknochen und der Wurzeloberfläche ausfüllt. Es besteht aus zellulären und extrazellulären Bestandteilen, zu denen Blutgefäße, Kollagenfasern, Nervenfasern und Grundsubstanz zählen (Furstman et al, 1972). Neben der Positionierung und Verankerung der Zahnwurzel in der knöchernen Alveole spielt das PDL bei der Gewebemöostase, der Regeneration als auch bei der Reparatur als Zellreservoir eine wichtige Rolle. Durch die Applikation von

mechanischen Kräften im Rahmen einer orthodontischen Behandlung kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Synthese und Degradation der extrazellulären Matrixbestandteile, wodurch letztendlich eine Zahnbewegung ermöglicht wird.

### **1.1.2 Parodontale Ligament Fibroblasten (HPdLF)**

Der vorrangige Zelltyp des parodontalen Ligaments sind die humanen parodontalen Fibroblasten (HPdLF) (Cho et al., 2000). Sie haben eine bedeutende Aufgabe für den Metabolismus des parodontalen Ligaments, indem sie an der Synthese und Degradation von extrazellulären Matrixbestandteilen beteiligt sind (Krishnan et al., 2006) und verschiedene Signalmoleküle sezernieren (Wang et al., 2007). Die HPdLF sind innerhalb des PDL entlang eines dreidimensionalen Netzwerkes aus Kollagenfasern angeordnet, welches in eine gelartige Grundsubstanz, die überwiegend aus Proteoglykanmolekülen und verschiedenen Glykoproteinen besteht (Wescott et al., 2007; Ozaki et al., 2005), eingebettet ist. Die Fasern verbinden damit die Wurzeloberfläche des Zahnes mit dem Alveolarknochen (Nanci et al., 2006; Takahashi et al., 2006) und gewährleisten dadurch eine stabile und gegenüber mechanischen Kräften dynamische Zahnposition (Choi et al., 2011). Eine zügige Anpassung an externe mechanische Kräfte, wie sie bei der Bewegung des Zahnes im Rahmen einer kieferorthopädischen Behandlung erforderlich ist, wird durch einen schnellen Gewebe-*turnover* der HPdLF ermöglicht (Pavasant et al., 2011). Die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität, die Reparatur und die Anpassung an pathologische Prozesse innerhalb des parodontalen Ligaments sowie der umgebenden Gewebestrukturen ist dadurch gewährleistet (Howard et al., 1998; Lekic et al., 1997).

Eine weitere Eigenschaft der HPdLF besteht darin, auf externe mechanische Reize mit einer Änderung der Synthese von extrazellulären Matrixbestandteilen reagieren zu können. Dabei können die mechanischen Stimuli von den Zellen in Kompressions- und Zugbelastung unterschieden werden und somit entweder zu einer vermehrten Synthese der extrazellulären Matrix oder einer Degradierung führen (He et al., 2004). Durch ihre Lage im Parodontalspalt fungieren sie zudem als Vermittler zwischen der mechanischen Krafteinwirkung und den Alveolarknochenzellen (Diercke et al., 2011). Im Falle einer orthodontischen

Bewegung führt dies zu einer Knochenresorption auf der Druck- sowie zu einer Knochenapposition auf der Zugseite.

Viele Funktionen der HPdLF sind von einer mechanischen Stimulation abhängig und sorgen bei angemessener Belastung für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase (Pavasant et al., 2011). Zu hohe Kräfte können hingegen über eine vermehrte Bildung von Matrix-Metall-Proteinase-8 (MMP-8) und proinflammatorischen Zytokinen zu einer Gewebedestruktion führen (Jacobs et al., 2013).

### **1.1.3 Extrazelluläre Matrix des PDL**

Die extrazelluläre Matrix des parodontalen Ligaments besteht aus einem soliden, fibrinösen Fasernetzwerk aus Kollagenfasern, hauptsächlich Kollagen Typ I und III (He et al., 2004; Jepsen et al., 1963) sowie einem flüssigen, nicht-kollagenösen Polysaccharidgel.

Durch die hohe Zugfestigkeit der Kollagenfasern ist der Zahn solide im Wurzelzement und im Alveolarknochen gegenüber eintretenden mechanischen Kräften verankert (Bumann et al., 1997). Orthodontische Kräfte können zusätzlich eine gesteigerte Kollagen-I Synthese in PDL-Zellen hervorrufen (Kook et al., 2009; Bumann et al., 1997). Die Einbettung in das Polysaccharidgel sorgt für die Sicherstellung einer physiologischen Umgebung für die Zellen und gewährleisten die Diffusion von Nährstoffen und Hormonen (Wescott et al., 2007; Diercke et al., 2011).

Die orthodontische Zahnbewegung führt dabei nicht nur zu einem Aufbau von Kollagenen und einem damit einhergehenden Umbau von parodontalem Gewebe, sondern auch zu Um- und Abbauprozessen der extrazellulären Matrixbestandteile (Hennemann et al., 2008). Dies geschieht maßgeblich durch die Matrix-Metallproteinase (MMPs) und ihre Inhibitoren (*tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*= TIMPs) (Waddington et al., 2001). Die proteolytische Aktivität der MMPs wird streng durch die Anwesenheit der TIMPs kontrolliert. Durch Bindung der TIMPs an die aktiven MMPs wird die MMP-Aktivität verringert (Lambert et al., 2004). Änderungen im Gleichgewicht der beiden können dabei zahlreiche physiologische Gewebereaktionen, wie etwa die Angiogenese (Roy et al., 2006)

oder den Gewebeumbau zur Folge haben (Page-McCaw et al., 2007), aber auch pathologische Mechanismen, wie Entzündungen und Tumorwachstum generieren (Takahashi et al., 2003; Lambert et al., 2004; Gomis-Rüth et al., 1997; Coussens et al., 1996).

#### **1.1.4 Alveolarknochen**

Der Alveolarknochen (Lamina cribriformis) bildet die knöcherne Begrenzung der Alveole. Er besteht aus dem Osteoid, einer aus Kollagenfasern und Knochenmatrixproteinen gebildeten weichen organischen Phase, und einer nicht organischen Phase, die hauptsächlich Hydroxylapatit enthält und für die Mineralisierung des Knochens sorgt (Hennemann et al., 2008; Proff et al., 2009). Auch der Alveolarknochen ist ein dynamisches Gewebe, das permanenten Umbauprozessen, dem sogenannten *bone remodelling*, unterliegt. Bei physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen Knochenresorption und -apposition, das jedoch durch forcierte okklusale Kräfte oder pathologische Zustände gestört werden kann (Belibasakis et al., 2012).

Haupteffektorzellen des Alveolarknochens sind die Osteoblasten und Osteoklasten. Es handelt sich dabei um mechanosensible Zellen, die durch Aktivitätsänderung die Auf- und Umbauprozesse im Knochen beeinflussen (Proff et al., 2009; Krishnan et al., 2009). Osteoblasten sind für die Apposition von Knochen verantwortlich. Sie lagern sich dem Knochen flächig an und synthetisieren die Knochenmatrix. Im weiteren Verlauf des Knochenbildungsprozesses werden einige Osteoblasten von der Matrix eingeschlossen und wandeln sich in nicht mehr teilungsfähige Osteozyten um. Osteoklasten hingegen stellen die Gegenspieler der Osteoblasten dar und entwickeln sich aus fusionierten mononukleären Vorläuferzellen. Sie sind für die Resorption des Knochens verantwortlich. Über lange Zellfortsätze haben Osteoblasten die Möglichkeit zur interzellulären Kommunikation und können dadurch Informationen weitergeben.

Das Zusammenspiel der unterschiedlichen Zelltypen des Knochenstoffwechsels unterliegt einer subtilen Kontrolle und wird hauptsächlich durch systemische Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren geleitet (Meikle et al., 2006). Vor allem den Zytokinen kommt dabei eine wichtige Bedeutung als lokale biochemische

Mediatoren zu. Von Osteoblasten sezerniert, können sie direkt eine regulierende Wirkung auf die Osteoklasten ausüben.

Ein wichtiges Zytokinsystem des Knochenstoffwechsels besteht aus dem *tumor necrosis factor* (TNF)-Liganden RANKL und seinen beiden Rezeptoren RANK und OPG, welches RANKL neutralisiert. RANKL ist ein Protein aus der Familie der Tumornekrosefaktoren, das wesentlich an der Regulation des Knochenumbaus beteiligt ist. Über die Bindung an den RANK-Rezeptor an monozytären Osteoklasten-Vorläuferzellen kann es deren Differenzierung zu reifen Osteoklasten veranlassen und folglich zu einer gesteigerten Knochenresorption führen (Meikle et al., 2006).

Der Zytokinrezeptor OPG antagonisiert hingegen die RANKL/RANK-vermittelte Wirkung durch kompetitive Bindung des RANKL. Das Verhältnis von OPG zu RANKL beeinflusst daher maßgeblich den Knochenaufbau und -abbau. Durch Zunahme der RANKL/OPG-Relation kommt es zu einer erhöhten RANK-abhängigen Osteoklastenaktivierung und Differenzierung. Eine Verringerung führt hingegen zu einer verstärkten Knochenneubildung durch Hemmung der Osteoklastenaktivierung (Krishnan et al., 2006; Low et al., 2005). Eine orthodontische Zahnbewegung kann somit über Veränderungen im RANKL/OPG-Zytokinsystems beeinflusst werden. Um diesen Vorgang besser verstehen zu können, sollen im Folgenden die physiologischen Grundlagen der Zahnbewegung genauer erläutert werden.

## **1.2 Orthodontische Zahnbewegung**

Die orthodontische Zahnbewegung ist die Reaktion des dentoalveolären Komplexes auf eine von extern applizierte Kraft. Im Rahmen einer kieferorthopädischen Behandlung wird sie therapeutisch zur Korrektur von Zahnfehlstellungen genutzt und unterscheidet sich daher von der physiologischen Zahnbewegung während des Zahndurchbruchs sowie von der pathologischen Zahnbewegung als Folge einer entzündlichen Degeneration des parodontalen Gewebes.

Durch eine kieferorthopädische Apparatur wird eine Kraft aufgebracht, die den Umbau des Desmodonts und des Alveolarknochens einleitet und dadurch zur

Korrektur der Zahnfehlstellung führt (Shinya et al., 2009). Die mechanische Krafteinwirkung beeinflusst viele zelluläre Reaktionen und spricht mechanosensible Strukturen, wie Ionenkanalrezeptoren, Zytokine, das Zytoskelett und intrazelluläre Signalwege an, die zur Anpassung des biologischen Systems an die veränderte Situation beitragen (Andrade et al., 2009; Tsuji et al., 2004; Henneman et al., 2008). Abschließend konnte der genaue Ablauf der Signaltransduktion noch nicht geklärt werden. Nachgewiesen wurde bereits, dass die orthodontische Kraftapplikation zu Flüssigkeitsverschiebungen im Desmodont führt, wodurch es zur Verbiegung der Zellen und der extrazellulären Matrix kommt. Durch die Verformung der Zellen und der extrazellulären Matrix werden Ionenkanäle in der Plasmamembran der Zellen geöffnet und verschiedene Signalkaskaden aktiviert, die letztendlich die Kraft über das Zytoskelett zum Zellkern weiterleiten und dort zu einer veränderten Genexpression führen. Die Freisetzung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Kolonie-stimulierenden Faktoren und vasoaktiven Neurotransmittern bewirkt daraufhin den Umbau der parodontalen Gewebestrukturen und ermöglicht die Zahnbewegung (Krishnan et al., 2006; Davidivitch et al., 1991).

Auf histologischer Ebene erfolgt die Zahnbewegung in mehreren aufeinanderfolgenden Phasen, die sich wie folgt untergliedern lassen:

In der ersten Phase, die auch als initiale Dämpfung bezeichnet wird, kommt es durch das Einwirken der Kraft zu einer Auslenkung des Zahnes, die durch die maximale Kompression des Desmodonts und des parodontalen Gewebes in der Druckzone bestimmt wird. Es kommt zu einer Veränderung der Blutzirkulation des Plexus dentalis sowie zu einer Komprimierung der Parodontalfasern in den Druckzonen, wodurch der Zahn dem Alveolarknochen angenähert wird (Wichelhaus et al., 2017). Diese Phase ist auf die ersten drei Tage beschränkt.

In der darauf folgenden zweiten Phase kommt es, bedingt durch die anhaltende maximale Druckbelastung, zu Blutzirkulationsstörungen, Obliterationen und Zelldegenerationen und einer damit verbundenen Störung der physiologischen Abbauprozesse im Knochen. Dies resultiert in einer mehr oder weniger stagnierenden Zahnbewegung. Die Dauer und Intensität dieser sogenannten Hyalinisierungsphase hängt von der Spannungs- und Druckverteilung im

parodontalen Ligament ab und wird von der Kraftgröße, der Knochenoberfläche und der Kraftrichtung bestimmt (Wichelhaus et al., 2017). Die Dauer dieser Phase beträgt in Abhängigkeit von Alter und Knochendichte des Patienten zwischen zwei und zehn Wochen.

In der abschließenden Phase, der sogenannten resorptiven Phase, beginnen die zwischenzeitlich differenzierten Osteoklasten mit dem Umbau des Parodontal- und Knochengewebes. Dies geschieht bei geringerer Druckapplikation mit ununterbrochener Blutzirkulation vom Desmodont selbst (direkte Resorption) oder von der Lamina cribrosa (indirekte Resorption) aus. Diese Phase kann länger als 4 Wochen dauern und ist durch eine gesteigerte Zahnbeweglichkeit und langfristig konstante Remodelierungsprozesse, die eine gleichmäßige Zahnbewegung ermöglichen, gekennzeichnet (Schmuth et al., 1994; Harzer et al., 1999; Wichelhaus et al., 2017).

### **1.3 Kraftapplikation *in vitro***

Im Rahmen einer orthodontischen Therapie werden die gewünschten therapeutischen Ergebnisse mittels einer mechanischen Krafteinwirkung erzielt. In Abhängigkeit von der Krafteinwirkungsdauer und der Kraftgröße finden unterschiedliche Gewebereaktionen statt, die maßgeblichen Einfluss auf den Therapieverlauf haben (Krishnan et al., 2006).

Mechanosensible Zellen, wie die HPdLF, können die unterschiedlichen Formen der mechanischen Belastung erkennen (He et al., 2004). Über die Aktivierung von intra- und extrazellulären Signalketten kommt es daraufhin zu Veränderungen auf zellulärer Ebene, wie zum Beispiel eine Änderung der Zellproliferationsrate oder aber auch eine gesteigerte oder verminderte Apoptose bzw. Proteinbiosynthese (Colombo et al., 2008).

Die mechanische Belastung, die Zellen bei der orthodontischen Zahnbewegung erfahren, kann *in vitro* mit verschiedenen Apparaturen simuliert werden. Im Labor kultivierte Zellen werden dabei einer genau definierten statischen oder auch zyklischen Druck- oder Zugbelastung ausgesetzt, um so die *in vivo* stattfindenden zellulären Prozesse besser untersuchen zu können. Für die Applikation von

mechanischem Stress wurden in der Literatur unterschiedliche Methoden, wie etwa die computerkontrollierte Stretching-Methode (He et al., 2004) oder auch das Zentrifugieren, um eine statische Kompression der Zellen zu bewirken (Theilig et al., 2001), angewendet.

Im Rahmen der vorliegenden *in vitro* Untersuchung wurden die kultivierten humanen PDL Fibroblasten jeweils auf 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Um die Zellen zu stimulieren, wurden Glaszylinder mit einer definierten Größe und Gewicht ( $\varnothing$  33mm und 17,1g entspricht 2g/cm<sup>2</sup> Druckbelastung) auf die Wells platziert. Der Zeitraum und Zeitpunkt für diese definierte Krafteinwirkung kann beliebig gewählt werden und soll die orthodontisch einwirkende Kraft während einer kieferorthopädischen Behandlung simulieren. Dieses von Kirschneck et al. mehrfach erprobte Verfahren zur Simulation von Druckbelastung auf Zellen des parodontalen Ligamentes wurde bereits mehrfach erfolgreich im Rahmen von *in vitro* Studien angewendet und konnte sich dadurch etablieren (Kanzaki et al., 2002; Schröder et al., 2018).

#### **1.4 Low-level-Lasertherapie**

Längere Tragezeiten von kieferorthopädischen Apparaturen führen vermehrt zu Wurzelresorptionen, Gingivitiden und Karies (Yassaei et al., 2013). Verfahren, die zu einer beschleunigten Zahnbewegung führen, um diese negativen Nebeneffekte zu reduzieren, haben in den letzten Jahren vermehrt Einzug in den Praxisalltag erhalten (Kirschneck und Proff, 2017). Sie können in chirurgische und nicht-chirurgische Verfahren unterteilt werden. Zu den chirurgischen Verfahren wie Kortikotomie und Osteotomie oder ihrer minimalinvasiven Variante der Kortikozision oder Osteoperforation zählen auch die dentoalveoläre Distraction oder parodontale Distraction, die den Knochen zu einer gesteigerten Osteoklastogenese anregen sollen. Darüber hinaus stehen auch nicht-chirurgische Verfahren zur Verfügung: elektrischer Strom, gepulste oder statische elektromagnetische Felder, mechanische Vibration, niedrig-intensiv gepulster Ultraschall (*low-intensity pulsed ultrasound, LIPUS*) und die *low-level-Lasertherapie* (Kirschneck und Proff, 2018).

Die Lasertherapie findet in der Zahnheilkunde mittlerweile seit fast 30 Jahren ihre Anwendung. In den verschiedenen Disziplinen wie etwa der ästhetischen Zahnmedizin, der zahnärztlichen Chirurgie und Parodontologie ist sie bereits

etabliert, wo hingegen ihr Einsatz im Bereich der Kieferorthopädie noch nicht allzu weit verbreitet ist. Indikationsgebiete in der orthodontischen Therapie sind die Zahnschmelzkonditionierung oder -reduktion, das Debonding von Brackets, die Lichtpolymerisation, die Weichgewebechirurgie, wie etwa die Frenektomie, die Gingivektomie bei hyperplastischer Gingiva oder zur ästhetischen Korrektur, die Freilegung von retinierten Zähnen und die Biostimulation (Chhatwani et al., 2017). Bezüglich der LLLT (Softlasertherapie) ist die Datenlage über die Beschleunigung der Zahnbewegung widersprüchlich. Im Rahmen mehrerer *in vivo* Untersuchungen der Arbeitsgruppen um Cruz et al. und Genc et al. konnte eine Beschleunigung der Zahnbewegung nach kieferorthopädischer Extraktionstherapie und Bestrahlung mittels *low-level*-Laser gezeigt werden (Cruz et al., 2004; Genc et al., 2013). Neben diesen Studien wurden jedoch ebenfalls Forschungsarbeiten veröffentlicht, die keine Beschleunigung der Zahnbewegung nachweisen konnten (Salehi et al., 2015; Limpanichkul et al., 2006). Die inhomogenen Untersuchungsergebnisse lassen sich vermutlich auf unterschiedliche Laserfrequenzen und übertragene Energiedosen zurückführen. Eine geringere Energiedichte (2,5 bis 8 J/cm<sup>2</sup>) scheint dabei am effektivsten zu sein (Ge et al., 2015). Auch scheint der Einsatzzeitpunkt der Bestrahlung für die Effizienz der Behandlung eine wichtige Rolle zu spielen.

Erkenntnisse im Bereich der zellulären Prozesse *in vitro* könnten Erklärungsansätze für die Ergebnisse *in vivo* liefern und möglicherweise zu einer Optimierung der Parameter im klinischen Einsatz beitragen.

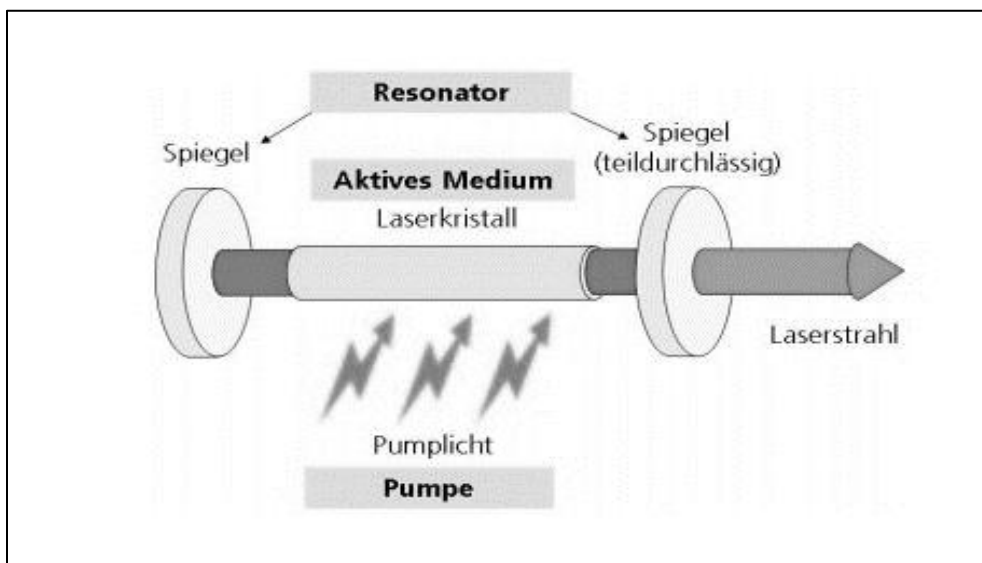
#### **1.4.1 Physikalische Grundlagen**

Die Abkürzung Laser steht für *light amplification by stimulated emission of radiation*. Laserstrahlung besteht aus elektromagnetischen Wellen, die sich durch ihre hohe Intensität, ihren engen Frequenzbereich (monochromatisches Licht), der scharfen Bündelung ihres Strahles und der großen Kohärenzlänge von anderen Beleuchtungsquellen, wie etwa dem Licht einer Glühbirne, unterscheiden. Durch diese Eigenschaften finden Laser zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten in vielen Bereichen des täglichen Lebens, der Technik und Forschung, aber auch in der Zahnmedizin.

Die notwendigen Funktionselemente für eine Laserstrahlquelle sind ein aktives Medium, das Licht emittieren und verstärken kann, eine Pumpe für die Energieeinspeisung und ein optischer Resonator (Spiegel), der das Licht zur weiteren Verstärkung in das aktive Medium zurückkoppelt (Abb. 1). Das Lasermedium kann aus einem Feststoff, einer Flüssigkeit oder einem Gas bestehen.

Ohne Energieeinwirkung befinden sich die Teilchen des Mediums in ihrem energetischen Grundzustand. Durch die Pumpe wird den Teilchen externe Energie in Form von Strom oder Licht zugeführt, sodass sie in ein höheres Energieniveau übergehen. Beim Zurückfallen auf ihr gewohntes Grundenergielevel wird Energie in Form eines sogenannten Photons (Lichtquant) frei. Trifft dieses Photon auf ein anderes angeregtes Teilchen, fällt dieses wiederum in seinen Grundzustand zurück und der Vorgang setzt sich lawinenartig fort. Man bezeichnet diesen Vorgang auch als stimulierte Emission.

Abbildung 1: Funktionselemente einer Laserstrahlquelle



(aus: Versuchsanleitung Tailored Light – Erzeugung und Charakterisierung von ultrakurzen Laserpulsen, RWTH Aachen und Fraunhofer Insitut, 2017. Stand: 27.12.2019. Verfügbar unter:[https://institut2a.physik.rwth-aachen.de/de/teaching/praktikum/Anleitungen/TAL\\_2017-02-17.pdf](https://institut2a.physik.rwth-aachen.de/de/teaching/praktikum/Anleitungen/TAL_2017-02-17.pdf))

Durch die kontinuierliche Energieeinspeisung und die beiden Resonatoren wird die Anzahl der Photonen ständig erhöht. Ein gerichteter Strahl mit definierter

Wellenlänge entsteht. Dieser Strahl kann den Laser verlassen und auf das entsprechende Gewebe geleitet werden. Dort kann er dann, abhängig von seiner Wellenlänge, verschiedene Aufgaben erfüllen.

#### **1.4.2 Diodenlaser**

Typischerweise werden Laser nach ihrem Lasermedium kategorisiert. Für die Biostimulation im Rahmen einer LLLT eignen sich Helium-Neon-Laser oder Diodenlaser. Letzterer benutzt als Medium ein Halbleitermaterial, wodurch er in der Lage ist, unterschiedliche Wellenlänge, meist im Bereich von 810 nm bis 980 nm, zu erzeugen (Chhatwani et al., 2017).

In Abhängigkeit von der Wellenlänge können Diodenlaser in Hard- und Softlaser unterschieden werden und finden ein unterschiedliches Einsatzgebiet. Hardlaser lösen durch die Absorption des Laserstrahls eine direkte Reaktion mit dem Gewebe aus. Einsatz finden sie in der zahnärztlichen Chirurgie sowie in der Keim- und Bakterienreduktion. Softlaser lösen hingegen keine direkte Reaktion mit dem Gewebe aus, sondern wirken in der Tiefe des Gewebes, auf zellulärer Ebene. Sie werden hauptsächlich in der Schmerz- und der photodynamischen Therapie eingesetzt (Gaus, 2007).

Der in der vorliegenden Studie verwendete *Epic 10<sup>TM</sup>* Laser (Biolase) verwendet eine Festkörper-Diode als Halbleiterquelle für nicht sichtbare Infrarotstrahlung im Wellenlängenbereich von 940 nm +/- 10 nm. Die Energie wird über eine flexible Faser, die an einem Ende mit der Laserquelle und am anderen Ende mit dem Handstück verbunden ist, zur Behandlungsstelle geleitet. Verschiedene Typen von Arbeitsaufsätzen wurden für die unterschiedlichen Anwendungen konzipiert und optimiert. Das Gerät wird mittels eines kabellosen Fußschalters aktiviert und kann über eine Konsole mit *touch-display* gesteuert werden.

Zum Einsatz kommen Diodenlaser meistens in der Weichgewebechirurgie, da die Wellenlängen von pigmentierten Zellen wie Melanin absorbiert werden, weniger jedoch von Hydroxylapatit und Wasser in den dentalen Hartschubstanzen.

Neuere Diodenlaser können auch Wellenlängen von 445 nm erzeugen, was sich als vorteilhaft erweist, da das Absorptionsmaximum von Hämoglobin bei unter 600 nm

liegt (Beard et al., 2011). Durch den hohen Energieeintrag in den Hämoglobinzellen kommt es zu einer beschleunigten Koagulation und Hämostase. Wasser dagegen absorbiert in diesem Bereich kaum. Dadurch wird eine thermisch begrenzte Einwirkung auf das Gewebe erreicht (Silverstone et al., 1975). Aufgrund der anwenderfreundlichen Eigenschaften eines Diodenlasers eignen sich diese sehr gut für den Einsatz in der kieferorthopädischen Praxis.

### **1.4.3 Biologische Wirkung**

Im Gegenteil zu anderen medizinisch angewendeten Lasern hat der *low-level*-Laser keinen ablativen oder thermischen Effekt auf das Gewebe. Durch die Absorption der Strahlung im Gewebe werden photochemische Prozesse auf zellulärer Ebene ausgelöst (Huang et al., 2009), die abhängig von der Eindringtiefe in das betroffene Gewebe sind (Seifi et al., 2007) und zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch einer abschließenden Klärung bedürfen.

Gesichert ist bisher, dass die Strahlung einen biostimulativen Effekt auf die Mitochondrien der Zellen hat, auch als Photobiomodulation bezeichnet (Greco et al., 1989). Durch die direkte Aktivierung von photosensiblen mitochondrialen Akzeptormolekülen, den Chromophoren, werden die Mitochondrien stimuliert (Sutherland, 2002). Der erhöhte zelluläre Metabolismus führt zu einer gesteigerten Synthese von Adenosin-Triphosphat (ATP), Radikalfängern wie den *reactive oxygen species* (ROS) und Transkriptionsfaktoren in den betroffenen Zellen (Karu, 1999; Chen et al. 2011). Die gesteigerte Proteinsynthese fördert die Produktion von RNA (Ribonukleinsäure) und DNA (*deoxyribonucleic acid*) in den Mitochondrien und triggert weitere zelluläre Effekte, wie zum Beispiel eine erhöhte Zellmigration und Proliferation sowie die Ausschüttung verschiedenster Zytokine und Wachstumsfaktoren (Karu et al., 2005). Osteoklasten, die bei den Auf- und Umbauprozessen im Knochen während einer Zahnbewegung eine große Rolle spielen, sind multinukleare Zellen mit einer hohen mitochondrialen Aktivität. Dadurch haben sie ein hohes Potential, durch die *low-level*-Laserstrahlung beeinflusst zu werden.

#### **1.4.4 Auswirkungen der LLLT auf die Zahnbewegung**

Saito et al. untersuchten erstmalig im Tiermodell die Auswirkung von *low-level* Laserstrahlung auf den Verlauf der kieferorthopädischen Therapie (Saito et al., 1997). Im Rahmen ihrer Studie konnten sie eine Beschleunigung der Knochenregeneration im Bereich der Gaumennaht nach vorheriger kieferorthopädischer Dehnung und kombinierter Bestrahlung mit LLL feststellen. Sie folgerten daraus, dass LLLT in Abhängigkeit von Dosis, Dauer und Frequenz der Bestrahlung die Knochenregeneration beschleunigen kann. Weitere Studien von Genc et al. und Cruz et al. kamen mit ihren *in vivo* Untersuchungen zu ähnlichen Ergebnissen (Cruz et al., 2004; Genc et al., 2013).

Der genaue zelluläre Mechanismus, der zur Beschleunigung der Zahnbewegung führt, ist aktuell jedoch unklar. Bisher bekannt ist, dass durch die Druck-Zug-Belastung auf die Zellen des parodontalen Ligamentes während einer orthodontischen Zahnbewegung eine Veränderung der Proliferationsraten der Zellen in der Druck- und der Zugzone hervorruft: Untersuchungen belegen eine erhöhte Konzentration von Osteoklasten auf der Druckseite und eine gesteigerte Expression von Osteoblasten auf der Zugseite in Zahnbewegungsrichtung (Yamaguchi et al., 2009). Das vermehrte Vorkommen beider Zelltypen führt durch die Zunahme von Auf- und Abbauprozessen im angrenzenden Knochen zur Bewegung des Zahnes. Die Remodellierungsrate wird dabei durch die Menge der Osteoblasten bestimmt, da diese über die beiden Faktoren TNF und RANKL für die Induktion von Proliferation und Differenzierung der Osteoklasten verantwortlich sind (Nanda et al., 2015). Die Osteoklastengnese wird durch die kompetitive Bindung von RANKL an den RANK-Rezeptor der Osteoblasten reguliert. Die Bindung von RANKL induziert die Osteoklastengnese und aktiviert die Osteoklasten. Auf der anderen Seite führt die Bindung von OPG zur Hemmung der Osteoklastensynthese. Der RANK-Rezeptor stellt somit einen wichtigen Regulator für Knochenremodellierungsprozesse dar (Meikle et al., 2006).

Während der kieferorthopädischen Behandlung wurde eine erhöhte RANKL-Konzentration sowie eine signifikante Verringerung der OPG-Konzentration im PDL und in der gingivalen Sulkusflüssigkeit nachgewiesen (Kapila et al., 1998). Durch

die zusätzliche Bestrahlung mittels LLL scheint die Expression von RANKL in Osteoklastenvorläuferzellen nochmals hochreguliert, was bereits auf immunhistochemischer Ebene im Rahmen mehrerer Untersuchungen gezeigt werden konnte (Aihara et al., 2006; Kapila et al., 1998; Kim et al., 2009). Die erhöhte Genexpression von RANKL könnte daher die Geschwindigkeit der Zahnbewegung während einer kieferorthopädischen Behandlung erhöhen.

Im Rahmen derselben Studien konnte zudem ein Anstieg der Fibronectin und Kollagen-Typ I Synthese nach Bestrahlung mittels LLL festgestellt werden (Kim et al., 2009). Fibronectin, welches ubiquitär im parodontalen Gewebe vorkommt, unterstützt die Differenzierung von Fibroblasten und sorgt so für die vermehrte Produktion von Kollagen-Typ I. Dies sorgt für einen erhöhten Gewebe-*turnover* im PDL und fördert die Remodellierung während der orthodontischen Zahnbewegung. Fibronectin triggert zudem die Hochregulierung von RANKL und die damit verbundene Steigerung der Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung (Nakayamada et al., 2003; Nishiguchi, 2007).

Weitere Effekte, die der Bestrahlung durch LLL zugeschrieben werden, sind die verstärkte Osteoblastenproliferation, die zur Knochenneubildung auf der Zugseite beiträgt (Ozawa et al., 1998), die zusätzliche Bildung des *macrophage-colony stimulating factors* (M-CSF), der im Bereich der Kompressionszone zu einer vermehrten Differenzierung von reifen Osteoklasten führt (Yoshida et al., 2009) sowie die Erhöhung der parodontalen Durchblutung (Huang et al., 2014).

## Ziele der Dissertation

Wie zuvor beschrieben, bestätigen mehrere klinische Studien eine beschleunigte Zahnbewegung durch zusätzliche Anwendung einer *low-level*-Lasertherapie. Unklar ist, welche Prozesse sich auf zellulärer Ebene abspielen. Ziel dieser Studie ist es daher, *in vitro* die Hauptzellen des parodontalen Ligaments (HPdLF) einer Druckbelastung auszusetzen und den Einfluss in Kombination mit einer *low-level*-Lasertherapie auf den Stoffwechsel der HPdLF zu untersuchen.

### 1.5 Fragestellungen

1. Bewirkt mechanische Druckbelastung eine Veränderung der Genexpression innerhalb des RANKL/OPG-Systems?
2. Bewirkt die Bestrahlung mittels *low-level*-Laser eine Veränderung der Genexpression innerhalb des RANKL/OPG-Systems?
3. Inwiefern beeinflusst die Kombination aus LLLT und mechanischer Belastung diese beiden wichtigen Marker für die kieferorthopädische Zahnbewegung?
4. Können Erklärungsansätze für die klinisch beschleunigte Zahnbewegung unter Berücksichtigung des RANKL/OPG-Systems gefunden werden?

# Material und Methoden

## 1.6 Untersuchungsdesign

Die Fragestellung soll im Rahmen einer *in vitro* Studie untersucht werden. Humane parodontale Fibroblasten (HPdLF) wurden kultiviert und einer Druckbelastung über 2 Tage unter Zellkulturbedingungen ausgesetzt. Des Weiteren wurden die Zellen einer Laserbestrahlung mittels *low-level*-Laser mit 940 nm Wellenlänge und unterschiedlicher Energiedichte ausgesetzt.

### 1.6.1 Zelllinie und Zellkultur

Für die Studie wurden kommerziell erworbene humane parodontale Ligamentfibroblasten (HPdLF, Lonza Group Ltd, Basel, Schweiz) im Zellkulturlabor kultiviert. Nach dem Auftauprozess entsprechend der Herstellerempfehlungen wurden die Zellen bei einer Temperatur von 37°C, einer CO<sub>2</sub> - Konzentration von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 100 % in einem Inkubator (HERAcell, Heraeus, Hanau, Deutschland) kultiviert. Die Versuche wurden mit Zellen der vierten bis sechsten Passage durchgeführt.

### 1.6.2 Zellmedium

Zur Kultivierung der Zellen wurde *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Biochrom AG, Berlin, Deutschland) verwendet. Diesem wurde 10% fetales Kälberserum (FCS, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland), 500 ng/ml Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF; Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) und 1% Penicillin/ Streptomycin/ Neomycin (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) zugefügt. Der Wechsel des Nährmediums erfolgte alle drei Tage. Während der Versuchsdurchführung wurde auf ein FCS reduziertes Medium mit 1 % gewechselt.

### 1.6.3 Subkultivierung

Mit dem Erreichen einer 90 %igen Konfluenz wurde das Nährmedium unter sterilen Bedingungen abpipettiert, die Zellen zweimal mit PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) gewaschen und mit Accutase bei 37°C für 4 Minuten inkubiert.

Anschließend wurden die abgelösten Zellen mit Nährmedium in ein 50 ml Tube überführt und fünf Minuten mittels Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand aus Nährmedium und Accutase wurde abpipettiert, das Zellpellett wurde gevortext und mit 10 ml Nährmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und jeweils 70000 Zellen pro Well auf eine 6-Well-Platte aufgetragen. Zur Zelladhärenz wurden die Zellen für 24 h mit 2 ml supplementierten Nährmedium kultiviert. Anschließend wurde in allen Gruppen das Medium abpipettiert und durch Medium mit reduziertem FCS Anteil (1%) ersetzt.

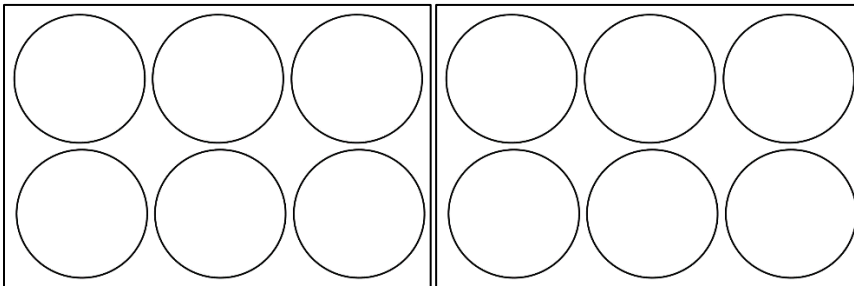
#### **1.6.4 Einteilung der Versuchsgruppen**

Der Versuchsaufbau setzte sich insgesamt aus 6 Versuchsgruppen zusammen. Gruppe 1 diente als Kontrollgruppe ohne Druck- und LLL-Bestrahlung (Kontrolle). Gruppe 2 bestand aus der Bestrahlung mittels LLL einer Energiedichte von  $1,25 \text{ J/cm}^2$  (+LLL). Gruppe 3 wurde der Bestrahlung mittels LLL einer Energiedichte von  $10 \text{ J/cm}^2$  ausgesetzt (+++LLL). Gruppe 4 wurde alleiniger statischer Druckbelastung ausgesetzt (Druck). Die Zellen der Gruppe 5 wurden wie in Gruppe 2 einer Bestrahlung mit einer Energiedichte von  $1,25 \text{ J/cm}^2$  ausgesetzt sowie einer Druckbelastung entsprechend Gruppe 4 (Druck +LLL). Die Zellen der Gruppe 6 wurden der gleichen Druckbelastung wie Gruppen 4 und 5 ausgesetzt und mit LLL einer Energiedichte wie Gruppe 3 bestrahlt (Druck +++LLL).

Abbildung 2: Schematische Darstellung der einzelnen Versuchsgruppen

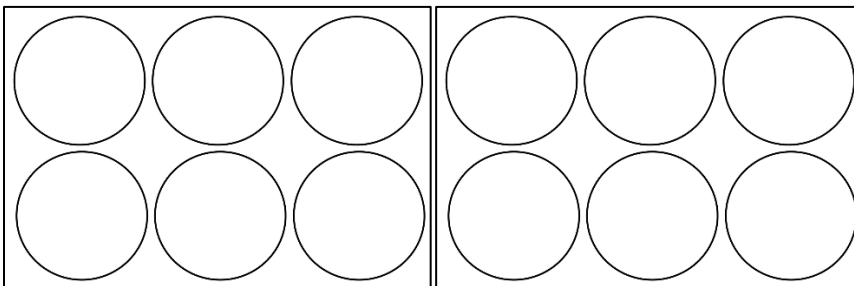
Gruppe 1: Kontrolle

Gruppe 2: + LLL



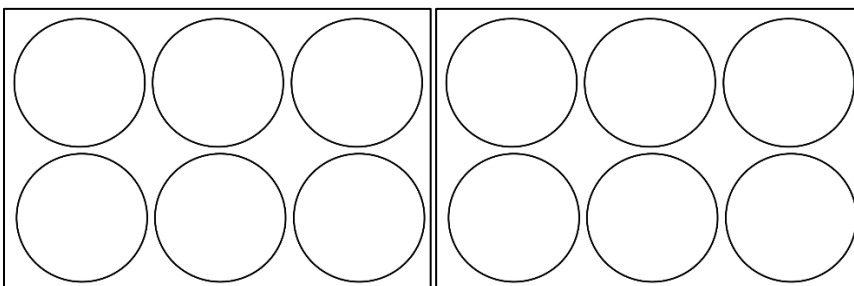
Gruppe 3: +++ LLL

Gruppe 4: Druck



Gruppe 5: Druck + LLL

Gruppe 6: Druck +++ LLL

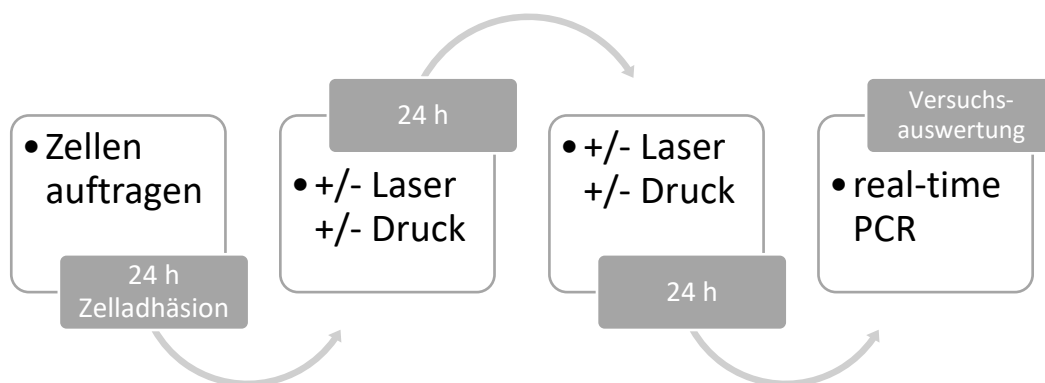


Quelle: eigene Grafik

### 1.6.5 Versuchsaufbau

Zur Durchführung der Versuchsreihe wurden die HPdLF auf die 6-Well-Platten aufgetragen. Nach 24 stündiger Zelladhäsion wurden die Platten der Gruppen 4-6 einer statischen Druckbelastung über 48 Stunden ausgesetzt. Die Gruppen 2, 3, 5 und 6 wurden mittels LLL bestrahlt. Gruppe 1 erhielt weder Laserbestrahlung noch Druckbelastung und fungierte somit als Kontrollgruppe. Weitere 24 Stunden später wurde die Bestrahlung mittels Laser wiederholt. Nach weiteren 24 Stunden wurde die RT-PCR durchgeführt und der Versuch ausgewertet.

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung

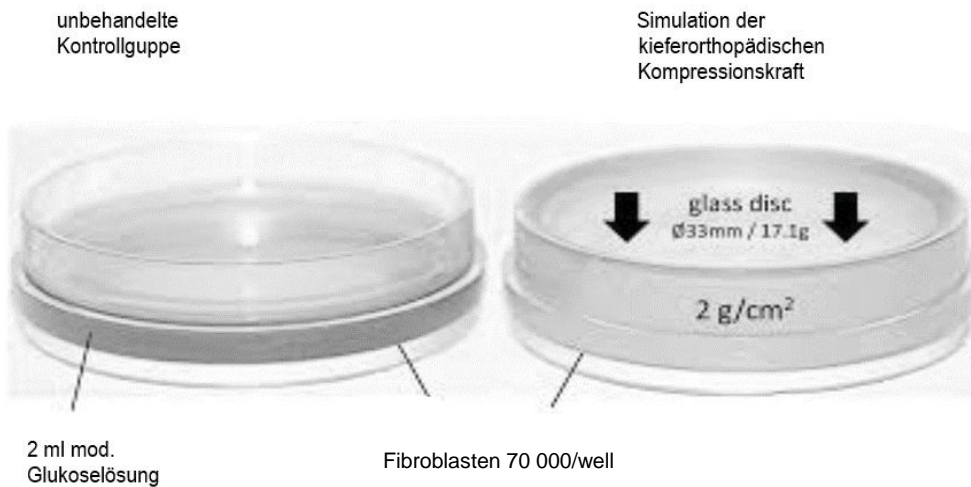


Quelle: eigene Grafik

### 1.6.6 Applikation der statischen Druckbelastung

Zur Simulation der statischen Druckbelastung wurde ein von Kirschneck et al. etabliertes und mehrfach untersuchtes System mit Glaszylinder gewählt (Schröder et al., 2018). Die kultivierten HPdLF wurden jeweils auf 6-Well-Zellkulturplatten mit einer Zelldichte von 70 000 Zellen pro Well ausgesät. Um die Zellen zu stimulieren, wurden Glaszylinder mit einer definierten Größe und Gewicht ( $\varnothing$  33mm und 17,1g entspricht  $2\text{g/cm}^2$  Druckbelastung) für 48 h auf die Wells platziert.

Abbildung 4: *In vitro* Simulation von kieferorthopädischer Kompressionskraft auf kultivierte HPdLF



Quelle: modifiziert nach Schröder A, Bauer K, Spanier G, Proff P, Wolf M, Kirschneck C. Expressionkinetik humaner Parodontalligamentfibroblasten in den frühen Phasen der kieferorthopädischen Zahnbewegung. *J Orofac Orthop* 2018; 79(5):337–51

### 1.6.7 Low-level-Laserbestrahlung

Die LLL-Bestrahlung der Zellen erfolgte unter einer sterilen Werkbank. Als Dioden-Laser wurde der *Epic 10<sup>TM</sup>* Laser der Firma Biolase mit einer Wellenlänge von 940 nm verwendet. Die verschiedenen Energiedichten wurden durch Modifikation der Bestrahlungszeit und der Laserleistung erreicht. Zum Einsatz kamen eine niedere Energiedichte von 1,25 J/cm<sup>2</sup> (120 s; 0,1 Watt) und eine höhere Energiedichte von 10 J/cm<sup>2</sup> (240 s; 0,4 Watt). Der Abstand der Laserspitze zum Boden der 6-Well Platte betrug 10 cm.

### 1.6.8 Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*) ist eine molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung von DNA *in vitro*. Die DNA Synthese wird dabei durch das Enzym DNA-Polymerase katalysiert, das die einzelnen Bestandteile der DNA zu langen Molekülsträngen verbindet. Die PCR besteht aus drei Teilschritten: der Trennung der beiden DNA Stränge

(Denaturierung), der Bindung von Primern an die DNA Sequenzen (Annealing, Hybridisierung) und der Bildung neuer DNA-Stränge mit Hilfe der Polymerase (Elongation) (Kubista et al., 2006). Wird zuvor RNA in DNA mittels des Enzyms *reverse*-Transkriptase umgeschrieben, spricht man von der *reverse*-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion.

Die mRNA-Expression von OPG und RANKL in den HPdLF sollte mit Hilfe der RT-PCR im Rahmen der vorliegenden Studie bestimmt werden. Hierfür wurden die 6-Well-Platten 24 Stunden nach der Bestrahlung mittels LLL und Druckbelastung vorsichtig mit je 1 ml PBS gewaschen. Das Nährmedium wurde zuvor abpipettiert. Nach Inkubation mit 0,05 % Trypsin-EDTA und Ablösung von der flexiblen Silikonmembran wurden die Zellen zusammen mit 2 ml ihres Nährmediums für 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Die extrahierte mRNA (peqGOLD Total RNA KIT, peqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) wurde anschließend mit dem ND-1000 Spektrophotometer (PeqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) auf Quantität (260 nm) und Qualität (*ratio*: 260/280 nm) untersucht. Mittels des iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad Laboratories, Hercules, USA) und dem Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) erfolgte die reverse Transkription der mRNA in cDNA (*complementary* DNA). Die spezifischen Sense- und Antisense-Primer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) wurden mit Hilfe der NCBI *nucleotide library* und Primer3-Design angelegt. Als *housekeeping*-Gene dienten Aktin und Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). Die einzelnen Wells der 96-Well-PCR-Platte wurden jeweils mit 2 µl cDNA und 23 µl eines nach Herstellerangaben gefertigten MasterMix befüllt (iQ SYBR Green Supermix, Biorad Laboratories, Hercules, USA; Sense- und Antisense-Primer; DNA/RNA freiem Wasser, peqlab GmbH, Erlangen, Deutschland). Durch den beigefügten Fluoreszenzfarbstoff SYBR konnte anschließend mittels Fluoreszenzmessung eine direkte Quantifizierung der vervielfältigten DNA Abschnitte erfolgen (Peters et al., 2004), wobei die Zunahme der Fluoreszenz mit einem Anstieg an gebundener DNA korrelierte.

Der Vervielfältigungszyklus bestehend aus Denaturierungsphase bei 95°C, Anlagerung der Primer bei 56°C und Elongationsphase bei 71°C wurde insgesamt 40 Mal wiederholt. Pro Primer wurden jeweils Triplets verwendet. Die PCR fand im

Thermocycler iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Biorad Laboratories, München, Deutschland) statt, wobei die RT-PCR mittels der IQ5 Optical System Software Version 2.0 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) gestartet wurde und nach Herstellerangaben durchgeführt werden konnte.

#### **1.6.9 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Computersoftware SPSS 19.0 (IBM-SPSS, Ehningen, Germany). Nach der Testung auf Normalverteilung wurden die detektierten Daten einer Varianzanalyse unterzogen (ANOVA, post hoc Test: Tukey). Wurden zwei Gruppen direkt miteinander verglichen, kam zusätzlich der Student's t-Test zum Einsatz. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde dabei als statistisch signifikant gewertet (\* $p < 0,05$ ).

# Ergebnisse

## 1.7 Ergebnisse der RT-PCR

Die Ergebnisse der RT-PCR wurden tabellarisch erfasst. Eine Übersicht über alle Versuchsgruppen gibt die folgende Tabelle. Die Genexpression wird in Relation zur Kontrollgruppe dargestellt.

Tabelle 1: Ergebnisse der RT-PCR

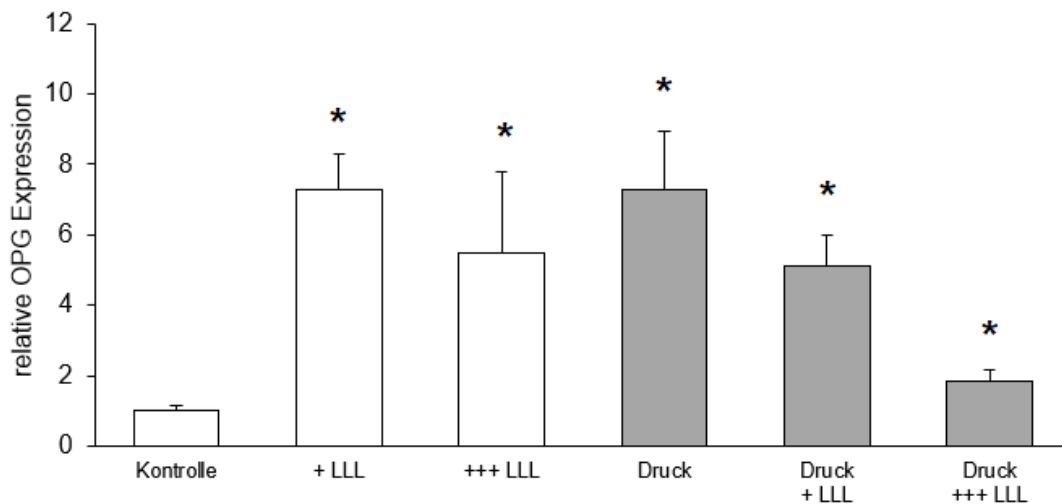
Marker	Versuchsgruppe	Expression
<b>RANKL</b>	Kontrolle	1,00000
<b>RANKL</b>	+ LLL	12,66034
<b>RANKL</b>	+++ LLL	1,91388
<b>RANKL</b>	Druck	3,29055
<b>RANKL</b>	Druck + LLL	19,10808
<b>RANKL</b>	Druck +++ LLL	211,91644
<b>OPG</b>	Kontrolle	1,00000
<b>OPG</b>	+ LLL	7,29470
<b>OPG</b>	+++ LLL	5,47218
<b>OPG</b>	Druck	7,29415
<b>OPG</b>	Druck + LLL	5,11181
<b>OPG</b>	Druck +++ LLL	1,86752
<b>RANKL/OPG</b>	Kontrolle	1,00000
<b>RANKL/OPG</b>	+ LLL	1,73555
<b>RANKL/OPG</b>	+++ LLL	0,34975
<b>RANKL/OPG</b>	Druck	0,45112
<b>RANKL/OPG</b>	Druck + LLL	3,73803
<b>RANKL/OPG</b>	Druck +++ LLL	113,47505

Quelle: eigene Erhebung

### 1.7.1 Genexpression von OPG

Die Genexpression von OPG zeigte bei solitärer Bestrahlung mittels LLL sowohl bei Bestrahlung mit einer niedrigen Energiedichte des *low-level*-Lasers als auch bei einer hohen Energiedichte einen signifikant erhöhten Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Falle der Bestrahlung mittels niedriger LLL-Energiedichte wurde die Genexpression um das 7-fache gesteigert, bei der hohen Energiedichte des LLL um fast das 6-fache. Die alleinige Applikation von Druck bewirkte ebenfalls eine signifikante Erhöhung der OPG-Expression, etwa auf dem Niveau bei Bestrahlung mittels niedrig energetischem LLL. Die Kombination aus Druckbelastung und Bestrahlung mittels niedrigerenergetischem LLL führte zu einem signifikant erhöhten Anstieg der OPG-Genexpression, ebenfalls bei höherer energetischer Laserbestrahlung, jedoch in verringertem Ausmaß. Die gesteigerte OPG-Genexpression bei kombinierter Druck- und Bestrahlungsbelastung lag jedoch unter der Genexpression bei reiner Bestrahlung mittels LLL.

Abbildung 5: Relative OPG-Genexpression

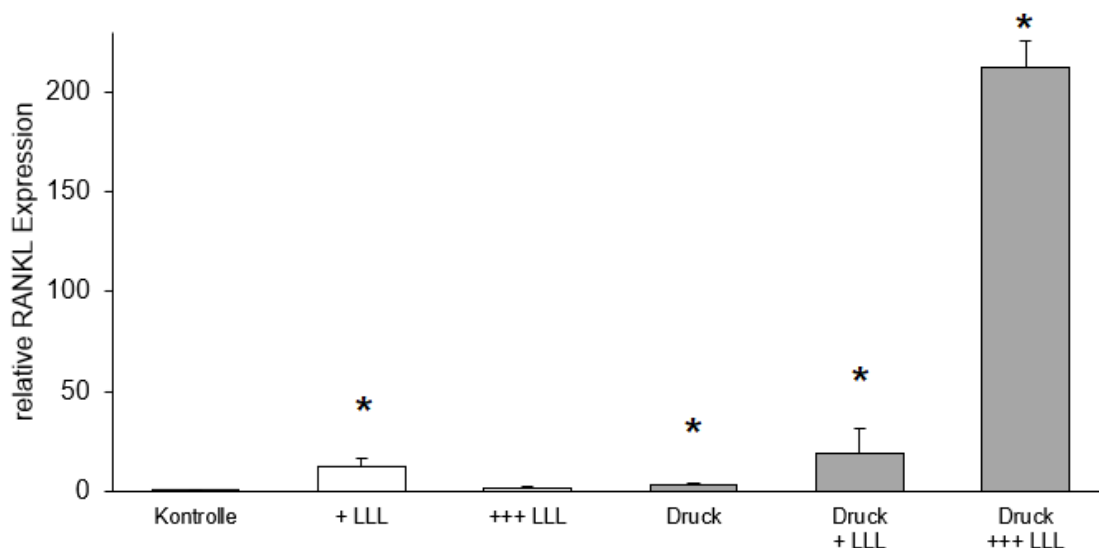


Quelle: eigene Erhebung

### 1.7.2 Genexpression von RANKL

Die Genexpression von RANKL zeigte bei Bestrahlung mittels niedrigenergetischem LLL eine statistisch signifikante Erhöhung der Genexpression. Bei Bestrahlung mit höherer Energiedichte des LLL konnte kein signifikanter Anstieg der RANKL-Genexpression gezeigt werden (relativer Anstieg 1,91). Die gesteigerte Genexpression von RANKL bei reiner Druckbelastung konnte hingegen als signifikant bewertet werden (\* $p < 0,05$ ). Die kombinierte Druck- und Bestrahlungsbelastung zeigte ebenfalls eine statistisch signifikante Steigerung der RANKL-Genexpression sowohl bei einer niedrigeren als auch bei einer höheren Energiedichte des Lasers. Eine sehr deutliche Steigerung der RANKL-Genexpression, die ebenfalls als signifikant bewertet werden konnte, konnte bei Kombination der Druckbelastung und der hoch energetischen Laserbestrahlung des LLL festgestellt werden. Die Steigerung betrug das 211-fache. Die Kombination von Druckbelastung und Bestrahlung mittels LLL zeigten deutlich stärkere Anstiege der RANKL-Genexpression als bei reiner Bestrahlung mittels LLL.

Abbildung 6: Relative RANKL-Genexpression

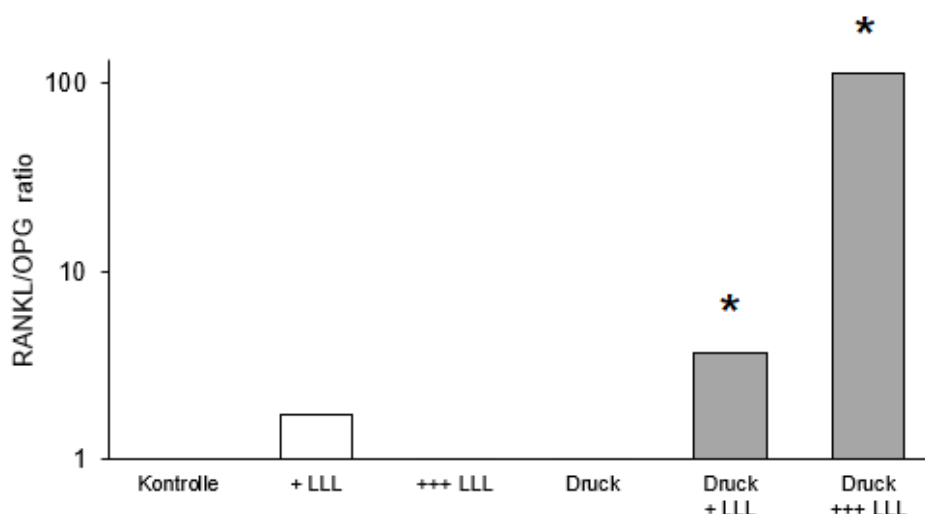


Quelle: eigene Erhebung

### 1.7.3 RANKL/OPG-ratio

Setzt man die RANKL/OPG-Expression in Bezug zueinander, konnte eine Zunahme der RANKL/OPG-ratio bei solitärer Bestrahlung mittels LLL niedriger Energiedichte festgestellt werden (Faktor 1,74 in Bezug zur nicht bestrahlten/ belasteten Kontrollgruppe). Die Bestrahlung mittels Laser einer höheren Energiedichte sowie die reine Druckbelastung führt zu einer minimalen Verschiebung der *ratio* in Richtung von OPG und konnten nicht als statistisch signifikant gewertet werden. Eine deutliche Zunahme der RANKL/OPG-ratio ließ sich bei der kombinierten Bestrahlung mittels LLL und Druckbelastung verzeichnen. Bei Kombination aus mechanischer Druckbelastung und Laserstrahlung niedriger Energiedichte betrug die Steigerung 3,74 im Verhältnis zur Kontrollgruppe. Insbesondere die Kombination aus Laserstrahlung mit hoher Energiedichte und mechanischer Druckbelastung zeigte eine starke Steigerung der *ratio* zugunsten der RANKL-Genexpression (Faktor 113,48 in Bezug zur Kontrollgruppe). Als statistisch signifikant (\* $p < 0,05$ ) gewertet wurden die *ratio*-Zunahmen bei alleiniger Bestrahlung mittels niedrigenergetischem LLL sowie die Ergebnisse bei kombinierter Druckbelastung und LLL mit niedriger und hoher Energiedichte.

Abbildung 7: RANKL/OPG-ratio



Quelle: eigene Erhebung

## Diskussion

Durch die orthodontische Zahnbewegung entsteht eine Krafteinwirkung auf das Parodontium in Bewegungsrichtung des Zahnes. Mechanosensible Zellen des parodontalen Ligamentes, wie die HPdLF, reagieren mit einer angepassten Differenzierung, Genexpression und Proteinbiosynthese auf die Änderung des Belastungsmusters (Krishnan et al., 2009). Bei der Bestrahlung mittels *low-level-Laser* konnte zudem im Rahmen aktueller Studien eine Beschleunigung der Zahnbewegung festgestellt werden (Genc et al., 2013; Cruz et al., 2004). Um diese Beobachtungen auf zellulärer Ebene nachvollziehen zu können, wurden HPdLF im Labor kultiviert und mit Hilfe eines Drucksimulationsmodelles mittels Glaszylinderkolben ( $2\text{g/cm}^2$ ) und anschließender Bestrahlung mit einem *low-level-Laser* bei 940 nm Wellenlänge und zweier unterschiedlicher Energiedichten ( $1,25\text{ J/cm}^2$ ;  $10\text{ J/cm}^2$ ) bestrahlt. Die Ergebnisse zeigen eine gesteigerte Genexpression der für die Knochenumbauprozesse wichtigen Proteine OPG und RANKL nach solitärer Druckbelastung, Laserbestrahlung und bei der Kombination der beiden Parameter.

### 1.8 Eigene Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur

Das RANKL/OPG-System bildet den zentralen Signalweg für Knochenauf- und Knochenumbauprozesse im Organismus. Das Rezeptor-Ligand vermittelte System hat einen entscheidenden Einfluss auf die Osteoklastendifferenzierung und ist somit ein wesentlicher Faktor für den Umfang der orthodontischen Zahnbewegung. Tierexperimentelle Studien konnten eine gesteigerte Osteoklastogenese beim Anstieg der RANKL-Genexpression zeigen, wohingegen die gesteigerte Genexpression von OPG die Osteoklastogenese und somit auch die Zahnbewegung verlangsamt (Kanzaki et al., 2004; Kanzaki et al., 2006). Eine Veränderung der RANKL/OPG-*ratio* führt demzufolge zu einer verstärkten oder verminderten Knochenresorption und spielt somit eine wichtige Rolle für die orthodontische Zahnbewegung.

Im Rahmen der vorliegenden *in vitro* Studie wurde bei mechanischer Belastung eine Verschiebung der RANKL/OPG-*ratio* in Richtung der OPG-Genexpression

verzeichnet. Ein als statistisch signifikant zu wertender Anstieg der RANKL-Genexpression (Faktor 3,29) wurde durch einen noch stärkeren Anstieg der OPG-Genexpression (Faktor 7,29) relativiert. Eine Studie mit ähnlichem Studiendesign von Schröder et al. konnte ebenfalls eine signifikante Hochregulierung der RANKL-Genexpression nach statischer Druckbelastung zeigen (Schröder et al., 2018). Dies unterstützt die Annahme, dass RANKL maßgeblich am Knochenabbau bei mechanischer Kraftbelastung verantwortlich ist und wie auch schon im Rahmen vorheriger Studien vermutet, durch die Applikation einer mechanischen Kraft maßgeblich beeinflusst wird (Yamaguchi et al., 2006). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte eine erhöhte RANKL-Genexpression und eine Reduktion der OPG-Genexpression nach mechanischer Druckbelastung von Zellen des parodontalen Ligamentes gezeigt werden (Nishijima et al., 2006; Nakao et al., 2007). Ein Anstieg der OPG-Genexpression wurde bisher nur auf der Zugseite der Zahnbewegung verzeichnet, nicht jedoch in der Kompressionszone (Garlet et al., 2007). Die Ursachen für den Anstieg der OPG-Genexpression im Rahmen der vorliegenden Studie sind noch unklar und bedürfen daher noch einer weiteren Klärung.

Eine Beeinflussung des RANKL/OPG-Systems kann neben einer mechanischen Druckbelastung auch durch die Bestrahlung mittels *low-level-Laser* hervorgerufen werden. Neben der Aktivierung und Produktion von endogenen Signalmolekülen führt die LLLT zu einer gesteigerten Genexpression von RANKL in Osteoklastenvorläuferzellen (Altan et al., 2014). Immunhistochemische Untersuchungen von Aihara et al. (Aihara et al., 2006), Kapila et al. (Kapila et al., 2006) und Kim et al. (Kim et al., 2009) konnten dies bestätigen. Eine *in vitro* Studie von Fujita et al. zeigte den positiven Effekt der LLLT auf die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten und ließ die Autoren schlussfolgern, dass die erhöhte Genexpression von RANKL die Geschwindigkeit der orthodontischen Zahnbewegung fördert (Fujita et al., 2008).

Die Ergebnisse der aktuellen Studie zeigen ebenfalls eine gesteigerte Genexpression von RANKL nach solitärer Bestrahlung mittels LLL bei beiden Energiedichten, insbesondere bei Bestrahlung mit einer niedrigeren Energiedichte des Lasers (Faktor 12,66 im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollgruppe). Ebenfalls erhöht ist die OPG-Genexpression. Die RANKL/OPG-*ratio* ist bei Bestrahlung

mittels einer niedrigen Energiedichte zugunsten von RANKL verschoben, bei hoher Energiedichte zugunsten von OPG. Diese Ergebnisse entsprechen bereits publizierten Untersuchungsergebnissen (Fujita et al., 2008) und unterstützen die Annahme, dass der Effekt der *low-level*-Lasertherapie auf das RANKL/OPG-System von der verwendeten Energiedichte abhängt. Van Breugel et al. konnten im *in vitro* Experiment mit humanen Fibroblasten zeigen, dass eine Energiedosisleistung unter 2,91 mW die zellulären Proliferationsprozesse positiv beeinflussen kann, wohingegen eine erhöhte Energiedosisleistung von 5,98 mW keine Effekte auf die Zellproliferation zeigte (Van Breugel et al., 1992). Eine niedrige Energiedosisleistung scheint in Anlehnung an die Ergebnisse der aktuellen Studie auch einen stimulierenderen Effekt auf die RANKL-Genexpression zu haben und führt somit vermehrt zur Aktivierung von Osteoklasten, die die Knochenumbauprozesse begünstigen und zu einer erhöhten Knochenumbaurate führen. Die unterschiedliche Beeinflussung des RANKL/OPG-Systems, in Abhängigkeit von der Energiedichte des Lasers, könnte einen Ansatzpunkt für eine Erklärung der inhomogenen Studienergebnisse in der aktuellen Literatur, in Bezug auf die Effektivität der *low-level*-Lasertherapie, auf die Beschleunigung der orthodontischen Zahnbewegung darstellen und bedarf weiterer Untersuchungen.

Eine Kombination aus mechanischer Druckbelastung und Bestrahlung mittels *low-level*-Laser ist den Ergebnissen der aktuellen Studie zufolge mit einer massiven Zunahme der RANKL/OPG-*ratio* sowohl bei geringer, als auch bei hoher Energiedichte des Lasers gekennzeichnet. Dies ist hauptsächlich auf die Zunahme der RANKL-Genexpression und einer gegenläufigen OPG-Genexpressionsrate zurückzuführen. Einen ähnlichen Anstieg der RANKL-Genexpression in Zellen des parodontalen Ligamentes, während kombinierter kieferorthopädischer Behandlung und Bestrahlung mittels *low-level*-Laser, konnten Kapila et al. bereits 1998 nachweisen. Weitere Untersuchungen identifizierten ebenfalls eine erhöhte RANKL-Genexpression in Osteoklastenvorläuferzellen nach zusätzlicher Laserbestrahlung *in vitro* (Aihara et al., 2006). Damit unterstützen sie die Annahme, dass die vermehrte Genexpression von RANKL nach kombinierter Druck- und Bestrahlungsbelastung der HPdLF zu einer vermehrten Osteoklastenaktivität führt

und damit die Knochenumbau- und Knochenabbauprozesse auf der Druckseite der orthodontischen Zahnbewegung fördert und somit die Zahnbewegung erleichtert.

## **1.9 Bewertung des Studiendesigns**

Die Verwendung einer gedehnten Monolayerkultur, wie sie in der vorliegenden Arbeit für die *in vitro* Untersuchung der HPdLF genutzt wurde, stellt eine gute Möglichkeit dar, die molekularen Mechanismen der orthodontischen Zahnbewegung auf ein Labormodell zu übertragen und zu untersuchen. Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen lassen sich jedoch nicht direkt mit den Verhältnissen *in vivo* vergleichen, da zelltypischen Interaktionen und der Einfluss des umliegenden Gewebes im Rahmen des Untersuchungsdesigns vernachlässigt wird. Zusätzlich zu klinischen und histologischen Studien ergänzen *in vitro* Studien jedoch mit ihren Ergebnissen den Wissensstand, im Falle der vorliegenden Arbeit insbesondere über Zusammenhänge auf zellulärer Ebene bei der orthodontischen Zahnbewegung.

Die Methode, eine mechanische Kraftapplikation mittels Glaszylinderkolben definierter Größe und Stärke zu simulieren, fand bereits im Rahmen mehrerer aktueller Studien Verwendung (Kanzaki et al., 2002; Schröder et al., 2018). In der vorliegenden Studie wurde eine Kraft von 2 g/cm<sup>2</sup> simuliert. Dies entspricht dem im Rahmen der kieferorthopädischen Therapie als optimal geltend und für eine physiologische Zahnbewegung essentiellen Kraftniveau (Meikle et al., 2006). Studien belegen eine Reduktion der RANKL-Genexpression bei einer statischen Krafteinwirkung von 3 g/cm<sup>2</sup> und eine Zelldestruktion bei noch stärkeren Kräften (Kanzaki et al., 2002). Für die Applikation von mechanischem Stress wurden in der Literatur weitere Methoden, wie etwa die computerkontrollierte Stretching-Methode (He et al., 2004) oder auch das Zentrifugieren, um eine statische Kompression der Zellen zu bewirken (Theilig et al., 2001), angewandt. Die beiden letzteren Methoden übersteigen jedoch häufig die optimale 2 g/cm<sup>2</sup> Krafteinwirkung auf die Zellen und sind daher in ihrer Anwendung limitiert. Bei der Zentrifugierung findet der Vorgang zudem nicht bei Körpertemperatur statt und simuliert somit nicht die physiologischen Bedingungen.

Die *real-time*-Polymerase-Kettenreaktion stellt ein besonders sensitives und vollautomatisiertes Verfahren zur Quantifizierung von mRNA dar und findet in vielen vergleichbaren Studien ihre Anwendung (Yamamoto et al., 2011). Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die mRNA nicht immer in ein Protein übersetzt wird und dass die Präsenz eines Proteins nicht zwangsläufig bedeutet, dass es biologisch aktiv ist (Meikle et al., 2006).

## **1.10 Schlussfolgerung und klinische Relevanz**

Eine erhöhte Tragezeit einer kieferorthopädischen Apparatur geht in vielen Fällen mit einem erhöhten Risiko für Wurzelresorptionen, Gingivitis und Kariesanfälligkeit einher (Limpanichkul et al., 2006). Um die Tragezeit einer kieferorthopädischen Apparatur zu verkürzen, gilt es einerseits die Zahnbewegung zu vereinfachen und andererseits die Knochenregenerierung zu beschleunigen. Eine Vielzahl von Behandlungsmethoden wurde erprobt, um dieses Ziel zu erreichen. Sie zeigten jedoch oftmals starke unerwünschte Nebenwirkungen (Yassaei et al., 2013).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die Bestrahlung mittels LLL zu einer Veränderung innerhalb des für den Knochenumbau wichtigen RANKL/OPG-Systems zugunsten von RANKL führt. Die alleinige mechanische Druckbelastung führt hingegen zu keiner signifikanten Änderung der RANKL/OPG-*ratio*. Bei der Kombination der beiden Einflussparameter mechanischer Druck und *low-level*-Laserbestrahlung zeigt sich eine Zunahme der RANKL/OPG-*ratio*, insbesondere bei der Verwendung eines Lasers mit hoher Energiedichte. Eine Zunahme der RANKL/OPG-*ratio* geht klinisch mit gesteigerten Knochenumbauprozessen einher und beschleunigt dadurch die Zahnbewegung.

Im Hinblick auf die klinische Anwendung sprechen diese Ergebnisse für eine Anwendung des *low-level*-Lasers, um die orthodontische Zahnbewegung zu beschleunigen. Mögliche Nebenwirkungen, die durch eine verlängerte Tragezeit der kieferorthopädischen Apparaturen bedingt ist, könnten dadurch eingedämmt werden.

Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um die Grenzen der Therapiemöglichkeiten zu ermitteln und den Nutzen der *low-level*-Laseranwendung in Bezug auf die Optimierung der kieferorthopädischen Behandlung abzuklären.

## Zusammenfassung

Das Parodontium wird während der kieferorthopädischen Zahnbewegung einer Druck- und Zugbelastung ausgesetzt. Diese Belastung führt Veränderungen in der Struktur des parodontalen Ligamentes und auf zellulärer Ebene herbei. Die mechanosensiblen Fibroblasten des parodontalen Ligaments (HPdLF) spielen hierbei eine wichtige Rolle. Das RANKL/OPG-Zytokinsystem ist dabei auf zellulärer Ebene ein wichtiges Signalsystem, das wesentlich an der Regulation des Knochenbaus beteiligt ist. Neben der mechanischen Belastung kann eine zusätzliche Bestrahlung mittels *low-level*-Laser zu einer veränderten Genexpression der Zellen führen. Ziel der vorliegenden *in vitro* Studie war es, die Veränderungen in der Genexpression von OPG und RANKL bei kombinierter Druck- und Laserbelastung unterschiedlicher energetischer Dichte zu untersuchen. Es wurden die Stoffwechselveränderungen von mechanisch belasteten Zellen mit und ohne *low-level*-Laserbestrahlung bei 1,25 J/cm<sup>2</sup> und 10 J/cm<sup>2</sup> Energiedichte sowie die Expressionsveränderung von OPG und RANKL bei solitärer Bestrahlung mittels *low-level*-Laser verglichen.

Die HPdLF wurden auf 6-Well-Platten kultiviert und anschließend für 48 h zur Simulierung der kieferorthopädischen Krafteinwirkung einer Druckbelastung mittels eines Glaszylinders mit einer definierten Größe und Gewicht ( $\varnothing$  33mm und 17,1g entspricht 2g/cm<sup>2</sup> Druckbelastung) ausgesetzt. Unter der Werkbank erfolgte jeweils nach 24 Stunden die *low-level*-Laserbestrahlung für 120 s bei 0,1 Watt (1,25 J/cm<sup>2</sup>) und für 240 s bei 0,4 Watt (10 J/cm<sup>2</sup>) bei einer Wellenlänge von 940 nm. Die Veränderungen der Genexpression für OPG und RANKL wurden mit Hilfe der *real-time*-Polymerase-Kettenreaktion dargestellt.

Sowohl eine alleinige mechanische Druckbelastung als auch die alleinige *low-level*-Laserbestrahlung mit einer niedrigen Energiedichte führte zu einer signifikant gesteigerten Genexpression von OPG und RANKL ( $p < 0,05$ ). Die Kombination aus mechanischer Druckbelastung und Bestrahlung mittels LLL von niedriger und auch bei hoher Energiedichte ließ die Genexpression von RANKL und OPG signifikant ansteigen. Die gesteigerte Genexpression von OPG fiel bei kombinierter Druckbelastung und LLL-Bestrahlung geringer aus als bei alleiniger LLL-Bestrahlung. Für RANKL konnte eine deutliche Steigerung der Genexpression bei

kombinierter Druckbelastung und LLL-Bestrahlung im Vergleich zur Genexpressionssteigerung bei alleiniger Bestrahlung festgestellt werden. Für die RANKL/OPG-*ratio* bedeutet dies eine signifikante Änderung bei der Einwirkung von alleiniger LLL Bestrahlung niedriger Energiedichte. Eine weitere Steigerung wurde bei kombinierter Druckbelastung und LLL-Bestrahlung gemessen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen die bereits in der aktuellen Literatur beschriebenen Veränderungen der kombinierten Einwirkung von mechanischer Kraft und LLL-Therapie auf den Zellstoffwechsel. Die LLL-Therapie scheint dabei über die Steigerung der Genexpression von RANKL zu einer erhöhten Osteoklastenaktivität in der Kompressionszone der Zahnbewegungsrichtung zu führen und somit möglicher Faktor für eine beschleunigte Zahnbewegung zu sein.

## Literatur

- Aihara N, Yamaguchi M, Kasai K. Low-energy irradiation stimulates formation of osteoclast-like cells via RANK expression in vitro. *Lasers Med Sci* 2006; 21(1):24–33.
- Andrade I, Taddei SRA, Garlet GP, Garlet TP, Teixeira AL, Silva TA et al. CCR5 down-regulates osteoclast function in orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 2009; 88(11):1037–41.
- Basdra EK, Papavassiliou AG, Huber LA. Rab and rho GTPases are involved in specific response of periodontal ligament fibroblasts to mechanical stretching. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1268(2):209–13.
- Beard P. Biomedical photoacoustic imaging. *Interface Focus* 2011; 1(4):602–31.
- Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol* 2012; 39(3):239–48.
- Bumann A, Carvalho RS, Schwarzer CL, Yen EH. Collagen synthesis from human PDL cells following orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod* 1997; 19(1):29–37.
- Chhatwani S, Gebhardt P, Ludwig B. Klinische Indikationen und Anwendung von Lasern in der Kieferorthopädie; 2017 [Stand: 27.12.2019]. Verfügbar unter: <https://www.quintessenz-news.de/klinische-indikationen-und-anwendung-von-lasern-in-der-kieferorthopaedie/>.
- Chen AC-H, Arany PR, Huang Y-Y, Tomkinson EM, Sharma SK, Kharkwal GB et al. Low-level laser therapy activates NF- $\kappa$ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS ONE* 2011; 6(7): e22453.
- Cho MI, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol* 2000 2000; 24:9–27.
- Choi JW, Arai C, Ishikawa M, Shimoda S, Nakamura Y. Fiber system degradation, and periostin and connective tissue growth factor level reduction, in the periodontal ligament of teeth in the absence of masticatory load. *J Periodont Res* 2011; 46(5):513–21.

- Colombo A, Cahill PA, Lally C. An analysis of the strain field in biaxial Flexcell membranes for different waveforms and frequencies. *Proc Inst Mech Eng H* 2008; 222(8):1235–45
- Coussens LM, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol* 1996; 3(11):895–904.
- Cruz DR, Kohara EK, Ribeiro MS, Wetter NU. Effects of low-intensity laser therapy on the orthodontic movement velocity of human teeth: a preliminary study. *Lasers Surg Med* 2004; 35(2):117–20.
- Davidovitch Z. Tooth movement. Boca Raton: CRC Press; 1991.
- Diercke K, Kohl A, Lux CJ, Erber R. Strain-dependent up-regulation of ephrin-B2 protein in periodontal ligament fibroblasts contributes to osteogenesis during tooth movement. *J Biol Chem* 2011; 286(43):37651–64.
- Doshi-Mehta G, Bhad-Patil WA. Efficacy of low-intensity laser therapy in reducing treatment time and orthodontic pain: a clinical investigation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2012; 141(3):289–97.
- Fujita S, Yamaguchi M, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. Low-energy laser stimulates tooth movement velocity via expression of RANK and RANKL. *Orthod Craniofac Res* 2008; 11(3):143–55.
- Furstman L, Bernick S. Clinical considerations of the periodontium. *Am J Orthod* 1972; 61(2):138–55.
- Garlet TP, Coelho U, Silva JS, Garlet GP. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *Eur J Oral Sci* 2007; 115(5):355–62.
- Gaus H. Der Low-Level-Laser in der Zahnarztpraxis. *Laser Journal 2* 2007:27ff.
- Ge MK, He WL, Chen J, Wen C, Yin X, Hu ZA et al. Efficacy of low-level laser therapy for accelerating tooth movement during orthodontic treatment: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci* 2015; 30(5):1609–18.

- Genc G, Kocadereli I, Tasar F, Kilinc K, El S, Sarkarati B. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on orthodontic tooth movement. *Lasers Med Sci* 2013; 28(1):41–7.
- Gomis-Rüth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K et al. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 1997; 389(6646):77–81.
- Greco M, Guida G, Perlino E, Marra E, Quagliariello E. Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163(3):1428–34.
- Harzer W. *Lehrbuch der Kieferorthopädie*. München: Hanser; 1999.
- He Y, Macarak EJ, Korostoff JM, Howard PS. Compression and tension: differential effects on matrix accumulation by periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Connect Tissue Res* 2004; 45(1):28–39.
- Henneman S, den Hoff JW von, Maltha JC. Mechanobiology of tooth movement. *Eur J Orthod* 2008; 30(3):299–306.
- Howard PS, Kucich U, Taliwal R, Korostoff JM. Mechanical forces alter extracellular matrix synthesis by human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodont Res* 1998; 33(8):500–8.
- Huang H, Williams RC, Kyrkanides S. Accelerated orthodontic tooth movement: molecular mechanisms. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2014; 146(5):620–32.
- Huang Y-Y, Chen AC-H, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response* 2009; 7(4):358–83.
- Jacobs C, Grimm S, Ziebart T, Walter C, Wehrbein H. Osteogenic differentiation of periodontal fibroblasts is dependent on the strength of mechanical strain. *Arch Oral Biol* 2013; 58(7):896–904.
- Jawad MM, Husein A, Azlina A, Alam MK, Hassan R, Shaari R. Effect of 940 nm low-level laser therapy on osteogenesis in vitro. *J Biomed Opt* 2013; 18(12):128001.

- Jepsen A. Root surface measurement and a method for x-ray determination of root surface area. *Acta Odontol Scand* 1963; 21:35–46.
- Kanzaki H, Chiba M, Arai K, Takahashi I, Haruyama N, Nishimura M et al. Local RANKL gene transfer to the periodontal tissue accelerates orthodontic tooth movement. *Gene Ther* 2006; 13(8):678–85.
- Kanzaki H, Chiba M, Takahashi I, Haruyama N, Nishimura M, Mitani H. Local OPG gene transfer to periodontal tissue inhibits orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 2004; 83(12):920–5.
- Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res* 2002; 17(2):210–20.
- Kapila YL, Lancero H, Johnson PW. The response of periodontal ligament cells to fibronectin. *J Periodontol* 1998; 69(9):1008–19.
- Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B, Biol* 1999; 49(1):1–17.
- Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg* 2005; 23(4):355–61.
- Kim S-J, Moon S-U, Kang S-G, Park Y-G. Effects of low-level laser therapy after Corticision on tooth movement and paradental remodeling. *Lasers Surg Med* 2009; 41(7):524–33.
- Kirschneck C, Proff P. Verfahren zur Beschleunigung der orthodontischen Zahnbewegung: DGKFO; 2017 [Stand: 27.12.2019]. Verfügbar unter: [https://www.dgkfo-vorstand.de/fileadmin/redaktion/veroeffentlichungen/Zahnbewegung\\_2017-07.pdf](https://www.dgkfo-vorstand.de/fileadmin/redaktion/veroeffentlichungen/Zahnbewegung_2017-07.pdf).
- Kiyosaki T, Mitsui N, Suzuki N, Shimizu N. Low-level laser therapy stimulates mineralization via increased Runx2 expression and ERK phosphorylation in osteoblasts. *Photomed Laser Surg* 2010; 28 Suppl 1:167-72.

- Kook S-H, Hwang J-M, Park J-S, Kim E-M, Heo J-S, Jeon Y-M et al. Mechanical force induces type I collagen expression in human periodontal ligament fibroblasts through activation of ERK/JNK and AP-1. *J Cell Biochem* 2009; 106(6):1060–7.
- Krishnan V, Davidovitch Z. On a path to unfolding the biological mechanisms of orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 2009; 88(7):597–608.
- Krishnan V, Davidovitch Z'e. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006; 129(4):469.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27(2-3):95–125.
- Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 49(3):187–98.
- Lekic P, McCulloch CA. Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec* 1996; 245(2):327–41.
- Lekic PC, Pender N, McCulloch CA. Is fibroblast heterogeneity relevant to the health, diseases, and treatments of periodontal tissues? *Crit Rev Oral Biol Med* 1997; 8(3):253–68.
- Limpanichkul W, Godfrey K, Srisuk N, Rattanayatikul C. Effects of low-level laser therapy on the rate of orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res* 2006; 9(1):38–43.
- Low E, Zoellner H, Kharbanda OP, Darendeliler MA. Expression of mRNA for osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa beta ligand (RANKL) during root resorption induced by the application of heavy orthodontic forces on rat molars. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2005; 128(4):497–503.
- Mabuchi R, Matsuzaka K, Shimono M. Cell proliferation and cell death in periodontal ligaments during orthodontic tooth movement. *J Periodont Res* 2002; 37(2):118–24.
- Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod* 2006; 28(3):221–40.

- Nakao K, Goto T, Gunjigake KK, Konoo T, Kobayashi S, Yamaguchi K. Intermittent force induces high RANKL expression in human periodontal ligament cells. *J Dent Res* 2007; 86(7):623–8.
- Nakayamada S, Okada Y, Saito K, Tamura M, Tanaka Y. Beta1 integrin/focal adhesion kinase-mediated signaling induces intercellular adhesion molecule 1 and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on osteoblasts and osteoclast maturation. *J Biol Chem* 2003; 278(46):45368–74.
- Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000* 2006; 40:11–28.
- Nanda R. Esthetics and biomechanics in orthodontics. Second edition. St. Louis, Missouri: Saunders, an imprint of Elsevier Inc; 2015.
- Nishiguchi M, Yuasa K, Saito K, Fukumoto E, Yamada A, Hasegawa T et al. Amelogenin is a negative regulator of osteoclastogenesis via downregulation of RANKL, M-CSF and fibronectin expression in osteoblasts. *Arch Oral Biol* 2007; 52(3):237–43.
- Nishijima Y, Yamaguchi M, Kojima T, Aihara N, Nakajima R, Kasai K. Levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement and effect of compression force on releases from periodontal ligament cells in vitro. *Orthod Craniofac Res* 2006; 9(2):63–70.
- Ozaki S, Kaneko S, Podyma-Inoue KA, Yanagishita M, Soma K. Modulation of extracellular matrix synthesis and alkaline phosphatase activity of periodontal ligament cells by mechanical stress. *J Periodont Res* 2005; 40(2):110–7.
- Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone* 1998; 22(4):347–54.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(3):221–33.
- Pavasant P, Yongchaitrakul T. Role of mechanical stress on the function of periodontal ligament cells. *Periodontol 2000* 2011; 56(1):154–65.

- Proff P, Reicheneder C, Faltermeier A, Kubein-Meesenburg D, Römer P. Effects of mechanical and bacterial stressors on cytokine and growth-factor expression in periodontal ligament cells. *J Orofac Orthop* 2014; 75(3):191–202.
- Proff P, Römer P. The molecular mechanism behind bone remodelling: a review. *Clin Oral Investig* 2009; 13(4):355–62.
- Reitemeier B, Schwenzer N, Ehrenfeld M, Biffar R. Einführung in die Zahnmedizin. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2006. (Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde).
- Roy R, Zhang B, Moses MA. Making the cut: protease-mediated regulation of angiogenesis. *Exp Cell Res* 2006; 312(5):608–22.
- Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1997; 111(5):525–32.
- Salehi P, Heidari S, Tanideh N, Torkan S. Effect of low-level laser irradiation on the rate and short-term stability of rotational tooth movement in dogs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2015; 147(5):578–86.
- Schmuth, Gottfried; Haunfelder, David; Diedrich, Peter; Horch, Hans-Henning (1994): Praxis der Zahnheilkunde. 3. Aufl. München: Urban & Schwarzenberg.
- Schröder A, Bauer K, Spanier G, Proff P, Wolf M, Kirschneck C. Expressionkinetik humaner Parodontalligamentfibroblasten in den frühen Phasen der kieferorthopädischen Zahnbewegung. *J Orofac Orthop* 2018; 79(5):337–51
- Seifi M, Shafeei HA, Daneshdoost S, Mir M. Effects of two types of low-level laser wave lengths (850 and 630 nm) on the orthodontic tooth movements in rabbits. *Lasers Med Sci* 2007; 22(4):261–4.
- Shinya K, Shinya A, Nakahara R, Nakasone Y, Shinya A. Characteristics of the tooth in the initial movement: the influence of the restraint site to the periodontal ligament and the alveolar bone. *Open Dent J* 2009; 3:85–91.
- Shirazi M, Ahmad Akhouni MS, Javadi E, Kamali A, Motahhari P, Rashidpour M et al. The effects of diode laser (660 nm) on the rate of tooth movements: an animal study. *Lasers Med Sci* 2015; 30(2):713–8.

- Silverstone LM, Saxton CA, Dogon IL, Fejerskov O. Variation in the pattern of acid etching of human dental enamel examined by scanning electron microscopy. *Caries Res* 1975; 9(5):373–87.
- Sutherland JC. Biological effects of polychromatic light. *Photochem Photobiol* 2002; 76(2):164–70.
- Takahashi I, Nishimura M, Onodera K, Bae J-W, Mitani H, Okazaki M et al. Expression of MMP-8 and MMP-13 genes in the periodontal ligament during tooth movement in rats. *J Dent Res* 2003; 82(8):646–51.
- Takahashi I, Onodera K, Nishimura M, Mitnai H, Sasano Y, Mitani H. Expression of genes for gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontal tissues during orthodontic tooth movement. *J Mol Histol* 2006; 37(8-9):333–42.
- Theilig C, Bernd A, Leyhausen G, Kaufmann R, Geurtsen W. Effects of mechanical force on primary human fibroblasts derived from the gingiva and the periodontal ligament. *J Dent Res* 2001; 80(8):1777–80.
- Tsuji K, Uno K, Zhang GX, Tamura M. Periodontal ligament cells under intermittent tensile stress regulate mRNA expression of osteoprotegerin and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and -2. *J Bone Miner Metab* 2004; 22(2):94–103.
- van Breugel HH, Bär PR. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med* 1992; 12(5):528–37.
- Waddington RJ, Embery G. Proteoglycans and orthodontic tooth movement. *J Orthod* 2001; 28(4):281–90.
- Wang JH-C, Thampatty BP, Lin J-S, Im H-J. Mechanoregulation of gene expression in fibroblasts. *Gene* 2007; 391(1-2):1–15.
- Wescott DC, Pinkerton MN, Gaffey BJ, Beggs KT, Milne TJ, Meikle MC. Osteogenic gene expression by human periodontal ligament cells under cyclic tension. *J Dent Res* 2007; 86(12):1212–6.
- Wichelhaus A, Eichenberg T. *Farbatlant der Zahnmedizin. 2., unveränderte Auflage.* Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2017.

- Wolf HFR, Rateitschak EM. Band 1: Parodontologie. 3., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag; 2003.
- Yamaguchi M. RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res* 2009; 12(2):113–9.
- Yamaguchi M, Aihara N, Kojima T, Kasai K. RANKL increase in compressed periodontal ligament cells from root resorption. *J Dent Res* 2006; 85(8):751–6.
- Yamamoto K, Yamamoto T, Ichioka H, Akamatsu Y, Oseko F, Mazda O et al. Effects of mechanical stress on cytokine production in mandible-derived osteoblasts. *Oral Dis* 2011; 17(7):712–9.
- Yassaei S, Fekrazad R, Shahraki N. Effect of low level laser therapy on orthodontic tooth movement: a review article. *J Dent (Tehran)* 2013; 10(3):264–72.
- Yoshida T, Yamaguchi M, Utsunomiya T, Kato M, Arai Y, Kaneda T et al. Low-energy laser irradiation accelerates the velocity of tooth movement via stimulation of the alveolar bone remodeling. *Orthod Craniofac Res* 2009; 12(4):289–98.
- Youssef M, Ashkar S, Hamade E, Gutknecht N, Lampert F, Mir M. The effect of low-level laser therapy during orthodontic movement: a preliminary study. *Lasers Med Sci* 2008; 23(1):27–33.

# Anhänge

## 1.11 Tabellen

Tabelle 1: Ergebnisse der RT-PCR ..... 25

## 1.12 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktionselemente einer Laserstrahlquelle .....	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung der einzelnen Versuchsgruppen .....	20
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung.....	21
Abbildung 4: <i>In vitro</i> Simulation von kieferorthopädischer Kompressionskraft auf kultivierte HPdLF .....	22
Abbildung 5: Relative OPG-Genexpression .....	26
Abbildung 6: Relative RANKL-Genexpression .....	27
Abbildung 7: RANKL/OPG- <i>ratio</i> .....	28

## 1.13 Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
ATP	Adenosintriphosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	<i>fetal calf serum</i>
g	Gramm
g/cm <sup>2</sup>	Gramm pro Quadratcentimeter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HPdLF	<i>human periodontal ligament fibroblasts</i>
J/cm <sup>2</sup>	Joule pro Quadratcentimeter
Laser	<i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LIPUS	<i>low-intensity pulsed ultrasound</i>
LLL	<i>low-level-Laser</i>
LLLT	<i>low-level-Laser-Therapie</i>
M-CSF	<i>macrophage-colony stimulating factors</i>
ml	Milliliter
MMP-8	Matrix-Metallproteinase-8
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter

nm	Nanometer
Ø	Durchschnitt
OPG	Osteoprotegerin
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaktion</i>
PDL	parodontales Ligament
RANK	<i>Receptor Actovator of NF-kB</i>
RANKL	<i>Receptor Actovator of NF-kB Ligand</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT-PCR	<i>real-time-polymerase chain reaction</i>
s	Sekunde
TIMP	<i>tissue inhibitors of matrix metallproteinases</i>
TNF	Tumornekrosefaktor

## 1.14 Liste verwendeter Materialien

6-Well-Platte (Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland)

Accutase (Innovative Cell Technologies Inc., San Diego, USA)

Antisense-Primer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Epic 10™ Laser (Biolase EUROPE GmbH, Floß, Deutschland)

peqGOLD Total RNA KIT (peqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland)

Fetales Kälberserum (FCS; Life Technologies GmbH, Damstadt, Deutschland)

Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Massachusetts, USA)

Glaszylinder mit einer definierten Größe und Gewicht ( $\varnothing$  33mm/ 17,1g = 2g/cm<sup>2</sup> Druckbelastung) (lokaler Optiker, Mainz, Deutschland)

Housekeeping Gene Aktin und Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)

humane parodontale Ligamentfibroblasten (HPdLF, Lonza Group Ltd, Basel, Schweiz)

Inkubator (HERAcell, Heraeus, Hanau, Deutschland)

IQ5 Optical System Software Version 2.0 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)

iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad Laboratories, Hercules, USA)

MasterMix (iQ SYBR Green Supermix, Biorad Laboratories, Hercules, USA;  
Sense- und Antisense-Primer; DNA/RNA freies Wasser, peqlab GmbH, Erlangen,  
Deutschland)

NCBI nucleotide library/Primer3-Design (National Center for Biotechnology  
Information, Rockville Pike/Bethesda, USA)

ND-1000 Spektrophotometer (PeqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland)

PBS (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland)

Penicillin/ Streptomycin/ Neomycin (Life Technologies GmbH, Darmstadt,  
Deutschland)

SPSS 19.0 (IBM-SPSS, Ehningen, Germany)

96-Well-PCR-Platte (TW-MT, 712282, Biozym Scientific GmbH, Hessisch  
Oldendorf, Deutschland)

Thermocycler iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Biorad  
Laboratories, München, Deutschland)

Trypsin-EDTA (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland)

## 1.15 Danksagung

Mein Dank gilt ..... für die freundliche Überlassung des Themas und der Betreuung dieser Dissertation. Besonders bedanken möchte ich mich bei ihm für die fundierte wissenschaftliche Ausbildung an der Universitätsmedizin Mainz.

..... danke ich sehr für die Möglichkeit die experimentellen Arbeiten der vorliegenden *in vitro* Studie im Labor der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten der Universitätsmedizin Mainz durchführen zu können.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei ..... und ..... für die intensive Unterstützung und Hilfestellung bei der Durchführung der Experimente, der statistischen Auswertung sowie der kompetenten fachlichen begleitenden Betreuung der Doktorarbeit.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie für ihre stetige Unterstützung während meiner Studienzeit in Mainz und meiner Weiterbildungszeit zum Kieferorthopäden in Bremen und Freiburg bedanken.

## **Tabellarischer Lebenslauf**