

Immunologische und mikrobiologische Parameter in der Sulkusflüssigkeit von
Patienten mit chronischer Parodontitis: Einfluss des Rauchens

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae dentariae

(Dr. med. dent.)

**Vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

Von Shayan Assadi

Geboren am 07.08.1987 in Babol (Iran)

Gutachter:

1. PD Dr. Arndt Güntsch, Jena

2. Prof. Dr. Wolfgang Pfister, Jena

3. PD Dr. Sigrun Eick, Bern

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.07.2014

Verzeichnis der Abkürzungen

GNR	Nichtraucher mit gesundem Parodont
GR	Raucher mit gesundem Parodont
PNR	Nichtraucher mit chronischer Parodontitis
PR	Raucher mit chronischer Parodontitis
aMMP-8	aktivierte Matrix-Metalloproteinase 8
IL	Interleukin
TNF	Tumornekrosefaktor
IFN	Interferon
A. a.	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
P. g.	Porphyromonas gingivalis
F. a.	Filifactor alocis
T. f.	Tannerella forsythia
T. d.	Treponema denticola
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
GSF	Gingivale Sulkusflüssigkeit
API	Approximalraum-Plaque-Index
SBI	Sulkus-Blutungs-Index
AL	Klinischer Attachmentlevel
PJ	Packungsjahre

Verzeichnis der Abkürzungen	III
Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
1.1 Chronische Parodontitis	5
1.2 Aggressive Parodontitis	5
1.2.1 Lokalisierte aggressive Parodontitis	6
1.2.2 Generalisierte aggressive Parodontitis	6
1.3 Mikrobiologie der Parodontitis	6
1.3.1 Aggregatibacter actinomycetemcomitans	7
1.3.2 Porphyromonas gingivalis	8
1.3.3 Tannerella forsythia	8
1.3.4 Treponema denticola	9
1.3.5 Filifactor alocis	9
1.4 Die Bedeutung der Sulkusflüssigkeit in der Parodontologie	9
1.4.1 Eigenschaften der gingivalen Sulkusflüssigkeit	10
1.4.2 Zytokine in der gingivalen Sulkusflüssigkeit	11
Interleukin-1 β (IL-1 β)	11
Interleukin-6 (IL-6)	12
Interleukin-8 (IL-8)	13
Tumornekrosefaktor- α /Tumornekrosefaktor- β (TNF- α / TNF- β)	14
Interleukin-4 (IL-4)	16
Interleukin-10 (IL-10)	16
1.4.3 Matrix-Metalloproteinase 8 (MMP8) – Biomarker der Parodontitis	17
1.5 Risikofaktoren für die Parodontitis	20
2. Ziele der Arbeit	22
3. Material und Methoden	23
3.1 Probandenauswahl	23
3.2 Untersuchungsmethoden	23
3.2.1 Klinische Untersuchungen	23
Modifizierter Sulkus-Blutungs-Index (SBI)	23
Approximalraum-Plaque-Index (API)	24
Sondierungstiefe und Klinischer Attachmentlevel (AL)	24
Packungsjahre (PJ)	25
3.2.2 Probeentnahme und Untersuchungen der Sulkusflüssigkeit	25
3.2.3 Quantitative Bestimmung der aMMP-8 Konzentration	26
3.2.4 Quantitative Bestimmung von Zytokinen in der Sulkusflüssigkeit	27
Testdurchführung	28
3.2.5 Mikrobiologische Untersuchungen	28
3.3 Statistische Auswertung	29
3.3.1 Studiendesign	29
3.3.2 Auswertungen	29
4. Ergebnisse	31
4.1 Charakterisierung der Probanden und klinische Parameter	31
4.1.1 Kategorisierung der Sondierungstiefen	33
4.2 Immunologische Parameter	34
4.2.1 Ergebnisse der Messungen der aMMP-8-Konzentration	34
4.2.2 Ergebnisse der Messungen der Zytokin-Konzentrationen	35
4.2.2.1 Pro-inflammatorische Zytokine	35
Interleukin-1 β	36

Interleukin-6	36
Interleukin-8	37
Tumornekrosefaktor- α	38
Tumornekrosefaktor- β	39
4.2.2.2 Anti-inflammatorische Zytokine	39
Interleukin-4	40
Interleukin-10	40
4.2.2.3 Verhältnis (Ratio) von IL-1 β zu IL-10	41
4.3 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen	41
4.4 Korrelationen der Daten	42
4.4.1 Korrelation der klinischen Daten mit der aMMP-8 Konzentration	42
4.4.2 Korrelation der immunologischen und mikrobiologischen Daten mit der aMMP-8 Konzentration	44
Immunologische Parameter	44
Mikrobiologische Parameter	44
4.4.3 Korrelation der klinischen Daten untereinander	45
4.4.4 Korrelation der Zytokine untereinander	46
4.4.5 Korrelation der mikrobiologischen Ergebnisse mit den klinischen Daten	47
5. Diskussion	48
5.1 Einordnung in die wissenschaftliche Literatur	48
5.2 Diskussion der immunologischen Ergebnisse	50
5.2.1 Zytokine	50
5.2.1.1 Pro-inflammatorische Zytokine	50
IL-1 β	50
IL-6	51
IL-8	51
TNF- α	52
TNF- β	53
5.2.1.2 Anti-inflammatorische Zytokine	53
IL-4	53
IL-10	54
5.2.1.3 Verhältnis von IL-1 β zu IL-10	55
5.2.2 Aktivierte Matrix Metalloproteinase-8 (aMMP-8)	55
5.3 Diskussion der mikrobiologischen Ergebnisse	58
6. Schlussfolgerungen	59
7. Literaturverzeichnis	60
8. Anhang	78
8.1 Danksagung	78
8.2 Lebenslauf	79
8.3 Ehrenwörtliche Erklärung	81

Zusammenfassung

Die Parodontitis resultiert aus einem Ungleich zwischen parodontalpathogenen Bakterien sowie der lokalen und systemischen Immunabwehr. In der Sulkusflüssigkeit lassen sich immunologische und mikrobiologische Parameter messen, anhand derer Rückschlüsse auf den Pathogeneseprozess gezogen werden können. Als potentieller Biomarker der Wirtsantwort wurde vor mehr als zwanzig Jahren die aktivierte Matrix-Metalloproteinase 8 (aMMP-8) identifiziert. Sie wird vor allem von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) als Reaktion auf mikrobielle Belastung gebildet. Sie prozessiert das Kollagen im Parodont und bahnt damit den Granulozyten den Weg zur Abwehr von Keimen. Durch körpereigene Abwehrproteine und die damit einhergehende Entzündung kommt es zur Destruktion parodontalen Gewebes, was mit Attachmentverlust einher geht.

Das Rauchen von Zigaretten stellt einen Risikofaktor für die Parodontitis dar, indem es unter anderem die Immunreaktion auf die Parodontitis modifiziert. Es ist bereits bekannt, dass der Tabakrauch die Funktion von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten beeinträchtigt. Der Einfluss des Rauchens auf die aMMP-8 wurde bisher nicht untersucht.

Eine frühe Diagnose des Gewebeuntergangs bei Parodontitis, beispielsweise anhand von Biomarkern, die einen Entzündungszustand anzeigen bevor klinische Zeichen feststellbar sind, wird insbesondere dann wichtig, wenn eine frühe Prävention des irreversiblen Attachmentverlustes eingeleitet werden soll.

Ob Rauchen einen Einfluss auf immunologische und mikrobiologische Parameter bei Patienten mit generalisierter chronischer Parodontitis hat, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Das Ziel der Analyse der gingivalen Sulkusflüssigkeit war es klinische, mikrobielle und immunologische Parameter miteinander zu verknüpfen, um einen Beitrag zur Risikobestimmung für die Parodontitis zu leisten. Dabei soll vor allem geklärt werden, ob die aMMP-8 Konzentration vom Tabakkonsum abhängig ist und ob es sich auch bei Rauchern als Biomarker der Parodontitis eignet. Weiterhin sollte der klinische Zustand bei Rauchern auf einer möglichen Korrelation mit der aMMP-8 Konzentration überprüft werden. Eine umfassende Untersuchung von sieben Zytokinen und fünf wichtigen parodontalpathogenen Keimen sollte mögliche Zusammenhänge zwischen der Immunreaktion und der aMMP-8 Konzentration bei Rauchern aufdecken.

In einer Querschnittsstudie wurden insgesamt 60 Probanden untersucht. Von je 30 parodontal gesunden Probanden bzw. Patienten mit chronischer Parodontitis (davon jeweils die Hälfte

Raucher) erfolgte nach Aufklärung und Einwilligung in die Studie die Entnahme von Sulkusflüssigkeit aus der tiefsten Tasche je Quadrant. Die Proben der Sulkusflüssigkeit wurden mit einem Enzymimmunoassay auf folgende Parameter untersucht: aMMP-8-Konzentration, Konzentration von Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Tumornekrosefaktor- β (TNF- β), Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-10 (IL-10). Per Real-Time PCR wurde die Quantität der Keime *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Treponema denticola* (*T. denticola*), *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) und *Filifactor alocis* (*F. alocis*) bestimmt. Die Konzentration von aMMP-8 wurde als primärer Zielparameter definiert. Eine a priori Fallzahlplanung erfolgte für diesen Parameter anhand bereits vorliegender Daten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass die Bestimmung der aMMP-8 eine Differenzierung zwischen den Gruppen mit parodontal Gesunden und Parodontitis erlaubt ($p \leq 0,05$). Rauchen scheint hier keinen Einfluss zu haben. Es bestehen signifikante Korrelationen zwischen den ermittelten Werten der aMMP-8 und verschiedener klinischer Parameter.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass je höher die Konzentration der aMMP-8, desto höher die Blutungsneigung, die Sondierungstiefe und der Attachmentlevel ist (je $p \leq 0,05$). Des Weiteren besteht ein Dosis-Zeit-abhängiger Effekt des Rauchens (Anzahl der pack-years) und den Werten der aMMP-8. Je höher die pack-years, desto höher die aMMP-8 Konzentration ($p \leq 0,05$).

Die untersuchten parodontalpathogenen Bakterien wurden in signifikant höheren Keimzahlen bei Parodontitispatienten ermittelt. Rauchen schien hier keinen Einfluss zu haben. Lediglich *Filifactor alocis* wurde signifikant häufiger bei Rauchern gefunden als bei Nichtrauchern mit Parodontitis. Das Verhältnis pro- zu anti-inflammatorischen Interleukinen, ausgedrückt als IL1/IL10-Ratio, war bei Parodontitispatienten deutlich Richtung Inflammation verschoben.

1. Einleitung

Die Parodontitis ist eine Infektionskrankheit, bei deren Ätiologie primär orale Mikroorganismen eine wichtige Rolle spielen (Socransky 1977).

Seit den 1950er- Jahren wurde die Prävalenz von Parodontitis weltweit untersucht. Aktuell zur Verfügung stehende Daten zeigen eine steigende Tendenz der Parodontopathien in den Industrieländern. Die Ergebnisse der IV. Deutschen Mundgesundheits-Studie (DMS IV) aus dem Jahre 2006 zeigen, dass die Parodontalerkrankungen in der deutschen Bevölkerung weit verbreitet sind und die Prävalenz der Erkrankung seit der DMS III im Jahre 1997 gestiegen ist. Die DMS IV zeigt, dass unter den Erwachsenen 52,7% unter mittelschweren und 20,5% unter schweren Formen der Parodontitis leiden. Bei den Senioren sind 48,0% von einer mittelschweren und 39,8% von einer schweren Form dieser Erkrankung betroffen. Als besondere Risikofaktoren für schwere Formen der Parodontitis erwiesen sich ein niedriger Bildungsstand und das Rauchen. In der Altersgruppe der Erwachsenen hatten Raucher mit einfacher Schulbildung im Vergleich zum Durchschnitt der Altersgruppe ein um den Faktor 3,3 höheres Risiko, an einer schweren Parodontitis zu erkranken. Schwere Formen der Parodontitis sind außerdem bei Männern häufiger als bei Frauen anzutreffen (Micheelis und Schiffner 2006).

Der Parodontitis geht zumeist eine unbehandelte und über Wochen bestehende, etablierte Gingivitis voraus (Page und Schroeder 1976). Spezifische Keime wurden für die Progression und Manifestation einer Parodontitis verantwortlich gemacht (Socransky 1977), jedoch gibt es immer noch keine klare Evidenz, die dies schlüssig belegt (Bartold und Van Dyke 2013).

Frühe Studien von Loe und Mitarbeiter zeigen, dass die frühzeitige mechanische Entfernung der Plaque (Loe et al. 1965) zur Rückbildung der Gingivitis führt und somit die Entstehung einer Parodontitis verhindert werden kann. Die kausale Therapie der Parodontitis besteht darin, die Zahl der Parodontalpathogene zu verringern und so die Progression der Entzündung zu stoppen, damit das infizierte Gewebe ausheilen kann (Magnusson et al. 1994). Dies ist durch mechanische und antimikrobielle Methoden möglich. Die wichtigste Rolle spielt hierbei die mechanische Entfernung der supra-, und subgingivalen Plaque (Scaling) sowie die Wurzelglättung (Root planing) mit Hilfe von Handinstrumenten oder mit Ultraschallgeräten (Oosterwaal et al. 1987). Die wichtigsten Ziele hierbei sind die Entfernung von bakteriellen Ablagerungen von der Wurzeloberfläche, sowie die Entfernung von Endotoxin und bakteriell infiziertem Wurzelzement (Pattison 1996). Dabei erzielt man mit Handinstrumenten und Ultraschallgeräten ungefähr gleichwertige Ergebnisse (Oosterwaal et al. 1987). Orale antibakterielle Lösungen wie z.B. Chlorhexidin oder Antibiotika (Haffajee et al. 2003)

können die mechanische Therapie ergänzen (Brex et al. 1990).

Als Kriterium für die erfolgreiche Therapie wurde die Verminderung der Keimzahl im Verlauf der Behandlung heran gezogen. Dabei lag das Augenmerk vor allem auf der Reduktion der Leitkeime *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) und *Treponema denticola* (*T. denticola*) (Slots und Listgarten 1988, van Winkelhoff und de Graaff 1991), die für die Initiation und Progression der Parodontitiden verantwortlich gemacht werden (Socransky und Haffajee 1994).

Zur Untersuchung der Bakterien-Wirt-Interaktionen eignet sich insbesondere als Untersuchungsmedium die Sulkusflüssigkeit (Guentsch et al. 2011). Gewonnene Proben der Sulkusflüssigkeit haben den Vorteil, dass in diesen zusätzlich zu mikrobiellen, auch immunologische und systemische Biomarker enthalten sind, die den Entzündungsprozess der Parodontopathien charakterisieren können (Lamster und Ahlo 2007).

So gibt es beispielsweise Studien, die die Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen und einigen bestimmten Botenstoffen des Immunsystems, sogenannten Zytokinen, bei parodontalen Erkrankungen untersuchten (Ejeil et al. 2003, Sorsa et al. 2004). Dabei deutet sich an, dass die aktivierte Matrix-Metalloproteinase 8 (aMMP-8) ein wichtiger Biomarker des Entzündungsprozesses ist (Kraft-Neumärker et al. 2012, Sorsa et al. 2004). Zusätzlich spielen bestimmte Zytokine, wie beispielsweise TNF- α , IL-1 β , IL-8 und IL-6 eine wichtige Rolle bei der Wirtsantwort auf die bakterielle Infektion (Ejeil et al. 2003, Masada et al. 1990, Rossomando et al. 1990).

Neben endogenen Faktoren wie z.B. Diabetes (Southerland et al. 2005) ist bekannt, dass exogene Risikofaktoren wie beispielsweise Stress und Tabakkonsum negative Auswirkungen auf das Immunsystem haben und damit zusätzlich die Parodontitisprogression begünstigen können (Mooney et al. 2001, Guentsch et al. 2006, Bergström 2003)

Aus der internationalen Literatur ist allerdings nicht klar zu entnehmen, ob Tabakkonsum Einfluss auf die Aktivität der aMMP-8 hat.

Die Parodontitis wird von einer kleinen Gruppe von gram-negativen, anaeroben oder microaerophilen Bakterien, die den subgingivalen Bereich kolonisieren, ausgelöst (Page und Kornman 1997). Ob Mikroorganismen die alleinige Ursache für die Entstehung einer Parodontitis darstellen, muss noch geklärt werden (Dongari-Bagtzoglou 2008).

Der Wirtorganismus antwortet auf Antigene, Bakterien und ihre Virulenzfaktoren mit einer

entzündlichen Reaktion. Dabei werden Zytokine, Eikosanoide und andere Entzündungsmediatoren wie z.B. Kinine und Matrix-Metalloproteinasen ausgeschüttet, die dann die Destruktion von Knochen und Bindegewebe einleiten. Diese Vorgänge werden zudem von endogenen und exogenen Faktoren modifiziert (Page und Kornman 1997).

Die Parodontalerkrankungen wurden im November 1999 auf dem „International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions“ klassifiziert (Armitage 1999). Die beiden wichtigsten Parodontitisformen sind die aggressive und die chronische Parodontitis.

1.1 Chronische Parodontitis

Die chronische Parodontitis (cP) ist eine infektiöse Erkrankung, die mit einer Entzündung des Zahnhalteapparates und progressivem Verlust von Attachment und Knochen einhergeht. Es bilden sich parodontale Taschen und/oder gingivale Rezessionen. Die chronische Parodontitis ist die am meisten vorkommende Form der Parodontitis. Die Prävalenz und der Schweregrad der Krankheit steigen mit zunehmendem Alter. Man unterscheidet eine lokalisierte von einer generalisierten Form (> 30 % der Parodontien betroffen) (Lindhe et al. 1999).

Der Schweregrad kann für einzelne Zähne und Parodontien oder für die gesamte Dentition angegeben werden. Dabei unterscheidet man entsprechend des Attachmentverlustes eine leichte (1 – 2 mm), moderate (3 - 4 mm) und schwere (\geq 5 mm) chronische Parodontitis (Lindhe et al. 1999).

Weitere Charakteristika der chronischen Parodontitis sind:

- Das Ausmaß des Gewebsuntergangs steht im Zusammenhang mit lokalen Reizfaktoren
- Häufiges Vorkommen von subgingivalen Konkrementen
- Kann durch andere Einflüsse wie das Rauchen von Zigaretten und emotionalem Stress begünstigt werden (Lindhe et al. 1999)

1.2 Aggressive Parodontitis

Die aggressive Parodontitis wird in eine lokalisierte und eine generalisierte Form unterteilt. Diese haben einige gemeinsame Merkmale. Erstens sind die betroffenen Patienten mit Ausnahme der Parodontitis klinisch gesund. Weiterhin findet bei dieser Form der Parodontitis ein rapider Attachment- und Knochenverlust statt, während auch die Familienanamnese positiv ist.

Sekundäre Merkmale sind:

- Die Menge an bakterieller Ablagerung ist nicht proportional zum Gewebsuntergang
- Erhöhtes Vorkommen der Bakterien *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis*
- Abnorme Phagozytenfunktionen
- Hyperaktive Makrophagen, deren Vorkommen mit einem erhöhtem Level von Prostaglandin E2 und IL-1 β einher geht

Es müssen nicht alle Merkmale der Krankheit vorliegen (Lang et al. 1999).

1.2.1 Lokalisierte aggressive Parodontitis

Die lokalisierte Form manifestiert sich typischerweise an den 1. Molaren und den Inzisivi. Der Erkrankungsbeginn liegt zumeist in der Pubertät. Die Antikörper-Titer gegen die Parodontalpathogene sind im Serum erhöht (Lang et al. 1999).

1.2.2 Generalisierte aggressive Parodontitis

Die generalisierte Form beginnt meist vor dem 30. Lebensjahr. Es sind drei Zähne zusätzlich zum ersten Molaren oder Inzisivus mit generalisiertem Attachmentverlust betroffen. Risikofaktoren wie emotionaler Stress, Zigarettenrauchen, Medikamente, Sexualhormone und systemische Erkrankungen wie Diabetes mellitus begünstigen ihre Entwicklung (Lang et al. 1999).

1.3 Mikrobiologie der Parodontitis

Die Bakterien der supra- und vor allem der subgingivalen Plaque spielen in der Pathogenese der Parodontitis eine wichtige Rolle (Löe et al. 1965). Es wurden mehr als 700 verschiedene Bakterienspezies in der Mundhöhle nachgewiesen (Paster et al. 2006). Die Anwesenheit der meisten Stämme ist physiologisch. Bakterien, ihre Metaboliten und Produkte sind generell notwendig und nützlich für die Gesundheitserhaltung des Parodonts (Socransky et al. 1988). Von der Gesamtzahl der Spezies werden ungefähr zwanzig als parodontalpathogen angesehen, wobei wiederum nur einige von diesen in der Lage sind, tatsächlich die Krankheit Parodontitis auszulösen (Genco et al. 1996).

Die physiologische Flora besteht vor allem aus grampositiven, fakultativ anaeroben Kokken und unbeweglichen Stäbchen. Sie haben sich im Laufe der Evolution besser an die Verhältnisse der menschlichen Mundhöhle adaptiert. Parodontalpathogene Mikroorganismen

sind dagegen überwiegend gramnegativ und obligat anaerob (Carlsson 1989).

Zu diesen Mikroorganismen gehören *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* (Genco et al. 1996, Haffajee und Socransky 1994). In der jüngeren Literatur wurde auch der Keim *Filifactor alocis* (*F. alocis*) mit parodontalen Erkrankungen in Bezug gebracht (Kumar et al. 2003) und für die Verschlechterung des parodontalen Zustandes verantwortlich gemacht (Kumar et al. 2006).

Auch bei parodontal Gesunden lassen sich Parodontalpathogene nachweisen, ohne dass diese eine Parodontitis entwickeln (Bartold und Van Dyke 2013). Somit scheint es noch ungeklärt, ob Bakterien tatsächlich kausal an der Parodontitis beteiligt oder mit jener nur assoziiert sind (Dongari-Bagtzoglou 2008). Es gibt Hinweise, dass es sich bei den Keimen in der parodontalen Tasche, die zurzeit als pathogen angesehen werden, um kommensale Keime handelt. Diese verursachen die Erkrankung scheinbar nur, wenn eine Wirtsempfänglichkeit vorliegt und eine Parodontitis induziert wird (Berezow und Darveau 2011).

1.3.1 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Diese Spezies wurde schon früh als eine der ersten möglichen parodontalpathogenen Keime diskutiert (Mandell und Socransky 1981)

A. actinomycetemcomitans ist ein kleines, nicht bewegliches, gramnegatives und kapnophiles Stäbchen (Fives-Taylor et al. 1999). Es wird vorwiegend mit der aggressiven Parodontitis in Bezug gebracht (Fine et al. 2006), wobei bei erfolgreicher Therapie eine Eliminierung oder zumindest Verringerung der Spezies in der subgingivalen Flora nachgewiesen werden kann. Man wies nach, dass viele Probanden mit aggressiver Parodontitis einen erhöhten Serumantikörper-Titer gegen *A. actinomycetemcomitans* hatten (Ebersole et al. 1985). *A. actinomycetemcomitans* hat eine Vielzahl an Virulenzfaktoren. Es kann an vielen Strukturen der Mundhöhle, wie z.B. Zahnoberfläche, extrazellulären Matrix-Proteinen oder anderen Bakterien adhären (Meyer und Fives-Taylor 1994). Es produziert unter anderem Leukotoxin, mit dem es polymorphkernige Leukozyten und Monozyten zerstört und damit die Immunabwehr beeinflusst (Henderson et al. 2003). Es induziert Apoptose (Kato et al. 2000) und hat gewebsdestruierende Enzyme wie Kollagenasen, Epithelotoxin und Hyaluronidasen, mit denen es in das Gewebe eindringen und dieses zerstören kann. Es hemmt die Fibroblastenfunktion und stört damit die Kollagensynthese, wodurch vermehrt Bindegewebe abgebaut wird und es zu Attachmentverlust kommt. Weiterhin kann es mit Endotoxin und durch Störung der Osteoklastenaktivität zu Knochenabbau beitragen (Fives-Taylor et al. 1999).

1.3.2 *Porphyromonas gingivalis*

Dieses Bakterium ist ein gramnegatives, schwarz pigmentiertes, anaerobes und unbewegliches Stäbchen. Es bildet orale Kolonien und ist abhängig von der Anwesenheit anderer Keimspezies (Nelson et al. 2003). Es ist ein asacharolytischer Keim und braucht Häm sowie Peptide zum wachsen (Lamont und Jenkinson 1998). Mit Hilfe von Fimbrillin hat *P. gingivalis* die Fähigkeit zur Koaggregation, was bedeutet, dass es nicht nur an Proteinen der extrazellulären Matrix, Epithelzellen oder Speichelmoleküle adhäreren kann (Goulbourne und Ellen 1991), sondern auch an Mikroorganismen, die sich bereits als Biofilm auf dem Zahn und den epithelialen Flächen befinden (Lamont et al. 1994).

Es ist in der Lage einige proteolytische Enzyme wie beispielsweise Kollagenasen, Fibrinolysin (Holt et al. 1999) und Gingipain (Imamura 2003) zu produzieren, mit dem es Gewebe zerstören kann. Es befindet sich vor allem in parodontalen Taschen mit erhöhter Sondierungstiefe (Haffajee und Socransky 1994). Zudem induziert es gingivale Blutungen und fördert damit die Entzündung der Gingiva (Morinushi et al. 2000). Bei erfolgreicher Therapie der Parodontitis ist eine Eliminierung oder quantitative Verringerung der Spezies zu verzeichnen (Lamont und Jenkinson 1998).

Porphyromonas gingivalis wird vor allem bei chronischer Parodontitis nachgewiesen (Haffajee und Socransky 1994), aber auch zusammen mit *A. actinomycetemcomitans* mit der aggressiven Parodontitis in Verbindung gebracht (Pfister und Eick 2001).

1.3.3 *Tannerella forsythia*

Im Jahre 1979 wurde dieses Bakterium erstmalig als *Bacteriodes forsythus* beschrieben (Tanner et al. 1979). Sie war nur schwer zu kultivieren. Die Kolonien brauchten meistens 7-14 Tage zum wachsen (Haffajee und Socransky 1994). Bei *T. forsythia* handelt es sich um ein gramnegatives, anaerobes, spindelförmiges und hochpleomorphes Stäbchen. Es zeigte sich, dass sich ihr Wachstum bei Anwesenheit des *Fusobacterium nucleatum* verstärkte. Auch klinisch gesehen ist *T. forsythia* in der subgingivalen Plaque mit *Fusobacterium nucleatum* und *P. gingivalis* vorzufinden (Socransky et al. 1988). *T. forsythia* kommt mehr in der subgingivalen, als in der supragingivalen Plaque vor. Listgarten und Mitarbeiter fanden heraus, dass Serum-Antikörper gegen *T. forsythia* am häufigsten bei Patienten mit refraktärer Parodontitis erhöht waren (Listgarten et al. 1993). Als einer seiner Virulenzfaktoren ist *T. forsythia* genauso wie *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* auch in der Lage in Epithelzellen einzudringen (Genco et al. 1996).

1.3.4 *Treponema denticola*

Dieses zur Gruppe der Spirochäten gehörendes gramnegatives, anaerobes und bewegliches Bakterium, findet man öfter in Regionen mit erhöhter Sondierungstiefe (Riviere et al. 1992, Simonson et al. 1988). Bei erfolgreicher Therapie von befallenen Regionen, war die Eliminierung von *T. denticola* zu verzeichnen, wobei bei fehlgeschlagener Therapie sich die Anzahl nicht änderte oder sogar anstieg (Simonson et al. 1992).

Die Spirochäten werden auch mit der nekrotisierend ulzerierenden Gingivitis in Bezug gebracht (Riviere et al. 1991). *T. denticola* kann an Epithelzellen, Fibroblasten und extrazellulärer Matrix des parodontalen Gewebes haften, einige gewebstreuierende Virulenzfaktoren, wie beispielsweise Peptidasen, Trypsin, und chymotrypsin-artige Proteinase produzieren. Zudem ist es zur Hämolyse fähig (Sela 2001).

1.3.5 *Filifactor alocis*

Filifactor alocis ist ein stäbchenförmiger, grampositiver und obligat anaerober Keim. Wie *P. gingivalis* und *T. denticola* (Loesche 1986), zeigt auch *Filifactor alocis* eine dem Trypsin ähnliche Aktivität (Maiden et al. 1996). Es ist in der Lage unter oxidativem Stress zu überleben und induziert zudem die Invasion von *P. gingivalis* in epitheliale Zellen (Aruni et al. 2011). In der Literatur wurde *F. alocis* bei Patienten mit chronischer (Kumar et al. 2003, Schlafer et al. 2010) und aggressiver Parodontitis in erhöhter Menge nachgewiesen (Hutter et al. 2003, Schlafer et al. 2010). Es ist hierbei für die Verschlechterung des parodontalen Zustandes verantwortlich (Kumar et al. 2006) und eignet sich gut als mikrobiologischer Marker für Parodontitis (Kumar et al. 2006, Schlafer et al. 2010).

1.4 Die Bedeutung der Sulkusflüssigkeit in der Parodontologie

Der diagnostische Wert der gingivalen Sulkusflüssigkeit (GSF) wurde vor mehr als fünfzig Jahren erkannt. Brill und Krasse wiesen damals nach, dass eine fluoreszierende Farbe, die Hunden in den systemischen Kreislauf injiziert wurde, mittels Filterpapier im gingivalen Sulkus wieder zu erkennen ist (Brill und Krasse 1958). Diese Entdeckung ließ vermuten, dass das Epithel des gingivalen Sulkus für kleine Moleküle durchlässig sei und somit die Passage von Gewebsflüssigkeit in den Sulkus eine Rolle in der oralen Immunabwehr spielen könnte (Brill und Björn 1959). Daraufhin wurde vorgeschlagen, die Sulkusflüssigkeit zur quantitativen Bewertung der Parodontitis zu untersuchen (Brill 1960).

Ungefähr zwanzig Jahre später konnten erstmals Enzyme und einige Indikatoren der Immunabwehr in der Sulkusflüssigkeit nachgewiesen werden (Attström und Egelberg 1970,

Goodson et al. 1974). Trotzdem blieb das Interesse in die Sulkusflüssigkeit zurückhaltend, bis durch Studien, der schubweise Charakter der Parodontitis (Socransky et al. 1984) und die Wichtigkeit der Immunantwort auf die Parodontitis klar wurde (Genco und Slots 1984).

Seitdem gewinnt die Sulkusflüssigkeit vor allem in der Diagnostik von Parodontalerkrankungen immer mehr an Bedeutung. Heute ist bekannt, dass in ihr sowohl mikrobiologische als auch immunologische und systemische Indikatoren gemessen werden können (Loos und Tjoa 2005, Armitage 2004, Ebersole 2003).

1.4.1 Eigenschaften der gingivalen Sulkusflüssigkeit

Eine kleine Einsenkung am Zahn von 0,1 - 0,5 mm Tiefe wird als gingivaler Sulkus bezeichnet. Er wird von der Zahnoberfläche, dem oralen Sulkusepithel und den koronalen Zellen des Saumepithels begrenzt (Lindhe et al. 2004).

Die gingivale Sulkusflüssigkeit ist ein Serumtranssudat des sich im gingivalen Corium befindenden Blutgefäßplexus. Bei vorliegender Inflammation stellt es ein entzündliches Exsudat dar (Alfano 1974). Die Sulkusflüssigkeit entleert den Sulkus von Fremdschubstanzen. Es hat somit einen isolierenden Effekt und ist relativ vom Speichel getrennt (Goodson 2003).

Die Menge von Sulkusfluid in einer Tasche steigt, sowohl klinisch als auch histometrisch, mit dem Fortschreiten des gingivalen Entzündungsstatus (Armitage 1995).

Die aus dem gingivalen Sulkus entnommene Flüssigkeit spiegelt die Bestandteile des Serums, die zelluläre Immunantwort im Parodont und Teile des gingivalen Sulkus wieder. Zur Entnahme der GSF gibt es verschiedene Methoden. Bei den Wasch-Techniken mit Mikropipetten gibt es zwei Möglichkeiten: bei der ersten Technik wird der Sulkus mit einer balancierten Salzlösung mittels Mikropipette ausgewaschen (Skapski und Lehner 1976). Bei der zweiten Methode wird mit Hilfe eines Acryl-Stents das gingivale Gewebe vom Rest der Mundhöhle abgegrenzt, um daraufhin die GSF mit Hilfe einer Salzlösung aus dem Sulkus heraus zu waschen (Oppenheim 1970). Weiterhin ist es möglich die Sulkusflüssigkeit mittels herkömmlicher Papierspitzen oder mit Filterpapierstreifen, die für eine bestimmte Zeit in den Sulkus eingeführt werden, zu sammeln (Griffiths 2003). Die Flüssigkeit, die von diesen absorbiert wird, wird eluiert und weiter analysiert (Lamster und Ahlo 2007). Ein Vergleich der genannten Entnahmemethoden zeigte, dass bei der Waschmethode zwar mehr Zytokine aus dem Sulkus gesammelt werden konnten, jedoch Papierstreifen sich besser dazu eignen, um sowohl immunologische, als auch mikrobielle Parameter zu messen. Es wurde vorgeschlagen Filterpapierstreifen bei der Probeentnahme zu präferieren, während die Waschmethoden alternativ für spezielle, Fragestellungen dienen können (Guentsch et al.

2011). Die biochemische Analyse der Sulkusflüssigkeit bietet ein non-invasives Mittel zur Untersuchung der Wirtsantwort bei parodontalen Krankheiten (Lamster 1997). Die GSF ist meistens eine klare Flüssigkeit, wobei in ihr Leukozyten wie polymorphkernige neutrophile Granulozyten (Andersen und Cimasoni 1993), Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten, enthalten sein können, die sie ein wenig trüben können (Skapski und Lehner 1976). Zusätzlich findet man in ihr, außer den Leukozyten, diverse andere Zellpopulationen, wie Mikroorganismen aus der Plaque und abgeschilferte Epithelzellen, die die hohe Teilungsrate der Sulkusepithelzellen widerspiegeln (Egelberg 1963). Die Präsenz von roten Blutkörperchen spielt eine untergeordnete Rolle und weist auf eine Verletzung der mikrovaskulären Gefäße hin, das typisch für eine fortgeschrittene Entzündung ist (Delima und Van Dyke 2003). Wie Delima und Van Dyke zusammenstellen (Delima und Van Dyke 2003), wird die GSF als ein Gemisch aus Blut, Bestandteilen des Wirtsgewebes und der subgingivalen Plaque betrachtet, das Elektrolyte, Proteine, kleine organische Moleküle, Zytokine, spezifische Antikörper, bakterielle Antigene und Enzyme, sowohl vom Wirt als auch von Mikroorganismen stammend, enthält (Golub et al. 1981, Lamster 1997, Nakashima et al. 1996).

1.4.2 Zytokine in der gingivalen Sulkusflüssigkeit

Die immunologische Wirtsantwort in Form von Botenstoffen, so genannten Zytokinen, die sich im Sulkus befinden, spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Parodontitis (Seymour 1991). Sobald die epitheliale Barriere des Sulkus mit ihren antimikrobiellen Peptiden überwunden ist, kommt der adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle zu. Hierbei spielt das Gleichgewicht zwischen den Th1- und den Th2-Zytokinen eine zentrale Rolle. Anti-inflammatorische Th2 Zytokine wie beispielsweise das Interleukin-10 haben dabei einen protektiven Effekt, während inflammatorische Th1-Zytokine wie Interleukin-2 oder Interferon- γ zum Gewebeverlust und einer Verstärkung der Parodontitis führen (Gemmell und Seymour 2004).

Interleukin-1 β (IL-1 β)

Das Interleukin-1 (IL-1) ist ein Zytokin, das von aktivierten Phagozyten, Keratinozyten, Epithelzellen, B-Zellen, Monozyten und weiteren Zelltypen produziert werden kann (Dinarello 1988). Ein erhöhter Level dieses pro-inflammatorischen Zytokins wurde schon bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen wie beispielsweise bei rheumatischer Arthritis (Bunning et al. 1986), der Psoriasis (Debets et al. 1995) und Morbus Crohn beobachtet

(Ligumsky et al. 1990). Weiterhin besteht der Verdacht, dass IL-1 als pro-inflammatorischer Mediator eine wichtige Rolle in der Ätiologie von parodontalen Erkrankungen spielt (Engbretson et al. 2002). Es wurde nachgewiesen, dass verschiedene Wirtszellen, wie beispielsweise Monozyten oder Makrophagen auf Lipopolysaccharide oder Endotoxine gramnegativer Bakterien mit einer erhöhten Ausschüttung von IL-1 reagieren (Lindemann et al. 1988, Mølvig et al. 1988). Bei einem erhöhten Level von IL-1 verstärkt sich die Adhäsion von PMN an Epithelzellen um das 18-fache (Bevilacqua et al. 1985). Weiterhin kann IL-1 seine eigene Genexpression in verschiedenen Zellen induzieren (Dinarello et al. 1987) und initiiert zudem die Ausschüttung von Kollagenasen sowie Matrix-Metalloproteinasen, die schon lange dafür bekannt sind Bindegewebe und Knochen abzubauen (Birkedal-Hansen 1993).

Es gibt zwei Formen des Interleukin-1. Diese sind das IL-1 α und IL-1 β . Sie werden von zwei verschiedenen Genen kodiert und weisen eine 26%ige Homologie ihrer Aminosäuren auf (Dinarello 1988). Somit ist es nicht überraschend, dass sich ihre katabolischen, pro-inflammatorischen und weiteren biologischen Aktivitäten ähneln (Masada et al. 1990). Beide Formen spielen eine wichtige Rolle bei der Destruktion von Knochen und Bindegewebe während der Dauer einer Entzündung (Gowen et al. 1983) und haben einen synergistischen Effekt auf die knochenresorptiven Aktivitäten des Parathormons (Dewhirst et al. 1987), des Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) und des Lymphotoxins (Stashenko et al. 1987).

Jedoch wurde nachgewiesen, dass entzündetes gingivales Gewebe sowohl mehr IL-1 β als auch mehr IL-1 α produzierende Zellen enthält, während diese bei der gesunden Gingiva verringert oder nicht vorhanden sind (Honig et al. 1989). In einer weiteren Studie wurde beobachtet, dass Probanden, die ein spezifisches IL-1 Gen-Polymorphismus tragen, mehr IL-1 β produzieren. Es wurde gezeigt, dass Probanden mit gleichwertig ausgeprägtem Entzündungsstatus der Gingiva beim Vorhandensein des mit Parodontitis assoziierten Genotyps mehr IL-1 β in gingivalem Gewebe produzierten (Engbretson et al. 1999).

Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 ist ein ungefähr 26 kDa schweres und 185 Aminosäuren langes Zytokin (Mizel 1989). Es kann von diversen Zellen gebildet werden. Zu diesen gehören Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, PMN, Epithelzellen, Tumorzellen und normale sowie neoplastische B-Zellen (Kishimoto und Hirano 1988, Kishimoto 1989). Es hat ein breites Spektrum an Zielzellen und kann somit auch großen Einfluss auf die Immunantwort bei entzündlichen Prozessen nehmen (Mizel 1989). Tatsächlich weist schon die breite Palette seiner ursprünglicher Namen, wie

beispielsweise Hepatozyten-stimulierender Faktor, B-Zell-stimulierender Faktor, Plasmazytom-Wachstumsfaktor oder β 2-Interferon auf seine vielfältigen Funktionen hin (Billiau et al. 1989). Es hat wichtigen Einfluss, nicht nur auf die B-Zellen, jedoch auch auf die T-Zellen als Aktivator der zytotoxischen T-Zell Generation und in Myelom-Zellen als Wachstumsfaktor (Okada et al. 1988), in Hepatozyten als Induktor des Akutphaseproteins (Gauldie et al. 1987), in Nervenzellen als Stimulator der Differenzierung und in Fibroblasten als ein wachstumsregulierender Faktor (Sato et al. 1988).

Das IL-6 wird während der Immunantwort produziert. Es kann das Wachstum und die Differenzierung von T- und B-Lymphozyten beeinflussen (Kishimoto 1989). Zumeist ist aber die Anwesenheit von anderen Stimulantien wichtig, um den gewünschten Effekt zu erzielen. Zu diesen Stimulantien gehören das IL-1 und das TNF- α (Ishimi et al. 1990, Billiau et al. 1989). Die Stimulation der T-Zell Proliferation durch IL-6 beinhaltet nicht nur das direkte Wachstumssignal, sondern auch die Induktion von IL-2 Rezeptoren, wodurch die T-Zellen auch auf IL-2 reagieren können (Mizel 1989). IL-1 und IL-6 arbeiten stark synergistisch bei der Induktion der T-Zell Proliferation (Elias et al. 1989). Das Wachstum und die Differenzierung der B-Lymphozyten zu Antikörper bildenden Zellen wird auch in Anwesenheit von IL-6 zusammen mit anderen Stimulantien angeregt (Billiau et al. 1989, Kishimoto und Hirano 1988).

Im Hinblick auf parodontalen Erkrankungen ist erwähnenswert, dass das IL-6 sowohl selbst, als auch gemeinsam mit anderen Zytokinen Knochenresorption induzieren kann (Ishimi et al. 1990). Der IL-6 Titer ist allgemein bei Parodontitis (Guillot et al. 1995) und vor allem bei der refraktären Parodontitis erhöht (Reinhardt et al. 1993).

Interleukin-8 (IL-8)

Das IL-8 ist 77 Aminosäuren lang und vor allem für die Aktivierung und Rekrutierung von Granulozyten verantwortlich. Zudem ist es ein starker Mediator bei entzündlichen Prozessen (Baggioni et al. 1989). Es wird von vielen verschiedenen Zellen wie Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Lymphozyten, Endothelzellen und Epithelzellen gebildet (Hoffmann et al. 2002). Auch neutrophile Granulozyten sind in der Lage auf Lipopolysaccharide von parodontalpathogenen Keimen mit der Sekretion von IL-8 zu reagieren (Yoshimura et al. 1997), jedoch sind bakterielle Endotoxine nicht die primären Auslöser für die Bildung von IL-8. Die Bildung dieses Zytokins wird, wie Schluger und Rom herausgefunden haben, vor allem durch IL-8 selbst, TNF- α sowie Immunkomplexen induziert (Schluger und Rom 1997). Zu den Funktionen des IL-8 gehört die Regulation vieler

Funktionen der PMN. Es hat Einfluss auf deren Aktivierung, Adhäsion zu Endothelzellen, Chemotaxis, Formänderung und ihrer Exozytose von Granulat, welches wiederum einige lysosomale Enzyme enthält (Tonetti 1997). Das IL-8 wirkt im Gegensatz zu anderen Zytokinen zielgerichtet auf PMN und nur gering auf andere Zellen im Blut. Es scheint aufgrund seiner aktivierenden und chemotaktischen Wirkung auf PMN sehr wichtig bei der Initiierung und Entwicklung von inflammatorischen Prozessen und Gewebeuntergang in parodontalen Erkrankungen zu sein (Bickel 1993). Weiterhin wird vermutet, dass das IL-8 entzündungshemmende Wirkungen bei der Pathogenese einer gingivalen Entzündung hat, während es den Untergang von parodontalem Gewebe unterstützt. Somit beeinträchtigt die Rekrutierung von PMN durch das IL-8 nicht nur die Fähigkeit des Wirtes gegen die Infektion zu reagieren, sondern es verstärkt auch aufgrund der erhöhten Sekretion von lysosomalen Enzymen und Matrix-Metalloproteinasen den Gewebeabbau (Tonetti et al. 1998).

In einigen Studien wurde gezeigt, dass polymorphkernige neutrophile Granulozyten durch IL-1 β und IL-8 vermehrt das Enzym Elastase sezernieren, welches die Entzündung um ein verstärktes Maß voran treibt (Brandolini et al. 1996). Es wird spekuliert, dass das Zusammenspiel von IL-8 und Elastase mit dem Grad der Gewebszerstörung korreliert (Bickel 1993).

Tumornekrosefaktor- α /Tumornekrosefaktor- β (TNF- α / TNF- β)

Der Begriff Tumornekrosefaktor (TNF) bezieht sich auf eine Superfamilie von mehr als vierzig pro-inflammatorischen Zytokinen. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf zwei funktionell eng miteinander verwandten Zytokinen, deren Synthese jedoch von zwei unterschiedlichen Genen kodiert wird. Bei diesen beiden Zytokinen handelt es sich um das TNF- α , auch als Cachectin bekannt und dem TNF- β , welches auch Lymphotoxin (LT) genannt wird (Pfeffer 2003).

Pfeffer fasst zusammen, dass die beiden Zytokine ihre Namen ursprünglich durch ihre Fähigkeit, die Apoptose von Tumorzellen und Kachexie hervor zu rufen, erhielten. Deren Aktivität hat, vor allem bei Entzündungen und der Immunreaktion gegen einige infektiöse Pathogene, Vorteile für den Wirt. Auf der anderen Seite kann durch sie der Wirtsorganismus bei Erkrankungen wie der Sepsis, der Tumorkachexie und Autoimmunerkrankungen geschädigt werden (Pfeffer 2003).

Die ersten Mitglieder der TNF Zytokin-Familie waren das TNF- α und das LT (Pfeffer 2003). Man identifizierte sie als Typ II Transmembranproteine, die biologisch aktiv sind und die Struktur eines nicht kovalent gebundenen Trimers, bestehend aus drei Polypeptidketten,

aufwiesen (Carswell et al. 1975). Das TNF- α und das LT haben nur ungefähr zu 30% die gleiche Aminosäuresequenz in ihrer Primärstruktur. Jedoch sind die Regionen mit der größten Homologie verantwortlich für die Ähnlichkeiten der Tertiär- und Quartärstrukturen von TNF- α und LT (Pennica et al. 1984). In Kontrast dazu hat die externe Oberfläche dieser Trimere, welches für Selektivität ihrer Rezeptoren verantwortlich ist, nur wenig Ähnlichkeit (Idriss und Naismith 2000). Während das TNF- α sowohl als in der Membran integriertes Protein als auch nach proteolytischer Spaltung durch Metalloproteinasen und somit in gelöster Form biologisch aktiv ist, entfaltet das LT seine Aktivität nur als gelöstes Molekül (Hehlhans und Pfeffer 2005).

Das TNF- α wird als 26 kDa schweres Propeptid synthetisiert und erst nach proteolytischer Spaltung zum 17 kDa schweren reifen Protein. Beide Formen trimerisieren spontan und bilden so die bioaktive Form (Smith und Baglioni 1987). Dieses wird, als ein pro-inflammatorisches Zytokin von vielen unterschiedlichen Zelltypen, wie Makrophagen, Monozyten und B- bzw. T- Lymphozyten, als Antwort auf Lipopolysaccharide, einschließlich derjenigen der parodontalpathogenen Mikroorganismen (Lindemann et al. 1988), weiterhin als Reaktion auf Entzündungen, Verletzungen und Infektionen, sezerniert (Tracey und Cerami 1993). Dabei verursacht es ein breites Spektrum an systemischen und zellulären Reaktionen, wie die Aktivierung und Migration von Leukozyten, Fieber, Akute-Phase-Reaktion, Zellproliferation, T-Zell Differenzierung und Apoptose. Zudem induziert es die Synthese von IL-1, IL-6, IFN- γ und TNF- α selbst (Tracey und Cerami 1993). Eine Dysregulation der TNF- α Synthese wird mit der Pathogenese verschiedener Krankheiten wie Morbus Crohn, rheumatoider Arthritis und Diabetes in Verbindung gebracht (Balkwill et al. 2000). Bei chronischer Parodontitis ist TNF- α in der Sulkusflüssigkeit in erhöhter Menge vorzufinden (Gamonal et al. 2003). Hier stimuliert es die Freisetzung von Kollagenasen aus Fibroblasten, die für Gewebsuntergang und Knochenresorption verantwortlich gemacht werden (Bertolini et al. 1986).

Somit wurde TNF- α als Prädiktor der Entwicklung einer Parodontitis betrachtet (Rossomando et al. 1990).

Das TNF- β scheint eine wichtige Rolle bei der Organogenese lymphoider Organe zu spielen. Hierzu wurde beispielsweise in einem Tierexperiment nachgewiesen, dass bei Mäusen, denen das TNF- β fehlte, periphere Lymphknoten und Peyer-Plaques nicht angelegt waren (De Togni et al. 1994).

Interleukin-4 (IL-4)

Das IL-4, früher „B-Zell growth factor“ genannt (Howard et al. 1982), ist ein 20 kDa schweres Produkt von vor allem aktivierter T-Zellen. Es besteht aus 129 Aminosäuren (Corcoran et al. 1992) und moduliert verschiedene Funktionen der hämatopoetischen Zellen (Mizel 1989). IL-4 unterdrückt viele Funktionen humaner Monozyten, wie beispielsweise die Produktion von TNF- α und IL-1, IL-6 (te Velde et al. 1990), und IL-8 (Standiford et al. 1990). Durch die Inhibition von Prostaglandin E2 führt es zur Verringerung der interstitiellen Kollagensynthese und somit zur verstärkten Knochenresorption (Shapira et al. 1992). Das Fehlen von IL-4 in erkranktem parodontalem Gewebe wurde mit der Aktivität und dem Fortschreiten parodontaler Erkrankungen in Bezug gebracht (Shapira et al. 1992).

Außer in der Parodontologie wird das IL-4 mit einigen weiteren Allgemeinerkrankungen wie beispielsweise Asthma (Wenzel et al. 2007), Multiple Sklerose (Mirel et al. 2004) oder erosiver rheumatoider Arthritis (Prots et al. 2006) in Bezug gebracht.

Interleukin-10 (IL-10)

Das IL-10 ist eines der wichtigsten Zytokine mit anti-inflammatorischen Eigenschaften. Es besteht aus 160 Aminosäuren, hat ein Gewicht von ungefähr 35kDa und ist ein Homodimer, welches aus zwei nicht kovalent miteinander gebundenen Monomeren besteht (Windsor et al. 1993, Sabat et al. 2010).

Im Jahre 1989 wurde das erste mal ein neuer immunologischer Mediator in einem Tierexperiment mit Mäusen entdeckt, welches von T-Helferzellklonen sezerniert wurde und die Synthese von IL-2 und Interferon- γ (IFN- γ) inhibierte. Es wurde „cytokine synthesis inhibitory factor“ (CSIF) genannt (Fiorentino et al. 1989). Heute ist das CSIF als IL-10 bekannt. Mit der Zeit wurde bekannt, dass das IL-10 nicht nur von T-Zellen, sondern von fast allen Leukozyten produziert wird. Dabei scheinen jedoch die Makrophagen, Monozyten (Siewe et al. 2006) und T-Helferzellen (Murai et al. 2009) eine besonders wichtige Rolle zu spielen. Die Funktionen des IL-10 sind sehr verschieden. Es scheint hierbei vor allem auf Monozyten und Makrophagen hemmende Effekte zu haben (Fiorentino et al. 1991). Diese sind vor allem die Hemmung der Freisetzung von Immunmediatoren und die Hemmung der Antigen-Präsentation. Es unterdrückt somit einige Funktionen jener Zellen, die für eine aktive Rolle bei der Immunreaktion verantwortlich sind (Sabat et al. 2010). Somit wird, die durch bakterielle Lipopolysaccharide und INF- γ induzierte Sekretion von TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8, verhindert (Fiorentino et al. 1991). IL-10 reduziert zudem die Produktion von INF- γ in Th1-Zellen und die Synthese von IL-12, wobei die Funktion der Th1-Reaktion drastisch

abgeschwächt wird (D'Andrea et al. 1993).

Zusätzlich verstärkt das IL-10 die Th2-Reaktion, die Freisetzung von anti-entzündlichen Mediatoren wie dem IL-1-Rezeptor-Antagonisten sowie dem TNF- α -Rezeptor als auch die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen (Hart et al. 1996, Jenkins et al. 1994). Es stimuliert die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen und die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen (Calzada-Wack et al. 1996).

Im Bezug zur Parodontitis gibt es Studien, die eine erhöhte Produktion von IL-10 bei Probanden mit Parodontitis nachweisen. Man fand heraus, dass gingivale mononukleare Zellen von Probanden mit chronischer Parodontitis mehr IL-10 produzierten als diejenigen von Probanden mit gesunder Gingiva. Es wurde vermutet, dass das IL-10 im entzündeten gingivalen Gewebe eine lokale Immunantwort potenziert, welche in eine erhöhte Produktion von anti-kollageneszierenden Zellen endet (Stein und Hendrix 1996). Jedoch weiß man auch, dass CD8⁺ Zellen, die IL-10 produzieren bei Probanden mit Parodontitis in geringer Menge vorkommen (Gemmell und Seymour 1998).

Zusammengefasst besteht die physiologische Funktion des IL-10 darin, eine überschießende sowohl spezifische als auch unspezifische Immunreaktion zu verhindern und somit verstärktem Gewebeabbau vorzubeugen.

1.4.3 Matrix-Metalloproteinase 8 (MMP8) – Biomarker der Parodontitis

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) bilden die wichtigste Gruppe der Proteinasen, die sich sowohl am normalen Gewebeumbau des Parodonts als auch Destruktionsprozessen bei parodontalen Erkrankungen beteiligen (Birkedal-Hansen 1993, Woessner 1991). Sie degradieren Makromoleküle der extrazellulären Matrix wie Kollagene, Fibronectin, Laminin und das Proteoglykan Core Protein (Birkedal-Hansen 1993). Viele Zellen der Gingiva, wie beispielsweise Fibroblasten (Hanemaaijer et al. 1997) und polymorphkernige neutrophile Granulozyten (Uitto et al. 2003) sind in der Lage MMPs zu synthetisieren.

Dabei werden die MMPs als inaktive Zymogene sezerniert. Die Aktivierung der MMP Zymogene zu aktivierten Matrix Metalloproteinasen (aMMP) spielt somit eine wichtige Rolle für die Struktur, Funktion und Zusammensetzung der parodontalen Bindegewebsmatrix und geschieht durch die Trennung einer Zink (Zn^{2+})-Cystein Verbindung, die die Reaktivität ihrer aktiven Seite verhindert. Dabei werden diese Zymogene meistens vorher in löslicher Pro-Form sezerniert (Uitto et al. 2003).

Nur eine kleine Gruppe von MMPs, auch „Membrantyp-MMP“ (MT-MMP) genannt, wird nicht sezerniert, sondern führt ihre Funktion auf der Zelloberfläche aus. Einige der löslichen

MMPs werden dabei auf der Zelloberfläche von eben diesen MT-MMP aktiviert (Uitto et al. 2003). Wieder andere lösliche MMPs werden extrazellulär durch bestimmte Kaskaden, die von Gewebeproteinase, wie Plasmin, Kallikrein und Trypsin initiiert werden, aktiviert. Diese Prozesse werden oft von aktivierten MMPs, die als Pro-MMPs arbeiten amplifiziert (Uitto et al. 2003).

MMPs werden neben ihren bereits beschriebenen pathologischen Funktionen auch mit physiologischem Gewebeumbau, wie beispielsweise während der Embryonalentwicklung, der Zahnentwicklung oder der Wundheilung in Verbindung gebracht (Woessner 1991, Llano et al. 1997). Tatsächlich wurden einige andere Aktivitäten der MMPs identifiziert, die nicht das Spalten von extrazellulären Molekülen einbeziehen. Es scheint so, als ob MMPs die Fähigkeit haben mit größter Präzision bioaktive Moleküle wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Rezeptoren der Zelloberfläche und Adhäsionsmoleküle zu prozessieren (López-Otín und Overall 2002).

Die Gen-Familie der MMPs kodiert 24 homologe Proteinase (MMP 1-3 und 7-28). Die MMP Familie kann in fünf Obergruppen unterteilt werden: den interstitiellen Kollagenasen (MMP-1, -8, -13), den Gelatinasen (MMP-2, MMP-9), den Stromelysinen (MMP-3, -10, -11), den Membran-Typ MMPs (MMP-14, -15, -16, 17) und anderen MMPs (Sorsa et al. 2004). Wie viele extrazelluläre Proteine, sind MMPs multidomänische Mosaikproteine, die sich in ihrer Primär-, Sekundär-, und Tertiärstruktur sehr ähneln. Die funktionell wichtigste Domäne ist die katalytische. Bemerkenswert ist dabei, dass die katalytischen Domänen unter allen MMPs sehr ähnlich sind. Nur durch kleine Unterschiede in der Domäne wird die Substratspezifität für die jeweilige MMP festgelegt und zusätzlich durch bestimmte Außenstrukturen am Protein modifiziert (Uitto et al. 2003).

Da MMPs in der Lage sind Gewebe zu zerstören, wird ihre Aktivität streng überwacht. Dies passiert vor allem durch ihre vier Gegenspieler: den „tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1-4“ (TIMP-1-4). Die Hauptform ist hierbei das TIMP-1. Es ist ein ungefähr 30 kDa schweres Glykoprotein und wird von den meisten Bindegewebszellen und von Makrophagen synthetisiert (Uitto et al. 2003). Alle TIMPs haben als Gemeinsamkeit eine zwei-domänen Struktur, in der nur die N-Domäne in der Lage ist MMPs zu inhibieren. TIMP-1 bildet mit hoher Affinität irreversible, nicht kovalente Bindungen mit aktivierten MMPs und hemmt diese dadurch. Jeder TIMP ist in der Lage die meisten MMPs zu inhibieren. Eine Ausnahme bilden hier die Membran-Typ MMPs: diese können nicht von TIMP-1 gestoppt werden (Uitto et al. 2003, Ingman et al. 1996).

Wie Sorsa und Mitarbeiter reflektierten (Sorsa et al. 2004), wurde die humane gingivale

Kollagenase das erste Mal im Jahre 1966, also vor mehr als vierzig Jahren im Labor nachgewiesen (Fullmer und Gibson 1966). Heute herrscht die Meinung, dass Kollagenasen, allen voran die Matrix-Metalloproteinasen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Parodontitis spielen.

Da parodontalpathogene Mikroorganismen bei Parodontopathien eine wichtige Rolle spielen, nahm man jedoch zunächst an, dass jene Kollagenasen mikrobiellen Ursprungs sind (Sorsa et al. 1987). Diese Theorie wurde widerlegt, als man herausfand, dass Kollagenasen der Säugetiere Kollagen an einem einzigen Lokus angreifen und spalten, während bakterielle Kollagenasen jenes an multiplen Orten spalten und so mehrere kürzere Fragmente bilden (Sorsa et al. 1987). Ein Jahr später fanden Sorsa *et al.* heraus, dass die wichtigste Kollagenase bei der Pathogenese der Parodontitis die humane Kollagenase-2, auch MMP-8 genannt, ist (Sorsa et al. 1988). Diese Erkenntnisse wurden in den nachfolgenden Jahren durch Studien, die ein breites Spektrum an RNA- und Protein-Analyseverfahren für MMPs anwendeten, weiterhin ausgedehnt und verfeinert (Kiili et al. 2002, Tervahartiala et al. 2000). Golub und Mitarbeiter haben nachgewiesen, dass es sich bei 94%-96% der Kollagenasen, die bei Patienten mit chronischer Parodontitis gemessen wurden, um MMP-8 handelt (Golub et al. 1997). Die Behandlung der Parodontitis durch Scalen und Wurzelglättung senkt nachweislich den MMP-8 Level in der gingivalen Sulkusflüssigkeit, während tiefe parodontale Taschen erhöhte MMP-8 Werte aufweisen (Mäntylä et al. 2006).

Vorerst wurde angenommen, dass das MMP-8 nur von PMN synthetisiert werden kann. Jedoch weiß man heute, dass auch viele andere Zelltypen, die sich im gesunden und erkrankten parodontalem Gewebe befinden wie Epithelzellen des gingivalen Sulkus, Fibroblasten, Endothelzellen (Hanemaaijer et al. 1997), Monozyten, Makrophagen und auch Plasmazellen in der Lage sind das MMP-8 zu produzieren (Kiili et al. 2002, Tervahartiala et al. 2000).

Bakterielle Proteinase, die sich in der sub-, und supragingivalen Plaque befinden, sind in der Lage, das durch ihre eigenen Lipopolysaccharide, von PMN freigesetzte MMP-8 zu prozessieren. Diese werden dabei von ihrer inaktiven, 60-80 kDa schweren Form, in die aktive Form, die 40-60 kDa wiegt, umgewandelt (Sorsa et al. 1995).

Andererseits können 40-60 kDa schwere MMP-8 auch zu den weniger glykosylierten Formen dieser Spezies gehören, deren Produktion durch Fibroblasten des parodontalen Ligaments, Endothelzellen, Odontoblasten und Chondrozyten und von pro-inflammatorischen Mediatoren wie das IL-1 β sowie das TNF- α begünstigt wird (Hanemaaijer et al. 1997, Palosaari et al. 2000, Cole et al. 1996). Weiterhin befinden sich inaktive hochmolekulare MMP-8 Formen in

der Sulkusflüssigkeit, die mehr als 100 kDa wiegen. Diese haben mit ihren endogenen Inhibitoren wie dem α 2-Makroglobulin und den TIMPs Komplexe gebildet und sind somit nicht mehr in der Lage ihre Funktion auszuführen (Ingman et al. 1996).

MMP-8 stellt einen Biomarker und ein potenzielles Hilfsmittel bei der Diagnostik einer Parodontitis dar (Sorsa et al. 2004). So gibt es Methoden die auf einem immunofluorimetrischem Assay (Hanemaaijer et al. 1997) basieren oder verschiedene „Chair side-Tests“, die eine schnelle Messung des MMP-8 Levels ermöglichen (Mäntylä et al. 2006, Munjal et al. 2007).

1.5 Risikofaktoren für die Parodontitis

Unter einem Risikofaktor wird eine Variable aus dem Bereich des Lebensstils, der Umwelt und angeborener oder erworbener Faktoren verstanden, die auf Basis epidemiologischer Evidenz mit der Krankheitsentstehung eines Individuums in Zusammenhang steht (Hoffmann 2005). Risikofaktoren stehen somit mit der Entwicklung und Progression der Erkrankung in Verbindung, ohne zwangsläufig einen kausalen Charakter zu haben.

Als Risikofaktoren für die Parodontitisprogression sind schon lange Rauchen (Tabakkonsum) (Solomon et al. 1968) und unbehandelter Diabetes mellitus bzw. ungenügend eingestellter Diabetes mellitus (Grossi und Genco 1988) bekannt. Als Risikoindikatoren werden Stress und Osteoporose genannt (Genco 1996).

In Deutschland liegt die Raucherprävalenz ähnlich hoch wie im europäischen Durchschnitt. Etwa 37% der erwachsenen Frauen und 42% der Männer in Deutschland rauchen (Baumeister et al. 2008). Studien haben gezeigt, dass Raucher eine stärker pathogene orale Mundflora besitzen, als Nichtraucher. Diese wird vor allem durch die Anwesenheit von *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* gekennzeichnet (Zambon et al. 1996). Es wurde nachgewiesen, dass bei jungen rauchenden Erwachsenen, der klinische Attachmentlevel und Loki mit Rezessionen, signifikant höher waren, als bei Nichtrauchern (Rosa et al. 2008). Andere Studien berichten, dass das Rauchen zu Zahnverlust, Attachmentverlust und Abbau des Alveolarknochens führt (Axelsson et al. 1998).

Weiterhin findet man bei ungefähr 20-30% der Raucher eine Melanose der befestigten Gingiva. Es gibt allgemein bei Rauchern eine ausgeprägte Zahnsteinbildung und trotz Entzündung nur relativ geringe Anzeichen für eine entzündete Gingiva. Diese ist weniger gerötet und die Blutungsneigung ist beim Sondieren um ein vielfaches geringer als bei Nichtrauchern (Müller et al. 2002). Zusätzlich scheinen Raucher anfälliger für fortgeschrittene und aggressive Formen der Parodontitis zu sein (Gloria et al. 2002) und auf

die Behandlung der Parodontitis weniger anzusprechen als Nichtraucher (Baumert Ah et al. 1994).

Der Tabakrauch der Zigaretten modifiziert die Immunantwort des Wirtes bei der Bekämpfung parodontalpathogener Keime. Dabei werden vor allem die PMN, als erste Linie der Infektionsabwehr, beeinträchtigt. Durch das Rauchen wird die Entwicklungsfähigkeit und die Funktion von PMN nachteilig beeinflusst (Guentsch et al. 2006). Durch die Beeinträchtigung ihrer Chemotaxis und Phagozytose, kommen diese in erkrankten Gebieten des Parodonts in verringerter Zahl vor oder werden in ihrer Funktion gehindert (Seymour 1991).

Das Rauchen führt zu einer verschlechterten Durchblutung des Gewebes (Baab und Öberg 1987), Reduktion der Fibroblastenfunktion des Desmodonts (Hanes et al. 1991), zu einer Unterdrückung der Osteoblastenproliferation (Fang et al. 1991), zu einer Stimulation der Osteoklasten und somit zum Knochenabbau (Henemyre et al. 2003), zu einer erhöhten Flussrate der gingivalen Sulkusflüssigkeit (McLaughlin et al. 1993) und einer Verringerung der Lymphozytenproliferation (Barbour et al. 1997).

Es wird zudem vermutet, dass das Rauchen auch Einfluss auf die Sekretion bestimmter Zytokine des Wirtes, wie beispielsweise das IL-1, IL-6 oder TNF- α , hat (Boström et al. 1999, Rawlinson et al. 2003).

Auch auf bestimmte Enzyme des Wirtes scheint das Rauchen einen einflussreichen Effekt zu haben. In einer Studie von Özçaka *et al.* wurde nachgewiesen, dass die Serumkonzentration des MMP-9, der Myeloperoxidase und der neutrophilen Elastase bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern erhöht, während der Level von TIMP-1 verringert ist. Aus diesem Ergebnis wurde das Fazit gezogen, dass das Rauchen zusammen mit parodontaler Destruktion prädisponierend für kardiovaskuläre Erkrankungen sein können (Özçaka et al. 2011).

Eine Studie wies nach, dass die Konzentration des aMMP-8 im Komplex mit α 2-Antitrypsin in positiver Korrelation mit dem Tabakkonsum stand (Söder et al. 2002).

Auch ist dazu bekannt, dass der Level der aktivierten MMP-8 bei Rauchern mit chronischer Parodontitis einen negativen Einfluss auf das Behandlungsergebnis einer Parodontitis hat (Leppilahti et al. 2013).

Untersuchungen zum Einfluss der aMMP-8 bei Rauchern mit Parodontitis sind in der Literatur, trotz der Bedeutung der aMMP-8 als Biomarker der Parodontitis, selten.

2. Ziele der Arbeit

Die Parodontitis wird primär durch spezielle Keime des subgingivalen Biofilms initiiert. Allerdings ist es die überschießende Immunantwort des Wirtes auf die bakterielle Bedrohung, die für den parodontalen Gewebeverlust verantwortlich ist.

Aktives MMP-8, welches unter anderem von neutrophilen Granulozyten sezerniert wird, ist mit verantwortlich für den parodontalen Attachmentverlust. In Reaktion auf die mikrobielle Belastung spaltet aMMP-8 Kollagen in parodontalem und gingivalem Ligament.

Somit kann die Analyse der Sulkusflüssigkeit im Hinblick auf den aMMP-8 Level dem behandelnden Zahnarzt die Möglichkeit geben, zwischen gesundem und entzündetem Parodont zu differenzieren.

Einen starken Einfluss auf die Reaktionen des Immunsystems haben Risikofaktoren wie beispielsweise der Tabakkonsum. Im Rahmen der Literaturrecherche zeigte sich, dass bisher ungeklärt ist, ob Tabakkonsum als Risikofaktor der Parodontitis Einfluss auf die Konzentration von aMMP-8 in der Sulkusflüssigkeit hat.

In der vorliegenden Studie wurden in der gingivalen Sulkusflüssigkeit mikrobielle und immunologische Parameter analysiert und mit klinischen Befunden (SBI, 6-Punkt-Messung, AL) in Bezug gesetzt.

Hierbei ergaben sich folgende Fragen im Detail:

- 1.) In welchem Zusammenhang steht der Tabakkonsum mit der Konzentration von aMMP-8 in der Sulkusflüssigkeit?
- 2.) Eignet sich die aMMP-8 als Biomarker der Parodontitis bei Rauchern?
- 3.) Bestehen Korrelationen zwischen den untersuchten Interleukinen und der Konzentration der aMMP-8?
- 4.) Ist die bakterielle Belastung durch Parodontalpathogene mit der aMMP-8 Konzentration assoziiert?
- 5.) Korreliert der klinische Zustand des Parodonts in Abhängigkeit vom Tabakkonsum mit der aMMP-8 Konzentration?

3. Material und Methoden

3.1 Probandenauswahl

Für die vorliegende Studie wurden 67 Patienten des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des Universitätsklinikums im Zeitraum von September 2011 bis August 2012 als Probanden rekrutiert. Von diesen wurden 60 (je 15 Nichtraucher mit klinisch gesundem Parodont bzw. mit chronischer Parodontitis und je 15 Raucher mit klinisch gesundem Parodont bzw. mit chronischer Parodontitis) in die Auswertung der Studie einbezogen.

Die Definition der chronischen Parodontitis richtete sich nach der Klassifikation des „International Workshop for a Classification System of Periodontal diseases and Conditions“ aus dem Jahre 1999 (Armitage 1999).

Raucher (PR) und Nichtraucher mit chronischer Parodontitis (PNR) wurden in die Studie einbezogen, wenn sie folgende Kriterien erfüllten: mehr als 30% der Sondierungstiefen \geq 5mm, SBI \geq 30%, API \geq 30%. In die Kontrollgruppen wurden Raucher (GR) und Nichtraucher (GNR) mit klinisch gesundem Parodont ohne Anzeichen von Attachmentverlust (Sondierungstiefen \leq 3 mm; SBI \leq 30%; API \leq 30%; klinischer Attachmentlevel =0 mm) rekrutiert.

Zusätzlich erfolgte die Erfassung der Packungsjahre. Als Nichtraucher wurden die Probanden klassifiziert, die noch nie geraucht hatten. Gelegenheitsraucher und Ex-Raucher wurden von der Untersuchung ausgeschlossen.

Alle Probanden mussten allgemein folgende Einschlusskriterien aufweisen:

Sie durften keinerlei antibiotische Behandlung in den letzten 6 Monaten erfahren haben. Chronische allgemeinmedizinische Erkrankungen (z.B. Diabetes Mellitus oder koronare Herzerkrankungen) sowie Erkrankungen im nasopharyngealen Bereich durften nicht vorliegen. Mindestens 25 Zähne mussten vorhanden sein. Schwangere und stillende Frauen wurden nicht in die Studie aufgenommen.

Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Jena lag vor. Alle Probanden wurden vor Beginn der Untersuchungen über die Studie aufgeklärt und unterschrieben eine entsprechende Einwilligungserklärung zur Teilnahme an der Studie.

3.2 Untersuchungsmethoden

3.2.1 Klinische Untersuchungen

Modifizierter Sulkus-Blutungs-Index (SBI)

Zur Messung des modifizierten Sulkusblutungsindex (Lange 1978), als Ausdruck des

Entzündungsstatus der Gingiva, wurde der Gingivarand mit Hilfe einer stumpfen Parodontalsonde (PCPMDBIU, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) bei einem geringen Druck von etwa 0,25 N ausgestrichen. Nach einigen Sekunden wurde das Vorhandensein einer Blutung mit einer Ja/Nein Entscheidung bewertet. Dieser Vorgang erfolgte im ersten und dritten Quadranten vestibulär und im zweiten und vierten Quadranten oral. Abschließend wurde der SBI prozentual für das Gesamtgebiss, als Anteil der blutenden Sulci aus der Gesamtzahl der untersuchten Sulci, berechnet.

Approximalraum-Plaque-Index (API)

Der Approximalraum-Plaque-Index (Lange 1978) dient zur Beurteilung der Mundhygiene des Patienten. Mit Hilfe eines Plaquerevelators (Mira 2 Ton, Hager & Werken GmbH und Co. KG, Duisburg, Deutschland) wurde der supragingivale Biofilm an allen vorhandenen Zähnen angefärbt. Danach wurde quadrantenweise im Sinne einer Ja/Nein Entscheidung bewertet ob im Approximalraum Plaque vorhanden war oder nicht. Dies geschah, im Gegensatz zum SBI, im ersten und dritten Quadranten von oral und im zweiten und vierten Quadranten von vestibulär. Bei der Beurteilung blieben orale und vestibuläre Glattflächen unberücksichtigt. Schließlich wurde der API prozentual für das Gesamtgebiss, als Anteil der plaquebehafteten Approximalräume aus der Gesamtzahl der untersuchten Approximalräume, berechnet.

Sondierungstiefe und Klinischer Attachmentlevel (AL)

Der klinische Attachmentlevel definiert sich als die Distanz zwischen der Schmelz-Zement-Grenze und dem mit einer Sonde klinisch sondierbaren Boden der parodontalen Tasche (Ramfjord 1967) und wurde analog zur Sondierungstiefe ermittelt.

Die Messungen wurden mit Hilfe einer Parodontalsonde (Parodontometer CP-15UNC, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) mit Milimeterskala, an jedem vorhandenen Zahn an sechs verschiedenen Stellen (mesiobukkal, bukkal, distobukkal, distopalatinal/lingual, palatinal/lingual, mesiopalatinal/lingual) vorgenommen.

Es folgte die Einteilung der Sondierungstiefen in drei Subkategorien (Hung und Douglass 2002). Hierbei wurde wie folgt unterteilt:

- Flache Tasche: 1 - 3 mm
- Mittlere Tasche: 4 - 6 mm
- Tiefe Tasche: > 7 mm

Schließlich wurde der Mittelwert aller aufgenommenen Werte je Proband ermittelt.

Packungsjahre (PJ)

Packungsjahre beschreibt die inhalierte Rauch-Dosis eines Rauchers in einem Jahr. Um die PJ zu ermitteln wird die Zahl der täglich konsumierten Zigarettenpackungen mit der Zahl der Raucherjahre multipliziert.

3.2.2 Probeentnahme und Untersuchungen der Sulkusflüssigkeit

Die Sulkusflüssigkeit wurde mittels Filterpapierstreifen-Streifen (GCF-Streifen, dentognostics GmbH, Jena, Deutschland) einen Tag nach den klinischen Untersuchungen entnommen, um Blutkontaminationen der gewonnen Proben zu vermeiden. Die Probenentnahme erfolgte bei den Parodontitispatienten aus der tiefsten Tasche je Quadrant und bei den parodontal Gesunden standardisiert an der mesiobukkalen Stelle des jeweiligen ersten Molars. Dafür wurde der Entnahmeort mit Hilfe von Watterollen trockengelegt und mit einem kurzen Luftstoß mit dem Luftbläser getrocknet, so dass der Zahn vom Speichel befreit wurde. Die Filterpapierstreifen wurden danach in die Taschen eingeführt und für 30 Sekunden dort belassen. Nach der Probeentnahme wurden die vier Filterpapierstreifen gepoolt, in einem Eppendorf-Röhrchen gesammelt und für maximal einer Stunde bei 2-8° Celsius im Kühlschrank gelagert, um hiernach zum Labor transportiert zu werden (Guentsch et al. 2011). Der Transport zum Labor erfolgte in einem gekühlten Behälter und dauerte im Durchschnitt zehn Minuten.

Die Weiterverarbeitung der Poolproben im Labor umfasste folgende Arbeitsschritte:

Zu den Filterpapierstreifen wurde 600µl Eluierungspuffer bestehend aus Phosphatpuffer, Kaseinpuffer und 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane (Angaben der Firma dentognostics GmbH, Jena, Deutschland) gegeben. Das Röhrchen wurde vorsichtig geschwenkt, worauf eine fünfminütige Eluierung folgte. Nach fünf Minuten \pm 10 Sekunden wurde 100µl Eluat aus dem Röhrchen in ein zweites Eppendorf-Gefäß aliquotiert. Das zweite Gefäß wurde bei 2-8° Celsius im Kühlschrank, bis zur weiteren Analyse, die innerhalb von 7 Tagen erfolgte, gelagert.

Da in dieser Studie mit den Poolproben der Sulkusflüssigkeit sowohl die Konzentration des aMMP-8 als auch der oben genannten Zytokine und parodontalpathogenen Keime untersucht werden sollten, wurde das verbliebene restliche Eluat wie folgt weiter verarbeitet:

Die Röhrchen mit den Streifen und dem Puffer wurden für eine Minute geschüttelt, worauf ein fünfminütiges Zentrifugieren bei 111,2 g folgte. Hiernach wurden je 30µl in vier weitere Eppendorf-Röhrchen aliquotiert. Alle Röhrchen wurden bei -20° Celsius bis zur Analyse der Zytokine und Bakterien gelagert.

Dabei wurden die 4 Eppendorf-Röhrchen mit je 30µl Eluat für die Untersuchungen der Zytokine verwendet, während die Gefäße mit dem übrig gebliebenen 380µl Eluat und den vier Filterpapierstreifen für die Analyse der Keime herangezogen wurden.

Die Bearbeitung der Proben erfolgte en bloc, um unnötiges Auftauen zu vermeiden und methodisch bedingte Schwankungen bei den nachfolgenden Untersuchungen zu minimieren.

3.2.3 Quantitative Bestimmung der aMMP-8 Konzentration

Die quantitative Bestimmung der aMMP-8 Konzentration erfolgte mittels Enzymimmunoassay (dentoELISA aMMP8, dentognosits GmbH, Jena). Nachdem die intraoral entnommenen Proben im klinikeigenen Labor mit dem Eluierungspuffer bearbeitet wurden, erfolgte der Transport von 100µl zur Firma dentognostics GmbH. Hier wurden die Proben wie folgt weiter bearbeitet:

Das Eluat wurde noch einmal mit Eluierungspuffer auf ein Verhältnis von mindestens 1:50 verdünnt (10µl GSF-Eluat : 490µl Probenpuffer).

Auf einer Mikrotitrationsplatte waren in die einzelnen Vertiefungen spezifische Antikörper gegen die aMMP-8 fixiert. Je 100µl der nun verdünnten Probe wurde in jede Vertiefung der Mikrotitrationsplatte gegeben. Das Ganze wurde bei 37°Celsius in einem Brutschrank für 60 Minuten inkubiert. Die in der Sulkusflüssigkeit befindlichen aMMP-8 bildeten Immunkomplexe mit den fixierten Antikörpern. Nach dieser Zeit wurden die nicht gebundenen Komponenten je 3 mal mit 200µl Waschpuffer pro Vertiefung ausgewaschen. Anschließend wurde in jede Vertiefung 100µl Peroxidase-Enzymkonjugat (monoklonaler aMMP-8 Antikörper, gekoppelt mit Peroxidase) gegeben. Die Mikrotitrationsplatte wurde wieder bei 37° Celsius für 30 Min im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit verband sich das Konjugat mit den gebildeten Immunkomplexen. Nichtgebundene Komponenten wurden nach 30 Minuten wieder je 3 mal mit 200µl Waschpuffer pro Vertiefung heraus gewaschen. Danach wurde in jede Vertiefung 100µl TMB-Substratlösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid) gegeben. Die Platte wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und währenddessen bei 500 U/min geschüttelt. Durch die Aktivität der Peroxidase entstand ein blauer Farbstoff. Nach 15 Min wurde in jede Vertiefung 100µl Stopplösung (Schwefelsäure) gegeben, wodurch die Lösungsfarbe nach gelb umschlug. Nach Zugabe der Stopplösung wurde die Farbintensität jeder Vertiefung im Mikrotitrationsplatten-Photometer bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen. Die Farbintensität war dabei proportional zur Konzentration der aMMP-8 in der Probe.

Da es sich bei den Proben um Poolproben handelte, wurden die Ergebnisse als Mittelwert

zusammen mit einem mathematisch unterlegten Streubereich angegeben.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden in Anlehnung an (Prescher et al. 2007) wie folgt interpretiert:

-aMMP8 im Eluat <8 ng/ml: Niedriger Bereich, gesund, nicht entzündet.

-aMMP8 im Eluat 8-20 ng/ml: Mittlerer Bereich, geringgradiges entzündliches Geschehen

-aMMP8 im Eluat >20 ng/ml: Hoher Bereich, akutes Entzündungsgeschehen

(Dentagnostics Stand: 09/12)

3.2.4 Quantitative Bestimmung von Zytokinen in der Sulksuflüssigkeit

Die quantitative Datenerfassung der Zytokine wurde mit dem *Human Th1/Th2 11 plex Kit* (eBioscience, Wien, Österreich) durchgeführt. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf einem Sandwich Immunoassay bei dem sogenannte *Beads* als feste Phase benutzt werden. Diese Polysterolbeads liegen in zwei Größen vor (4,4 µm und 5,5 µm) und tragen spezifisch zu den gesuchten Analyten fluorochrommarkierte (Starfire Red) Antikörper. Durch eine Abstufung der Fluoreszenzintensitäten kann später eine messtechnische Unterscheidung der Analyten innerhalb einer Größenpopulation getroffen werden. Mit dem verwendeten Test war es möglich folgende Zytokine in einem Ansatz zu untersuchen: IL-1β, IL-6, IL-8, IL-4, IL-10, TNF-α und TNF-β.

Die Beads bilden bei Zugabe zur Probe Immunkomplexe mit den passenden Zytokinen. Über einen Detektionsantikörper (Biotinkonjugat-Mix) wird ein Streptavidin-Phycoerythrin (PE) – Konjugat an die Immunkomplexe gebunden.

Die messtechnische Analyse eines FlowCytomix-Ansatzes erfolgte im Durchflusszytometer BD FACSCalibur (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Durch die Unterscheidung der Beads im Vorwärtsstreulicht ist eine Trennung der Größe nach möglich. Die Analyse der Fluoreszenzintensitäten des Starfire red-Signals und des PE-Signals lässt eine Differenzierung hinsichtlich Art und Konzentration der Zielgröße zu. Für alle untersuchten Zytokine wurden entsprechende Standardreihen im Test mitgeführt.

Die Kalkulation der Volumina des Bead-Mix, des Konjugat-Mix und der Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung erfolgte mit dem Volume Calculation Programm (eBioscience, Wien, Österreich).

Zur Durchführung der Untersuchung mussten zunächst alle Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmt werden. Die Testreagenzien wurden entsprechend Herstellerangaben vorbereitet und schrittweise mit den Proben inkubiert. Alle Inkubationsschritte wurden auf 96er Mikrotiterplatten (eBioscience, Wien, Österreich), dunkel, bei Raumtemperatur und unter

vorsichtigem Schütteln durchgeführt. Zur Analyse wurden die Ansätze in Röhrchen überführt und im Durchflusszytometer hinsichtlich ihrer Eigenschaften im Streulicht und Fluoreszenzintensität untersucht.

Die Auswertung und Kalkulation der gesuchten Zytokinkonzentrationen konnte mit der Software FlowCytomix Pro 3.0 (eBioscience, Wien, Österreich) erfolgen.

Für jedes Zytokin wurde zusätzlich eine Standardreihe hergestellt.

Testdurchführung

Die Untersuchungen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt:

Es wurde 25µl des Probenpuffers in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Diesem wurden 25µl des Probeneluats, 25µl der Perlenmischung und 50µl der Konjugatmischung beigemischt. Alle Komponenten wurden gemischt und bei Raumtemperatur (18-25°Celsius) für 2 Stunden gelagert. Dabei wurden sie mittels Aluminiumfolie vor Lichteinwirkung geschützt.

Nach dieser Zeit wurden 1ml des Probenpuffers in jedes Röhrchen gegeben und mit 200 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Alle Überschüsse wurden vorsichtig entfernt, sodass noch 100µl Liquid im Röhrchen verblieben. An dieser Stelle wurden alle bisherigen Schritte wiederholt.

Es folgte die Zugabe von 50µl der Streptavidin-Phycoerythrin Lösung, das erneute Mischen aller Komponenten und die anschließende Lagerung bei Raumtemperatur für eine Stunde. Auch hier wurden die Proben mittels Aluminium-Folie vor Lichteinwirkung geschützt. Danach wurde 1ml Probenpuffer dazu gegeben und das Röhrchen mit 26 g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Überschüsse wurden vorsichtig verworfen, so dass noch 100µl Liquid in jedem Röhrchen verbleiben. Hiernach wurden die letzten beiden Schritte wiederholt. Abschließend wurden 500µl Probenpuffer in jedes Röhrchen beigemischt und die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 575nm im Flowcytometer gemessen.

3.2.5 Mikrobiologische Untersuchungen

Die Untersuchungen der Mikroflora erfolgte mithilfe einer Real-time Polymerasekettenreaktion (PCR). Dazu wurden zuerst die Desoxyribonukleinsäuren (DNA) der Bakterien mit einem DNA Extraktionssystem (High Pure PCR Template Preparation Kit; Roche, Mannheim, Germany), unter Berücksichtigung der Herstellerangaben, gewonnen.

Die Real-time PCR wurde mit Hilfe des Real-time Rotary Analyzers (RotorGene 2000; Corbett Research, Sydney, Australia) durchgeführt. Die Primer für *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola* wurden von Ashimoto und Mitarbeiter (Ashimoto et al. 1996) vorgegeben, während die Primer für *Aggregatibacter*

actinomycetemcomitans von Tran und Rudney (Tran und Rudney 1999) und diejenigen für *Filifactor alocis* von Schlafer *et. al* (Schlafer et al. 2010) beschrieben wurden. Die Amplifikation der DNA wurde mit einem 20 µl Reaktionsvolumen, welches aus 2 µl extrahiertem DNA-Strang und 18 µl Reaktionsgemisch bestand, durchgeführt. Letztere setzte sich aus 2 µl 10x PCR Pufferlösung, 2,75 mM Magnesiumchlorid, 0,2 mM Nukleotiden, 0,5 µM Primer, 10⁻⁴ SyberGreen und 1 U taq Polymerase zusammen (Fermentas Life Science, St. Leon-Rot, Germany).

Für jeden Probanden wurden zusätzlich positive und negative Kontrollen durchgeführt. Die Positivprobe wurde zusammengesetzt von 2 µl Genom-DNA der Referenzstämmen in einer Konzentration von 10² bis 10⁷, während die Negativprobe aus 2 µl sterilem Wasser bestand. Zu jeder der beiden Proben wurde 18µl Reaktionsgemisch hinzugegeben.

Die Reaktionszyklen begannen mit einem anfänglichen Denaturierungsschritt (bei 95°C für 5 Minuten). Hiernach folgten 45 Zyklen bei 95°C (je 15 Sekunden), bei 60°C (außer bei *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* 58°C, 20 Sekunden) und bei 72°C (20 Sekunden).

Weiterhin wurden die Sensitivität und Spezifität dieser Methode anhand von den bekannten Bakterienstämmen und subgingivalen Proben überprüft.

Schlussendlich wurde die Spezifität der Vervielfältigung mithilfe von Schmelzkurven getestet.

3.3 Statistische Auswertung

3.3.1 Studiendesign

Die aMMP-8 Konzentration wurde als primärer Zielparameter definiert, während die Konzentration der Interleukine und Bakterien als sekundäre Parameter einbezogen wurden. Es wurde a priori eine Teststärkenanalyse (G*Power, freie statistische Software) basierend auf einer Pilot-Studie (10 Probanden, die nicht in der Hauptstudie einbezogen wurden) durchgeführt. Eine Probenzahl von n=14 in jeder Gruppe erreichte eine statistische Stärke von 90%.

3.3.2 Auswertungen

Alle statistischen Analysen wurden mit der Software SPSS 20.0.0 für Mac OS (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

Für jede Variable pro Gruppe (GNR, GR, PNR, PR) wurde der Mittelwert mit der Standardabweichung ermittelt. Danach erfolgte die Datenauswertung im Allgemeinen mit Hilfe von nichtparametrischen Tests. Diese werden immer dann angewandt, wenn die

Annahme der Normalverteilung nicht aufrechterhalten werden kann. Bei diesen Tests werden nicht die Messwerte selbst, sondern deren Rangplätze verarbeitet. Somit sind sie unempfindlich gegen Ausreißer einer Messreihe (Bühl 2012). Aus diesen Gründen eigneten sie sich besonders gut für die Auswertung der Daten in dieser Studie.

Um die verschiedenen Variablen in den einzelnen Gruppen untereinander auf signifikante Unterschiede zu vergleichen, wurde zunächst der H-Test nach Kruskal und Wallis durchgeführt. Dieser basiert auf eine gemeinsame Rangreihe der Werte aller Stichproben und eignet sich beim Vorliegen von mehr als zwei voneinander unabhängigen Stichproben (Bühl 2012). Bei einem signifikantem Testergebnis stellte sich die Frage, welche der vier Gruppen sich im Einzelnen paarweise voneinander unterscheiden würden. Die Antwort darauf wurde mit dem U-Test nach Mann und Whitney ermittelt, welcher sich zum nichtparametrischen Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben eignet und auf einer gemeinsamen Rangreihe der Werte beider Stichproben basiert (Bühl 2012).

Bei allen Tests wurde das statistische Signifikanzniveau mit $p \leq 0,05$ festgelegt.

Wie aus Studien bekannt ist, spielt das Verhältnis von IL-1 β , als gewebedestruierendes Zytokin, zu IL-10 als Zytokin, welches eine überschießende Immunreaktion verhindert, eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Parodontitis (de Lima Oliveira et al. 2012, Teles et al. 2010, Toker et al. 2008). Aus diesem Grund wurde auch in der vorliegenden Studie für jeden Probanden das Verhältnis von IL-1 β zu IL-10 errechnet. Aus diesen Daten wurde der Mittelwert pro Gruppe gebildet.

Abschließend wurden die klinischen, immunologischen und mikrobiologischen Parameter auf eine statistisch signifikante Korrelation mit den aMMP-8 Werten untersucht. Bei bestehender Korrelation wurde die Regressionsgerade gebildet. Auch die Korrelation der immunologischen Ergebnisse untereinander wurde analysiert.

Zur Untersuchung der Korrelation wurde die Rangkorrelation nach Spearman berechnet. Diese eignet sich für nichtnormalverteilte Parameter. Dabei werden die einzelnen Werte Rangplätzen zugeordnet, die dann in einer entsprechenden Formel weiterverarbeitet werden (Bühl 2012). Bei diesen Berechnungen wurde die statistisch signifikante Korrelation mit $p \leq 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

Die Probanden waren geschlechts- und altersgleich verteilt. Wie erwartet, hatten Patienten mit Parodontitis signifikant höhere Werte bezüglich klinischer Attachmentlevel, Sondierungstiefe, SBI und API. Demografische und klinische Daten wurden in Tabelle 1 zusammengefasst.

4.1 Charakterisierung der Probanden und klinische Parameter

Tabelle 1: Demografische und klinische Parameter

	Nichtraucher		Raucher	
	<i>Parodontal Gesund (n=15)</i>	<i>Parodontitis (n=15)</i>	<i>Parodontal Gesund (n=15)</i>	<i>Parodontitis (n=15)</i>
Alter [J] (Mittelwert; Bereich)	41 (23-68)	45 (24-70)	37 (24-59)	44 (26-61)
Geschlecht (m : w)	5 : 10	9 : 6	8 : 7	6 : 9
SBI (Mittelwert ± SA) [%]	36,62 ± 18,96	48,64 ± 19,45	27,62 ± 17,67 *	48,06 ± 22,39*
API (Mittelwert ± SA) [%]	21,56 ± 20,92*	95,68 ± 6,38*	24,76 ± 18,82*	92,33 ± 8,32*
Klinischer AL (Mittelwert ± SA) [mm]	1,91 ± 0,32*	1,81 ± 0,41*	3,13 ± 2,16*	3,26 ± 0,64*
Sondierungstiefe (Mittelwert ± SA) [mm]	1,85 ± 0,30*	2,79 ± 0,94*	1,79 ± 0,39*	3,03 ± 0,56*
Packungsjahre (Mittelwert ± SA)	-	-	6,03 ± 4,35*	18,24 ± 12,60*

* $p \leq 0,05$

Der SBI war im Durchschnitt in den beiden Gruppen mit parodontal gesunden Probanden niedriger als in den Gruppen mit Parodontitispatienten. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit Rauchern (GR-PR) war statistisch signifikant ($p \leq 0,05$) (**Abbildung 1**).

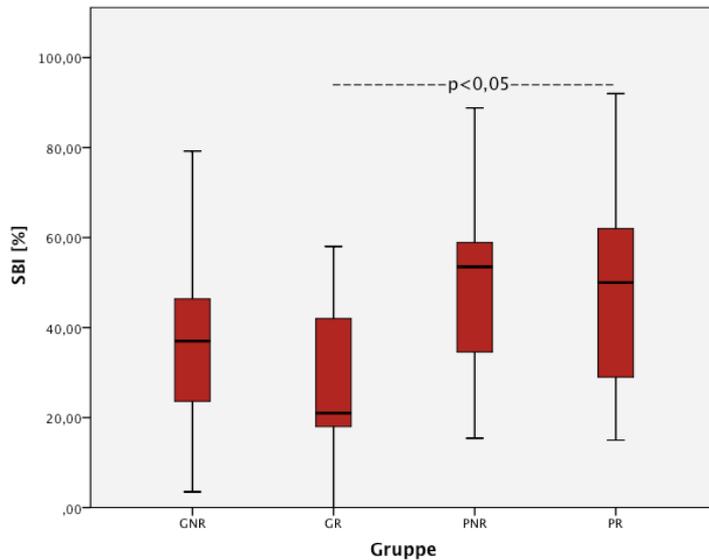


Abbildung 1: Blutungsneigung und statistisch signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$)

Es war zu erkennen, dass Probanden mit gesundem Parodont einen geringeren API aufwiesen, als diejenigen mit Parodontitis. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Parodontitispatienten und Patienten mit gesundem Parodont bestand ($p \leq 0,05$).

Der klinische Attachmentlevel war bei Rauchern höher als bei Nichtrauchern. Zwischen den Gruppen GNR-PNR, GNR-PR, GR-PNR und GR-PR wurde beim AL ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt ($p \leq 0,05$).

Bei den Sondierungstiefen bestand zwischen den Gruppenpaaren GNR-PNR, GNR-PR, GR-PNR, PNR-PR sowie GR-PR ein statistisch signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) (Abbildung 2). In dieser Studie lag der Wert der Packungsjahre bei Probanden mit gesundem Parodont deutlich niedriger als bei Probanden mit Parodontitis (Tabelle 1).

Hierbei wurde zwischen den beiden Gruppen mit Rauchern GR-PR ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt ($p \leq 0,05$).

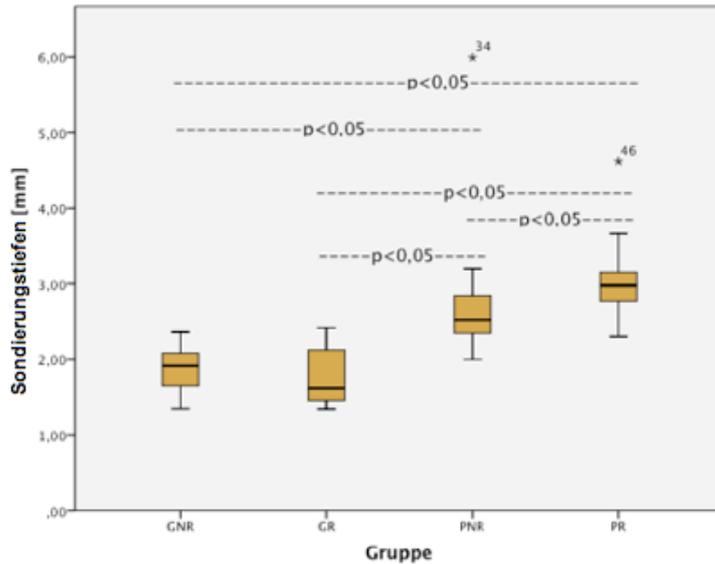


Abbildung 2: Mittlere Sondierungstiefen [mm] und statistisch signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$)

4.1.1 Kategorisierung der Sondierungstiefen

Die Unterteilung der Sondierungstiefen in flache, mittlere und tiefe parodontale Taschen ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Prozentuale Verteilung Sondierungstiefenkategorien

	Nichtraucher		Raucher	
	Parodontal Gesund (n=15)	Parodontitis (n=15)	Parodontal Gesund (n=15)	Parodontitis (n=15)
Sondierungstiefe 1-3mm (Mittelwert \pm SA) [%]	100,00 \pm 0,00*	77,69 \pm 17,43*	100,00 \pm 0,00*	71,39 \pm 16,16*
Sondierungstiefe 4-6mm (Mittelwert \pm SA) [%]	0,00 \pm 0,00*	19,26 \pm 10,16*	0,00 \pm 0,00*	26,49 \pm 13,69
Sondierungstiefe >7mm (Mittelwert \pm SA) [%]	0,00 \pm 0,00*	3,04 \pm 10,13	0,00 \pm 0,00*	2,10 \pm 4,29*

* $p \leq 0,05$

Sowohl für flache (ST 1-3 mm) als auch für mittlere (ST 4-6 mm) Sondierungstiefen bestand zwischen den Gruppen GNR-PNR, GNR-PR, GR-PNR sowie GR-PR ein statistisch signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$).

Bei den tiefen Taschen ($ST > 7$ mm) wurde zwischen den Gruppenpaaren GNR-PR sowie GR-PR ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt ($p \leq 0,05$) (Tabelle 2).

4.2 Immunologische Parameter

Zu den immunologischen Ergebnissen werden in dieser Studie sowohl die Messung der aMMP-8 als auch der Zytokin Konzentrationen gezählt. Die Auswertung der immunologischen Parameter erfolgte separat für den primären Zielparame-ter aMMP-8 und anschließend für die untersuchten Zytokine als sekundäre Untersuchungsparameter.

4.2.1 Ergebnisse der Messungen der aMMP-8-Konzentration

Die aMMP-8 war, bei Patienten mit Parodontitis im Vergleich zu parodontal Gesunden signifikant erhöht ($p \leq 0,05$). Der Mittelwert für Probanden mit Parodontitis wurde durchschnittlich mit $35,73 \pm 25,31$ ng/ μ l gemessen, während es für parodontal Gesunde bei $10,80 \pm 7,11$ ng/ μ l lag.

Innerhalb der Gruppen Parodontal Gesund und Parodontitis bestanden keine signifikanten Unterschiede (GNR vs. GR = $9,20 \pm 4,36$ ng/ μ l vs. $12,40 \pm 8,96$ ng/ μ l; PNR vs. PR = $35,67 \pm 29,27$ ng/ μ l vs. $35,80 \pm 21,68$ ng/ μ l).

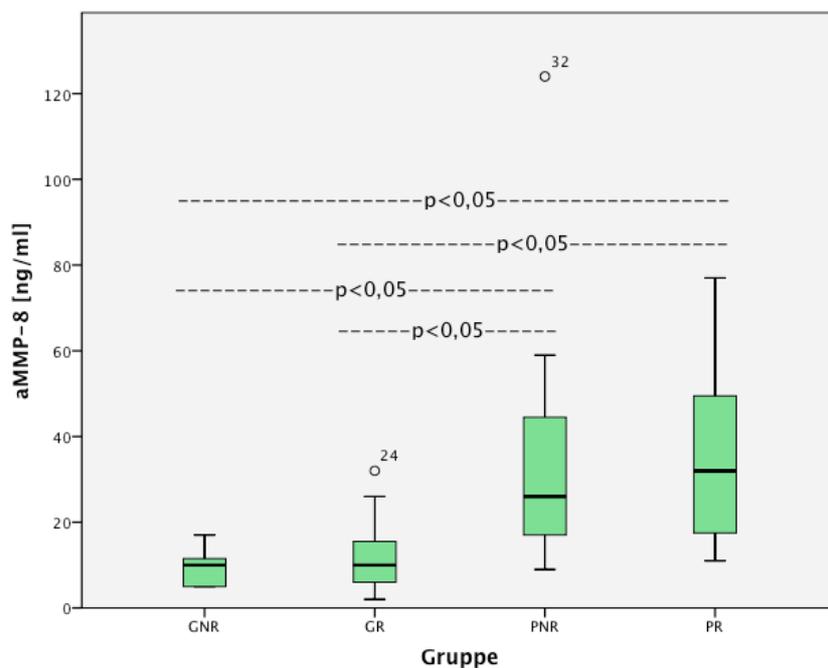


Abbildung 3: aMMP-8 Konzentration [ng/ml] und statistisch signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$)

4.2.2 Ergebnisse der Messungen der Zytokin-Konzentrationen

Die entnommenen Proben der GSF wurden auf 7 verschiedene Zytokine untersucht.

Zur Charakterisierung der immunologischen Prozesse wurden die Zytokine in pro-inflammatorische (Tabelle 3) und anti-inflammatorische Zytokine (Tabelle 4) unterteilt.

4.2.2.1 Pro-inflammatorische Zytokine

Tabelle 3: Pro-inflammatorische Zytokine

<i>Zytokin</i>	Nichtraucher		Raucher	
	<i>Parodontal Gesund</i>	<i>Parodontitis</i>	<i>Parodontal Gesund</i>	<i>Parodontitis</i>
IL-1 β (Mittelwert \pm SA) [pg/ml]	65,20 \pm 21,93	87,35 \pm 55,61*	26,76 \pm 22,67*	130,16 \pm 91,00*
IL-6 (Mittelwert \pm SA) [pg/ml]	100,00 \pm 5,02	40,08 \pm 0,00	4,69 \pm 5,51	40,08 \pm 55,86
IL-8 (Mittelwert \pm SA) [pg/ml]	86,01 \pm 19,9*	119,62 \pm 77,84*	39,38 \pm 28,86	126,72 \pm 75,59
TNF- α (Mittelwert \pm SA) [pg/ml]	134,82 \pm 195,23	234,27 \pm 324,21	21,15 \pm 2,28	91,99 \pm 161,14
TNF- β (Mittelwert \pm SA) [pg/ml]	82,19 \pm 109,21	84,29 \pm 97,73	44,85 \pm 51,08	72,26 \pm 99,70

* $p \leq 0,05$

Interleukin-1 β

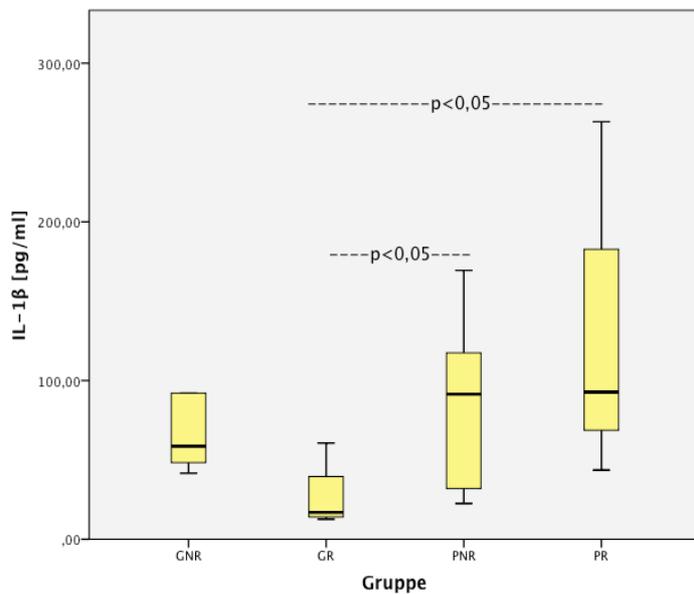


Abbildung 4: IL-1 β Konzentration [pg/ml] und statistisch signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$)

Allgemein ergaben sich für das IL-1 β bei Probanden mit gesundem Parodont niedrigere Werte, als für Probanden mit Parodontitis. Diese Beobachtung wurde sowohl für Raucher als auch für Nichtraucher gemacht. Weiterhin fiel auf, dass die IL-1 β Konzentration in der Gruppe GR deutlich niedriger war als in den anderen drei Gruppen. Es konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen GR-PNR und GR-PR ermittelt werden ($p \leq 0,05$) (Abbildung 4).

Der Mittelwert für Probanden mit Parodontitis lag bei $106,81 \pm 73,20$ pg/ml, während bei parodontal Gesunden $49,83 \pm 28,85$ pg/ml gemessen wurde. Es konnte ein statistisch signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen Probanden mit klinisch gesundem Parodont und denjenigen mit Parodontitis festgestellt werden.

Interleukin-6

Die IL-6 Konzentration war im Durchschnitt bei Rauchern deutlich niedriger als bei Nichtrauchern. Die Gruppe PNR konnte in der Auswertung nicht berücksichtigt werden, da IL-6 bei nur einem Probanden gemessen wurde (Abbildung 5). Der Mittelwert für Probanden mit Parodontitis lag bei $17,32 \pm 39,54$ pg/ml, während für parodontal Gesunde $0,31 \pm 1,56$ pg/ml ermittelt wurde.

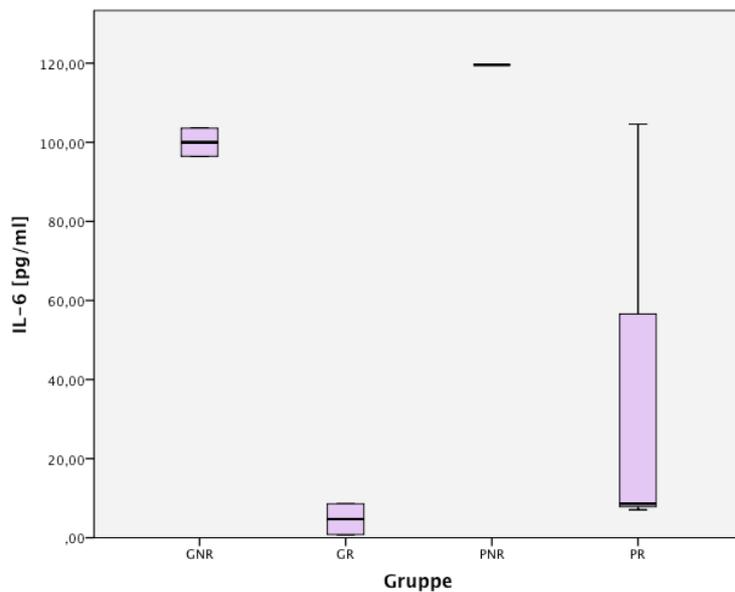


Abbildung 5: IL-6 Konzentration [pg/ml]

Interleukin-8

Der Mittelwert der Interleukin-8 Konzentration für Probanden mit Parodontitis war $124,19 \pm 73,44$ pg/ml, während für parodontal Gesunde $59,08 \pm 33,29$ pg/ml ermittelt wurden. Es konnte ein statistisch signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen Probanden mit klinisch gesundem Parodont und denjenigen mit Parodontitis festgestellt werden.

Die IL-8 Konzentration war in der Gruppe GNR verglichen mit der Gruppe GR deutlich erhöht. Parodontal erkrankte Raucher und Nichtraucher hatten vergleichbare IL-8 Werte. Rauchende Probanden mit gesundem Parodont hatten durchschnittlich die niedrigste Interleukin-8 Konzentration im Sulkus, während die Raucher mit Parodontitis die höchste aufwiesen. Es wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen GNR-GR ermittelt ($p \leq 0,05$) (Abbildung 6).

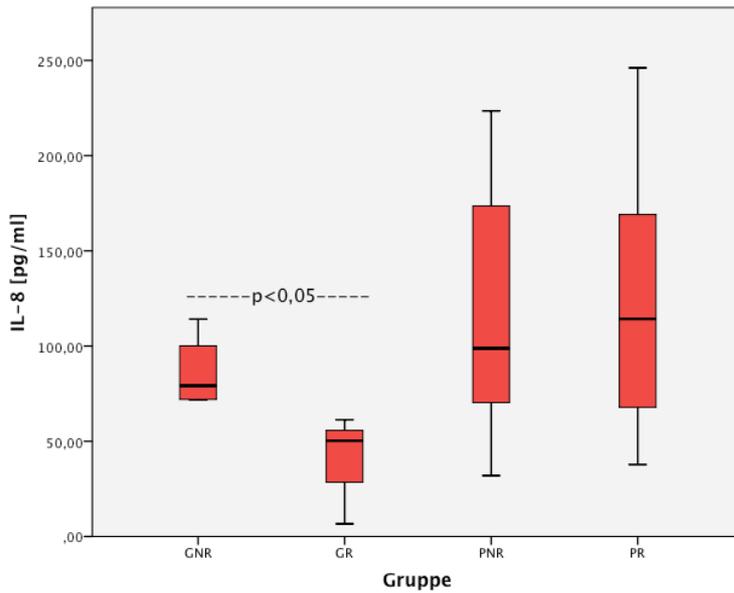


Abbildung 6: IL-8 Konzentration [pg/ml] und statistisch signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$)

Tumornekrosefaktor- α

Beim TNF- α lag der Mittelwert für Probanden mit Parodontitis bei $30,05 \pm 107,05$ pg/ml und bei parodontal Gesunden bei $34,73 \pm 107,29$ pg/ml.

Allgemein war TNF- α bei Nichtrauchern erhöht. Probanden mit klinisch gesundem Parodont wiesen durchschnittlich die niedrigsten Werte auf, während bei Nichtrauchern mit Parodontitis der höchste TNF- α Wert detektiert wurde. Die Gruppe PR hatte eine relativ hohe TNF- α Konzentration, der dennoch unter den Konzentrationen lag, die in den Gruppen GNR und PNR gemessen wurden (Abbildung 7).

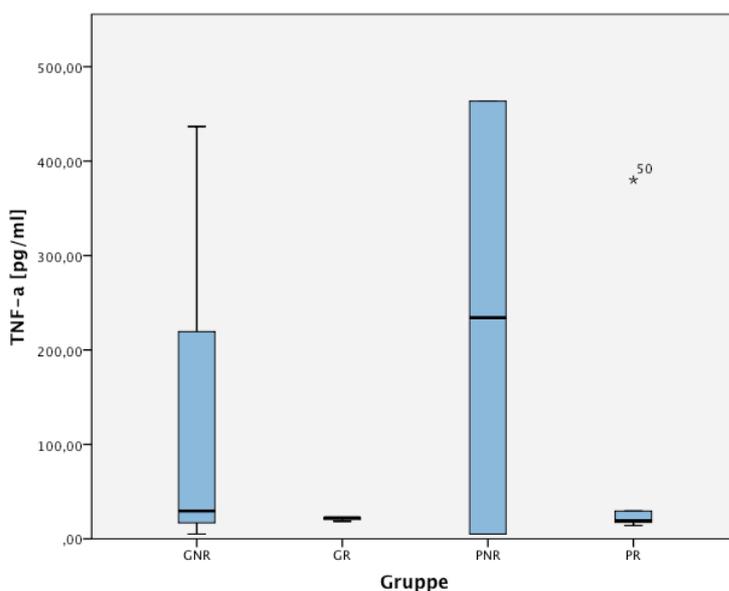


Abbildung 7: TNF- α Konzentration [pg/ml]

Tumorekrosefaktor- β

Die TNF- β Konzentration war in den Gruppen mit Nichtrauchern generell höher als bei Rauchern (Abbildung 8). Während bei den Gruppen GNR und PNR vergleichbare TNF- β Konzentrationen gemessen wurden, waren in der Gruppe PR höhere Werte zu erkennen, als bei den Rauchern mit klinisch gesundem Parodont (Tabelle 3).

Der Mittelwert für TNF- β lag bei Probanden mit Parodontitis bei $13,24 \pm 43,76$ pg/ml, während für parodontal Gesunde $16,68 \pm 52,44$ pg/ml ermittelt wurden.

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden nicht ($p \geq 0,05$).

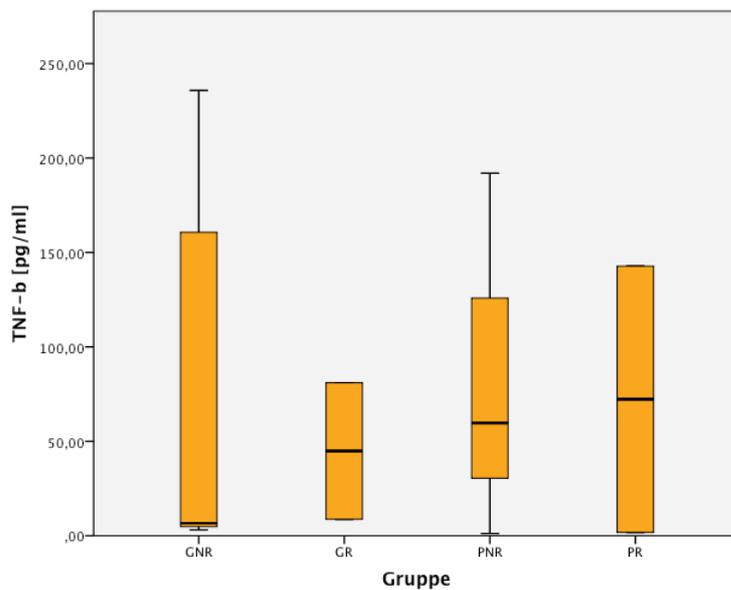


Abbildung 8: TNF- β Konzentration [pg/ml]

4.2.2.2 Anti-inflammatorische Zytokine

Tabelle 4: Anti-inflammatorische Zytokine

Zytokin	Nichtraucher		Raucher	
	Parodontal Gesund	Parodontitis	Parodontal Gesund	Parodontitis
IL-4 (Mittelwert \pm SA) [pg/ml]	40,41 \pm 36,30	29,83 \pm 15,02	54,31 \pm 67,27	64,44 \pm 24,36
IL-10 (Mittelwert \pm SA) [pg/ml]	85,91 \pm 64,87	50,52 \pm 29,93	42,00 \pm 13,03	53,00 \pm 29,39

* $p \leq 0,05$

Interleukin-4

Das IL-4 wurde bei Nichtrauchern in einer niedrigeren Durchschnittskonzentration gemessen. Für die Gruppe PR ergab sich eine um das doppelte höhere Konzentration als für die Gruppe PNR. Die Gruppe GNR hatte durchschnittlich eine etwas niedrigere IL-4 Konzentration als die Gruppe GR (Tabelle 4). Bei den Nichtrauchern hatten die klinisch parodontal gesunden Probanden höhere Werte als diejenigen mit Parodontitis, während bei den Rauchern Probanden mit gesundem Parodont geringere Werte aufwiesen, als diejenigen mit einer Parodontitis (Abbildung 9). Der Mittelwert für Probanden mit Parodontitis lag bei $43,68 \pm 25,35$ pg/ml, während für parodontal Gesunde $44,58 \pm 43,92$ pg/ml gemessen wurde.

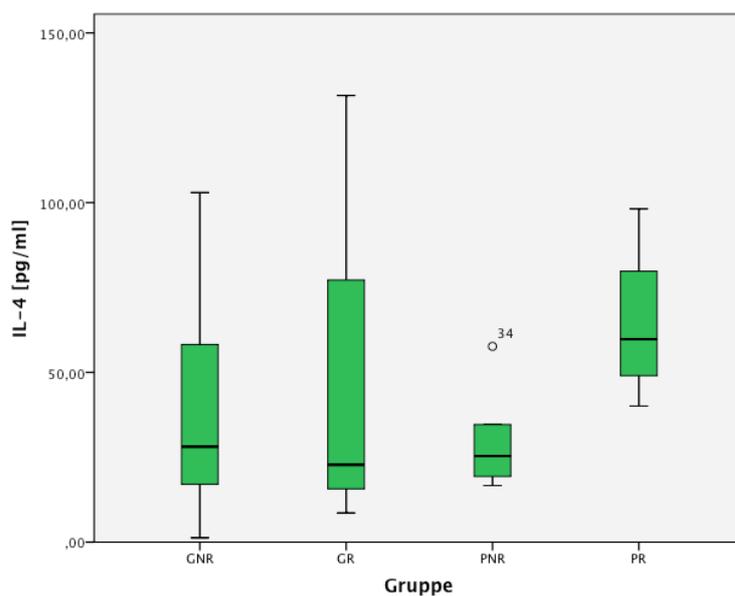


Abbildung 9: IL-4 Konzentration [pg/ml]

Interleukin-10

Der Mittelwert der Interleukin-10 Konzentration für Probanden mit Parodontitis lag bei $51,59 \pm 27,38$ pg/ml, während für parodontal Gesunde $68,40 \pm 53,92$ pg/ml ermittelt wurden. Die Durchschnittskonzentration des IL-10 war bei Nichtrauchern generell höher als bei Rauchern. Nichtraucher mit gesundem Parodont hatten höhere IL-10 Konzentrationen als Nichtraucher mit Parodontitis. In der Gruppe PR war die IL-10 Konzentration im Vergleich mit der Gruppe GR erhöht (Abbildung 10). Signifikante Unterschiede bestanden nicht ($p \geq 0,05$).

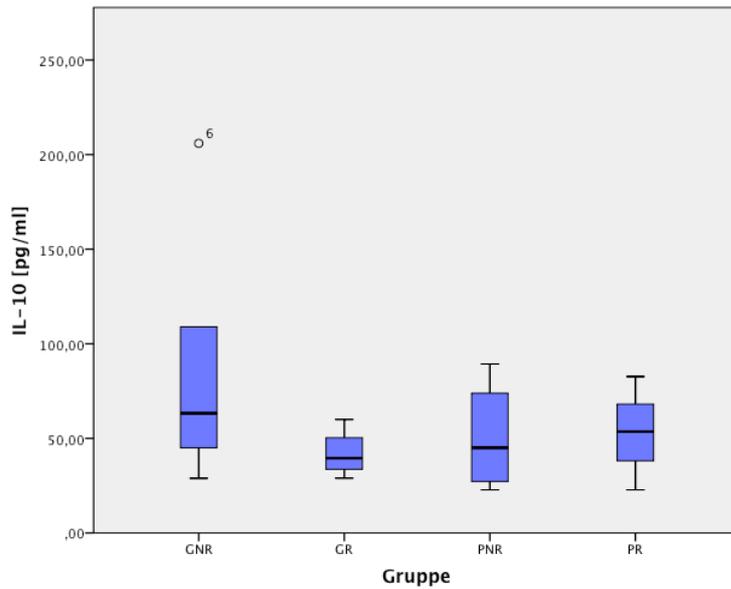


Abbildung 10: IL-10 Konzentration [pg/ml]

4.2.2.3 Verhältnis (Ratio) von IL-1 β zu IL-10

Tabelle 5: Ratio IL-1 β zu IL-10

	Nichtraucher		Raucher	
	Parodontal Gesund	Parodontitis	Parodontal Gesund	Parodontitis
IL-1 β : IL-10	0,82 \pm 0,42	1,51 \pm 0,70	0,40 \pm 0,39	1,20 \pm 0,11

*p \leq 0,05

Das Verhältnis von IL1- β zu IL-10 war bei der Gruppe GR am niedrigsten, während sie den maximalen Wert in der Gruppe PNR erreichte. Der Wert der Gruppe PR lag etwas niedriger, als derjenige der Gruppe PNR (Tabelle 5). Werte größer 1,0 deuteten auf eine Imbalance zwischen pro – und anti-inflammatorischen Zytokinen hin.

4.3 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen

Die Parodontalpathogene wurden bei Parodontitispatienten signifikant häufiger und in höheren Konzentrationen detektiert als bei parodontal Gesunden (*A. actinomycetemcomitans* = klinisch gesund vs. Parodontitis = 9,38 \pm 15,00/ μ l vs. 1057,38 \pm 4216,39/ μ l, *P. gingivalis* = 0,00 \pm 0,00/ μ l vs. 163137,88 \pm 362188,14/ μ l, *T. denticola* = 127,76 \pm 488,07/ μ l vs. 16091,50 \pm 35991,03/ μ l, *T. forsythia* = 127,76 \pm 488,07/ μ l vs. 166971,90 \pm 35991,04/ μ l und *F. alocis* = 0,00 \pm 0,00/ μ l vs. 996,35 \pm 2513,93/ μ l).

Für *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* und *F. alocis* wurden jeweils statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen klinisch Gesunden und Probanden mit Parodontitis ermittelt. Dabei hatten vor allem Raucher durchschnittlich höhere Werte.

A. actinomycetemcomitans war in allen Gruppen nachweisbar, mit deutlich höheren Keimzahlen bei Parodontitispatienten. *P. gingivalis* konnte nur bei Parodontitispatienten signifikant detektiert werden ($p \leq 0,05$). Ähnlich stellte sich *T. forsythia* dar. *T. denticola* wurde in allen Gruppen nachgewiesen, auch hier wiederum mit deutlichem Bezug zur Parodontitis. *F. alocis* konnte vor allem bei Parodontitispatienten nachgewiesen werden. Hier primär bei Rauchern (Tabelle 6).

Tabelle 6: quantitative Mengen der Keime *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* und *F. alocis*

Keim [Anzahl/ μ l] (Mittelwert \pm SA)	Nichtraucher		Raucher	
	Parodontal Gesund	Parodontitis	Parodontal Gesund	Parodontitis
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	5,71 \pm 8,41	671,80 \pm 2318,28	12,73 \pm 18,88	1442,92 \pm 5579,60
<i>P. gingivalis</i>	0,00 \pm 0,00*	161320,06 \pm 477656,87*	0,00 \pm 0,00*	164955,73 \pm 208728,03*
<i>T. forsythia</i>	0,00 \pm 0,00*	142845,53 \pm 310639,68*	78,63 \pm 260,80*	191098,267 \pm 212052,503*
<i>T. denticola</i>	32,00 \pm 69,33*	13260,86 \pm 37986,52*	217,13 \pm 673,98*	18922,20 \pm 34972,84*
<i>F. alocis</i>	0,00 \pm 0,00*	460,27 \pm 1638,31*	0,00 \pm 0,00*	1532,40 \pm 3129,09*

* $p \leq 0,05$

4.4 Korrelationen der Daten

4.4.1 Korrelation der klinischen Daten mit der aMMP-8 Konzentration

Es wurde eine signifikante Korrelation zwischen der aMMP-8 Konzentration und dem SBI festgestellt ($p \leq 0,05$). Dabei zeigte sich: je höher die aMMP-8 Konzentration war, desto höher stieg der prozentuale Anteil der Sulkusblutung (Abbildung 11A).

Weiterhin wurde eine signifikante Korrelation zwischen aMMP-8 und dem Mittelwert der Sondierungstiefe festgestellt ($p \leq 0,05$). Man konnte einen deutlichen Anstieg der

Sondierungstiefe mit dem Anstieg der aMMP-8 Konzentration in Bezug bringen (Abbildung 11B).

Es wurde zudem eine signifikante Korrelation zwischen aMMP-8 und dem Mittelwert der Packungsjahre festgestellt. Je größer die Zahl der Packungsjahre, desto höher die aMMP-8 Werte (Abbildung 11C).

Letztlich wurde eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem klinischen Attachmentlevel und der aMMP-8 Konzentration ermittelt ($p \leq 0,05$). Hierbei zeigt sich ein Zusammenhang zwischen der aMMP-8 Werte und dem Attachmentlevel (Abbildung 11D).

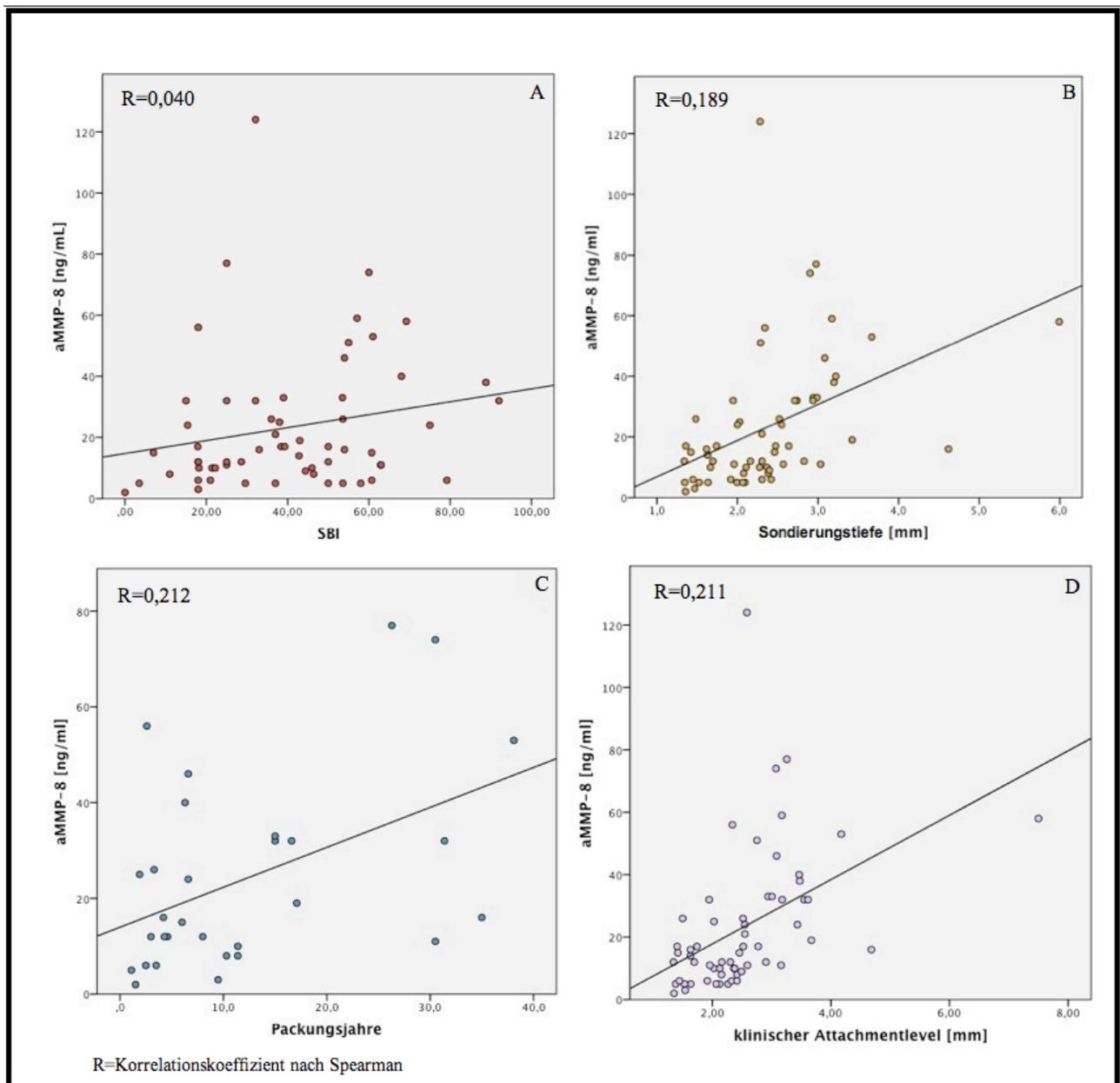


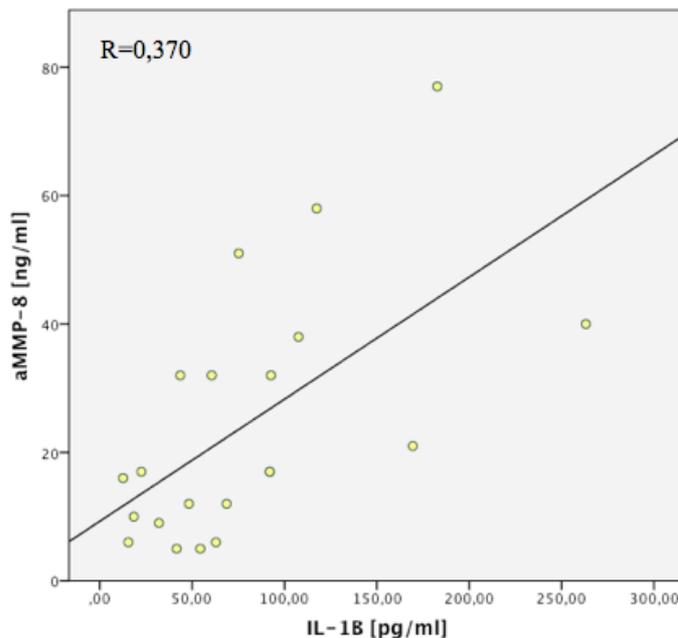
Abbildung 11: Korrelation der klinischen Daten mit der aMMP-8 Konzentration; A) aMMP-8 vs. SBI; B) aMMP-8 vs. Sondierungstiefe; C) aMMP-8 vs. Packungsjahre; D) aMMP-8 vs. Attachmentlevel

4.4.2 Korrelation der immunologischen und mikrobiologischen Daten mit der aMMP-8 Konzentration

Immunologische Parameter

Als einziges Zytokin wurde für IL-1 β eine signifikante Korrelation mit der aMMP-8 Konzentration festgestellt ($p \leq 0,05$). Auch hier konnte man einen Zusammenhang zwischen Anstieg der IL-1 β Konzentration und dem Anstieg der aMMP-8 Konzentration beobachten (Abbildung 12).

Bei allen anderen in dieser Studie untersuchten Zytokine konnten keine statistisch signifikanten Korrelationen mit der aMMP-8 Konzentration festgestellt werden. Auf eine weiterführende grafische Darstellung wird daher verzichtet.



R = Korrelationskoeffizient nach Spearman

Abbildung 12: Korrelation des IL-1 β mit der aMMP-8 Konzentration

Mikrobiologische Parameter

Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der aMMP-8 Konzentration und *P. gingivalis* konnte verzeichnet werden (Abbildung 13A).

Weiterhin wurde eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Keimen *T. denticola* (Abbildung 13B), *T. forsythia* (Abbildung 13C) und *F. alocis* (Abbildung 13D) ermittelt.

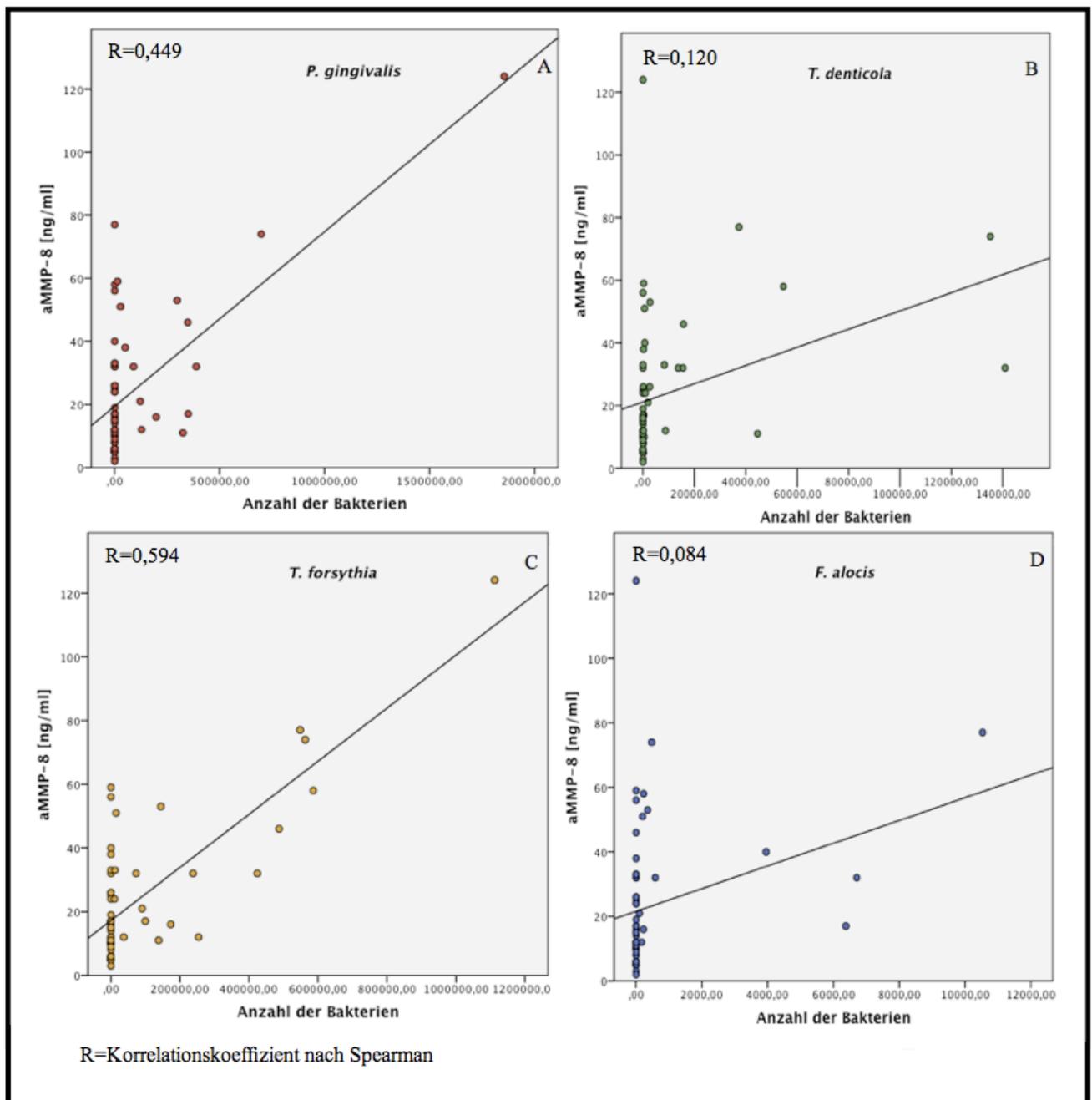


Abbildung 13: Korrelation der mikrobiologischen Daten mit der aMMP-8 Konzentration; A) aMMP-8 vs. *P.gingivalis*.; B) aMMP-8 vs. *T.denticola*; C) aMMP-8 vs. *T. forsythia*; D) aMMP-8 vs. *F.alocis*

4.4.3 Korrelation der klinischen Daten untereinander

Die Korrelation der klinischen Daten untereinander ist in Tabelle 7 dargestellt. Sowohl der klinische Attachmentlevel als auch die Sondierungstiefen korrelierten hierbei mit dem SBI und den Packungsjahren.

Tabelle 7: Signifikante Korrelation der klinischen Daten untereinander (P); Korrelationskoeffizient nach Spearman (R)

	AL		SBI		PJ		ST	
	P	R	P	R	P	R	P	R
AL	-	-	0,00	0,41	0,00	0,75	0,00	0,93
SBI	0,00	0,41	-	-	-	-	0,00	0,48
PJ	0,00	0,75	-	-	-	-	0,00	0,69
ST	0,00	0,94	0,00	0,48	0,00	0,68	-	-

- keine statistisch signifikante Korrelation P: p-Wert $\leq 0,05$ statistisch signifikante Korrelation
R: Korrelationskoeffizient nach Spearman

4.4.4 Korrelation der Zytokine untereinander

Die Werte für IL-1 β als pro-inflammatorisches Zytokin korrelierten mit den anti-entzündlichen Zytokinen IL-10 und IL-4. TNF- α stand sowohl mit IL-6 als auch mit TNF- β in statistisch signifikanter Korrelation (Tabelle 8).

Tabelle 8: Korrelation der Zytokine untereinander; Korrelationskoeffizienten nach Spearman

	IL-1 β		IL-6		IL-8		TNF- α		TNF- β		IL-10		IL-4	
	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R
IL-1 β	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	0,70	0,00	0,77
IL-6	-	-	-	-	-	-	0,02	0,82	-	-	-	-	-	-
IL-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF- α	-	-	0,02	0,82	-	-	-	-	0,00	0,90	-	-	-	-
TNF- β	-	-	-	-	-	-	0,00	0,90	-	-	-	-	-	-
IL-10	0,01	0,70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-4	0,00	0,77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- keine statistisch signifikante Korrelation P: p-Wert $\leq 0,05$ statistisch signifikante Korrelation
R: Korrelationskoeffizient nach Spearman

4.4.5 Korrelation der mikrobiologischen Ergebnisse mit den klinischen Daten

Bei der Untersuchung der klinischen und mikrobiologischen Daten fiel auf, dass *P. gingivalis* und *T. denticola* mit den klinischen Parametern SBI, ST, AL und PJ signifikant korrelierten, *A. actinomycetemcomitans* dagegen nicht (Tabelle 9).

Tabelle 9: Korrelationen der klinischen Parameter vs. mikrobielle Werte mit Korrelationskoeffizienten nach Spearman

	SBI		ST		AL		PJ	
	P	R	P	R	P	R	P	R
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. gingivalis</i>	0,00	0,35	0,00	0,52	0,00	0,58	0,00	0,67
<i>T. forsythia</i>	-	-	0,00	0,54	0,00	0,60	0,00	0,63
<i>T. denticola</i>	0,00	0,44	0,00	0,58	0,00	0,59	0,00	0,57
<i>F. alocis</i>	0,05	0,23	0,00	0,48	0,00	0,56	0,00	0,57

- keine statistisch signifikante Korrelation

P: p-Wert $\leq 0,05$ statistisch signifikante Korrelation

R: Korrelationskoeffizient nach Spearman

5. Diskussion

5.1 Einordnung in die wissenschaftliche Literatur

Die Parodontitis ist eine entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates. In der internationalen Literatur geht man primär davon aus, dass sie durch eine Gruppe von gram-negativen und anaeroben Bakterien, die subgingival siedeln, ausgelöst wird. Jedoch besteht Evidenz zur Annahme, dass nur bei einem empfänglichen Wirt eine Entzündung ausgelöst wird (Bartold und Van Dyke 2013).

Bisher ist erwiesen, dass das Immunsystem des Wirtes auf Bakterien und ihre Virulenzfaktoren mit einer entzündlichen Reaktion antwortet. Dabei werden Zytokine und andere Entzündungsmediatoren wie z.B. die Matrix-Metalloproteinasen ausgeschüttet, die dann die Destruktion von Knochen und Bindegewebe einleiten (Page und Kornman 1997). Um die Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus bei einer Parodontitis zu verstehen, wird schon lange die gingivale Sulkusflüssigkeit als diagnostisches Medium heran gezogen. Schon vor mehr als dreißig Jahren wurden die ersten Immunindikatoren in ihr entdeckt (Goodson et al. 1974). Heute weiß man, dass in der Sulkusflüssigkeit sowohl mikrobiologische als auch immunologische und systemische Parameter gemessen werden können (Armitage 2004). Die Zunahme der Bedeutung der Sulkusflüssigkeit als diagnostisches Medium stellt im Hinblick klinischer und labortechnischer Untersuchungsmethoden neue Herausforderungen an dentale Diagnostikmethoden. Im Hinblick auf diese Problematik wurden in der Vergangenheit diverse Methoden zur Probenentnahme aus der Sulkusflüssigkeit untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich Papierstreifen zur simultanen Messung von immunologischen und mikrobiellen Werten am Besten eignen (Guentsch et al. 2011).

Bei der Untersuchung der Sulkusflüssigkeit hat sich in der letzten Zeit das aMMP-8 als ein wichtiger Biomarker der Parodontitis durchgesetzt (Kraft-Neumärker et al. 2012, Sorsa et al. 2004). Dieses scheint vor allem eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der chronischen Parodontitis zu spielen (Ingman et al. 1996, Kiili et al. 2002). Diverse Studien belegen einen Rückgang der zuvor erhöhten aMMP-8 Konzentration nach der Behandlung der Parodontitis (Chen et al. 2000, Mäntylä et al. 2006).

Eine weitere, noch nicht vollständig beantwortete Frage ist das Zusammenspiel immunologischer Botenstoffe miteinander bei der Pathogenese der Parodontitis. Viele verschiedene Zytokine spielen hierbei eine wichtige Rolle und wurden in verschiedenen Studien näher betrachtet. Vor allem das IL-1 β (Engbretson et al. 1999) und das TNF- α (Gamonal et al. 2003, Rossomando et al. 1990) als pro-inflammatorische und das IL-10 (Fiorentino et al. 1991) als anti-inflammatorisches Zytokin werden dabei in der

internationalen Literatur häufig diskutiert. Besonders das Verhältnis von IL-1 β zu IL-10 scheint die entzündliche Reaktion gut widerzuspiegeln. Man fand heraus, dass die Konzentration von IL-1 β nach Behandlung der Parodontitis abnahm, während die IL-10 Konzentration zunahm (de Lima Oliveira et al. 2012). Eine andere Studie von Teles *et. al* belegt, dass Probanden mit aggressiver Parodontitis ein IL-1 β /IL-10 Verhältnis größer als 1 aufwiesen, als Probanden mit gesundem Parodont. Man nahm somit an, dass bei einer Parodontitis eine Imbalance zwischen pro-und anti-inflammatorischen Zytokinen vorliegen müsse (Teles et al. 2010).

Neben dem IL-10 wird in der internationalen Literatur auch das IL-4 als anti-inflammatorisches Zytokin genannt (te Velde et al. 1990). Seine Rolle bei der Entstehung der Parodontitis scheint vernachlässigt zu werden. Es existieren nur wenige Studien darüber, die belegen, dass seine Abwesenheit mit der Progression parodontaler Erkrankungen in Bezug gebracht werden kann (Shapira et al. 1992).

Zusammen mit der mikrobiellen Ursache wird die Parodontitis durch Risikofaktoren wie dem Tabakkonsum begünstigt. Rauchen modifiziert die Immunantwort des Wirtes bei der Reaktion auf Pathogene. Diese wird abgeschwächt und begünstigt somit die Entstehung einer Parodontitis mit typischen Symptomen wie Attachmentverlust, vergrößerte Sondierungstiefen und Knochenabbau (AAP 1999).

Das Rauchen wurde im Bezug auf die Pathogenese der Parodontitis schon in einigen verschiedenen Studien untersucht. So wurde beispielsweise eine Reduktion der PMN Funktion mit starkem Tabakkonsum in Verbindung gebracht (Guentsch et al. 2006). Man fand außerdem heraus, dass das Immunsystem bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern eine niedrigere Menge an Antikörper bilden kann, wodurch die Bekämpfung der bakteriellen Infektion beeinträchtigt wird (Mooney et al. 2001). Weiterhin stellten Gunsolley und Mitarbeiter heraus, dass Raucher einen höheren Plaque Index aufwiesen, als Nichtraucher (Gunsolley et al. 1998). Eine andere Studie untersuchte die aMMP-8 Konzentration im Bezug zu klinischen Parametern und beobachtete, dass die aMMP-8 Konzentration vor allem bei Rauchern mit Parodontitis erhöht war (Mäntylä et al. 2006).

Die vorliegende Studie untersuchte die Effekte des Tabakkonsums auf die Ausschüttung des aMMP-8 im gingivalen Sulkus. Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen der aMMP-8 Konzentration und der Konzentration von diversen pro-und anti-inflammatorischen Zytokinen, den Parodontalpathogenen *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* und *F. alocis* sowie traditioneller klinischer parodontologischer Parameter wie dem SBI, dem klinischen Attachmentlevel und der Sondierungstiefe gesucht.

5.2 Diskussion der immunologischen Ergebnisse

5.2.1 Zytokine

5.2.1.1 Pro-inflammatorische Zytokine

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt fünf pro-inflammatorische Zytokine untersucht. Die Unterteilung in pro- und anti-inflammatorische Zytokine erlaubt eine bessere Sicht auf die immunologischen Verhältnisse und ist in Tabelle 3 und Tabelle 4 zusammenfassend zu sehen.

IL-1 β

Das IL-1 β ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das in mehreren Studien mit der Pathogenese der Parodontitis in Bezug gebracht wurde. Engbretson *et al.* fanden heraus, dass Probanden mit Parodontitis eine bis zu 2,5-fach höhere IL-1 β Konzentration in den parodontalen Taschen aufwiesen, als diejenigen die nicht an Parodontitis erkrankt waren (Engbretson *et al.* 1999). Das IL-1 β ist in hoher Menge in entzündeter Gingiva vorhanden und induziert dort die Aktivität von Kollagenasen und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), was wiederum zum Knochen- und Bindegewebeabbau führt (Birkedal-Hansen 1993, Honig *et al.* 1989). Somit sollte eine hohe IL-1 β Konzentration auch mit einer hohen Konzentration an Kollagenasen und MMPs vergesellschaftet sein.

Die in der vorliegenden Studie gesammelten Daten stimmen mit den Hinweisen in der internationalen Literatur überein. Das IL-1 β war allgemein in den Gruppen mit Parodontitis in deutlich höherer Konzentration zu messen, als in den Gruppen, mit parodontal gesunden Probanden (Tabelle 3). Die Gruppe PR hatte dabei den höchsten Wert, während der mit Abstand niedrigste Durchschnittswert in der Gruppe GR gemessen wurde. Dieses Ergebnis sowie die statistisch signifikante Differenz zwischen den Gruppen GR-PR (Abbildung 4), lässt vermuten, dass Parodontitis die Ausschüttung des IL-1 β fördert.

Jedoch deutet die stark erhöhte IL-1 β Konzentration bei der Gruppe PR darauf hin, dass die immunsupprimierenden Effekte des Rauchens nur solange anhalten bis keine Entzündung vorliegt. Weitere Untersuchungen scheinen zu belegen, dass bei der Parodontitis der Tabakkonsum keinen Einfluss auf die IL-1 β Konzentration im GCF hat (Giannopoulou *et al.* 2003). Sowohl bei Rauchern als auch bei Nichtrauchern mit Parodontitis ist der IL-1 β Level erhöht.

Es scheint, dass das Rauchen bei gesunden Probanden einen immunsupprimierenden Effekt hat. Es wurde bereits berichtet, dass Tabakkonsum die Funktionen von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, die eine wichtige Rolle im Immunsystem spielen, enorm

abschwächt (Guentsch et al. 2006). Weiterhin ist bereits bekannt, dass Monozyten und Makrophagen auf Lipopolysaccharide und Endotoxine gramnegativer Bakterien mit einer erhöhten Sekretion von IL-1 (Lindemann et al. 1988) reagieren. Demzufolge deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass der Tabakrauch nicht nur negative Auswirkungen auf die PMN, sondern auch auf andere Immunzellen wie die Monozyten und Makrophagen hat. In der Literatur liegen keine exakten Daten dazu vor, sodass um dieses Ergebnis zu untermauern, weitere Studien in dieser Richtung nötig wären.

IL-6

Das IL-6 wird während der Immunantwort beispielsweise von Makrophagen oder PMN produziert (Kishimoto 1989). Es ist bei der Parodontitis erhöht (Guillot et al. 1995) und kann zusammen mit anderen Mediatoren Knochenresorption induzieren (Ishimi et al. 1990).

Die in dieser Studie gemessenen Werte entsprechen nur zu einem Teil der Meinung in der aktuellen Studienlage. Bei Nichtrauchern mit gesundem Parodont war der IL-6 Titer deutlich höher, als bei Nichtrauchern mit Parodontitis. Immunmodulierende Faktoren, wie Tabakkonsum oder die entzündliche Reaktion bei einer Parodontitis, scheinen das Gleichgewicht zwischen Sekretion und Inhibition dieses Zytokins zu Gunsten der Hemmung der Sekretion oder der vermehrten Sekretion zu beeinflussen.

Beim Vergleich der Gruppen GNR und GR lässt sich eine leichte Tendenz zur Abschwächung des Immunsystems bei Rauchern erkennen, während die entzündliche Reaktion bei einer Parodontitis mit einer erhöhten IL-6 Produktion einhergeht (Tabelle 3). Diese Tendenz bekräftigt die vorliegenden Daten aus der internationalen Literatur (Guillot et al. 1995, Kishimoto und Hirano 1988)

Passend zur Studienlage wurde in der vorliegenden Studie eine statistisch signifikante Korrelation zwischen IL-6 und TNF- α gefunden (Tabelle 8). Dieses Ergebnis verstärkt die Vermutung, dass das IL-6 in seiner Funktion von TNF- α abhängt (Billiau et al. 1989, Ishimi et al. 1990).

IL-8

IL-8 ist dafür bekannt, ein starker Mediator bei entzündlichen Prozessen zu sein (Baggiolini und Clark-Lewis 1992). Wichtige Zellen des Immunsystems wie beispielsweise die neutrophilen Granulozyten sezernieren als Reaktion auf Lipopolysaccharide von parodontalpathogenen Keimen IL-8 (Yoshimura et al. 1997). Dieses hat Einfluss auf chemotaktische und aktivierende Funktionen der PMN und spielt damit eine wichtige Rolle

bei der Initiierung und Entwicklung entzündlicher Prozesse und dem Gewebsuntergang während parodontalen Erkrankungen (Bickel 1993). Hierbei verstärkt es den Gewebeuntergang durch die Induktion der Sekretion von mehr MMPs (Tonetti et al. 1998) und Elastase (Bickel 1993).

Diese Beobachtungen werden tendenziell in dieser Studie bestätigt. Die IL-8 Konzentration lag in der vorliegenden Arbeit bei Probanden mit gesundem Parodont unterhalb dem Wert derjenigen mit Parodontitis (Tabelle 3). In der internationalen Literatur herrscht teilweise eine kontroverse Meinung darüber ob das IL-8 bei Nichtraucher mit Parodontitis in erhöhter Konzentration vorliegt oder nicht. Chung *et. al* haben beispielsweise herausgefunden, dass die Parodontitistherapie bei einigen Probanden zu einem erhöhten bei anderen aber wiederum zu einem erniedrigten IL-8 Level führt (Chung et al. 1997). Eine Studie von Mathur *et. al* fand aber wiederum heraus dass, die IL-8 Menge bei einer Entzündung ansteigt und in gesundem Parodont verringert ist (Mathur et al. 1996).

Diese unterschiedlichen Meinungen in der Literatur, machen es schwierig eine korrekte Einordnung dieses Zytokins zu vollziehen.

Das Ergebnis dieser Studie mag insgesamt darauf hindeuten, dass die IL-8 Sekretion bei einer Parodontitis erhöht wird. Dieses würde Daten aus der gängigen Literatur bestätigen (Mathur et al. 1996). Um genauere Schlussfolgerungen zu ziehen, wären weitere Studien mit einer größeren Probandenzahl nötig.

Der Tabakkonsum scheint eine wichtige Rolle, bei der IL-8 Sekretion während einer Parodontitis zu spielen. Die Daten aus dieser Studie belegen, dass bei Rauchern der IL-8 Level niedriger ist, als bei Nichtrauchern (Abbildung 6). Dieses Ergebnis entspricht denjenigen aus der bekannten Literatur (Kamma et al. 2004, Tymkiw et al. 2011).

TNF- α

Die Werte der TNF- α Konzentration waren in der vorliegenden Studie allgemein bei Rauchern niedriger als bei Nichtrauchern (Tabelle 3). Das TNF- α wurde schon früh als Indikator für die Entwicklung einer Parodontitis bekannt (Rossomando et al. 1990) und liegt bei Entzündung des Parodonts in erhöhter Konzentration vor (Gamonal et al. 2003). Auch in dieser Studie waren die TNF- α Konzentrationen in beiden Gruppen mit gesundem Parodont niedriger als in den Parodontitisgruppen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen somit die aktuellen Erkenntnisse aus der Literatur.

TNF- β

Das TNF- β spielt eine wichtige Rolle bei der Organogenese lymphoider Organe (De Togni et al. 1994). Es bindet zwar an den selben Rezeptor wie das TNF- α (Loetscher et al. 1991), wurde aber dennoch bis jetzt nicht mit der Parodontitis in Bezug gebracht.

In der vorliegenden Studie sind die durchschnittlichen TNF- β Konzentrationen in beiden Gruppen mit Rauchern niedriger als in denjenigen mit Nichtrauchern. Somit lässt sich auch hier eine Beeinträchtigung des Immunsystems durch den Tabakkonsum vermuten. Auffällig ist, dass Probanden mit Parodontitis eine durchschnittlich höhere TNF- β Konzentration hatten als Probanden mit gesundem Parodont (Tabelle 3). Diese Tendenz lässt darauf deuten, dass dieses Zytokin bei entzündlichen Prozessen im Parodont eine wichtige Rolle spielen könnte und somit erhöht ist.

Die in dieser Studie berechnete statistisch signifikante Korrelation zwischen TNF- α und TNF- β (Tabelle 8) lässt auf ähnliche Wirkungsweise der beiden Botenstoffe schließen. Weitere Studien wären nötig, um diesen Zusammenhang besser zu untersuchen.

5.2.1.2 Anti-inflammatorische Zytokine

Bei den anti-inflammatorischen Zytokinen, die in dieser Studie in Betracht gezogen wurden, handelte es sich um IL-4 und IL-10 (Tabelle 4).

Sie spielen als Antagonisten der pro-inflammatorischen Botenstoffe einen wichtigen Konterpart und verhindern eine überschießende entzündliche Immunreaktion.

IL-4

Interleukin-4 ist dafür bekannt, verschiedene Funktionen der hämatopoetischen Zellen zu regulieren (Mizel 1989). Als anti-inflammatorisches Zytokin hemmt es viele entzündliche Reaktionen des Immunsystems wie beispielsweise die Ausschüttung von TNF- α , IL-1, IL-6 (te Velde et al. 1990). Die Abhängigkeit der IL-1 β Sekretion vom IL-4 Level wurde auch in der vorliegenden Studie durch eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den genannten Zytokinen nachgewiesen und bestärkt (Tabelle 8).

In der internationalen Literatur wird ein niedriger IL-4 Level in erkranktem parodontalem Gewebe mit dem Fortschreiten und der Aktivität parodontaler Erkrankungen in Bezug gebracht (Shapira et al. 1992). Die Daten aus der vorliegenden Studie bestätigen diese Aussage. Hier wurde in der Gruppe PNR die niedrigste IL-4 Konzentration gemessen, was für eine aktive parodontale Läsion mit Gewebeverlust sprechen würde. Dieses Erkenntnis deckt sich mit den in dieser Studie gesammelten klinischen Daten.

Auch sprechen Page *et. al* davon, dass das IL-4 in hohen Mengen die Sekretion von monozytischen Zellen und die Aktivität von knochenresorbierenden Matrix-Metalloproteinasen und Zytokinen inhibiert, so dass die Gewebszerstörung supprimiert wird (Page et al. 1997).

Andererseits haben einige Studien heraus gefunden, dass das IL-4 im entzündeten parodontalem Gewebe auffällig hoch ist (Gemmell et al. 2002) und es wurde nachgewiesen, dass der Immunglobulin G4 Titer, dessen Produktion vom IL-4 induziert wird, in parodontalen Läsionen um ein vielfaches höher ist, als in gesundem Parodont (Reinhardt et al. 1989). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen diese Aussagen. In der Gruppe PR wurde die höchste IL-4 Konzentration gemessen. Dieses entspricht den Ergebnissen aus der Studie von Gemmell *et. al* (Gemmell et al. 2002).

Da sich in dieser Studie für diesen sekundären Zielparameter keine statistischen Signifikanzen ermitteln ließen, wären weitere Studien mit größeren Fallzahlen nötig um genauere Informationen über dieses Zytokin im Zusammenhang mit Rauchen und Parodontitis zu bekommen.

IL-10

Das IL-10 ist als ein sehr wichtiges anti-inflammatorisches Zytokin dafür verantwortlich, dass weniger pro-inflammatorische Zytokine wie das IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 sezerniert werden (Fiorentino et al. 1991). Es verstärkt die Freisetzung von anti-entzündlichen Mediatoren, wie dem IL-1-Rezeptor-Antagonisten und dem TNF- α -Rezeptor (Hart et al. 1996, Jenkins et al. 1994) und verhindert damit zusammengefasst eine überschießende Immunreaktion sowie verstärkten Gewebeabbau bei der Parodontitis.

Eine Studie wies eine prozentual verringerte Anzahl von IL-10 produzierenden CD8 Zellen im gingivalen Gewebe von Probanden mit Parodontitis nach (Gemmell und Seymour 1998), während eine andere Arbeit heraus fand, dass gingivale mononukleare Zellen von Probanden mit chronischer Parodontitis mehr IL-10 produzierten als diejenigen von Probanden mit gesunder Gingiva (Stein und Hendrix 1996). Es wurde zudem berichtet, dass der IL-10 Level bei Parodontitis erniedrigt zu sein scheint (Passoja et al. 2010).

Die in der vorliegenden Studie gesammelten Daten sprechen dafür, dass die IL-10 Konzentration bei Probanden mit Parodontitis niedriger ist als bei parodontal Gesunden. Dieser Zustand könnte durch eine geringere Anzahl von IL-10 produzierenden Zellen hervorgerufen worden sein, wie Gemmell und Seymour vermuteten (Gemmell und Seymour 1998). In der Gruppe GR wurde die niedrigste IL-10 Konzentration gemessen. Es scheint dass der Tabakkonsum auch hier eine hemmende Wirkung auf das Immunsystem hat.

Auch in der internationalen Literatur wird bestätigt, dass bei Rauchern die IL-10 Konzentration im Sulkus erniedrigt ist (César-Neto et al. 2007, Torres de Heens et al. 2009) und pro-inflammatorische Zytokine dominieren.

5.2.1.3 Verhältnis von IL-1 β zu IL-10

Parodontale Entzündungen können sowohl mit einem erhöhten Level von pro-inflammatorischen Zytokinen wie beispielsweise IL-1 β , als auch mit einem gesenkten Level von anti-inflammatorischen Botenstoffen wie das IL-10 einhergehen. Diese beiden Umstände könnten eine wichtige Rolle bei der Pathogenese parodontaler Erkrankungen spielen (Deschner et al. 2000). Es ist noch nicht vollständig geklärt, wie dieses Zusammenspiel der Botenstoffe bei der Pathogenese einer Parodontitis funktioniert und konzertiert ist.

Das Verhältnis von IL-1 β zu IL-10 im gingivalen Sulkus kann hierbei einen wichtigen Hinweis auf Aktivität und das Fortschreiten von entzündlichen Prozessen im Parodont geben (Toker et al. 2008). Man vermutet, dass eine Imbalance zwischen dem pro-inflammatorischen Zytokin IL-1 β und dem anti-inflammatorischen Zytokin IL-10 bei parodontalen Erkrankungen vorkommt. So wurde heraus gefunden, dass die IL-1 β /IL-10 Ratio bei Probanden mit generalisierter aggressiver Parodontitis höher ist, als bei denjenigen mit gesundem Parodont (Teles et al. 2010). Eine weitere Studie wies nach, dass die IL-1 β /IL-10 Ratio nach der Therapie der Parodontitis signifikant gesenkt werden konnte, so dass das vorher vermutete Ungleichgewicht zwischen IL-1 β und IL-10 teilweise wieder rückgängig gemacht wurde (de Lima Oliveira et al. 2012).

Auch die Daten der vorliegenden Studie weisen sowohl bei gesunden Rauchern, als auch Nichtrauchern auf eine IL-1 β /IL-10 Ratio < 1 hin. Im Vergleich zur Gruppe GNR war die IL-1 β /IL-10 Ratio in der Gruppe PNR um ungefähr das Doppelte erhöht (> 1). Raucher mit Parodontitis hatten eine dreimal so hohe Ratio wie gesunde Raucher (Tabelle 5). Werte ≥ 1 deuten hierbei auf eine Imbalance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen zu Gunsten Letzterer hin. Diese Ergebnisse bekräftigen damit die Erkenntnisse vorheriger Studien (de Lima Oliveira et al. 2012, Teles et al. 2010). Interessanterweise war bei Rauchern mit Parodontitis die IL-1 β /IL-10 Ratio im Vergleich zu Nichtrauchern mit Parodontitis kleiner, was auf eine immunsupprimierende Wirkung des Rauchens hinweisen könnte.

5.2.2 Aktivierte Matrix Metalloproteinase-8 (aMMP-8)

Das aMMP-8 wird schon lange als wichtige gingivale Kollagenase bei der Pathogenese der Parodontitis diskutiert (Sorsa et al. 1988, Ingman et al. 1996). Man hat heraus gefunden, dass es sich bei 94%-96% der bei Patienten mit chronischer Parodontitis identifizierten

Kollagenasen um das aMMP-8 handelt (Golub et al. 1997). Sie ist somit die prädominante Kollagenase in entzündeter humaner Gingiva (Sorsa et al. 2004, Sorsa et al. 1988). Durch Scalen und Wurzelglätten kann bei Patienten mit Parodontitis der aMMP-8 Level gesenkt werden (Mäntylä et al. 2006). In der vorliegenden Studie wurde bei Probanden mit klinisch gesundem Parodont eine signifikant geringere aMMP-8 Konzentration gemessen, als bei Patienten mit Parodontitis.

Verglichen mit den Daten aus der Studie von Prescher *et. al* wurde hier bei den gesunden Probanden mit einem Durchschnittswert von $9,2 \pm 4,36$ ng/ml eine tendenziell höhere aMMP-8 Konzentration gemessen. Die Patienten mit Parodontitis hingegen wiesen aMMP-8 Konzentrationen auf, die auch in der Studie von Prescher *et. al* für Parodontitis charakteristisch waren (Prescher et al. 2007). Die Differenz der Werte bei parodontal Gesunden erklärt sich, da die Probanden in der vorliegenden Studie nicht anhand der aMMP-8 Werte, sondern mit Hilfe der klinischen Daten in die jeweiligen Gruppen eingeteilt wurden. Bezüglich dessen wurde nachgewiesen, dass sich von den klinischen Parametern vor allem die Sondierungstiefe dazu eignen könnte, um einen Bezug zur aMMP-8 Konzentration darzustellen. Während Prescher und Mitarbeiter keine Korrelation zwischen der Sondierungstiefe und dem aMMP-8 Level darlegten (Prescher et al. 2007), fand eine andere Studie eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Sondierungstiefen und dem aMMP-8 Level. Je größer die Sondierungstiefe, desto größer war hierbei der aMMP-8 Level (Kraft-Neumärker et al. 2012). Jedoch kann die Sondierungstiefe nicht alleinig betrachtet werden, um einen Vergleich mit dem aMMP-8 Level in der gingivalen Sulkusflüssigkeit herzustellen, da ein allgemeiner Vergleich keine Rückschlüsse auf spezifische einzelne Taschen und ihrem aMMP-8 Level zulässt (Kraft-Neumärker et al. 2012). Zu diesem Schluss kamen Kraft-Neumärker *et al.*, da sie in tiefen Taschen geringe aMMP-8 Level entdeckten, während sie in flachen Taschen wiederum hohe aMMP-8 Level maßen (Kraft-Neumärker et al. 2012).

Auch in der vorliegenden Studie wurde eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der aMMP-8 Konzentration und der Sondierungstiefe berechnet. Hier wurde auch mit der Zunahme der Sondierungstiefen eine Zunahme der aMMP-8 Konzentration verzeichnet (Abbildung 11B). Hierbei konnten tiefe Taschen mit einem hohen aMMP-8 Level in Bezug gebracht werden (Abbildung 11B).

Zusätzlich wurde in dieser Studie eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem SBI und der aMMP-8 Konzentration berechnet. Mit Zunahme der aMMP-8 Konzentration stieg der SBI an (Abbildung 11A). Die erhöhte gingivale Blutung bei hoher aMMP-8

Konzentration ist nicht nur durch die erhöhte Gefäßpermeabilität, sondern auch durch den Untergang von parodontalem Bindegewebe zu erklären, die MMPs bei der Parodontitis verursachen (Sorsa et al. 1988). Sie spalten Makromoleküle der extrazellulären Matrix wie Kollagene, Fibronectin, Laminin und das Proteoglykan Core Protein (Birkedal-Hansen 1993). Damit könnte auch der SBI zusammen mit der Messung der Sondierungstiefe zu einem Vergleich mit der aMMP-8 Konzentration heran gezogen werden. Man kann aus der statistisch signifikanten Korrelation dieser beiden klinischen Parameter mit der aMMP-8 Konzentration schließen, dass allgemein ein hoher aMMP-8 Level mit einer Verschlechterung der klinischen parodontalen Situation einhergeht. Dennoch kann auch durch die in dieser Studie gesammelten Daten kein genauer Vergleich gewährleistet werden, da die gesammelten klinischen Daten sich auf das gesamte Gebiss des jeweiligen Probanden beziehen, während die entnommenen Proben jeweils aus der tiefsten parodontalen Tasche stammen und somit nicht als allgemeingültig für das gesamte Gebiss betrachtet werden können. Um Präzise vorhersagen bezüglich eines Zusammenhangs zwischen klinischer Parameter und dem aMMP-8 Level machen zu können, sind größere Studien nötig, die nicht nur mehr Probanden als in der Studie von Kraft-Neumärker umfassen (Kraft-Neumärker et al. 2012), sondern auch Daten von jedem einzelnen Sulkus sammeln.

Das aMMP-8 wird unter anderem von PMN als inaktive Pro-Form sezerniert und danach durch Botenstoffe des Immunsystems wie beispielsweise das IL-1 β oder das TNF- α aktiviert (Ryan et al. 1996). Auch in der vorliegenden Studie wurde eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der aMMP-8 Konzentration und der IL-1 β Konzentration berechnet (Abbildung 12). Dabei wurde festgestellt, dass die aMMP-8 Konzentration mit der Zunahme des IL-1 β Levels anstieg. Somit wird die in der bekannten Literatur vertretene Meinung, dass die Aktivierung des inaktiven MMP-8 unter anderem vom Botenstoff IL-1 β abhängt, bestätigt.

Eine erhöhte aMMP-8 Konzentration in der gingivalen Sulkusflüssigkeit scheint vor allem bei Rauchern, die Progression der Parodontitis zu begünstigen (Mäntylä et al. 2006). Auch Söder bestätigt, dass vor allem bei rauchenden Probanden mit tiefen parodontalen Taschen eine signifikant höhere Konzentration von aMMP-8 zu messen ist, als bei Probanden mit gesundem Parodont (Söder 1999). Die statistisch signifikante Korrelation zwischen der Packungsjahre und der Sondierungstiefe (Tabelle 7) bekräftigt diese Aussage.

5.3 Diskussion der mikrobiologischen Ergebnisse

Die parodontalpathogenen Mikroorganismen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* und *Filifactor alocis* wurden signifikant vermehrt bei Patienten mit Parodontitis detektiert.

In dieser Studie wurde bei Rauchern mit Parodontitis die höchste Menge von *Tannerella forsythia* nachgewiesen. Auch in der internationalen Literatur wird bestätigt, dass *Tannerella forsythia* eher bei Rauchern zu finden ist, als bei Nichtrauchern (Haffajee und Socransky 2001). Es ist beispielsweise nachgewiesen, dass das Risiko von *T. forsythia* infiziert zu werden für Raucher 2,3 mal höher ist, als für Nichtraucher.

Aus der internationalen Literatur ist bekannt, dass *Filifactor alocis* vor allem bei Patienten mit chronischer Parodontitis zu finden ist (Kumar et al. 2003, Schlafer et al. 2010). Dieser Zusammenhang wird durch die Daten dieser Studie bekräftigt. *F. alocis* wurde auch hier vor allem bei Probanden mit Parodontitis in erhöhter Menge nachgewiesen (Tabelle 6). Es scheint so, als ob das Risiko einer Infektion mit *F. alocis* die Parodontitis begünstigen würde. Damit könnte sich *F. alocis*, wie bereits in einigen wenigen Studien angenommen (Kumar et al. 2006, Schlafer et al. 2010), als ein Leitkeim für die Parodontitis etablieren.

6. Schlussfolgerungen

Die vorliegende Studie untersuchte vor allem die Effekte des Tabakkonsums auf die Konzentration der aMMP-8 im gingivalen Sulkus. Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen der aMMP-8 Konzentration und der Konzentration der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , TNF- β , IL-10 und IL-4, den Bakterien *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* und *F. alocis* sowie klinischer Parameter wie dem SBI, dem klinischen Attachmentlevel und der Sondierungstiefe gesucht.

Patienten mit Parodontitis wiesen erwartungsgemäß signifikant höhere Sondierungstiefen, Attachmentlevel, Sondierungsblutungen und Plaquewerte auf als parodontal Gesunde. Rauchen scheint einen negativen Effekt auf Sondierungstiefe und Attachmentlevel zu haben, da diese in der Gruppe der rauchenden Parodontitispatienten im Vergleich zu den Nichtrauchern mit Parodontitis signifikant erhöht waren.

Es zeigte sich, dass die höchsten Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine bei Rauchern mit Parodontitis (PR) gemessen wurden, während anti-inflammatorische Zytokine bei parodontal gesunden Nichtrauchern (GNR) dominierten. Die Tatsache, dass die IL-1 β /IL-10 Ratio in der Gruppe PR im Vergleich zur Gruppe GNR um mehr als das Doppelte erhöht war und in der Gruppe GR generell am höchsten lag, lässt einen Zusammenhang zwischen dem Tabakkonsum und der Produktion von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen vermuten.

Bei Patienten mit Parodontitis konnte eine subgingivale Infektion mit parodontalpathogenen Mikroorganismen nachgewiesen werden. Bei den Keimen *T. denticola* und *T. forsythia* fiel auf, dass sie vor allem bei Rauchern in erhöhter Menge gemessen wurden, was dafür sprechen würde, dass der Tabakkonsum die Infektion mit *T. denticola* und *T. forsythia* begünstigt.

Je höher der Zigarettenkonsum, desto schlechter der klinische parodontale Zustand, welcher mit erhöhten Mengen von *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* und *F. alocis* einher ging. Diese wiederum induzieren eine erhöhte aMMP-8 Produktion, die eine bereits bestehende Parodontitis verstärken.

Die aMMP-8 Konzentration war bei Probanden mit Parodontitis höher als bei parodontal Gesunden. Rauchen hatte nur einen limitierten Effekt auf den aMMP-8 Spiegel.

Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen aMMP-8 und der Taschentiefe, dem klinischen Attachmentlevel sowie dem SBI.

7. Literaturverzeichnis

- AAP. 1999. Position Paper: Tobacco use and the periodontal patient. American Academy of Periodontology. *J Periodontol*, 70:1419-1427.
- Alfano MC. 1974. The origin of gingival fluid. *Journal of Theoretical Biology*, 47 (1):127-136.
- Andersen E, Cimasoni G. 1993. A rapid and simple method for counting crevicular polymorphonuclear leucocytes. *Journal of Clinical Periodontology*, 20 (9):651-655.
- Armitage GC. 1995. Clinical evaluation of periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 7 (1):39-53.
- Armitage GC. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology*, 4:1-6.
- Armitage GC. 2004. Analysis of gingival crevice fluid and risk of progression of periodontitis. *Periodontology 2000*, 34 (1):109-119.
- Aruni AW, Roy F, Fletcher HM. 2011. Filifactor alocis Has Virulence Attributes That Can Enhance Its Persistence under Oxidative Stress Conditions and Mediate Invasion of Epithelial Cells by Porphyromonas gingivalis. *Infection and Immunity*, 79 (10):3872-3886.
- Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. 1996. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiology and Immunology*, 11 (4):266-273.
- Attström R, Egelberg J. 1970. Emigration of blood neutrophils and monocytes into the gingival crevices. *Journal of Periodontal Research*, 5 (1):48-55.
- Axelsson P, Paulartder J, Lindhe J. 1998. Relationship between smoking and dental status in 35-, 50-, 65-, and 75-year-old individuals. *Journal of Clinical Periodontology*, 25 (4):297-305.
- Baab DA, Öberg PÅ. 1987. The effect of cigarette smoking on gingival blood flow in humans. *Journal of Clinical Periodontology*, 14 (7):418-424.
- Baggiolini M, Clark-Lewis I. 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Letters*, 307 (1):97-101.
- Baggioni M, Walz A, Kunkel SL. 1989. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest*, 84 (4):1045-1049.
- Balkwill F, Foxwell B, Brennan F. 2000. TNF is here to stay! *Immunology Today*, 21 (10):470-471.
- Barbour SE, Nakashima K, Zhang J-B, Tangada S, Hahn C-L, Schenkein HA, Tew JG. 1997.

- Tobacco and Smoking: Environmental Factors That Modify the Host Response (Immune System) and Have an Impact On Periodontal Health. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 8 (4):437-460.
- Bartold PM, Van Dyke TE. 2013. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. *Unlearning learned concepts. Periodontology 2000*, 62 (1):203-217.
- Baumeister SE, K. L., T.K. S. 2008. Nikotinabhängigkeit und Trends. *Ergebnisse des epidemiologischen Suchtsurveys 2006. Sucht* 54:26-35.
- Baumert Ah MK, Johnson GK, Kaldahl WB, Patil KD, Kalkwart KL. 1994. The effect of smoking on the response to periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology*, 21 (2):91-97.
- Berezow AB, Darveau RP. 2011. Microbial shift and periodontitis. *Periodontology 2000*, 55 (1):36-47.
- Bergström J. 2003. Tobacco smoking and risk for periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 30 (2):107-113.
- Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. 1986. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature*, 319:516-518.
- Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbone Jr MA. 1985. Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest*, 76 (5):2003-2011.
- Bickel M. 1993. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol*, 64 (5):456-460.
- Billiau A, Van Damme J, Ceuppens J, Baroja M. 1989. Interleukin 6, a ubiquitous cytokine with paracrine as well as endocrine functions. *Lymphokine Receptor Interactions*, (133-142).
- Birkedal-Hansen H. 1993. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol*, 64 (5):474-484.
- Boström L, Linder LE, Bergström J. 1999. Smoking and crevicular fluid levels of IL-6 and TNF-a in periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 26 (6):352-357.
- Brandolini L, Bertini R, Bizzarri C, Sergi R, Caselli G, Zhou D, Locati M, Sozzani S. 1996. IL-1 beta primes IL-8-activated human neutrophils for elastase release, phospholipase D activity, and calcium flux. *Journal of Leukocyte Biology*, 59 (3):427-434.
- Brex M, Netuschil L, Reichert B, Schreil G. 1990. Efficacy of Listerine®, Meridol® and

- chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis and plaque bacteria vitality. *Journal of Clinical Periodontology*, 17 (5):292-297.
- Brill N. 1960. Gingival Conditions Related to Flow of Tissue Fluid Into Gingival Pockets. *Acta Odontologica Scandinavica*, 18 (4):421-446.
- Brill N, Krasse BO. 1958. The Passage of Tissue Fluid into the Clinically Healthy Gingival Pocket. *Acta Odontologica Scandinavica*, 16 (3):233-245.
- Brill N, Björn H. 1959. Passage of Tissue Fluid Into Human Gingival Pockets. *Acta Odontologica Scandinavica*, 17 (1):11-21.
- Bühl A. 2012. SPSS 20: Einführung in die moderne Datenanalyse; 13. aktualisierte Auflage.
- Bunning RA, Richardson HJ, Crawford A, Skjodt H, Hughes D, Evans DB, Gowen M, Dobson PR, Brown BL, Russel RG. 1986. The effect of interleukin-1 on connective tissue metabolism and its relevance to arthritis. *Agents Actions Suppl*, 18:131-152.
- Calzada-Wack JC, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock HW. 1996. Interleukin-10 drives human monocytes to CD16 positive macrophages. *J Inflamm*, 46:78-85.
- Carlsson J. 1989. Microbiology of plaque associated periodontal disease. Lindhe J, ed *Textbook of clinical periodontology* 2nd ed Copenhagen: Munksgaard:129-152.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72 (9):3666-3670.
- César-Neto JB, Duarte PM, De Oliveira MCG, Tambeli CH, Sallum EA, Nociti FH. 2007. Smoking modulates interleukin-6:interleukin-10 and RANKL:osteoprotegerin ratios in the periodontal tissues. *Journal of Periodontal Research*, 42 (2):184-191.
- Chen HY, Cox SW, Eley BM, Mäntylä P, Rönkä H, Sorsa T. 2000. Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 27 (5):366-369.
- Chung RM, Grbic JT, Lamster IB. 1997. Interleukin-8 and β -glucuronidase in gingival crevicular fluid. *Journal of Clinical Periodontology*, 24 (3):146-152.
- Cole AA, Chubinskaya S, Schumacher B, Huch K, Cs-Szabo G, Yao J, Mikecz K, Hasty KA, Kuettner KE. 1996. Chondrocyte Matrix Metalloproteinase-8: HUMAN ARTICULAR CHONDROCYTES EXPRESS NEUTROPHIL COLLAGENASE. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (18):11023-11026.
- Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Wahl LM. 1992. IL-4 inhibition of PGE2 synthesis block interstitial collagenase and 92Kd type IV collagenase/gelatinase production of human monocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 267:515-519.

- D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin G, Trinchieri G. 1993. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med*, 178:1041-1048.
- de Lima Oliveira AP, de Faveri M, Gursky LC, Mestnik MJ, Feres M, Haffajee AD, Socransky SS, Teles RP. 2012. Effects of periodontal therapy on GCF cytokines in generalized aggressive periodontitis subjects. *Journal of Clinical Periodontology*, 39 (3):295-302.
- De Togni P, Goellner J, Ruddle N, Streeter P, Fick A, Mariathasan S, Smith S, Carlson R, Shornick L, Strauss-Schoenberger J, et al. 1994. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science*, 264 (5159):703-707.
- Debets R, Hegmans JPJJ, Troost RJJ, Benner R, Prens EP. 1995. Enhanced production of biologically active interleukin-1 α and interleukin-1 β by psoriatic epidermal cells ex vivo: evidence of increased cytosolic interleukin-1 β levels and facilitated interleukin-1 release. *European Journal of Immunology*, 25 (6):1624-1630.
- Delima AJ, Van Dyke TE. 2003. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontology 2000*, 31 (1):55-76.
- Dentognostics. Stand: 09/12. Interne Gebrauchsanleitung: dentoELISA aMMP-8.3-6.
- Deschner J, Arnold B, Kage A, Zimmermann B, Kanitz V, P BJ. 2000. Suppression of interleukin-10 release from human periodontal ligament cells by interleukin-1 β in vitro. *Archives of Oral Biology*, 45 (2):179-183.
- Dewhirst FE, Ago JM, Peros WJ. 1987. Synergism between parathyroid hormone and interleukin 1 in stimulating bone resorption in organ culture. *Journal of Bone Mineral Research*, 2:127.
- Dinarello CA. 1988. Biology of interleukin 1. *The FASEB Journal*, 2 (2):108-115.
- Dinarello CA, Ikejima T, Warner SJ, Orencole SF, Lonnemann G, Cannon JG, Libby P. 1987. Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol*, 139 (6):1902-1910.
- Dongari-Bagtzoglou A. 2008. Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 6 (2):201-208.
- Ebersole JL. 2003. Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. *Periodontology 2000*, 31 (1):135-166.
- Ebersole JL, Taubman MA, Smith DJ. 1985. Gingival crevicular fluid antibody to oral microorganisms. *Journal of Periodontal Research*, 20 (4):349-356.

- Egelberg J. 1963. Cellular Elements in Gingival Pocket Fluid. *Acta Odontologica Scandinavica*, 21 (4):283-287.
- Ejeil A-L, Gaultier F, Igondjo-Tchen S, Senni K, Pellat B, Godeau G, Gogly B. 2003. Are Cytokines Linked to Collagen Breakdown During Periodontal Disease Progression? *Journal of Periodontology*, 74:196-201.
- Elias JA, Trinchieri G, Beck JM, Simon PL, Sehgal PB, May LT, Kern JA. 1989. A synergistic interaction of IL-6 and IL-1 mediates the thymocyte-stimulating activity produced by recombinant IL-1-stimulated fibroblasts. *The Journal of Immunology*, 142 (2):509-514.
- Engbretson SP, Lamster IB, Herrera- Abreu M, Celenti RS, Timms JM, Chaudhary AGA, di Giovine FS, Kornman KS. 1999. The Influence of Interleukin Gene Polymorphism on Expression of Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α in Periodontal Tissue and Gingival Crevicular Fluid. *Journal of Periodontology*, 70:567-573.
- Engbretson SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB. 2002. GCF IL-1 β profiles in periodontal disease; Interleukin-1 β -Profile in der Sulkusflüssigkeit bei Parodontitis; Les profils IL-1 β dans le fluide crévulaire gingival lors de la maladie parodontale. *Journal of Clinical Periodontology*, 29 (1):48-53.
- Fang MA, Frost PJ, Iida-Klein A, Hahn TJ. 1991. Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Bone*, 12 (4):283-286.
- Fine DH, Kaplan JB, Kachlany SC, Schreiner HC. 2006. How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a model for infectious diseases. *Periodontology 2000*, 42 (1):114-157.
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of Experimental Medicine*, 170 (6):2081-2095.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*, 147:3815-3822.
- Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. 1999. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontology 2000*, 20 (1):136-167.
- Fullmer HM, Gibson W. 1966. Collagenolytic Activity in Gingivae of Man. *Nature*, 209:728-729.
- Gamonal J, Sanz M, O'Connor A, Acevedo A, Suarez I, Sanz A, Martínez B, Silva A. 2003. Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 30 (7):616-623.

- Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H. 1987. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84 (20):7251-7255.
- Gemmell E, Seymour GJ. 1998. Cytokine Profiles of Cells Extracted from Humans with Periodontal Diseases. *Journal of Dental Research*, 77 (1):16-26.
- Gemmell E, Seymour GJ. 2004. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontology 2000*, 35 (1):21-41.
- Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. 2002. Destructive Periodontitis Lesions are Determined by the Nature of the Lymphocytic Response. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13 (1):17-34.
- Genco R, Kornman KS, Williams R, Offenbacher S, Zambon J, Ishikawa I, Listgarten MA, Michalowicz B, Page R, Schenkein H, Slots J, Socransky SS, Van Dyke T. 1996. Consensus Report Periodontal Diseases: Pathogenesis and Microbial Factors. *Annals of Periodontology*, 1:926-932.
- Genco RJ. 1996. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol*, 67 (10 Suppl):1041-1049.
- Genco RJ, Slots J. 1984. Host Responses in Periodontal Diseases. *Journal of Dental Research*, 63 (3):441-451.
- Giannopoulou C, Kamma JJ, Mombelli A. 2003. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. *Journal of Clinical Periodontology*, 30 (2):145-153.
- Gloria C, Ramón J-M, Echeverría J-J. 2002. Effects of smoking on periodontal tissues. *Journal of Clinical Periodontology*, 29 (8):771-776.
- Golub LM, Iacono VJ, Nicoll G, Ramamurthy N, Kaslick RS. 1981. The response of human sulcular leucocytes to a chemotactic challenge. *Journal of Periodontal Research*, 16 (2):171-179.
- Golub LM, Lee HM, Greenwald RA, Ryan ME, Sorsa T, Salo T, Giannobile WV. 1997. A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis. *Inflammation Research*, 46 (8):310-319.
- Goodson JM. 2003. Gingival crevice fluid flow. *Periodontology 2000*, 31 (1):43-54.
- Goodson JM, Dewhirst F, Brunetti A. 1974. Prostaglandin E2 levels and human periodontal disease. *Prostaglandins*, 6:81-85.

- Goulbourne P, Ellen R. 1991. Evidence that Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis fimbriae function in adhesion to Actinomyces viscosus. *J Bacteriology*, 173:5266-5274.
- Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, McGuire MKB, Russel RG. 1983. An interleukin-1 like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature*, 360:378-380.
- Griffiths GS. 2003. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontology 2000*, 31 (1):32-42.
- Grossi SG, Genco RJ. 1988. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol*, 3:51-61.
- Guentsch A, Erler M, Preshaw PM, Sigusch BW, Klinger G, Glockmann E. 2006. Effect of smoking on crevicular polymorphonuclear neutrophil function in periodontally healthy subjects. *Journal of Periodontal Research*, 41 (3):184-188.
- Guentsch A, Kramesberger M, Sroka A, Pfister W, Potempa J, Eick S. 2011. Comparison of Gingival Crevicular Fluid Sampling Methods in Patients With Severe Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 82:1051-1060.
- Guillot JL, Pollock SM, Johnson RB. 1995. Gingival interleukin-6 concentration following phase I therapy. *J Periodontol*, 66 (8):667-672.
- Gunsolley JC, Quinn SM, Tew J, Gooss CM, Brooks CN, Schenkein HA. 1998. The Effect of Smoking on Individuals With Minimal Periodontal Destruction. *Journal of Periodontology*, 69:165-170.
- Haffajee AD, Socransky SS. 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 5 (1):78-111.
- Haffajee AD, Socransky SS. 2001. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota; Beziehung zwischen dem Zigarettenrauchen und der subgingivalen Mikroflora. *Journal of Clinical Periodontology*, 28 (5):377-388.
- Haffajee AD, Socransky SS, Gunsolley JC. 2003. Systemic Anti-Infective Periodontal Therapy. A Systematic Review. *Journal of Periodontology*, 8:115-181.
- Hanemaaijer R, Sorsa T, Kontinen YT, Ding Y, Sutinen M, Visser H, van Hinsbergh VWM, Helaakoski T, Kainulainen T, Rönkä H, Tschesche H, Salo T. 1997. Matrix Metalloproteinase-8 Is Expressed in Rheumatoid Synovial Fibroblasts and Endothelial Cells: REGULATION BY TUMOR NECROSIS FACTOR- α AND DOXYCYCLINE. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (50):31504-31509.
- Hanes PJ, Schuster GS, Lubas S. 1991. Binding, Uptake, and Release of Nicotine by Human Gingival Fibroblasts. *Journal of Periodontology*, 62 (2):147-152.
- Hart PH, Hunt EK, Bonder CS, Watson CJ, Finlay-Jones JJ. 1996. Regulation of surface and

- soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10. *J Immunol*, 157:3672-3680.
- Hehlgans T, Pfeffer K. 2005. The intriguing biology of the tumor necrosis factor/tumor necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, 115:1-20.
- Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M. 2003. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*. *Annual Review of Microbiology*, 57 (1):29-55.
- Henemyre CL, Scales DK, Hokett SD, Cuenin MF, Peacock ME, Parker HM, Brewer PD, Chuang AH. 2003. Nicotine Stimulates Osteoclast Resorption in a Porcine Marrow Cell Model. *Journal of Periodontology*, 74 (10):1440-1446.
- Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. 2002. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *Journal of Leukocyte Biology*, 72 (5):847-855.
- Hoffmann T. 2005. Epidemiologie von Risikofaktoren. *Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie*; Hrsg: Peter Gängler, Thomas Hoffmann, Brita Willershausen, Norbert Schwenzer, Michael Ehrenfeld, 2:258-259.
- Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. 1999. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology 2000*, 20 (1):168-238.
- Honig J, Rordorf-Adam D, Siegmund C, Wiedemann W, Erard F. 1989. Increased interleukin-1 beta concentration in gingival tissue from periodontitis patients. *Journal of Periodontal Research*, 24:362-367.
- Howard M, Farrar J, Hilfiker M, Johnson B, Takatsu K, Hamaoka T, Paul WE. 1982. Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2. *The Journal of Experimental Medicine*, 155 (3):914-923.
- Hung H-C, Douglass CW. 2002. Meta-analysis of the effect of scaling and root planing, surgical treatment and antibiotic therapies on periodontal probing depth and attachment loss. *Journal of Clinical Periodontology*, 29 (11):975-986.
- Hutter G, Schlagenhaut U, Valenza G, Horn M, Burgemeister S, Claus H, Vogel U. 2003. Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evaluation of clone libraries, novel phylotypes and putative pathogens. *Microbiology*, 149 (1):67-75.
- Idriss HT, Naismith JH. 2000. TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique*, 50 (3):184-195.
- Imamura T. 2003. The Role of Gingipains in the Pathogenesis of Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*, 74:111-118.

- Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, Konttinen YT, Sorsa T. 1996. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 23 (12):1127-1132.
- Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T. 1990. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *The Journal of Immunology*, 145 (10):3297-3303.
- Jenkins JK, Malyak M, Arend WP. 1994. The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils. *Lymphokine Cytokine Res*, 13:47-54.
- Kamma JJ, Giannopoulou C, Vasdekis VGS, Mombelli A. 2004. Cytokine profile in gingival crevicular fluid of aggressive periodontitis: influence of smoking and stress. *Journal of Clinical Periodontology*, 31 (10):894-902.
- Kato S, Nakashima K, Inoue M, Tomioka J, Nonaka K, Nishihara T, Kowashi Y. 2000. Human epithelial cell death caused by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *Journal of Medical Microbiology*, 49 (8):739-745.
- Kiili M, Cox SW, Chen HW, Wahlgren J, Maisi P, Eley BM, Salo T, Sorsa T. 2002. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue; Kollagenase-2 (MMP-8) und Kollagenase-3 (MMP-13) bei Erwachsenenparodontitis: Molekülformen und Titer im gingivalen Sulkusfluid und Immunolokalisation im Gingivagewebe; Les collagénases-2 (MMP-8) et -3 (MMP-13) dans la parodontite de l'adulte: formes moléculaires et teneurs dans le fluide créviculaire et immunolocalisation dans le tissu gingival. *Journal of Clinical Periodontology*, 29 (3):224-232.
- Kishimoto T. 1989. The biology of interleukin-6. *Blood*, 74 (1):1-10.
- Kishimoto T, Hirano T. 1988. Molecular Regulation of B Lymphocyte Response. *Annual Review of Immunology*, 6 (1):485-512.
- Kraft-Neumärker M, Lorenz K, Koch R, Hoffmann T, Mäntylä P, Sorsa T, Netuschil L. 2012. Full-mouth profile of active MMP-8 in periodontitis patients. *Journal of Periodontal Research*, 47 (1):121-128.
- Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. 2003. New Bacterial Species Associated with Chronic Periodontitis. *Journal of Dental Research*, 82 (5):338-344.

- Kumar PS, Leys EJ, Bryk JM, Martinez FJ, Moeschberger ML, Griffen AL. 2006. Changes in Periodontal Health Status Are Associated with Bacterial Community Shifts as Assessed by Quantitative 16S Cloning and Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (10):3665-3673.
- Lamont RJ, Jenkinson HF. 1998. Life Below Gum Line: Pathogenic Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology and Molecular Reviews*, 62:1244-1263.
- Lamont RJ, Gil S, Demuth DR, Malamud D, Rosan B. 1994. Molecules of *Streptococcus gordonii* that bind to *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology*, 4 (867-872).
- Lamster IB. 1997. Evaluation of Components of Gingival Crevicular Fluid as Diagnostic Tests. *Journal of Periodontology*, 2:123-137.
- Lamster IB, Ahlo JK. 2007. Analysis of Gingival Crevicular Fluid as Applied to the Diagnosis of Oral and Systemic Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1098 (1):216-229.
- Lang N, Bartold MP, Cullinan M, Jeffcoat M, Mombelli A, Murakami S, Page RC, Papapanou PN, Tonetti M, Van Dyke TE. 1999. Consensus Report: Aggressive Periodontitis. *Annals of Periodontology*, 4 (1):53-53.
- Lange DE. 1978. Die Anwendung von Indices zur Diagnose der Parodontopathien. *Dtsch Zahnärztl Z*, 33:108-111.
- Leppilahti JM, Kallio MA, Tervahartiala T, Sorsa T, Mäntylä P. 2013. Gingival Crevicular Fluid (GCF) Matrix Metalloproteinase -8 Levels Predict Treatment Outcome Among Smoking Chronic Periodontitis Patients. *Journal of Periodontology*, Epub ahead of print.
- Ligumsky M, Simon PL, Karmeli F, Rachmilewitz D. 1990. Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease--enhanced production during active disease. *Gut*, 31 (6):686-689.
- Lindemann RA, Economou JS, Rothermel H. 1988. Production of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor by Human Peripheral Monocytes Activated by Periodontal Bacteria and Extracted Lipopolysaccharides. *Journal of Dental Research*, 67 (8):1131-1135.
- Lindhe J, Karring T, Araujo M. 2004. Anatomy of the periodontium. *Textbook of clinical periodontology and implant dentistry*, 4th ed., Oxford: Blackwell Munksgaard.
- Lindhe J, Ranney R, Lamster IB, Charles A, Chung C-P, Flemmig TF, Kinane D, Listgarten MA, Loe H, Schoor R, Seymour GJ, Somerman M. 1999. Consensus Report: Chronic Periodontitis. *Annals of Periodontology*, 4 (1):38-38.
- Listgarten MA, Lai CH, Young V. 1993. Microbial composition and pattern of antibiotic

- resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. *Journal of Periodontology*, 64:155-161.
- Llano E, Pendás AM, Knäuper V, Sorsa T, Salo T, Salido E, Murphy G, Simmer JP, Bartlett JD, López-Otín C. 1997. Identification and Structural and Functional Characterization of Human Enamelysin (MMP-20). *Biochemistry*, 36 (49):15101-15108.
- Löe H, Theilade E, Jensen SB. 1965. Experimental Gingivitis in man. *J Periodontology*, 36:177-187.
- Loesche W. 1986. The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods. *Oral Microbiology and Immunology*, 1 (1):65-72.
- Loetscher H, Gentz R, Zulauf M, Lustig A, Tabuchi H, Schlaeger EJ, Brockhaus M, Gallati H, Manneberg M, Lesslauer W. 1991. Recombinant 55-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor. Stoichiometry of binding to TNF alpha and TNF beta and inhibition of TNF activity. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (27):18324-18329.
- Loos BG, Tjoa S. 2005. Host-derived diagnostic markers for periodontitis: do they exist in gingival crevice fluid? *Periodontology 2000*, 39 (1):53-72.
- López-Otín C, Overall CM. 2002. Protease degradomics: A new challenge for proteomics. *Nature Reviews Molecular Biology*, 3:509-519.
- Magnusson I, Low SB, McArthur WP, Marks RG, Walker CB, Maruniak J, Taylor M, Padgett P, Jung J, Clark WB. 1994. Treatment of subjects with refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 21:628-637.
- Maiden MF, Tanner A, Macuch PJ. 1996. Rapid characterization of periodontal bacterial isolates by using fluorogenic substrate tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (2):376-384.
- Mandell R, Socransky SS. 1981. A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. *Journal of Periodontology*, 10:593-598.
- Mäntylä P, Stenman M, Kinane D, Salo T, Suomalainen K, Tikanoja S, Sorsa T. 2006. Monitoring periodontal disease status in smokers and nonsmokers using a gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8-specific chair-side test. *Journal of Periodontal Research*, 41 (6):503-512.
- Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. 1990. Measurement of interleukin-1 α and -1 β in gingival crevicular fluid: Implications for the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, 25 (3):156-163.
- Mathur A, Michalowicz B, Castillo M, Aepli D. 1996. Interleukin-1 alpha, interleukin-8 and

- interferon-alpha levels in gingival crevicular fluid. *J Periodont Res*, 7:489-495.
- McLaughlin WS, Lovat FM, Macgregor IDM, Kelly PJ. 1993. The immediate effects of smoking on gingival fluid flow. *Journal of Clinical Periodontology*, 20 (6):448-451.
- Meyer DH, Fives-Taylor PM. 1994. Characteristics of adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect Immun*, 62:928-935.
- Micheelis W, Schiffner U. 2006. Vierte deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). Neue Ergebnisse zu oralen Erkrankungsprävalenzen, Risikogruppen und zum zahnärztlichen Versorgungsgrad in Deutschland 2005. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.
- Mirel DB, Barcellos LF, Wang J, Hauser SL, Oksenberg JR, Erlich A. 2004. Analysis of IL4R haplotypes in predisposition to multiple sclerosis. *Genes and Immunity*, 5:138-141.
- Mizel SB. 1989. The interleukins. *The FASEB Journal*, 3 (12):2379-2388.
- Mølvig J, Baek L, Christensen P, Manogue KR, Vlassara H, Platz P, Nielsen LS, Svejgaard A, Nerup J. 1988. Endotoxin-Stimulated Human Monocyte Secretion of Interleukin 1, Tumour Necrosis Factor Alpha, and Prostaglandin E2 Shows Stable Interindividual Differences. *Scandinavian Journal of Immunology*, 27 (6):705-716.
- Mooney J, Hodge PJ, Kinane DF. 2001. Humoral immune response in early-onset periodontitis: influence of smoking. *Journal of Periodontal Research*, 36 (4):227-232.
- Morinushi T, Lopatin DE, Van Poperin N, Ueda Y. 2000. The Relationship Between Gingivitis and Colonization by *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Children. *Journal of Periodontology*, 71 (3):403-409.
- Müller HP, Stadermann S, Heinecke A. 2002. Longitudinal association between plaque and gingival bleeding in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol*, 29:287-294.
- Munjal S, Miethe P, Netuschil L, Struck F, Maier K, Bauermeister C. 2007. Immunoassay-Based Diagnostic Point-of-Care Technology for Oral Specimen. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1098 (1):486-489.
- Murai M, Turovskaya O, Gisen K, Madan R, Christopher LK, Cheroutre H, Kronenberg M. 2009. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nature Immunology*, 10:1178-1184.
- Nakashima K, Giannopoulou C, Andersen E, Roehrich N, Brochut P, Dubrez B, Cimasoni G. 1996. A longitudinal study of various crevicular fluid components as markers of periodontal disease activity. *Journal of Clinical Periodontology*, 23 (9):832-838.
- Nelson KE, Fleischmann RD, DeBoy RT, Paulsen IT, Fouts DE, Eisen JA, Daugherty SC,

- Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn M, Haft DH, Kolonay JF, Nelson WC, Mason T, Tallon L, Gray J, Granger D, Tettelin H, Dong H, Galvin JL, Duncan MJ, Dewhirst FE, Fraser CM. 2003. Complete Genome Sequence of the Oral Pathogenic Bacterium *Porphyromonas gingivalis* Strain W83. *Journal of Bacteriology*, 185 (18):5591-5601.
- Okada M, Kitahara M, Kishimoto S, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T. 1988. IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. *The Journal of Immunology*, 141 (5):1543-1549.
- Oosterwaal PJM, Matee MI, Mikx FHM, van't Hof MA, Renggli HH. 1987. The effect of subgingival debridement with hand and ultrasonic instruments on the subgingival microflora. *Journal of Clinical Periodontology*, 14 (9):528-533.
- Oppenheim FG. 1970. Preliminary observations on the presence and origin of serum albumin in human saliva. *Helv Odontol Acta*, 14 (1):10-17.
- Özçaka Ö, Bıçakçı N, Pussinen P, Sorsa T, Köse T, Buduneli N. 2011. Smoking and matrix metalloproteinases, neutrophil elastase and myeloperoxidase in chronic periodontitis. *Oral Diseases*, 17 (1):68-76.
- Page RC, Schroeder HE. 1976. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current Work. *Lab invest*, 33:235.
- Page RC, Kornman KS. 1997. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000*, 14 (1):9-11.
- Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. 1997. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology 2000*, 14 (1):216-248.
- Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Rönkä H, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. 2000. The Expression of MMP-8 in Human Odontoblasts and Dental Pulp Cells is Down-regulated by TGF- β 1. *Journal of Dental Research*, 79 (1):77-84.
- Passoja A, Puijola I, Knuutila M, Niemelä O, Karttunen R, Raunio T, Tervonen T. 2010. Serum levels of interleukin-10 and tumour necrosis factor- α in chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 37 (10):881-887.
- Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. 2006. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology 2000*, 42 (1):80-87.
- Pattison AM. 1996. The use of hand instruments in supportive periodontal treatment. *Periodontology 2000*, 12 (1):71-89.
- Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck PH, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. 1984. Human tumour necrosis factor: precursor structure,

- expression and homology to lymphotoxin. *Nature*, 312:724-729.
- Pfeffer K. 2003. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 14 (3-4):185-191.
- Pfister W, Eick S. 2001. Mikrobiologische Diagnostik progressiver Formen der Parodontitis marginalis. *tzb*, 2:22-28.
- Prescher N, Maier K, Munjal SK, Sorsa T, Bauermeister CD, Struck F, Netuschil L. 2007. Rapid Quantitative Chairside Test for Active MMP-8 in Gingival Crevicular Fluid. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1098 (1):493-495.
- Prots I, Skapenko A, Wendler J, Mattyasovszky S, Yoné CL, Spriewald B, Burkhardt H, Rau R, Kalden JR, Lipsky PE, Schulze-Koops H. 2006. Association of the IL4R single-nucleotide polymorphism I50V with rapidly erosive rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 54 (5):1491-1500.
- Ramfjord SP. 1967. The periodontal Disease Index (PDI). *J Periodontol*, 38 (6):602-610.
- Rawlinson A, Grummitt JM, Walsh TF, Ian Douglas CW. 2003. Interleukin 1 and receptor antagonist levels in gingival crevicular fluid in heavy smokers versus non-smokers. *Journal of Clinical Periodontology*, 30 (1):42-48.
- Reinhardt RA, McDonald TL, Bolton RW, DuBois LM, Kaldahl WB. 1989. IgG subclasses in gingival crevicular fluid from active versus stable periodontal sites. *J Periodontol*, 60:44-50.
- Reinhardt RA, Masada MP, Kaldahl WB, DuBois LM, Kornman KS, Choi J-I, Kalkwarf KL, Allison AC. 1993. Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 20 (3):225-231.
- Riviere GR, Wagoner MA, Baker-Zander SA, Weisz KS, Adams DF, Simonson L, Lukehart SA. 1991. Identification of Spirochetes Related to *Treponema pallidum* in Necrotizing Ulcerative Gingivitis and Chronic Periodontitis. *New England Journal of Medicine*, 325 (8):539-543.
- Riviere GR, Elliot KS, Adam DF, Simonson LG, Forgas LB, Nilus AM, Lukehart SA. 1992. Relative proportions of pathogen-related oral spirochetes (PROS) and *Treponema denticola* in supragingival and subgingival plaque from patients with periodontitis. *Journal of Periodontology*, 2:131-136.
- Rosa GM, Lucas GQ, Lucas ON. 2008. Cigarette Smoking and Alveolar Bone in Young Adults: A Study Using Digitized Radiographs. *Journal of Periodontology*, 79 (2):232-244.
- Rossomando EF, Kennedy JE, Hadjimichael J. 1990. Tumour necrosis factor alpha in gingival

- crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. *Archive of Oral Biology*, 35 (6):431-434.
- Ryan ME, Ramamurthy S, Golub LM. 1996. Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. *Current Opinion Periodontology*, 3:85-96.
- Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J. 2010. Biology of interleukin-10. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21 (5):331-344.
- Satoh T, Nakamura S, Taga T, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, Kaziro Y. 1988. Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Molecular and Cellular Biology*, 8 (8):3546-3549.
- Schlafer S, Riep B, Griffen A, Petrich A, Hubner J, Berning M, Friedmann A, Gobel U, Moter A. 2010. Filifactor alocis - involvement in periodontal biofilms. *BMC Microbiology*, 10 (1):66.
- Schluger NW, Rom WN. 1997. Early responses to infection: chemokines as mediators of inflammation. *Current Opinion in Immunology*, 9 (4):504-508.
- Sela MN. 2001. Role of *Treponema denticola* in periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med*, 12:399-413.
- Seymour GJ. 1991. Importance of the host response in the periodontium. *Journal of Clinical Periodontology*, 18 (6):421-426.
- Shapira L, Van Dyke TE, Hart TC. 1992. A localized absence of interleukin-4 triggers periodontal disease activity: a novel hypothesis. *Medical Hypothesis*, 39:319-322.
- Siewe L, Bollati-Fogolin M, Wickenhauser C, Krieg T, Müller W, Roers A. 2006. Interleukin-10 derived from macrophages and/or neutrophils regulates the inflammatory response to LPS but not the response to CpG DNA. *European Journal of Immunology*, 36 (12):3248-3255.
- Simonson LG, Goodman CH, Bial JJ, Morton HE. 1988. Quantitative relationship of *Treponema denticola* to severity of periodontal disease. *Infect Immun*, 56:726-728.
- Simonson LG, Robinson PJ, Pranger RJ, Cohen ME, Morton HE. 1992. *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* as prognostic markers following periodontal treatment. *J Periodontol*, 63:270-273.
- Skapski H, Lehner T. 1976. A crevicular washing method for investigating immune components of crevicular fluid in man. *Journal of Periodontal Research*, 11 (1):19-24.
- Slots J, Listgarten MA. 1988. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 15 (2):85-93.

- Smith RA, Baglioni C. 1987. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *Journal of Biological Chemistry*, 262 (15):6951-6954.
- Socransky SS. 1977. Microbiology of Periodontal Disease - Present Status and Future Considerations. *J Periodontology*, 48 (9):497-504.
- Socransky SS, Haffajee AD. 1994. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontology 2000*, 5 (1):7-25.
- Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, Lindhe J. 1984. New concepts of destructive periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 11 (1):21-32.
- Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL, Hillman JD. 1988. Association between microbial species in subgingival plaque samples. *Oral Microbiology and Immunology*, 23:1-7.
- Söder B. 1999. Neutrophil elastase activity, levels of prostaglandin E2, and matrix metalloproteinase-8 in refractory periodontitis sites in smokers and non-smokers. *Acta Odontologica Scandinavica*, 57 (2):77-82.
- Söder B, Jin LJ, Wickholm S. 2002. Granulocyte elastase, matrix metalloproteinase-8 and prostaglandin E2 in gingival crevicular fluid in matched clinical sites in smokers and non-smokers with persistent periodontitis; Granulozytenelastase, Matrix-Metalloproteinase-8 und Prostaglandin E2 in der gingivalen krevikulären Flüssigkeit in entsprechenden klinischen Flächen bei Rauchern und Nichtrauchern mit bestehender Parodontitis; Elastase granulocyttaire, métalloprotéinase-8 de la matrice et prostaglandine E2 dans le fluide créviculaire chez des fumeurs et des non-fumeurs avec parodontite persistante. *Journal of Clinical Periodontology*, 29 (5):384-391.
- Solomon HA, Priore RL, Bross IDJ. 1968. Cigarette smoking and periodontal disease. *Journal of American Dental Association*, 77:1081-1084.
- Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. 2004. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Diseases*, 10 (6):311-318.
- Sorsa T, Uitto V-J, Suomalainen K, Turto H, Lindy S. 1987. A trypsin-like protease from *Bacteroides gingivalis*: partial purification and characterization. *Journal of Periodontal Research*, 22 (5):375-380.
- Sorsa T, Uitto V-J, Suomalainen K, Vauhkonen M, Lindy S. 1988. Comparison of interstitial collagenases from human gingiva, sulcular fluid and polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Periodontal Research*, 23 (6):386-393.
- Sorsa T, Ding Y-L, Ingman T, Salo T, Westerlund U, Haapasalo M, Tschesche H, Kontinen YT. 1995. Cellular source, activation and inhibition of dental plaque collagenase. *Journal of Clinical Periodontology*, 22 (9):709-717.

- Southerland JH, Taylor GW, Offenbacher S. 2005. Diabetes and Periodontal Infection: Making the Connection. *Clinical Diabetes*, 23 (4):171-178.
- Standiford TJ, Strieter RM, Chensue SW, Westwick J, Kasahara K, Kunkel SL. 1990. IL-4 inhibits the expression of IL-8 from stimulated human monocytes. *The Journal of Immunology*, 145 (5):1435-1439.
- Stashenko P, Dewhirst FE, Peros WJ. 1987. Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol*, 138:1464.
- Stein SH, Hendrix C. 1996. Interleukin-10 promotes anti-collagen antibody production in gingival mononuclear cells. *J Dent Res*, 75:158.
- Tanner ACR, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. 1979. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *Journal of Clinical Periodontology*, 6 (5):278-307.
- te Velde A, Huijbens R, Heije K, de Vries J, Figdor C. 1990. Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes. *Blood*, 76 (7):1392-1397.
- Teles RP, Gursky LC, Faveri M, Rosa EA, Teles FRF, Feres M, Socransky SS, Haffajee AD. 2010. Relationships between subgingival microbiota and GCF biomarkers in generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 37 (4):313-323.
- Tervahartiala T, Pirilä E, Ceponis A, Maisi P, Salo T, Tuter G, Kallio P, Törnwall J, Srinivas R, Konttinen YT, Sorsa T. 2000. The in vivo Expression of the Collagenolytic Matrix Metalloproteinases (MMP-2, -8, -13, and -14) and Matrilysin (MMP-7) in Adult and Localized Juvenile Periodontitis. *Journal of Dental Research*, 79 (12):1969-1977.
- Toker H, Poyraz O, Eren K. 2008. Effect of periodontal treatment on IL-1 β , IL-1ra, and IL-10 levels in gingival crevicular fluid in patients with aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 35 (6):507-513.
- Tonetti MS. 1997. Molecular factors associated with compartmentalization of gingival immune responses and transepithelial neutrophil migration. *Journal of Periodontal Research*, 32 (1):104-109.
- Tonetti MS, Imboden MA, Lang NP. 1998. Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of Interleukin-8 and ICAM-1. *J Periodontol*, 69:1139-1147.
- Torres de Heens GL, Kikkert R, Aarden LA, Van Der Velden U, Loos BG. 2009. Effects of smoking on the ex vivo cytokine production in periodontitis. *Journal of Periodontal*

- Research, 44 (1):28-34.
- Tracey KJ, Cerami A. 1993. Tumor Necrosis Factor, Other Cytokines and Disease. *Annual Review of Cell Biology*, 9:317-343.
- Tran SD, Rudney JD. 1999. Improved Multiplex PCR Using Conserved and Species-Specific 16S rRNA Gene Primers for Simultaneous Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, and *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (11):3504-3508.
- Tymkiw KD, Thunell DH, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE, Brogden KA, Guthmiller JM. 2011. Influence of smoking on gingival crevicular fluid cytokines in severe chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 38 (3):219-228.
- Uitto V-J, Overall CM, McCulloch C. 2003. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontology 2000*, 31 (1):77-104.
- van Winkelhoff AJ, de Graaff J. 1991. Microbiology in the management of destructive periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 18 (6):406-410.
- Wenzel SE, Balzar S, Ampleford E, Hawkins GA, Busse WW, Calhoun WJ, Castro M, Chung KF, Erzurum S, Gaston B, Israel E, Teague WG, Curran-Everett D, Meyers DA, Bleecker ER. 2007. IL4R α Mutations Are Associated with Asthma Exacerbations and Mast Cell/IgE Expression. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 175 (6):570-576.
- Windsor WT, Syto R, Tsarbopoulos A, Zhang R, Durkin J, Baldwin S, Paliwal S, Mui PW, Pramanik B. 1993. Disulfide bond assignments and secondary structure analysis of human and murine interleukin 10. *Biochemistry*, 32 (34):8807-8815.
- Woessner JF. 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *The FASEB Journal*, 5 (8):2145-2154.
- Yoshimura A, Hara Y, Kaneko T, Kato I. 1997. Secretion of IL-1 β , TNF- α , IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. *Journal of Periodontal Research*, 32 (3):279-286.
- Zambon JJ, Grossi SG, Machtei EE, Ho AW, Dunford R, Genco RJ. 1996. Cigarette Smoking Increases the Risk for Subgingival Infection With Periodontal Pathogens. *Journal of Periodontology*, 67:1050-1054.

8. Anhang

8.1 Danksagung

Herrn PD Dr. Arndt Güntsch bin ich zu großem Dank verpflichtet, für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, für seine fachlichen Hinweise, seiner Betreuung, die Unterstützung, seinem Vertrauen und vor allem seiner Geduld bei der Erstellung dieser Dissertation. Es ist ihm gelungen mich für die Parodontologie zu begeistern.

Auch danke ich Frau Dipl. Ing. Andrea Vöpel für ihre fachliche und konstruktive Unterstützung und Anleitung zum wissenschaftlich labortechnischem Arbeiten.

Weiterhin danke ich allen Probanden, die durch ihre Kooperation das Erstellen und schlussendlich auch die Erkenntnisse aus dieser Studie ermöglichten.

Ich danke meinem Bruder Shahriar Assadi für das Vertrauen, das er zu jeder Zeit, in mir hat.

Auch danke ich meiner Familie von ganzem Herzen, für ihre unermüdliche Unterstützung und ihren, vor allem in schwierigen Zeiten, unerschütterlichen Glauben in mir.

Schließlich danke ich all meinen Freunden für ihre aufmunternden Worte, ihre Unterstützung und ihre Geduld, in guten sowie auch in den schwierigen Phasen. Besonders Carlo, Daria und auch meine Freundin Koralie seien hier hervor gehoben.

Ich widme diese Dissertation meinem Vater Dr. Nasser Assadi und meiner Mutter Dalileh Abbaszadeh Sarhangi, die durch ihre Liebe und ihrer unglaublichen Geduld, mich in jeder Phase meines Lebens unterstützt haben.

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Shayan Assadi
Adresse: Grimbergstr. 46
45307 Essen
Geburtsdatum: 07.08.1987
Geburtsort: Babol (Iran)
Familienstand: Ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung:

1994-1998 Grundschule Rah-e-Noor (Iran)
1998-1999 Grundschule Stiftschule in Essen Stadtwald
1999-2007 Helmholtz-Gymnasium Essen Rüttenscheid

Schulabschluss:

08/2007 Abitur

Wehrdienst:

2007-2008 Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz Essen

Hochschulausbildung:

10/2008 Zahnmedizinstudium an der Friedrich Schiller Universität Jena
09/2009 Famulatur in der Essener Universitätsklinik für Mund-, Kiefer-,
und Gesichtschirurgie, plastische Operationen
03/ 2011 Erstes Staatsexamen (Physikum)
08/2011 Famulatur in Indien über Kindernothilfe bei der Organisation
„Zahnärzte für Indien“; Sitz in Duisburg

03/2012	Famulatur in Kenia bei der Organisation „Dentists for Africa“; Sitz in Sömmerda
12/2013	Staatsexamen
12/2013	Approbation als Zahnarzt

Wissenschaftliche Arbeiten:

2012	Promotion im Bereich der Parodontologie - Thema: “Immunologische und mikrobiologische Parameter in der Sulkusflüssigkeit von Patienten mit chronischer Parodontitis: Einfluss des Rauchens“
------	--

Sprachen:

Englisch fließend in Wort in Schrift
 Farsi fließend in Wort in Schrift
 Französisch fließend in Wort
 Großes Latinum

Nebentätigkeiten:

2009-2010	Studentische Hilfskraft in der Mund, - Kiefer, - Gesichtschirurgischen Ambulanz im Essener Universitätsklinikum (in den Semesterferien)
2009-2011	Wissenschaftliche Hilfskraft (Tutor) im Institut für Anatomie I in Jena

EDV-Kenntnisse:

Word
 Excel
 Powerpoint
 SPSS

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

8.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

PD Dr. Arndt Güntsch

Dipl. Ing. Andrea Völpel,

- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers