
Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

**Untersuchung zur Wertigkeit der parodontalen Expression von PGE2
und MMP-8 in der Diagnose der marginalen Parodontitis**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Isabella Kirchhoff, geb. Rüdell

aus
München
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent.
Matthias Folwaczny

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Johannes Randzio

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. Christina Ern

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.03.2018

1 EINLEITUNG	1
1.1 Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis	2
1.1.1 Risikofaktoren	5
1.1.2 Immunabwehr	7
1.2 Klassifizierung der Parodontitis	9
1.3 Parodontalpathogene Bakterien	10
1.3.1 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	11
1.3.2 Roter Komplex	12
1.3.2.1 Porphyromonas gingivalis	12
1.3.2.2 <i>Treponema denticola</i>	14
1.3.2.3 <i>Tannerella forsythia</i>	15
1.3.3 Oranger Komplex	16
1.3.3.1 <i>Prevotella intermedia</i>	16
1.3.3.2 <i>Parvimonas micra</i>	17
1.3.3.3 <i>Fusobacterium nucleatum</i>	18
1.4.2 PGE2	21
2 ZIEL DER ARBEIT	22
3 MATERIAL UND METHODEN	23
3.1 Erfassung patientenbezogener Daten	23
3.1.1 Patientenkollektiv	23
3.1.2 Röntgenprogramm	24
3.2 Probenentnahme am Patienten	25
3.3 Nachweis von MMP-8 mittels dentoELISA aMMP-8 kit	26
3.4 Nachweis von PGE2 mittels PGE2 high sensitivity EIA kit	28
3.5 Nachweis der Bakterien	30
3.5.1 DNA-Isolation	30
3.5.2 PCR zur Identifikation der Bakterien	31
3.5.3 ELISA zur Identifikation der Bakterien	32
3.6 Statistische Methodik	34
3.7 Materialien und Geräte	35
3.7.1 Geräte	35
3.7.2 Verbrauchsmaterialien	36
3.7.3 Molekularbiologische Kits	37
3.7.4 Chemikalien und Reagenzien	38
4 ERGEBNISSE	40
4.1 Deskriptive Statistik	40
4.1.1 Charakteristika der Studienpopulation	40

4.1.2 Verlust an Alveolarknochenhöhe in den einzelnen PA-Stadien	44
4.1.3 Vorhandene Zahnanzahl in den einzelnen PA-Stadien	45
4.1.4 Vorkommen der parodontalpathogenen Bakterien in den PA-Stadien	46
4.1.4.1 Vorkommen von <i>A. actinomycetemcomitans</i> in den einzelnen PA-Stadien	46
4.1.4.2 Vorkommen von <i>P. gingivalis</i> in den einzelnen PA-Stadien	47
4.1.4.3 Vorkommen von <i>T. denticola</i> in den einzelnen PA-Stadien	48
4.1.4.4 Vorkommen von <i>T. forsythia</i> in den einzelnen PA-Stadien	49
4.1.4.5 Vorkommen von <i>P. intermedia</i> in den einzelnen PA-Stadien	50
4.1.4.6 Vorkommen von <i>P. micra</i> in den einzelnen PA-Stadien	51
4.1.4.7 Vorkommen von <i>F. nucleatum</i> in den einzelnen PA-Stadien	52
4.2 Expression von MMP-8 und PGE2 in Abhängigkeit von Geschlecht, Rauchverhalten und ethnischer Abstammung	53
4.2.1 Expression von MMP-8 und PGE2 in der Gesamtpopulation	53
4.2.2 Expression von MMP-8 und PGE2 in den einzelnen PA-Stadien in Abhängigkeit vom Geschlecht	53
4.2.2.1 Expression von MMP-8 und PGE2 bei weiblichen Patienten	53
4.2.2.2 Expression von MMP-8 und PGE2 bei männlichen Patienten	54
4.2.3 Expression von MMP-8 und PGE2 in den einzelnen PA-Stadien in Bezug auf das Rauchverhalten	55
4.2.3.1 Expression von MMP-8 und PGE2 bei Nichtrauchern	55
4.2.3.2 Expression von MMP-8 und PGE2 bei Rauchern	55
4.2.4 Expression von MMP-8 und PGE2 in den einzelnen PA-Stadien in Abhängigkeit von der ethnischen Abstammung	56
4.3 Alveolarknochenverlust und der Einfluss auf die Expression von MMP-8 und PGE2	57
4.4 Parodontalpathogene Bakterien und der Einfluss auf die Expression von MMP-8 und PGE2	59
4.4.1 Expression von MMP-8 und PGE2 in Abhängigkeit einer Infektion durch <i>A. actinomycetemcomitans</i>	59
4.4.2 Expression von MMP-8 und PGE2 in Abhängigkeit einer Infektion durch <i>P. gingivalis</i>	59
4.4.3 Expression von MMP-8 und PGE2 in Abhängigkeit einer Infektion durch <i>T. denticola</i>	60
4.4.4 Expression von MMP-8 und PGE2 in Abhängigkeit einer Infektion durch <i>T. forsythia</i>	61
4.4.6 Expression von MMP-8 und PGE2 in Abhängigkeit einer Infektion durch <i>P. micra</i>	62
4.4.7 Expression von MMP-8 und PGE2 in Abhängigkeit einer Infektion durch <i>F. nucleatum</i>	63
4.5 Multivariate Analyse	64
5 DISKUSSION	66
5.1 Methoden	66
5.1.1 Auswahl der Studienpopulation	66
5.1.2 Sulkusflüssigkeit als Nachweismedium	67
5.1.3 Nachweis laborchemischer Parameter	68

5.2 Expression der Markermoleküle	69
5.2.1 Einfluss bakterieller Infektion auf die Expression von MMP-8	69
5.2.2 Einfluss bakterieller Infektion auf die Expression von PGE2	72
5.2.3 Einfluss des Geschlechts auf die Expression von MMP-8 und PGE2	74
5.2.4 Zusammenhang mit dem Rauchverhalten	75
6 ZUSAMMENFASSUNG	76
7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	78
8 LITERATURVERZEICHNIS	80
9 DANKSAGUNG	92
10 LEBENSLAUF	93
11 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	94

1 Einleitung

Die marginale Parodontitis ist eine der häufigsten Erkrankungen der menschlichen Mundhöhle und der Hauptgrund für Zahnverlust beim Erwachsenen (Offenbacher, 1996).

Bereits 1728 erkannte der französische Zahnarzt Pierre Fauchard die Zusammenhänge von mangelnder Mundhygiene und der Entstehung parodontaler Erkrankungen und schrieb dies in seinem Buch *“The surgeon dentist”* nieder (Merritt, 1939). Die Destruktion von Strukturen des Zahnhalteapparates wurde vom Zahnarzt Oskar Weski als Parodontose definiert. Im Jahr 1924 gründete er gemeinsam mit Hans Sachs und Robert Neumann die Arbeitsgemeinschaft für Parodontosenforschung (ARPA). Die ARPA sollte die zu dem Zeitpunkt nur an Universitäten erforschten Erkenntnisse über die Ursachen und die Therapiemöglichkeiten der *“Parodontose”* auch den niedergelassenen Zahnärzten zugänglich machen (Schlagenhauf, 2009). Schon früher war also das Bewusstsein über die Ätiologie und die Pathogenese parodontaler Erkrankungen vorhanden.

Obwohl die 2014 durchgeführte fünfte deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V) zur Bestandsaufnahme der oralepidemiologischen Situation der Parodontitis in Deutschland eine deutliche Verbesserung der Entwicklung von Parodontalerkrankungen im Vergleich zu der 2005 durchgeführten vierten Mundgesundheitsstudie (DMS IV) zeigt, verdeutlicht sie die Ausmaße der Erkrankung: in der aktuellen Studie ist nur noch etwa die Hälfte der Erwachsenen von einer schweren Parodontitis betroffen (DMS IV: 17,4%, DMS V: 8,2%), die Anzahl der Betroffenen mit moderater Parodontitis ist um etwa 10% gesunken (DMS IV: 53,6%, DMS V: 43,4%). Demnach ist immer noch jeder zweite Erwachsene von einer parodontalen Erkrankung betroffen. Ebenso ist bei den Senioren der Anteil der an schwerer Parodontitis erkrankten Personen auf etwa die Hälfte reduziert (DMS IV: 44,1%, DMS V: 19,8%). Die von moderater Parodontitis Betroffenen sind etwa gleich geblieben (DMS IV: 47,9%, DMS V: 44,8%). Auch in dieser Altersgruppe ist trotzdem noch jeder Zweite parodontal erkrankt (Jordan & Micheelis, 2016).

Man weiss inzwischen, dass viele verschiedene Faktoren, wie bestimmte parodontalpathogene Bakterien, deren Stoffwechselprodukte, die Expression von Entzündungsfaktoren, das Immunsystem, sowie der Einfluss verschiedener Risikofaktoren zum Krankheitsbild der Parodontitis führen können. Die Interaktion der verschiedenen krankheitsauslösenden Faktoren ist jedoch noch nicht vollständig erforscht.

1.1 Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis

Zu den parodontalen Erkrankungen zählen die Gingivitis und die Parodontitis. Die Gingivitis als mildeste Form der parodontalen Erkrankungen betrifft weltweit etwa 50-90% aller Erwachsenen. Sie ist reversibel und durch effektive orale Mundhygiene erfolgreich zu bekämpfen. Wenn die Gingivitis weiter voranschreitet, breitet sich die Entzündung auf das Parodont aus. Daraus kann eine Parodontitis resultieren (Pihlstrom et al., 2005). Somit ist die Parodontitis eine Folgeerkrankung der Gingivitis, jedoch entsteht nicht aus jeder Gingivitis eine Parodontitis (Sheiham & Netuveli, 2002).

Die Parodontitis ist eine irreversible, hauptsächlich durch bakterielle Plaque bedingte Entzündung des Zahnhalteapparates. Risikofaktoren sind modifizierend an der Pathogenese beteiligt. Entzündungsprozesse am Parodont führen zum Abbau von Alveolarknochen, was sogar den Zahnverlust zur Folge haben kann (Bodet et al., 2006b). Im Wesentlichen ist die Immunantwort auf die bakterielle Besiedelung die Ursache für die Zerstörung parodontalen Gewebes (Bodet et al., 2007). Diese Destruktion zeigt sich in den klinischen Zeichen der Parodontitis durch Ausbildung parodontaler Taschen (erhöhte Taschensondierungstiefen), Attachmentverlust, radiologisch erkennbaren Verlust an Alveolarknochen, sowie Blutung auf Sondierung (BOP: bleeding on probing) (Bodet et al., 2007; Eickholz, 2010).

In der subgingivalen Plaque konnten bisher mehr als 600 verschiedene Bakterienarten nachgewiesen werden, wobei nicht alle zur Entstehung und dem Fortschreiten von Parodontitis beitragen (Aas et al., 2005; Kroes et al.,

1999; Paster et al., 2001; Socransky & Haffajee, 1994). Bei gesunden parodontalen Verhältnissen ist die mikrobielle Plaque durch das Vorhandensein von hauptsächlich grampositiven Bakterien gekennzeichnet (Tonetti et al., 1998). Es tritt Sulkusflüssigkeit, ein Transsudat der Interstitialflüssigkeit, durch das Saumepithel in den Sulkus aus (Alfano, 1974). Bei der Gingivitis ändert sich die Zusammensetzung der Plaque durch den Anstieg von gramnegativen Bakterien (Tonetti et al., 1998). Diese verursachen eine lokale Immunantwort, charakterisiert durch Bildung eines gingivalen Erythems, eines Ödems und durch den Verlust der typischen Gingiva-Stippelung. Entzündungsgeschehen im Parodont führen zu Gefäßveränderungen mit erhöhter Vasodilatation und Vasopermeabilität, wodurch es zu einer leichter induzierbaren Blutung der Gingiva kommt, sowie dem Vorhandensein eines Exsudats aus polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten. Die dabei entstehende entzündliche Sulkusflüssigkeit, das Exsudat, enthält u.a. Entzündungsfaktoren und Bakterien, welche durch mikrobiologische Verfahren nachgewiesen werden können. Das Exsudat fließt vom Gewebe in den Sulkus und wird als gingivale Sulkusflüssigkeit bezeichnet (Page & Schroeder, 1976; Pashley, 1976; C. C. Tsai et al., 1998). Die Sulkusflüssigkeit stellt einen sehr nährstoffreichen Boden für Bakterien dar (Shah & Gharbia, 1995). Dennoch enthält sie auch, ähnlich dem Serum, Komponenten der körpereigenen und erworbenen Immunabwehr, um bis zu einem gewissen Grad die Ausbreitung von Bakterien und einer systemischen Infektion zu verhindern (Cimasoni, 1983).

Spezifische Bakterienarten und Bakterienkomplexe kommen häufiger an befallenen Stellen in parodontalem Gewebe vor, während andere vorwiegend in gesundem oder stabilem Gewebe anzutreffen sind. Die Bakterien des sogenannten roten Komplexes nach Socransky, bestehend aus *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola* sind die wichtigsten Auslöser der chronischen Parodontitis (Bodet et al., 2006a). Ihr Nachweis wird mit vereinzelt erhöhten Taschensondierungstiefen und Blutung auf Sondierung in Verbindung gebracht (Kasuga et al., 2000; Socransky et al., 1998). Diese Bakterien sind durch ihre Virulenzfaktoren in der Lage, sich an subgingivalen Flächen anzusiedeln und eine Immunantwort auszulösen, was zur Zerstörung des parodontalen Gewebes führen kann

(Bodet et al., 2007). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *Prevotella intermedia* und *Parvimonas micra* sind Markerkeime für die marginale Parodontitis bei Erwachsenen und stehen in Zusammenhang mit dem Fortschreiten der Erkrankung (Dzink et al., 1988; Moore et al., 1991; Slots & Ting, 1999).

Mikroorganismen, die sich in Parodontaltaschen befinden, führen auf drei verschiedenen Wegen zur Gewebedestruktion. Zum einen geben die Bakterien proteolytische Enzyme wie z.B. Kollagenasen ab, die zum Abbau des Bindegewebes führen (Birkedal-Hansen et al., 1988; Robertson et al., 1982). Zum anderen können bakterielle Produkte wie Lipopolysaccharide und Toxine direkt ortsansässige oder eingewanderte Zellen zur Ausschüttung von gewebeabbauenden Enzymen veranlassen. Außerdem führt die Provokation einer Immunantwort zur Abgabe von Zytokinen durch Makrophagen und Lymphozyten. Diese Zytokine stimulieren Gingivazellen zur Synthese von Matrixmetalloproteinasen, welche wiederum den Gewebeabbau initiieren (Birkedal-Hansen et al., 1984; Heath et al., 1987; Meikle et al., 1989; Takada et al., 1991). Ziele der abgegebenen Mediatoren sind Entzündungszellen, Fibroblasten, Keratinozyten des Saumepithels, Endothelzellen und Osteoblasten (Birkedal-Hansen, 1993).

1.1.1 Risikofaktoren

Neben dem Einfluss von Alter, Stress, genetischer Disposition, Mangelernährung und Erkrankungen des Mund- und Rachenraumes tragen Tabakkonsum und Diabetes stark zur Entstehung der Parodontitis bei (Aleksejuniene et al., 2002; Beck et al., 1990; Page & Beck, 1997; Page & Kornman, 1997).

Einer der wichtigsten Risikofaktoren, die zur Zerstörung parodontalen Gewebes führen, ist das Zigarettenrauchen. Durch das Zigarettenrauchen werden freie Radikale, sog. *Reactive Oxygene Species* (ROS) im Wirtsorganismus freigesetzt. Zu ihnen zählen beispielsweise die Hydroxyd- und Peroxylradikale. Diese freien Radikale führen zur Zerstörung der Wirts-DNA, zur Schädigung endothelialer Zellen und zur oxidativen Degradation von Lipiden. Außerdem induzieren sie ein vermehrtes Wachstum glatter Gefäßmuskulatur. Dadurch kommt es zu Gewebeveränderungen (C. C. Tsai et al., 2005). ROS aktivieren die Bildung der Mediatoren Interleukin-6, Tumornekrosefaktor- α und Interleukin-1 β , welche für die Pathogenese von parodontalen Erkrankungen von Bedeutung sind (Zhang et al., 2002).

Bei Rauchern ist der Sauerstoffpartialdruck in den Parodontaltaschen verglichen mit dem von Nichtrauchern signifikant erniedrigt (Hanioka et al., 2000), was die Kolonisation von Anaerobiern begünstigt. Die parodontalpathogenen Bakterien *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* heften sich vermehrt an epitheliale Zellen an, die durch Nikotin verändert wurden (Teughels et al., 2005). Bei Rauchern ist insbesondere der Spiegel an zirkulierenden Antikörpern, vor allem von IgG2, einem Subtyp der Immunglobulinklasse G, reduziert. IgG2 richtet sich u.a. gegen gramnegative parodontalpathogene Bakterien, durch dessen Mangel sich die verminderte parodontale Abwehr erklärt (Loos et al., 2004).

Tanaka et al. beschrieben einen synergistischen Effekt von Lipopolysacchariden und Nikotin über einen Anstieg von Prostaglandin E2 (PGE2) auf die Differenzierung von osteoklastenähnlichen Zellen. Dies kann ein möglicher Grund für den potenzierenden Effekt von Tabakkonsum und Plaqueanlagerung, sowie damit letztlich der Entstehung von Parodontitis sein

(Tanaka et al., 2006).

Bei Untersuchung des Risikofaktors Diabetes mellitus konnte gezeigt werden, dass Diabetiker häufiger an Parodontitis erkranken, die Parodontitis schwerer verläuft und schneller voranschreitet (Khader et al., 2009; Mealey & Ocampo, 2007; Preshaw et al., 2007; Salvi et al., 2008). Dabei hängt das Parodontitisrisiko von der Einstellung des Blutzuckerwertes ab. Gut eingestellte Diabetiker weisen im Vergleich zu Nichtdiabetikern kein erhöhtes Risiko auf, an Parodontitis zu erkranken, während bei schlecht eingestellten Diabetikern ein erhöhtes Parodontitisrisiko besteht (Lim et al., 2007; Tervonen & Karjalainen, 1997; C. Tsai et al., 2002). Ebenso hat die Einstellung des Blutzuckers einen Einfluss auf den Therapieerfolg. Gut eingestellte Diabetiker sprechen genauso gut auf die Parodontitistherapie an wie Nichtdiabetiker, während schlecht eingestellte Diabetiker eine weniger gute Therapieantwort zeigen (Christgau et al., 1998; Navarro-Sanchez et al., 2007; Tervonen et al., 2000; Westfelt et al., 1996).

Diabetes begünstigt die Destruktion parodontalen Gewebes unter anderem durch die Störung der Granulozytenfunktion mit Folge der verminderten parodontalen Wirtsabwehr, Gefäßveränderungen, Veränderung der Kollagen- und Glykosaminoglykan-Synthese, Fehlregulation der Zytokin-Produktion und durch Bildung von Advanced Glycation Endproducts (AGEs). AGEs sorgen für einen Monozytenanstieg im befallenen Parodontalgewebe. Die Interaktion von AGEs mit ihren Rezeptoren (RAGEs) führt zur gesteigerten Produktion proinflammatorischer Zytokine wie PGE₂, Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Aufgrund der Hyperglykämie werden AGEs bei Diabetikern verstärkt produziert und sind im Parodont nachweisbar (Duarte et al., 2007; Vlassara et al., 1988). Demnach wird die ohnehin schon durch parodontalpathogene Mikroorganismen hervorgerufenen Entzündungsreaktion durch AGEs noch verstärkt und die Knochendestruktion des Parodonts gefördert. Ein weiterer Effekt der AGEs besteht in der verstärkten Vernetzung des Kollagens, wodurch die extrazelluläre Matrix des Parodontalgewebes schlechter erneuert werden kann (Zieman & Kass, 2004).

1.1.2 Immunabwehr

Die angeborene oder unspezifische Immunabwehr wird in eine humorale und in eine zelluläre Komponente unterteilt.

Bei einer akuten Entzündung kommt es durch im Blutplasma vorhandene Substanzen (Bradykinin, Komplementfragmente, Fibrinprodukte u.a.) oder durch Substanzen aus dem Gewebe bzw. von Zellen (Histamin, Serotonin, Prostaglandine, Lymphokine) zu einer Gefäßreaktion mit Erhöhung der Gefäßpermeabilität, sowie zur unspezifischen Abwehr von Bakterien durch Leukozyten. Durch die erhöhte Durchlässigkeit der Gefäße resultiert eine gesteigerte Sulkusflüssigkeitsfließrate. Vor allem polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNs) wandern verstärkt durch das Saumepithel. PMNs können Mikroorganismen phagozytieren, sie bilden den Großteil der zellulären unspezifischen Immunabwehr (Moughal et al., 1992; Sigusch et al., 2001).

Die humorale Komponente der unspezifischen Immunabwehr wird durch das Komplementsystem, einen Komplex aus 17 verschiedenen Proteinen im Serum gebildet, wobei Immunkomplexe diese Kaskade aktivieren und Proteininteraktionen herbeiführen. Die einzelnen Faktoren werden bei der Aktivierung in Bruchstücke gespalten und sind ursächlich für verschiedene Reaktionen. Nach Aktivierung von Faktor C1 wird beispielsweise die Gefäßpermeabilität erhöht. Faktor C3a, C5a und C5b67 lösen die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten aus. Die Faktoren C3b und C5b erleichtern die Opsonisierung und Phagozytose von Bakterien. C3a und C5a erhöhen die Gefäßpermeabilität durch Freisetzung von Histamin aus Mastzellen. C3b aktiviert B-Lymphozyten und der Komplex C5b6789 verursacht die Lyse von Erythrozyten und gramnegativen Bakterien. Die hier beschriebene klassische Kaskade des Komplementsystems hat eine Latenzzeit von 5 bis 7 Tagen. Bestimmte Antigen-Antikörper-Komplexe und auch die Endotoxine gramnegativer Bakterien können den Faktor C3 direkt aktivieren und die entzündliche Reaktion somit beschleunigen (Schifferle et al., 1993; Sundqvist et al., 1985).

Da die unspezifische Immunabwehr nicht gegen alle Antigene vollständig wirksam ist, kann zusätzlich das spezifische Abwehrsystem aktiviert werden.

So wie das spezifische lässt sich auch das unspezifische Immunsystem in ein humorales und in ein zelluläres System unterteilen.

Immunglobuline (Ig) gehören dem humoralen System an. Nach Antigenkontakt reifen B-Lymphozyten zu Plasmazellen, die für die Antikörperproduktion zuständig sind. IgG stellt mit etwa 70% die größte Fraktion der Antikörper dar. Es heftet sich an Bakterien (Opsonisierung) und erleichtert dadurch deren Phagozytose durch Leukozyten (Wilson et al., 1995; Wilson & Genco, 1989). IgA im Speichel hemmt die Bakterienanhaftung auf Mundhöhlenoberflächen (Saito et al., 1993). Beim ersten Kontakt des Wirts mit einem Antigen erfolgt die Anheftung von IgE an basophile Granulozyten oder Mastzellen. Nach einem zweiten Kontakt mit dem Antigen werden diese Zellen zur Degranulation angeregt. Es werden Leukotriene, Heparin und Histamin ausgeschüttet, was Gefäßreaktionen verursacht. Antikörper der Klassen IgG und IgM können das Komplementsystem aktivieren, indem sie mit Antigenen Komplexe bilden (Antigen-Antikörper-Komplexe) (Cutler et al., 1993; Ebersole, 2003; Hellwig et al., 2007).

T-Lymphozyten gehören dem zellulären System der spezifischen Immunabwehr an. Der Kontakt von T-Lymphozyten mit spezifischen Antigenen führt zur Aktivierung der T-Lymphozyten und zur Ausschüttung multifunktionaler Lymphokine. Dazu gehören z.B. die Regulation der Antikörperproduktion von B-Lymphozyten, die Regulation der Proliferation von T-Lymphozyten und die Aktivierung von Osteoklasten (Hellwig et al., 2007; Sigusch et al., 1998).

Neutrophile Granulozyten, die sich in der Sulkusflüssigkeit befinden, bilden die erste Abwehr gegen Bakterien. Sie produzieren eine Reihe von Mediatoren, u.a. Leukotrien-B₄, Thromboxan-B₂, Plättchen-Aktivierungsfaktor, Elastase und MMP-8, welche in der Sulkusflüssigkeit nachweisbar sind. Der Anstieg des Mediators Interleukin-8 ist eines der frühesten Anzeichen für die Entstehung einer Gingivitis (C. C. Tsai et al., 1998).

Durch das Auftreten weiterer Entzündungs- und Abwehrzellen manifestiert sich zunehmend eine Parodontitis. Monozyten setzen PGE₂, Matrixmetalloproteinasen (MMPs), TNF- α und IL-1 frei. MMPs verursachen dabei eine Destruktion parodontalen Gewebes durch Zerstörung der Kollagenmatrix, während PGE₂, TNF- α und IL-1 über Osteoklastenaktivierung zum Abbau

von Knochen führen (Page, 1999). Bei fortschreitender Gingivitis in Richtung der Parodontitis vermehren sich gramnegative Bakterien und siedeln sich in der subgingivalen Plaque an, wodurch eine chronische Immunantwort ausgelöst wird (Beck et al., 1992; Socransky et al., 1998).

1.2 Klassifizierung der Parodontitis

Die gingivalen und parodontalen Erkrankungen werden nach der aktuellen Klassifikation der AAP und EFP in 8 Hauptgruppen gegliedert:

I. Gingivale Erkrankungen
II. Chronische Parodontitis
III. Aggressive Parodontitis
IV. Parodontitis als Manifestation einer Systemerkrankung
V. Nekrotisierende Parodontalerkrankungen
VI. Parodontalabszesse
VII. Parodontitis in Zusammenhang mit endodontalen Läsionen
VIII. Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformationen und Zustände

Abb.1 Einteilung der gingivalen und parodontalen Erkrankungen (nach AAP, 1999) (Wiebe & Putnins, 2000)

Die chronische Parodontitis ist durch ein langsames und schubweises Fortschreiten gekennzeichnet. Sie kann lokalisiert (weniger als 30% aller Zahnflächen betroffen) oder auch generalisiert (mehr als 30% aller Zahnflächen betroffen) auftreten. Zusätzlich wird sie je nach Stärke des Attachmentverlusts in leicht (1-2mm), moderat (3-4mm) und schwer (>5mm) eingeteilt. Typischerweise tritt die chronische Parodontitis im Erwachsenenalter auf und nimmt im Verlauf an Schwere zu. Aber auch Kinder und junge Patienten können bereits von der chronischen Parodontitis betroffen sein, weshalb diese Form der Parodontitis nicht mehr wie nach der früheren Klassifikation als adulte Parodontitis bezeichnet wird. Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes mellitus und psychogener Stress spielen bei der Entstehung und dem Fortschreiten der chronischen Parodontitis eine

begünstigende Rolle.

Die aggressive Parodontitis ist durch rasch fortschreitenden Attachmentverlust und Knochenabbau gekennzeichnet. Sie kann ebenso lokalisiert wie auch generalisiert auftreten. Die lokalisierte aggressive Parodontitis beginnt meist während der Pubertät und betrifft die Inzisiven und ersten Molaren. Bei der generalisierten Form sind zusätzlich noch mindestens drei weitere Zähne befallen. Die Einteilung des Attachmentverlusts in leicht, mittelschwer und schwer entspricht der einer chronischen Parodontitis. Auffällig ist die familiäre Häufung bei der aggressiven Parodontitis. Generell können sowohl die chronische als auch die aggressive Parodontitis in jeder Altersklasse auftreten, wobei die chronische Form hauptsächlich bei Erwachsenen und die aggressive Form vorwiegend bei Patienten unter 35 Jahren diagnostiziert wird (Wiebe & Putnins, 2000).

1.3 Parodontalpathogene Bakterien

Die parodontalpathogenen Bakterien werden häufig in die Bakterienkomplexe nach Socransky eingeteilt (Socransky et al., 1998).

Das gemeinsame Vorkommen der Bakterien im jeweiligen Komplex und deren Interaktion sind maßgeblich bedeutend für den Verlauf der Parodontitis. Das heisst, dass die Anwesenheit einzelner Keime in parodontalem Gewebe harmlos sein kann und erst deren Synergismus zu einer behandlungsbedürftigen Situation führt (Marsh, 1994). Im Verlauf der Parodontitis geht man von einer schrittweisen Besiedelung des Sulkus aus. So bilden die gering pathogenen Bakterien des violetten und des orangen Komplexes (*V.parvula*, *A. odontolyticus*, *C. rectus*, *E.nodatum*, *C.showae*, *C. gracilis*, *S.constellatus*) als Frühkolonisierer eine primäre Biofilmschicht. Dadurch haben Bakterienspezies mit höherer Pathogenität die Möglichkeit, den Sulkus zu besiedeln (Socransky et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden Bakterien der Spezies *A. actinomycetem-comitans*, sowie die Bakterien des roten Komplexes (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*) und drei Bakterien des orangen Komplexes (*P.*

intermedia, *P. micros*, *F. nucleatum*) bestimmt.

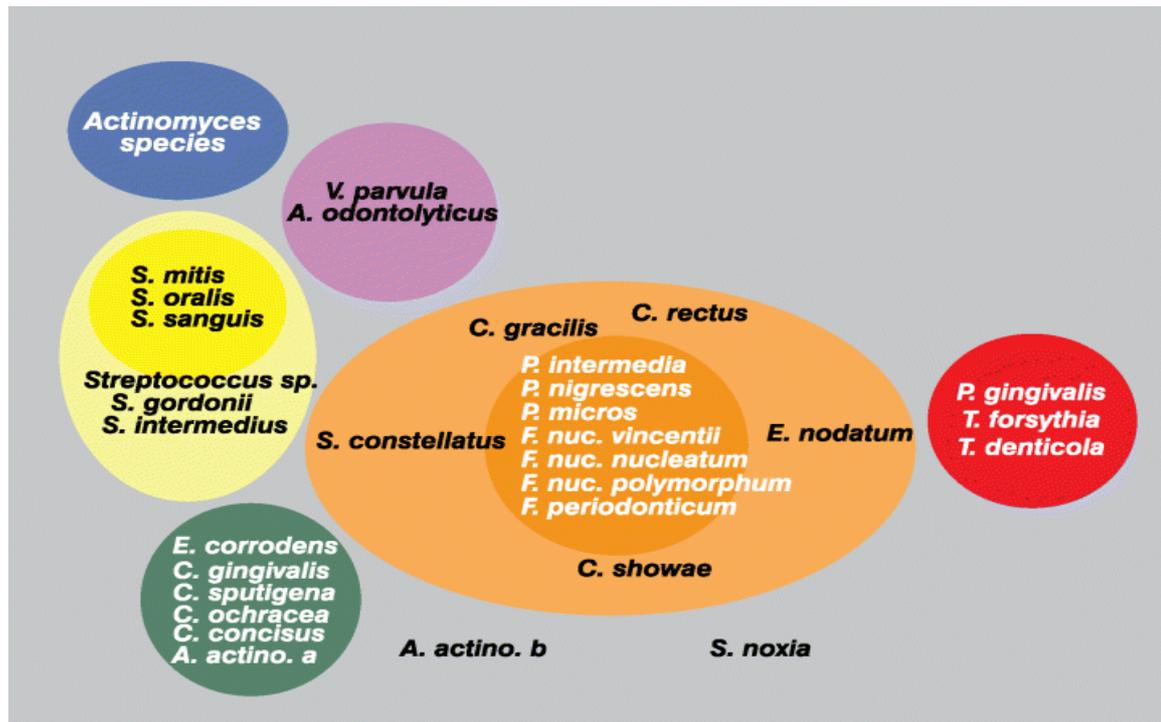


Abb.2 Bakterienkomplexe nach Socransky (Abb. aus Socransky et al., 1998), Unterteilung basiert auf dem gemeinsamen Vorkommen bestimmter Bakterien und deren Interaktion

1.3.1 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A. actinomycetemcomitans (früher *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) ist ein unbewegliches, fakultativ anaerobes und gramnegatives Stäbchen, das häufig bei aggressiver Parodontitis und in manchen Fällen der schweren chronischen Parodontitis beteiligt ist (He et al., 1998).

Das Bakterium wird in mindestens fünf Serotypen (a,b,c,d und e) unterteilt, deren Serogruppenspezifität durch die Struktur der Lipopolysaccharide differenziert wird (Kaplan et al., 2001). Das Vorkommen von Serotyp b ist vor allem mit aggressiver Parodontitis assoziiert, während es keinen offensichtlichen Unterschied in der Verteilung der Serotypen a, b und c bei Patienten mit chronischer Parodontitis gibt. Die Serotypen d und e werden selten bei chronischer Parodontitis detektiert und werden bei aggressiver Parodontitis nicht nachgewiesen (Yang et al., 2004; Yang et al., 2005).

A. actinomycetemcomitans produziert eine Reihe von Virulenzfaktoren, u.a.

Leukotoxin, Cytolethal Distending Toxin, Chaperone und LPS. Chaperone und LPS können Entzündungsreaktionen hervorrufen, die zum Abbau von Alveolarknochen führen (Holt & Ebersole, 2005; Rogers et al., 2007). LPS führt zu einer vermehrten Expression von PGE2 durch Osteoblasten (Rogers et al., 2007). Leukotoxin zerstört Leukozyten durch Porenbildung und setzt somit die Funktion des Immunsystems herab. Das Bakterium kann in gingivales Bindegewebe eindringen, weshalb es durch die herkömmliche, rein mechanische Parodontaltherapie schwer zu eliminieren ist (He et al., 1998). Cytolethal Distending Toxin kann durch seine DNase-Aktivität Lymphozyten deaktivieren, indem es die Zellteilung in der G2-Phase der Mitose stoppt und somit die Immunreaktion stören (De Rycke & Oswald, 2001; Tan et al., 2002). Zu den Virulenzfaktoren zählen auch Fimbrien, welche die Adhärenz des Bakteriums an Strukturen der Mundhöhle verbessern (Fives-Taylor et al., 1999).

1.3.2 Roter Komplex

Die Bakterien des roten Komplexes sind stark pathogen und von großer Bedeutung für das Voranschreiten der Parodontitis. Der Nachweis dieser Bakterien ist häufig mit klinischen Parametern wie erhöhter Taschen-sondierungstiefe, Attachmentverlust und Blutung auf Sondierung assoziiert (Holt & Ebersole, 2005). Ihr Vorkommen in subgingivaler Plaque ist bei Patienten, die von Parodontitis betroffen sind, im Gegensatz zu gesunden Patienten stark erhöht (Mineoka et al., 2008).

1.3.2.1 Porphyromonas gingivalis

P. gingivalis (*Bacteroides gingivalis*) ist ein gramnegatives, obligat anaerobes und schwarzpigmentiertes Stäbchen und einer der Hauptverursacher von chronischer Parodontitis. Das Bakterium wird nur selten bei Patienten mit gesunden parodontalen Verhältnissen nachgewiesen (Griffen et al., 1998; Haffajee et al., 1998; van Winkelhoff et al., 2002).

Seine Adhärenz an die Mundschleimhaut wird durch Fimbrien, Proteasen, Hämagglutinine und Lipopolysaccharide vermittelt (Holt & Ebersole, 2005).

P. gingivalis stimuliert Leukozyten zur Ausschüttung von Zytokinen und Prostaglandinen, vor allem von PGE₂. Die Entzündungsprozesse führen zur Zerstörung des Parodontalgewebes, was das Voranschreiten der marginalen Parodontitis begünstigt. *P. gingivalis* produziert eine Reihe von Virulenzfaktoren (Bodet et al., 2006b). Proteinasen von *P. gingivalis* veranlassen die Keratinozyten und Fibroblasten der Mukosa zur Expression von Matrixmetalloproteinasen (Birkedal-Hansen, 1993). Proteinasen bauen Kollagen Typ I und IV ab (Holt & Ebersole, 2005). Das Lipopolysaccharid von *P. gingivalis* induziert die Interleukin-1-Produktion in Makrophagen und peripheren Monozyten. Interleukin-1 ist bei parodontalen Erkrankungen in der Sulkusflüssigkeit signifikant erhöht und spielt eine Rolle bei Abbauprozessen des Alveolarknochens. *P. gingivalis* weist eine höhere Resistenz gegenüber der Phagozytose auf als die anderen, weniger pathogenen und schwarzpigmentierten Bacteroides-Arten (van Winkelhoff et al., 1988).

Gingipaine machen 85% der proteolytischen Aktivität des Bakteriums aus. Gingipaine sind spezifische Cystein-Proteasen, unterteilt in arginin- und lysin-spezifische Proteasen (Potempa et al., 1997). Sie beeinflussen die Bindung an andere Bakterien positiv und tragen zur Virulenz von *P. gingivalis* bei, indem sie den Abbau extrazellulärer Matrixproteine induzieren und Matrixmetalloproteinasen aktivieren (Sheets et al., 2006).

Durch die argininspezifische Protease wird die Gefäßpermeabilität erhöht, wodurch eine erhöhte Sulkusflüssigkeitsfließrate resultiert (Imamura et al., 1994). Durch seine fibrinolytische Aktivität ist *P. gingivalis* in der Lage, in Endothelzellen einzudringen (Deshpande et al., 1998; van Winkelhoff et al., 1988). Die Fähigkeit, intrazellulär zu persistieren und sich dort zu vermehren, ist charakteristisch für das Bakterium (Lamont et al., 1995; Sandros et al., 1993). *P. gingivalis* kann in die Blutbahn gelangen und dort durch Trypsin-ähnliche Enzyme die Kollagenasen aktivieren (Bodet et al., 2006b).

Auch das Komplementsystem wird aktiviert, wodurch die Prostaglandin-vermittelte Resorption des Alveolarknochens stimuliert wird (van Winkelhoff et al., 1988).

1.3.2.2 *Treponema denticola*

T. denticola gehört zu den obligat anaeroben, gramnegativen Bakterien und macht einen Anteil von etwa 50% der Gesamtbakterien in parodontalen Läsionen aus. Das Bakterium interagiert mit anderen parodontalpathogenen Bakterien, vor allem mit *P. gingivalis* und *F. nucleatum* (Holt & Ebersole, 2005). *T. denticola* zeigt ein ausgeprägtes Adhärenzverhalten zu Epithelzellen und Fibroblasten, zu Kollagen, Hyaluronsäure, Hydroxylapatit, Glykosaminoglykanen und zu Fibronectin (Ellen & Galimanas, 2005; Holt & Ebersole, 2005; M. Li et al., 1999; O'Brien-Simpson et al., 2004; Umemoto et al., 1997; Weinberg & Holt, 1990).

Seine Fähigkeit, tief in das Parodontalgewebe einzudringen, ist auf das Vorhandensein proteolytischer Enzyme, zytolytischer Faktoren und die hohe Beweglichkeit des Keimes zurückzuführen. Peptidasen, die u.a. an der äußeren Membran gebunden sind, zeigen hämolytische und hämagglutinierende Aktivitäten. Dazu gehören Adhäsine, die an Matrixproteine und Zellen binden und ein Protein der äußeren Membran, das porenbildende Eigenschaften aufweist (Sela, 2001). Die Penetration tiefergelegener Gewebeschichten geht mit der Zerstörung von *tight junctions* der Epithelzellschicht einher, wodurch das Fortschreiten der Parodontitis begünstigt wird (Chi et al., 2003).

T. denticola ist in der Lage, Protease-Inhibitoren zu deaktivieren. Protease-Inhibitoren sind involviert in die Regulation verschiedener proteolytischer Kaskaden wie das Komplementsystem, das Kallikrein-Kinin-System und das Gerinnungssystem, sowie in den Ablauf von Entzündungsreaktionen. Dafür verantwortlich ist eine Chymotrypsin-ähnliche Protease, welche α -1-Antitrypsin, Antichymotrypsin, Antithrombin III und Antiplasmin abbaut (Grenier, 1996).

Chymotrypsin-ähnliche Proteasen bauen außerdem Komponenten der Basalmembran wie Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin ab und spielen eine erhebliche Rolle bei der Invasion und Destruktion der Basalmembran (Grenier et al., 1990).

1.3.2.3 *Tannerella forsythia*

T. forsythia (früher *Bacteroides forsythus*) ist ein gramnegatives, obligat anaerobes fusiformes Bakterium. Das Vorkommen von *T. forsythia* ist an Stellen mit Blutung auf Sondierung im Gegensatz zu blutungsfreien Stellen deutlich erhöht, was für eine aktive parodontale Läsion spricht. Bei chronischer Parodontitis wird das Bakterium häufig gemeinsam mit *P. gingivalis* nachgewiesen. Ebenso wird *T. forsythia* mit dem Vorkommen der schweren Parodontitis assoziiert (Holt & Ebersole, 2005).

Zu den Virulenzfaktoren von *T. forsythia* zählt u.a. leucinreiches BspA-Protein (Bacteroides surface protein A). BspA spielt eine Rolle bei der Koaggregation mit anderen Bakterien, vor allem mit *F. nucleatum* und induziert die Produktion proinflammatorischer Zytokine in Monozyten (Inagaki et al., 2005; Yoo et al., 2007). BspA führt letztendlich zum Abbau des Alveolarknochens (Myneni et al., 2011). Es vermittelt eine Bindung an Fibronectin und andere Komponenten der extrazellulären Matrix ebenso wie die Anheftung und Invasion in Epithelzellen.

Der S-Layer auf der Zellwand dient als Schutz vor Phagozytose (Yoo et al., 2007). Außerdem fördert diese Schicht die Anheftung und Invasion des Bakteriums an Epithelzellen. Die S-Layer Glykane dienen als Liganden für Lektin-ähnliche Rezeptoren, die sich auf *F. nucleatum* befinden (Murray et al., 1988). Dadurch wird die Entstehung eines Biofilms, gebildet durch *F. nucleatum* und *T. forsythia*, gefördert, was zum Anstieg des Schweregrads der Parodontitis führen kann (Sharma et al., 2005). Proteasen tragen auf verschiedene Weise zur Virulenz von *T. forsythia* bei. Sie führen zum Abbau parodontalen Gewebes und verändern Wirtszellproteine durch die Exposition von Kryptotopen, um bakterielles Wachstum zu ermöglichen. Durch Spaltung von Komponenten, die bei der angeborenen (Zytokine, Chemokine, Komplementfaktoren) und erworbenen (Immunglobuline) Immunabwehr von Bedeutung sind, verlangsamen sie die Immunabwehr. Außerdem aktivieren sie Komponenten, die bei der Blutgerinnung und Fibrinolyse beteiligt sind (Holt & Bramanti, 1991; Sharma, 2010).

Die NanH-Sialidase ist die Sialidase, die am meisten durch das Bakterium exprimiert wird. Die Sialinsäure, die durch die NanH-Sialidase vom

Glykoprotein abgespaltet wird, dient als Wachstumsfaktor für die Entstehung von Biofilm (Honma et al., 2011).

1.3.3 Oranger Komplex

Die Keime des orangen Komplexes sind moderat bis stark pathogen und dienen als Brückenkeime zwischen den Frühkolonisierern und den stark pathogenen Keimen des roten Komplexes. Durch ihren Stoffwechsel schaffen sie für die rein anaeroben Keime des roten Komplexes ein günstiges Wachstumsmileu im Sulkus (Kolenbrander et al., 2006).

1.3.3.1 *Prevotella intermedia*

P. intermedia (früher *Bacteroides intermedius*) gehört zu den gramnegativen, schwarzpigmentierten Stäbchen, es ist ein obligat anaerobes Bakterium. *P. intermedia* wird sowohl bei parodontal gesunden, als auch bei parodontal erkrankten Personen detektiert. Das Bakterium wird oft bei periapikalen Abszessen, Schwangerschaftsgingivitis und bei akuter nekrotisierender ulzeröser Gingivitis (NUG) nachgewiesen (Maeda et al., 1998).

P. intermedia verstoffwechselt Zucker aerob, wodurch der Sauerstoffgehalt in seiner Umgebung so reduziert wird, dass sich dort weitere anaerobe Keime des roten Komplexes ansiedeln können (Kolenbrander et al., 2006).

Bestimmte Komponenten an der Zelloberfläche von *P. intermedia* sind für die Anheftung an Epithelzellen verantwortlich. Dazu zählen Fibrillen, Pili, Kapseln, Vesikel und Lipopolysaccharide. Zu den weiteren Virulenzfaktoren des Bakteriums zählen Proteasen, Kollagenasen und Phospholipase A. Phospholipase A spielt eine Rolle bei der Synthese von Prostaglandinen, die ihrerseits an Knochenresorptionsvorgängen beteiligt sind. Saure und alkalische Phosphatasen können Knochendestruktionen induzieren besonders dann, wenn die bakterielle Invasion bereits bis zur Oberfläche des Alveolarknochens fortgeschritten ist (Slots & Genco, 1984).

P. intermedia stimuliert sowohl die Expression von PGE2, als auch von MMP-8 und verursacht die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine in parodontalen Ligamentzellen (Guan et al., 2011; Guan et al., 2009).

1.3.3.2 *Parvimonas micra*

P. micra (früher *Peptostreptococcus micros* oder *Micromonas micra*) ist ein grampositives, anaerobes kokkoides Bakterium. Das Bakterium wird vor allem bei chronischer Parodontitis nachgewiesen (Rams et al., 1992).

Es gibt verschiedene morphologische Typen: den *rough type*, den *smooth type* und die milde Variante des *rough types*. Während die Bakterien des *rough types* an ihrer Oberfläche fibrilläre Strukturen besitzen, fehlen diese bei den anderen beiden Typen. In der Koaggregation mit anderen Bakterien zeigt sich kein Vorteil des *rough types* gegenüber dem *smooth type*. *P. micra* zeigt ein Koaggregationsverhalten mit *F. nucleatum* und der unbekapselten Form von *P. gingivalis* (Kremer & van Steenberg, 2000).

P. micra besitzt die Fähigkeit, an gingivale Epithelzellen anzuheften. Die Expression von IgG Fc-bindenden Proteinen ist ein weiterer Virulenzfaktor. Diese Proteine ermöglichen eine nichtimmunologische Bindung an IgG (Kremer et al., 2000). Dadurch wird die Opsonisierung und Phagozytose von *P. micra* verringert (Grenier & Michaud, 1994).

Auch die Synthese von Hyaluronidase trägt zur Pathogenität des Bakteriums bei. Hyaluronidase baut Hyaluronsäure, einen wichtigen Bestandteil der extrazellulären Matrix im Bindegewebe ab und ermöglicht dem Bakterium so eine schnellere Ausbreitung im Gewebe (Tam & Chan, 1985).

Yoshioka et al. (2005) berichten in ihrer Studie von einer Bindung zwischen dem Lipopolysaccharid von *A. actinomycetemcomitans* und *P. micra*, wodurch die Zytokinproduktion der Wirtszellen gesteigert wird. Diese Interaktion trägt vermutlich positiv zum Entstehen einer Entzündungsreaktion bei Parodontitis bei.

1.3.3.3 *Fusobacterium nucleatum*

F. nucleatum ist ein gramnegatives, anaerobes und unbewegliches Bakterium. Das Bakterium ist sowohl bei parodontalen als auch bei extraoralen Infektionen beteiligt, wobei es hauptsächlich die Mundhöhle besiedelt (Han et al., 2005). Es kann sich bei bis zu 6% Sauerstoffgehalt im umgebenden Milieu vermehren (Bolstad et al., 1996).

F. nucleatum besitzt die Fähigkeit, an Epithelzellen zu binden und sich an die wechselnden pH-Bedingungen in der Sulkusflüssigkeit anzupassen. Mit Hilfe seiner Stoffwechsellleistungen kann *F. nucleatum* das saure Milieu der Sulkusflüssigkeit, das in der frühen Phase der Parodontitis vorherrscht, neutralisieren. Dadurch können sich auch säureempfindliche Bakterien wie z.B. *P. gingivalis* in parodontalen Taschen ansiedeln (Zilm et al., 2007).

Das Bakterium kann in Epithel- und Endothelzellen eindringen, wodurch es in tiefergelegene Gewebekompartimente gelangen kann. *F. nucleatum* stimuliert die Expression des Mediators Interleukin-8 in Epithelzellen (Han et al., 2005). Diese Expression wird durch Kontakt des Bakteriums mit der Schleimhautoberfläche ausgelöst, wodurch neutrophile Granulozyten angelockt und aktiviert werden (Han et al., 2000). Das Bakterium verursacht die Apoptose von Leukozyten und kann die T-Zell-vermittelte Immunantwort unterdrücken. *Fusobacterium Adhäsion A (FadA)* befindet sich auf der Oberflächenmembran von *F. nucleatum*. Es beeinflusst die Bindung an Epithelzellen (Han et al., 2005). *F. nucleatum* ist in der Lage Koaggregationsbrücken zu bilden. Dadurch können sich andere Bakterien anheften, womit es als Brücke zwischen früh und spät ansiedelnden Bakterien dient (Kolenbrander et al., 2006).

Zu seinen Virulenzfaktoren zählen Lipopolysaccharide und so genannte OMPs. OMPs sind Proteine der äußeren Membran, die an der Koaggregation mit anderen Bakterien beteiligt sind. Die von dem Bakterium produzierten Metabolite Butyrat, Ammoniak und Propionat hemmen die Proliferation von Gingivofibroblasten (Bolstad et al., 1996).

Ebenso spielt eine 65 kDa Protease, die sowohl Fibrinogen und Fibronectin als auch Kollagen Typ I und Kollagen Typ IV abbauen kann, eine Rolle bei der Zerstörung parodontalen Gewebes (Bachrach et al., 2004).

1.4 Entzündungsfaktoren

1.4.1 MMP-8

Matrixmetalloproteinasen (MMP) sind zinkabhängige Endopeptidasen mit hoher proteolytischer Aktivität. Bestandteile der extrazellulären Matrix (Elastin, Kollagen, Proteoglykane, Fibronectin etc.) können durch MMPs abgebaut werden. Wenn gesunde parodontale Verhältnissen vorliegen, besteht ein Gleichgewicht von aktiven abbauenden MMPs und deren Inhibitoren (*tissue inhibitor of matrixmetalloproteinase* = TIMPs). Dieses Gleichgewicht ist bei einer Parodontitis zugunsten der aktiven MMPs gestört (Sorsa et al., 2004). Die Ausschüttung von MMPs durch mononukleäre Zellen wird durch Lipopolysaccharide und die proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 β und TNF- α stimuliert (Y. Li et al., 2010).

Besondere Bedeutung im Zusammenhang mit der marginalen Parodontitis kommt der MMP-8, einer neutrophilen Kollagenase zu. MMP-8 ist ursächlich bei degenerativen Prozessen der extrazellulären Matrix beteiligt (Buduneli et al., 2007). MMP-8 spaltet vor allem Kollagen-Typ 1, den Hauptvertreter des Kollagens in parodontalem Gewebe (Izakovicova Holla et al., 2012). Außerdem ist sie zur Destruktion von Alveolarknochen fähig (Uitto et al., 2003). Die Stärke der in Sulkusflüssigkeit nachgewiesenen MMP-8-Konzentration korreliert mit dem Schweregrad der Parodontitis (Izakovicova Holla et al., 2012). Ramseier et al. (2009) haben die Zunahme der MMP-8-Konzentration in ihrer Studie beim Vergleich zwischen gesunden Probanden, Probanden mit einer Gingivitis und von Probanden mit milder chronischer Parodontitis und schwerer chronischer Parodontitis dargestellt. Dabei nahm der Median vom Stadium gesund bis zum Stadium der schweren chronischen Parodontitis deutlich zu (Ramseier et al., 2009). Bei der Therapie der Parodontitis durch Scaling geht die Konzentration von MMP-8 in Sulkusflüssigkeit signifikant zurück (Sorsa et al., 2010).

Die Expression von MMP-8 infolge entzündlicher Reize erfolgt durch neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Epithelzellen, Endothelzellen und Plasmazellen (Hardy et al., 2012). Es ist bekannt, dass die parodontalpathogenen Bakterien *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans*, *P.*

gingivalis und *F. nucleatum* die Produktion, Freisetzung und Aktivierung von MMP-8 in neutrophilen Granulozyten induzieren (Claesson et al., 2002; Shin et al., 2008; Sorsa et al., 1992). Als einer der stimulierenden Faktoren für die Ausschüttung von MMP-8, ist das Leukotoxin von *A. actinomycetemcomitans* zu nennen. Es veranlasst neutrophile Granulozyten zur Freisetzung von MMP-8 (Claesson et al., 2002). Guan et al. (2009) haben einen positiven Effekt von *P. intermedia* auf die Expression von MMP-8 aus parodontalen Ligamentzellen festgestellt. Das kann zur Zerstörung parodontalen Gewebes beitragen, da MMP-8 nicht nur verschiedene Formen von Kollagen, sondern auch nichtkollagene Komponenten wie Laminin, Fibrinogen, Fibronectin und Proteoglykane spalten kann. Bei Entzündungen des Parodonts kann MMP-8 außerdem durch andere Entzündungsmediatoren wie zum Beispiel MMP-14, reaktive Sauerstoffspezies und mikrobielle Proteasen aktiviert werden (Hernandez et al., 2010).

Im Zusammenhang mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis spielt MMP-8 eine große Rolle. Costa et al. (2008) belegen in einer Studie, dass die Konzentration von MMP-8 im Speichel bei Parodontitispatienten mit oder ohne zusätzlicher Erkrankung an Diabetes mellitus Typ 2, sowie bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (ohne zusätzliche Parodontitis) im Gegensatz zur MMP-8-Konzentration der Kontrollgruppe (< 100 ng/ml) auf über 300 ng/ml erhöht ist. Das zeigt eine Erhöhung der MMP-8-Konzentration im Speichel von Diabetikern unabhängig von Entzündungen des Parodonts. Die unter anderem im Speichel enthaltene MMP-8 wird als Marker für die Intensität der Entzündung bei Parodontitis diskutiert und kann mittlerweile durch chairside-Schnelltests zur Früherkennung der Parodontitis eingesetzt werden (Sorsa et al., 2004). Ramseier et al. beobachteten in ihrer Studie den Zusammenhang von Biomarkern im Speichel und bakterieller DNA im Biofilm. Dabei fanden sie heraus, dass die Kombination von MMP-8 mit einem der Bakterien des roten Komplexes (*T. denticola*, *P. gingivalis* oder *T. forsythia*) am genauesten zur Identifizierung des Schweregrads der Parodontitis beiträgt. Dieses Erkenntnis ermöglicht eine Point-of-Care (POC) Diagnostik, um Risikopatienten im Vergleich zu den umfangreichen klinischen Untersuchungen zukünftig schneller identifizieren zu können (Ramseier et al., 2009).

1.4.2 PGE2

Prostaglandine sind Gewebshormone aus der Gruppe der Eikosanoide. Sie leiten sich von der Arachidonsäure ab, welche sich in der Phospholipid-Plasmamembran aller menschlicher Zellen befindet. Sie wird durch Phospholipase A2 aus dieser Membran herausgelöst und durch Enzyme weiterverarbeitet. Durch die Wirkung von Lipoxygenasen entstehen Leukotriene und durch die Wirkung der Prostaglandinsynthasen Cyclooxygenase 1 und 2 (COX1 und COX2) entstehen Prostaglandine, Prosta-zykline und Thromboxane (Offenbacher et al., 1993).

PGE2 ist ein wichtiger Entzündungsfaktor, der bei Patienten mit aktiver Parodontitis nachweislich in der Sulkusflüssigkeit erhöht ist (Offenbacher et al., 1993; Offenbacher et al., 1986). PGE2 hat einen positiven Effekt auf die Freisetzung von MMPs durch Fibroblasten und Osteoklasten (Offenbacher et al., 1993). In entzündetem Parodontalgewebe ist PGE2 in 10-fach höherer Menge nachweisbar, als in entzündungsfreiem Gewebe (Offenbacher et al., 1981). In einer Studie wurde belegt, dass sich 4 Wochen nach Einstellen der oralen Mundhygiene die Konzentration von PGE2 in Sulkusflüssigkeit verdoppelt (Heasman et al., 1993). PGE2 wird hauptsächlich von Osteoblasten produziert (Inada et al., 2006). Lipopolysaccharide, die in der äußeren Membran parodontalpathogener Bakterien enthalten sind, stimulieren die Produktion von Interleukin 1 α und 1 β im Parodontium. Beide Interleukine induzieren die Biosynthese von PGE2 vermutlich durch Zuführen des Isoenzym *Prostaglandin Synthase Typ 2 (PGHS2)*, auch COX-2 genannt (Herschman, 1994). Osteoblasten exprimieren RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand). Osteoklasten besitzen RANK (Receptor activator of nuclear factor kappa-B), einen Rezeptor für RANKL. Die Wiedererkennung zwischen RANKL und RANK induziert die Differenzierung von Osteoklasten-Progenitorzellen zu reifen Osteoklasten. Diese Differenzierung wird durch PGE2 gefördert. PGE2 bindet an EP4-Rezeptoren in Osteoblasten und induziert die Expression von RANKL an deren Oberfläche. Somit ist PGE2 für Knochenabbauvorgänge bei entzündlichen Prozessen verantwortlich (Inada et al., 2006). Auch in Bezug auf Diabetes mellitus lässt sich ein Zusammenhang mit PGE2 erkennen. Die PGE2-Konzentration in

Sulkusflüssigkeit ist bei Parodontitispatienten mit Diabetes im Vergleich zu nicht an Diabetes erkrankten Parodontitispatienten signifikant erhöht (Salvi et al., 1998).

2 Ziel der Arbeit

In dieser Studie soll analysiert werden, ob MMP-8 und PGE2 den Schweregrad der Erkrankung an einer Parodontitis anzeigen können und ob Verbindungen mit weiteren Einflussfaktoren insbesondere den Risikofaktoren der marginalen Parodontitis bestehen. Es soll der Einfluss verschiedener Merkmale wie Alter, Geschlecht, ethnische Abstammung, Knochenverlust, vorhandene Zahnanzahl und die Relevanz des Risikofaktors Rauchen auf die Expression der Entzündungsfaktoren PGE2 und MMP-8 in Sulkusflüssigkeit von Patienten mit marginaler Parodontitis im leichten bis mittelschweren und im schweren Parodontitisstadium untersucht werden.

Des Weiteren soll analysiert werden, ob das Vorkommen der parodontalpathogenen Bakterien *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *T. forsythia*, *P. micra*, *T. denticola* und *P. intermedia* mit der Expression der beiden Entzündungsfaktoren assoziiert ist.

3 Material und Methoden

3.1 Erfassung patientenbezogener Daten

3.1.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv stammte aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München. Es wurden insgesamt 162 Patienten in die Studie aufgenommen.

Die klinische Untersuchung erfolgte durch Messung der Taschensondierungstiefen an 6 Punkten pro Zahn (mesiobukkal, mediobukkal, distobukkal, mesiooral, mediooral, distooral) mittels einer Parodontalsonde PCP 10 (Hu-Friedy, Frankfurt am Main, Deutschland), wobei die Provokation einer Blutung auf Sondierung (BOP = bleeding on probing) notiert wurde. Der Furkationsbefall wurde mit einer Narbers-Sonde Typ PQ2N (Hu-Friedy, Frankfurt am Main, Deutschland) gemessen und nach *Nyman und Lindhe* klassifiziert:

Grad I: horizontaler Attachmentverlust bis 3 mm

Grad II: horizontaler Attachmentverlust über 3 mm, nicht durchgängig

Grad III: Furkation durchgängig sondierbar

Die Zahnmobilität wurde manuell bestimmt. Durch Anlegen eines Fingers an die oralen Zahnflächen und Gegendruck mit einem Instrument (z.B. Griff eines Mundspiegels) von vestibulär konnte die Lockerung der jeweiligen Zähne geprüft werden. Die Einteilung erfolgte entsprechend der Klassifizierung nach *Lindhe*:

Grad 0: physiologische, nicht erhöhte Zahnbeweglichkeit

Grad I: fühlbar erhöhte Zahnbeweglichkeit (bis 1mm horizontal)

Grad II: sichtbar erhöhte Zahnbeweglichkeit (bis 2mm horizontal)

Grad III: Beweglichkeit auf Lippen- und Zungendruck und in axialer Richtung (mehr als 2mm horizontal)

Die Aufnahme in die Studie erfolgte nach Diagnose einer marginalen Parodontitis durch die klinische Untersuchung und wurde nach Befundung der

Panoramaschichtaufnahmen (Punkt 3.1.2) in verschiedene Parodontitisstadien eingeteilt:

- als schweres Parodontitisstadium galt ein Attachmentverlust von > 50% an mindestens 7 Zähnen
- als leichtes bis mittelschweres Parodontitisstadium war dementsprechend ein Attachmentverlust von weniger als 50% unabhängig von der Anzahl betroffener Zähne oder ein Befall von weniger als 7 Zähnen mit > 50% Attachmentverlust definiert

Es wurde zwischen Rauchern und Nichtrauchern unterschieden. Als Raucher galten alle Patienten, die aktuell rauchten, unabhängig von der Stückzahl der Zigaretten. Dementsprechend galten die Patienten als Nichtraucher, die aktuell nicht rauchten, auch wenn das Rauchen erst kurz zuvor aufgegeben wurde.

Zu den Ausschlusskriterien zählten infektiöse Erkrankungen wie HIV oder Hepatitis C sowie ein bestehendes Endokarditisrisiko.

Die Parameter wurden durch sehr viele verschiedene Behandler im Studentenkurs erhoben.

Alle Teilnehmer wurden über Ziel, Art und Inhalt der Studie aufgeklärt. Von jedem der Teilnehmer wurde eine Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie unterschrieben. Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der LMU begutachtet (Nr.025-11).

3.1.2 Röntgenprogramm

Entsprechend der aus dem klinischen Befund resultierenden Indikation wurde für jeden Patienten zusätzlich zur klinischen Untersuchung auch eine radiologische Untersuchung mit Hilfe einer Panoramaschichtaufnahme durchgeführt. Diese Aufnahme wurde für alle Patienten mit dem Gerät Orthophos XG Plus (Sirona, Bensheim, Deutschland) angefertigt. Die Darstellung der Röntgenaufnahme erfolgte an nach der Röntgenverordnung für die Befundung zuge-

lassenen Bildschirmen mit Hilfe des Programmes Sidexis (Sirona, Bensheim, Deutschland). Die Panoramaschichtaufnahmen dienten der Diagnostik des Attachmentverlustes, welcher als Abstand zwischen der Schmelz-Zement-Grenze (Referenzlinie: 1 mm apikal) und dem radiologischen Apex (100% der Wurzellänge) gemessen wurde. Die Dokumentation erfolgte in Abstufung von 10% Schritten. In die Auswertung der Daten wurden die Zähne mit dem stärksten Attachmentverlust einbezogen.

3.2 Probenentnahme am Patienten

Für den Nachweis von bakterieller DNA wurden Proben der Sulkusflüssigkeit von den Patienten entnommen. Die Probenentnahme erfolgte mittels steriler Entnahmestreifen (dentognostics GmbH, Deutschland), die pro Quadrant an der jeweils tiefsten gemessenen Tasche 1 bis 2 mm in den Sulkus eingeführt wurden. Die GCF-/PISF-Entnahmestreifen wurden für 30 Sekunden im Sulkus belassen und danach in Kryoröhrchen (Greiner Bio One, Deutschland) aufbewahrt. Vor der Entnahme erfolgte eine relative Trockenlegung der betroffenen Zähne, um die Kontaminationen mit Speichel oder Blut zu vermeiden.

Die Entnahme zum Nachweis der parodontalpathogenen Bakterien *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *T. forsythia*, *P. micra*, *T. denticola* und *P. intermedia* wurde mittels steriler Papierspitzen (Absorbent Paper Points, VDW GmbH, Deutschland) an der gleichen Stelle wie die Entnahme der Sulkusflüssigkeit durchgeführt. Die Absorbent Paper Points wurden für 10 Sekunden bis auf den Taschenfundus eingeführt und danach ebenfalls in Kryoröhrchen (Greiner Bio One, Deutschland) aufbewahrt.

Die Proben wurden in Kühlboxen transportiert und anschliessend bei -20° C bis zur Auswertung gelagert.

3.3 Nachweis von MMP-8 mittels dentoELISA aMMP-8 kit

Zum quantitativen Nachweis der aktiven Matrix-Metalloproteinase-8 in Sulkusflüssigkeit wurde das Enzymimmunoassay dentoELISA aMMP-8 (dentognostics GmbH, Deutschland) verwendet.

In das Kryoröhrchen mit den GCF-/PISF-Entnahmestreifen wurden jeweils 600 µl Probenpuffer DIL (Phosphatpuffer, dentognostics GmbH, Deutschland) pipettiert, so dass die GCF-/PISF-Streifen vollständig bedeckt waren. Danach wurde das Gefäß 5 mal geschwenkt und nach 5 Minuten Pause erneut 5 mal geschwenkt. Die GCF-/PISF-Eluate wurden im Verhältnis 1:400 verdünnt: für jede Probe wurden 997,5 µl DIL vorgelegt und 2,5 µl GCF-/PISF-Eluat dazu pipettiert und gemischt.

Zur Untersuchung wurden mit hochspezifischen monoklonalen Antikörpern (enthalten Latexpartikel) beschichtete 96-well Mikrotiterplatten (Antikörper AK 8708, dentognostics GmbH, Deutschland) verwendet. Diese Antikörper sind spezifisch gegen aktivierte Matrix-Metalloproteinase-8 gerichtet.

Die Versuchsproben wurden nach dem Schema in Abb.3 in die Mikrotiterplatten eingebracht.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL5	Pat.1	Pat.5	Pat.9	Pat.13	Pat.17	Pat.21	Pat.25	Pat.29	Pat.33	Pat.37	Pat.41
B	CAL4	Pat.1	Pat.5	Pat.9	Pat.13	Pat.17	Pat.21	Pat.25	Pat.29	Pat.33	Pat.37	Pat.41
C	CAL3	Pat.2	Pat.6	Pat.10	Pat.14	Pat.18	Pat.22	Pat.26	Pat.30	Pat.34	Pat.38	Pat.42
D	CAL2	Pat.2	Pat.6	Pat.10	Pat.14	Pat.18	Pat.22	Pat.26	Pat.30	Pat.34	Pat.38	Pat.42
E	CAL1	Pat.3	Pat.7	Pat.11	Pat.15	Pat.19	Pat.23	Pat.27	Pat.31	Pat.35	Pat.39	Pat.43
F	DIL	Pat.3	Pat.7	Pat.11	Pat.15	Pat.19	Pat.23	Pat.27	Pat.31	Pat.35	Pat.39	Pat.43
G	Ctrl.	Pat.4	Pat.8	Pat.12	Pat.16	Pat.20	Pat.24	Pat.28	Pat.32	Pat.36	Pat.40	Pat.44
H	Ctrl.	Pat.4	Pat.8	Pat.12	Pat.16	Pat.20	Pat.24	Pat.28	Pat.32	Pat.36	Pat.40	Pat.44

Abb.3 Verteilung des Probenmaterials in der Mikrotiterplatte für den MMP8-Nachweis:
 Cal1-5 (Kalibrator)= je 100 µl, DIL (MMP-8 Probenpuffer)= 100µl, Ctrl. (Positiv-Kontrolle)= je 100µl, Pat.1-44= je 100 µl der verdünnten Proben in Dupletts pipettiert

Nach Zugabe der verdünnten Proben wurden durch die aktivierte Matrix-Metalloproteinase-8 Immunkomplexe mit den fixierten Antikörpern gebildet.

Nach dem Verschluss mit einer Abklebefolie wurde die Platte im Innovens

Oven Incubator (Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland) bei 37°C für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde jede Vertiefung mit Wash-Buffer (3x je 200 µl) (dentognostics GmbH, Deutschland) gewaschen, wodurch nicht gebundene Komponenten entfernt wurden.

Nachfolgend wurden je 100 µl eines Peroxidase-Enzymkonjugats (monoklonaler anti-aMMP-8 Antikörper AK 8706, gekoppelt mit Peroxidase) (dentognostics GmbH, Deutschland) in jede Vertiefung zugegeben und erneut bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Peroxidase-Enzymkonjugate verbinden sich während der Inkubation mit fixierten Immunkomplexen. Nicht gebundene Komponenten wurden durch das Waschen (3x 200 µl Wash-Buffer pro Vertiefung) entfernt.

Danach wurden 100 µl TMB Substrate (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid) zugegeben und die Platte mit einer Abklebefolie verschlossen. Bei der anschließenden Inkubation (bei Raumtemperatur für 15 Minuten und Schwenkung bei 500 rpm) wurde durch die Peroxidaseaktivität ein blauer Farbstoff erzeugt. Durch Zugabe von 100 µl Stop Solution (0,25 mol/l Schwefelsäure) (dentognostics GmbH, Deutschland) pro Vertiefung ändert sich die Farbe von blau nach gelb. Aus der Intensität der Farbe konnte auf die Konzentration der aMMP-8 in der Probe geschlossen werden. Die Messung wurde innerhalb von 30 Minuten nach Extinktion der Stop Solution im Mikrotiterplatten-Photometer Varioscan (Thermo Scientific, Deutschland) bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm durchgeführt.

3.4 Nachweis von PGE2 mittels PGE2 high sensitivity EIA kit

Zum quantitativen Nachweis von PGE2 wurde das PGE2 high sensitivity EIA kit (Enzo Life Sciences GmbH, Deutschland) verwendet. Es handelt sich hierbei um einen kompetitiven Enzym-Immunoassay. Der Nachweis basiert auf einem konkurrierenden Verhalten zwischen einer festen Menge an alkalische Phosphatase gekoppeltem PGE2 und der PGE2-Konzentration der Probe um einen monoklonalen Antikörper. Die Mikrotiterplatte (Enzo Life Sciences GmbH, Deutschland) ist mit den monoklonalen Anti-Maus-Antikörpern beschichtet.

Die GCF-/PISF-Eluate wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt. Für jede Probe wurden 225 µl Assay Buffer vorgelegt und 25 µl GCF-/PISF-Eluat dazu pipettiert und gemischt.

Zur Kalibrierung wurde eine PGE2-Standard-Verdünnungsreihe hergestellt (Standard 1-8):

- Standard 1= 980 µl Assay Buffer + 20 µl PGE2- Standard
- Standard 2= 500 µl Assay Buffer + 500 µl aus Standard 1
- Standard 3= 500 µl Assay Buffer + 500 µl aus Standard 2
- Standard 4= 500 µl Assay Buffer + 500 µl aus Standard 3
- Standard 5= 500 µl Assay Buffer + 500 µl aus Standard 4
- Standard 6= 500 µl Assay Buffer + 500 µl aus Standard 5
- Standard 7= 500 µl Assay Buffer + 500 µl aus Standard 6
- Standard 8= 500 µl Assay Buffer + 500 µl aus Standard 7

Die Konzentration von PGE2 von Standard 1 zu Standard 8 wurde dabei immer niedriger: 1000 pg/ml PGE2 (Standard 1), 500 pg/ml PGE2 (Standard 2), 250 pg/ml PGE2 (Standard 3), 125 pg/ml PGE2 (Standard 4), 62,5 pg/ml PGE2 (Standard 5), 31,25 pg/ml PGE2 (Standard 6), 15,63 pg/ml PGE2 (Standard 7), 7,81 pg/ml PGE2 (Standard 8).

Die Verteilung der Proben in die Mikrotiterplatten erfolgte nach einem festen Schema (Abb.4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	St.1	St.5	Pat.1	Pat.5	Pat.9	Pat.13	Pat.17	Pat.21	Pat.25	Pat.29	Pat.33
B	Blank	St.1	St.5	Pat.1	Pat.5	Pat.9	Pat.13	Pat.17	Pat.21	Pat.25	Pat.29	Pat.33
C	TA	St.2	St.6	Pat.2	Pat.6	Pat.10	Pat.14	Pat.18	Pat.22	Pat.26	Pat.30	Pat.34
D	TA	St.2	St.6	Pat.2	Pat.6	Pat.10	Pat.14	Pat.18	Pat.22	Pat.26	Pat.30	Pat.34
E	NSB	St.3	St.7	Pat.3	Pat.7	Pat.11	Pat.15	Pat.19	Pat.23	Pat.27	Pat.31	Pat.35
F	NSB	St.3	St.7	Pat.3	Pat.7	Pat.11	Pat.15	Pat.19	Pat.23	Pat.27	Pat.31	Pat.35
G	BO	St.4	St.8	Pat.4	Pat.8	Pat.12	Pat.16	Pat.20	Pat.24	Pat.28	Pat.32	Pat.36
H	BO	St.4	St.8	Pat.4	Pat.8	Pat.12	Pat.16	Pat.20	Pat.24	Pat.28	Pat.32	Pat.36

Abb.4 Verteilung des Probenmaterials in der Mikrotiterplatte für den PGE2-Nachweis:
 Blank= leer, TA (Total Activity, Positivkontrolle)= leer, NSB= je 150µl Assay Buffer + 50µl Conjugate, BO= je 100µl Assay Buffer + 50µl Conjugate + 50µl Antibody, St.(Standard)= je 100µl Standard + 50µl Conjugate + 50µl Antibody in Dupletts pipettiert, Pat.(Patientenprobe)= je 100µl Patientenprobe + 50µl Conjugate + 50µl Antibody in Dupletts pipettiert

Nach der Beimengung des Probenmaterials wurde die Platte für 20 Stunden bei 4°C inkubiert.

Danach wurde die Platte gewaschen (3x je 300 µl Wash-Buffer pro Vertiefung), wodurch nichtgebundene Komponenten entfernt wurden. In die Vertiefungen C1 und D1 (TA) wurden je 5 µl Conjugate (Enzo Life Sciences GmbH, Deutschland) und in die Vertiefungen A1 bis H12 je 200 µl Substrate (Enzo Life Sciences GmbH, Deutschland) pipettiert.

Die Platte wurde erneut für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dann wurden 50 µl Stop Solution (Natriumphosphatlösung, Enzo Life Sciences GmbH, Deutschland) pro Kavität hinzugegeben.

Die Messung wurde innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stop Solution im Mikrotiterplatten-Photometer Varioscan (Thermo Scientific, Deutschland) bei 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm durchgeführt. Die Farbintensität (gelb) ist umgekehrt proportional zur PGE2-Konzentration der Probe.

3.5 Nachweis der Bakterien

3.5.1 DNA-Isolation

Als erster Schritt des Bakteriennachweises in Sulkusflüssigkeit wurde die Isolation der Bakterien-DNA durchgeführt. Dazu wurde das vollautomatische MagNA Pure^{LC} System (Roche Diagnostics, Deutschland) in Kombination mit dem MagNA Pure DNA Isolation Kit III (Roche Diagnostics, Deutschland) nach dem Protokoll von Roche verwendet.

Mit dem MagNA Pure^{LC} System können bis zu 32 Proben in einem Durchgang isoliert werden. Die DNA haben die Eigenschaften, bei hoher Salzkonzentration und hoher Ionenstärke an Glas zu binden. Als Glas werden magnetische Silicapartikel verwendet.

Vor der Verwendung des MagNA Pure^{LC} Systems wurden die Bakterien lysiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 169 µl Bacteria Lysis Buffer (enthält chaotrope Salze) (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) und 26 µl Protein kinase K (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) zu jeder Probe (Kryoröhrchen mit Absorbent Paper Points). Danach wurden die Proben zur Vorisolation der DNA für 10 Minuten bei 65°C im Schüttelwasserbad Haake SWB25 (Thermo Electron Corporation, Deutschland) inkubiert und anschließend für weitere 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Daraufhin wurden die Proben für 1 Minute bei 10000g in der AllegraTM 25R Centrifuge (Beckman Coulter, Amerika) zentrifugiert und anschließend abgekühlt.

Die Behälter (Reagent Tubs) des MagNA Pure^{LC} Systems wurden wie durch die MagNA Pure Software vorgegeben mit dem Inhalt des MagNA Pure^{LC} DNA Isolation Kits III und mit den Patientenproben befüllt.

Die durch die Vorisolation frei zugängliche DNA wurde an die Silicaoberfläche der magnetischen Glaspartikel (MGPs) gebunden. Die mit DNA gebundenen MGPs wurden von der restlichen Probe magnetisch getrennt. Das darauffolgende Waschen mit Wash-Buffer (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) sorgte für die Entfernung nicht gebundener Substanzen (Proteine, Zellmembranen, PCR-Inhibitoren wie Heparin oder Hämoglobin) und für die Reduktion der chaotropen Salzkonzentration. Danach wurden die mit DNA gebundenen

MGPs von den Restablagerungen magnetisch getrennt. Als letztes wurde die DNA von den magnetischen Glaspartikeln gelöst. Nach Beendigung der DNA-Isolation wurden die Proben aliquotiert. Die isolierte DNA wurde bei -20°C gelagert.

3.5.2 PCR zur Identifikation der Bakterien

Zum Nachweis der parodontalpathogenen Bakterien wurde das Parident™ Testsystem (AMPLEX Diagnostics GmbH, Deutschland) in Verbindung mit dem DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland) verwendet.

Mit dem Kit können die Bakterien *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *T. forsythia*, *P. micra*, *T. denticola* und *P. intermedia* nachgewiesen werden.

Zur Vervielfältigung der Fragmente der Bakterien-DNA wurde eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) durchgeführt. Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist ein enzymabhängiges Verfahren, durch das bestimmte Gensequenzen vervielfältigt werden können. Dazu ist eine DNA-Kette mit zumindest teilweise bekannter Sequenz nötig. Man braucht zwei Primer, die an die Enden der bekannten Sequenz jeweils an eine der Ketten binden. Einzelne Nukleotidtriphosphat-Moleküle und eine hitzestabile Polymerase werden ebenfalls benötigt.

Die Vorbereitung der Amplifizierungsreaktion erfolgte nach dem Herstellerprotokoll (AMPLEX Diagnostics GmbH, Deutschland):

Für die PAF-PCR (*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*) wurde ein Mastermix bestehend aus 1 µl dNTP Mix, 1 µl PAF Primer, 5 µl PCR Puffer, 2 µl Tth DNA Polymerase und 36 µl destilliertem H₂O (ddH₂O) hergestellt. Für die PMT-PCR (*T. forsythia*, *P. intermedia*, *P. micra*, *T. denticola* und interne Kontrolle) wurde analog vorgegangen, doch anstelle des PAF Primers wurde ein PMT Primer verwendet. Für jede Probe wurde je ein Mastermix (45 µl) plus 5 µl Bakterien-DNA in eine Mikrotiterplatte pipettiert und in den Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland) trans-

feriert. Als Negativkontrolle wurde anstelle der Bakterien-DNA destilliertes H₂O verwendet.

Der Thermal Cycler durchlief folgendes Programm:

Zyklus	Temperatur (°C)	Zeit	Reaktion
1x	94	5 Min.	Anfangsdenaturierung der DNA
40x	94	25 Sek.	Denaturierung der DNA
	58	25 Sek.	Bindung der Primer
	72	45 Sek.	3'-OH Elongation der Primer
1x	72	3 Min.	Finale Elongation

Abb.5 Ablauf des PCR-Programms im Thermal Cycler

Bei der Denaturierung werden die Wasserstoffbrücken der zu vervielfältigenden DNA gespalten. Danach lag die Nukleinsäure einzelsträngig vor. Nach Abkühlung des Reaktionsansatzes auf 58°C binden die Primer jeweils an das 3'-Ende der Template-Sequenz. Durch die Polymerase wird ein komplementärer Strang in 5'-3'-Richtung vom Primer aus synthetisiert. Der zur Vervielfältigung der DNA ablaufende Vorgang aus Denaturierung, Primer-Bindung und Synthese wurde 40 mal wiederholt. Nach dem Ablauf des Programms wurden die PCR Produkte bei 4°C gelagert.

3.5.3 ELISA zur Identifikation der Bakterien

Mittels des Parident ELISA Kits (AMPLEX GmbH, Deutschland) wurde die vervielfältigte Bakterien-DNA hybridisiert. Die Hybridisierung dient der spezifischen Detektion der verschiedenen Bakterienarten.

Vorbereitung:

Die PCR-Produkte wurden langsam aufgetaut (auf Eis gelagert), zugleich erfolgte die Erwärmung von stringentem Wash-Buffer (AMPLEX GmbH,

Deutschland) im Brutschrank Hybaid Shake`n`Stack (Thermo Electron Corporation, Deutschland) auf 50°C.

Danach erfolgte die Denaturierung der PCR-Produkte für 10 Minuten bei 95°C im Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland). Die denaturierten PCR-Amplifikate wurden zu einzelsträngigen, spezifischen Sonden (Parident™ Sonden Module) gegeben. Die Sonden befinden sich an der Oberfläche der Mikrotiterplatte. Jedem PCR-Produkt wurden 300 µl Hybridisierungspuffer beigemischt. Durch den Hybridisierungspuffer findet eine Hybridisierung komplementärer Sequenzen statt. Die Hybridisierung wurde anschließend mittels ELISA detektiert.

ELISA:

Nach Pipettieren von 50 µl der verdünnten PCR-Proben in jede Kavität erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 50°C im Brutschrank Hybaid Shake`n`Stack. Danach fand eine Waschung der Mikrotiterplatte mit stringentem Wash-Buffer (3x200 µl pro Kavität) und anschließend mit Wash-Buffer (1x200 µl pro Kavität) (AMPLEX GmbH, Deutschland) statt. Im darauffolgenden Schritt wurden 100 µl Peroxidase-Konjugat in jede Kavität pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Konjugat bindet an die Markierung des Einzelstrangs des PCR-Produkts, das an die Oligonukleotidsonde gebunden ist.

Wieder erfolgte eine Waschung der Platte mit Wash-Buffer (3x200 µl pro Kavität). Nach Zugabe von 100 µl TMB-Substrate-Lösung in jede Kavität inkubierte man die Platte für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank Innovens Oven Incubator (Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland). Die Substrat-Lösung erzeugt eine blaue Farbreaktion.

Danach wurde die Reaktion gestoppt (100 µl Stop Solution pro Kavität), wobei sich die Farbe von blau nach gelb änderte. Die Extinktion der einzelnen Kavitäten konnte bei 450 nm und 620 nm im Mikrotiterplatten-Photometer Varioscan (Thermo Scientific, Deutschland) gemessen werden.

3.6 Statistische Methodik

Die Erfassung aller Daten für diese Studie erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel 2011 für Macintosh (Microsoft, München, Deutschland), die Auswertung der Daten berechnete das Programm SPSS Version 21 für Windows (IBM, Ulm, Deutschland).

Die Veranschaulichung der absoluten Häufigkeit verschiedener Merkmale (demographische Daten, Knochenverlust, Raucher/Nichtraucher, parodontal-pathogene Bakterien) in den beiden Parodontitisstadien leicht bis mittelschwer und schwer erfolgte anhand von Kreuztabellen. Für alle stetigen Merkmale wurde zunächst für jede Gruppe die Normalverteilung der Werte mit Hilfe des Kolmogoroff-Smirnov-Tests sowie die Homogenität der Varianzen zwischen den Gruppen mit Hilfe des Levene-Tests geprüft. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem exakten Fisher-Test. Für normalverteilte Werte erfolgten Mehrfachvergleiche mit dem Test nach Games Howell. Zusätzlich erfolgte eine multivariate Analyse der Verteilung von Zahnzahl, Knochenverlust, PGE2 in Sulkusflüssigkeit, MMP-8 in Sulkusflüssigkeit, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *P. micra* und *T. denticola* zwischen den Gruppen mit Hilfe des Spearman-Rho-Koeffizienten. Die Korrelation ist ein ungerichtetes Zusammenhangsmaß, was bedeutet, dass man anhand von Korrelationen keine Aussagen über den kausalen Zusammenhang machen kann. Wenn die Werte der einen Variablen groß oder klein werden, dann werden die der anderen ebenfalls groß oder klein. Man kann nicht sagen, ob die Variable A die Variable B beeinflusst oder umgekehrt. Die Beschreibung der Korrelationsgrößen war folgendermaßen:

< 0,1 sehr schwach

0,1 bis < 0,3 schwach

0,3 bis 0,7 mittelstark

0,7 bis 0,9 stark

0,9 bis 1 sehr stark

Bei Vorliegen negativer Werte handelt es sich um negative Korrelationen, da bei steigenden x-Werten die y-Werte sinken.

Zur Verdeutlichung der Signifikanz einer Korrelation wurden folgende Indizes zur Markierung verwendet:

* signifikant (0,05 Niveau)

** hochsignifikant (0,01 Niveau)

3.7 Materialien und Geräte

3.7.1 Geräte

Geräte	Firma, Herstellungsland
Extraktionsroboter: MagNa Pure LC	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Mikrotitrationsplattenphotometer Varioscanscan	Thermo Scientific, Deutschland
Innovens Oven Incubator	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Hybaid Shake'n''Stack	Thermo Electron Corporation, Deutschland
Schüttelwasserbad Haake SWB25	Thermo Electron Corporation, Deutschland
Allegra TM 25R Centrifuge	Beckman Coulter, Amerika

Tab.1 Übersicht der verwendeten Geräte mit Herstellerangabe

3.7.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma, Herstellungsland
Absorbent Paper Points	VDW, Deutschland
GCF-/PISF-Entnahmestreifen	dentognostics GmbH, Deutschland
Kryoröhrchen	Greiner Bio One, Deutschland
Abklebefolie Microseal Adhesive Sealer	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Research Eppendorf-Pipetten (10,100,200,1000 µl)	Eppendorf AG, Deutschland
Multichannel Transfer-Pipetten (30-300µl)	Brand GmbH&Co.KG, Deutschland
Elektronische Pipette Impact2 (30, 125, 250 µl)	Thermo Scientific, Deutschland
Integrity Filter Tips Sterile	Thermo Scientific, Deutschland
Safe Seal Tips Professional	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Goat anti-Mouse IgG Clear Microtiter Plate	Enzo Life Sciences, Deutschland
Mikrotiterplatte dento ELISA aMMP-8 96-wells	dentognostics GmbH, Deutschland
MagNA Pure LC Reaction Tips (small, large)	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
MagNA Pure LC Reagent Tub Lids (small, medium, large)	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
MagNA Pure LC Reagent Tub Lid Seals	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
MagNA Pure LC Processing Cartridges	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
MagNA Pure LC Cooling Block 96-well Plate	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
MagNA Pure LC Cooling Block Reaction Tubes (1,5ml)	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland

MagNA Pure LC Reagent Tubs (small, medium, large)	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Parident™ Sonden Modul interne Kontrolle	AMPLEX Diagnostics GmbH, Deutschland
Parident™ Sonden Modul Treponema denticola	AMPLEX Diagnostics GmbH, Deutschland
Parident™ Sonden Modul Prevotella intermedia	AMPLEX Diagnostics GmbH, Deutschland
Parident™ Sonden Modul Tannerella forsythia	AMPLEX Diagnostics GmbH, Deutschland
Parident™ Sonden Modul Parvimonas micra	AMPLEX Diagnostics GmbH, Deutschland
Parident™ Sonden Modul Fusobacterium nucleatum	AMPLEX Diagnostics GmbH, Deutschland
Parident™ Sonden Modul Porphyromonas gingivalis	AMPLEX Diagnostics GmbH, Deutschland
Parident™ Sonden Modul Aggregatibacter Actinomycetemcomitans	AMPLEX Diagnostics GmbH, Deutschland

Tab.2 Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangabe

3.7.3 Molekularbiologische Kits

Molekularbiologische Kits	Firma, Herstellungsland
Enzymimmunoassay dentoELISA aMMP-8	dentognostics GmbH, Deutschland
PGE2 high sensitivity EIA kit	Enzo Life Sciences GmbH, Deutschland
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Parident™ Testsystem	AMPLEX Diagnostics GmbH, Deutschland

Tab.3 Übersicht der verwendeten molekularbiologischen Kits mit Herstellerangabe

3.7.4 Chemikalien und Reagenzien

Verwendete Chemikalien/Reagenzien	Firma, Herstellungsland
DIL	dentognostics GmbH, Deutschland
GCF-/PISF-Eluat	dentognostics GmbH, Deutschland
Peroxidase Enzym-Conjugate	dentognostics GmbH, Deutschland
CAL 1-5	dentognostics GmbH, Deutschland
Wash Buffer Concentrate	dentognostics GmbH, Deutschland
TMB Substrate	dentognostics GmbH, Deutschland
Stop Solution	dentognostics GmbH, Deutschland
Control	dentognostics GmbH, Deutschland
PGE2 HS Standard	Enzo Life Sciences GmbH, Deutschland
PGE2 HS Antibody	Enzo Life Sciences GmbH, Deutschland
p-Npp Substrate	Enzo Life Sciences GmbH, Deutschland
GCF-/PISF-Eluat	Enzo Life Sciences GmbH, Deutschland
Assay Buffer	Enzo Life Sciences GmbH, Deutschland
Wash Buffer Concentrate	Enzo Life Sciences GmbH, Deutschland
Stop Solution	Enzo Life Sciences GmbH, Deutschland
PGE2 HS Conjugate	Enzo Life Sciences GmbH, Deutschland
Magnetic Glass Particles	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland

Elution Buffer	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Lysis/Binding Buffer	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Wash Buffer I, II und III	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Stringent Wash Buffer	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Bacteria Lysis Buffer	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Proteinkinase K	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Proteinkinase K Buffer	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
PAF Primer	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
PMT Primer	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Reaction Buffer	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Ultra Start Tth DNA Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Peroxidase Conjugate	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
TMB Substrate	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Stop Solution	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland

Tab.4 Übersicht der verwendeten Chemikalien/Reagenzien mit Herstellerangabe

4 Ergebnisse

4.1 Deskriptive Statistik

4.1.1 Charakteristika der Studienpopulation

	Gesamt	leichte/mittel- schwere PA	schwere PA
Anzahl	162 (100%)	106 (100%)	56 (100%)
Frauen	75 (46,3%)	50 (47,2%)	25 (44,6%)
Männer	87 (53,7%)	56 (52,8%)	31 (55,4%)
Raucher	80 (49,4%)	41 (38,7%)	39 (69,6%)
Nichtraucher	82 (50,6%)	65 (61,3%)	17 (30,4%)
Kaukasier	137 (84,6%)	87 (82,1%)	50 (89,2%)
Asiaten	8 (4,9%)	6 (5,7%)	2 (3,6%)
Araber	5 (3,1%)	3 (2,8%)	2 (3,6%)
Ethnie unbekannt	12 (7,4%)	10 (9,4%)	2 (3,6%)
Altersmittel \pm SD (Jahre)	50,7 \pm 9,7	50,3 \pm 10,7	51,5 \pm 7,4

Tab.5 Charakteristika der Studienpopulation, Standardabweichung (SD)

Es wurden insgesamt 162 Patienten untersucht.

Der Altersdurchschnitt der gesamten Studienpopulation betrug $50,7 \pm 9,7$ Jahre (Standardabweichung), in der leichten bis mittelschweren Parodontitisgruppe lag er bei $50,3 \pm 10,7$ Jahren und in der Gruppe der an schwerer Parodontitis erkrankten Personen bei $51,5 \pm 7,4$ Jahren (Tab.5).

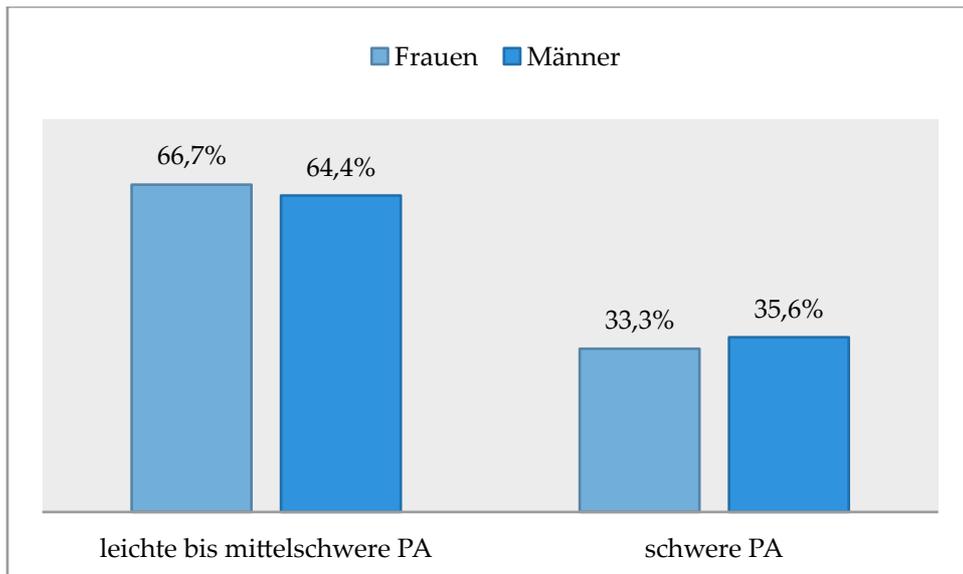


Abb.6 Darstellung der Verteilung weiblicher und männlicher Patienten innerhalb der PA-Stadien

An der Studie nahmen 75 (46,3%) Frauen und 87 (53,7%) Männer teil, somit war die Verteilung in Bezug auf die Geschlechter annähernd gleich (Tab.5). Auch die Häufigkeit der Parodontitisstadien innerhalb der Geschlechter war nicht signifikant unterschiedlich. So konnte bei 50 (66,7%) der weiblichen Patienten eine leichte bis mittelschwere Parodontitis und bei 25 (33,3%) eine schwere Parodontitis diagnostiziert werden. Bei den Männern wurde bei 56 (64,4%) eine leichte bis mittelschwere und bei 31 (35,6%) eine schwere Parodontitis diagnostiziert (Abb.6).

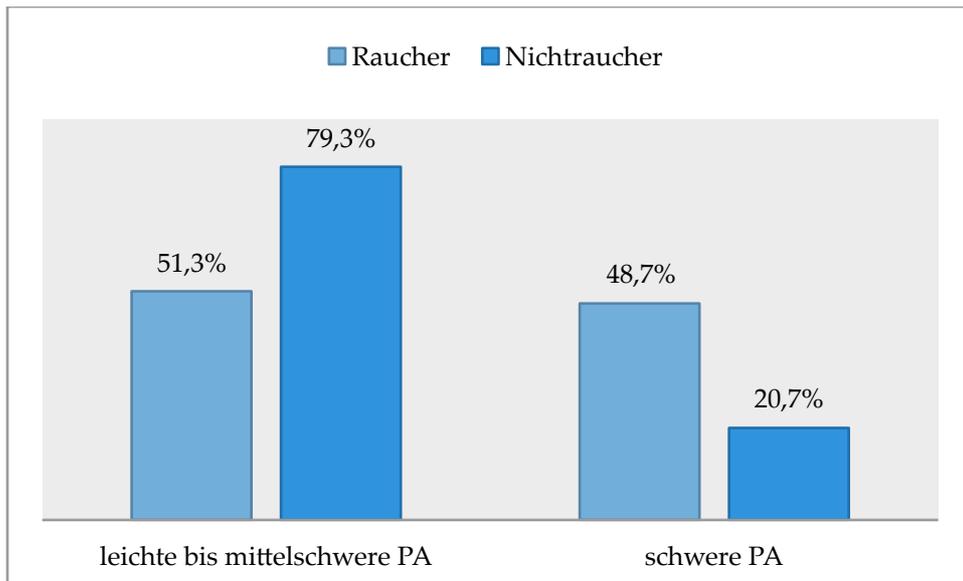


Abb.7 Übersicht über das Verhältnis von Nichtrauchern und Rauchern innerhalb der PA-Stadien

82 Personen (50,6%) waren Nichtraucher, zu den Rauchern gehörten mit 80 Personen (49,4%) etwa die Hälfte der Patienten (Tab.5).

An einer leichten bis mittelschweren Form der Parodontitis litten 65 (79,3%) Nichtraucher und 41 (51,3%) Raucher. An einer schweren Form der Parodontitis waren 17 (20,7%) Nichtraucher und 39 (48,7%) Raucher erkrankt. Bei den Rauchern fällt im Vergleich zu den Nichtrauchern also eine deutliche Zunahme der an schwerer Parodontitis erkrankten Personen auf (Abb.7).

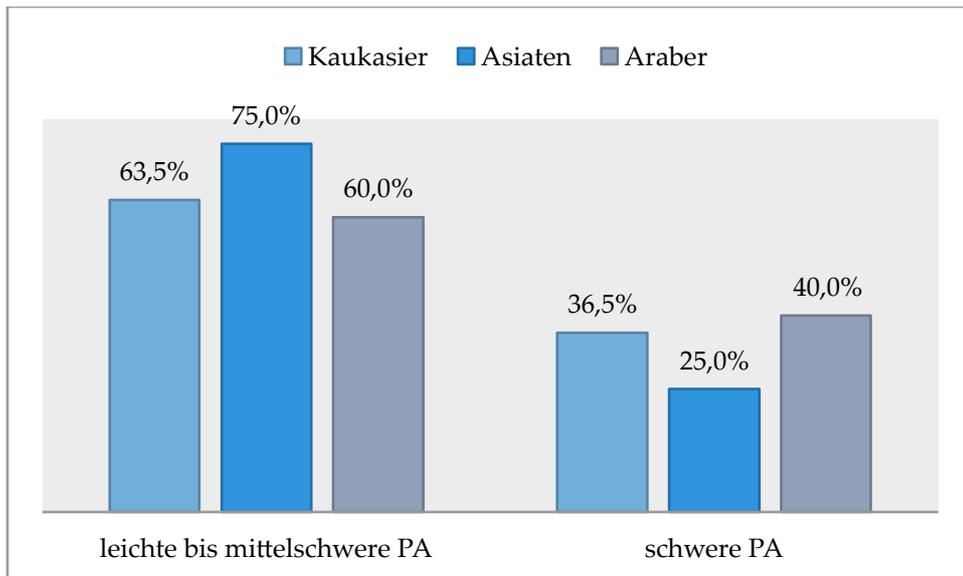


Abb.8 Darstellung der ethnischen Herkunft innerhalb der PA-Stadien

Mit 137 Personen (84,6%) war die Mehrheit der Patienten kaukasischer Herkunft,

8 Personen (4,9%) waren asiatischer und 5 Personen (3,1%) arabischer Herkunft. Bei 12 Personen fehlte die Angabe zur ethnischen Herkunft, weshalb diese nicht in Abb.8 berücksichtigt werden (Tab.5).

An einer leichten bis mittelschweren Parodontitis waren 87 (63,5%) kaukasische, 6 (75,0%) asiatische und 3 (60,0%) arabische Patienten erkrankt. Bei 50 (36,5%) Kaukasiern, 2 (25,0%) Asiaten und 2 (40,0%) Arabern wurde eine schwere Parodontitis diagnostiziert (Abb.8).

4.1.2 Verlust an Alveolarknochenhöhe in den einzelnen PA-Stadien

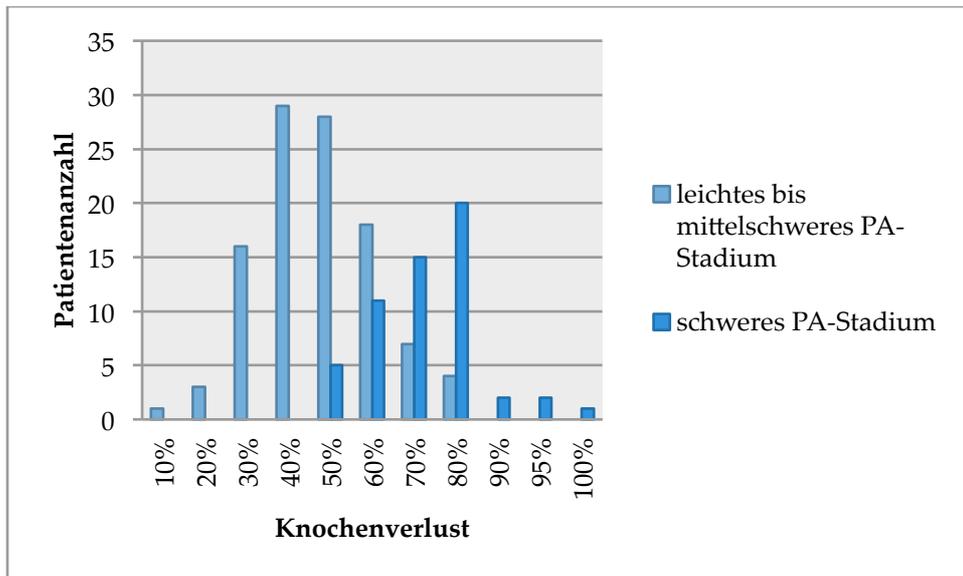


Abb.9 Darstellung des prozentualen Alveolarknochenverlustes innerhalb der PA-Stadien

Wie bereits erwähnt wird in der vorliegenden Studie ein schweres Parodontitisstadium als Befall von mindestens 7 Zähnen mit einem Knochenverlust von >50% definiert. Deshalb erfolgte die Darstellung der Ergebnisse erst ab einem Knochenabbau von 50%.

Von insgesamt 162 Patienten wurde bei 1 Patienten (0,9%) im leichten bis mittelschweren Parodontitisstadium ein Verlust der Alveolarknochenhöhe von 10% festgestellt. Von einem 20%-igen Knochenverlust waren 3 Patienten (2,8%) mit leichter bis mittelschwerer Parodontitis betroffen. 30% Knochenverlust wurde bei 16 Patienten (15,1%) im leichten bis mittelschweren Parodontitisstadium diagnostiziert. Ein Knochenverlust von 40% war bei 29 Patienten (27,4%) im leichten bis mittelschweren Parodontitisstadium zu verzeichnen. 28 Patienten (26,4%) mit leichter bis mittelschwerer und 5 Patienten (8,9%) mit schwerer Parodontitis hatten einen Knochenverlust von 50%. Mit einem Verlust an Alveolarknochenhöhe von 60% waren 18 Patienten (17,0%) im leichten bis mittelschweren und 11 Patienten (19,6%) im schweren Parodontitisstadium betroffen. Bei 7 Patienten (6,6%) im leichten bis mittelschweren und bei 15 Patienten (26,8%) im schweren Parodontitisstadium wurde ein Knochenverlust von 70%

diagnostiziert. 80% Knochenverlust wurde bei 4 Patienten (3,8%) mit leichter bis mittelschwerer und bei 20 Patienten (35,7%) mit schwerer Parodontitis festgestellt. 0 Patient (0,0%) mit leichter bis mittelschwerer und 2 Patienten (3,6%) mit schwerer Parodontitis hatten einen Knochenverlust von 90%. Ein Knochenverlust von 95% konnte bei 0 Patienten (0,0%) im leichten bis mittelschweren und bei 2 Patienten (3,6%) im schweren Parodontitisstadium diagnostiziert werden. 100% Verlust an Alveolarknochenhöhe wurde bei nur einem Patienten (1,8%) mit schwerer Parodontitis festgestellt (Abb.9).

4.1.3 Vorhandene Zahnanzahl in den einzelnen PA-Stadien

	vorhandene Zähne im Mittel	SD
leichtes bis mittelschweres PA-Stadium	25,14	4,88
schweres PA-Stadium	22,96	4,58

Abb.10 Übersicht über die Anzahl vorhandener Zähne in den einzelnen PA-Stadien, Standardabweichung (SD)

Im leichten bis mittelschweren Parodontitisstadium waren im Mittel 25,14 (\pm 4,88) und im schweren Parodontitisstadium 22,96 (\pm 4,58) Zähne in der Mundhöhle vorhanden (Abb.11).

4.1.4 Vorkommen der parodontalpathogenen Bakterien in den PA-Stadien

4.1.4.1 Vorkommen von *A. actinomycetemcomitans* in den einzelnen PA-Stadien

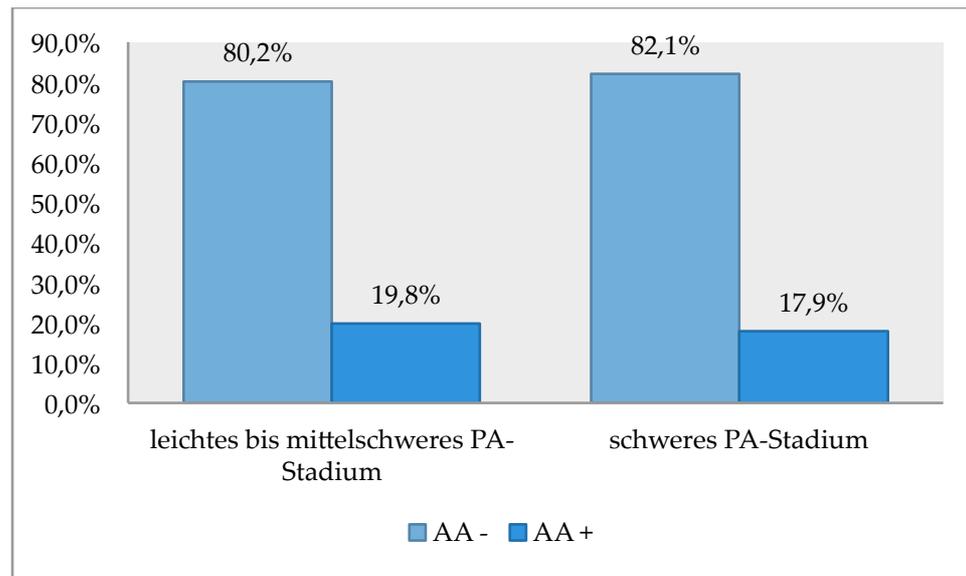


Abb.11 Vorkommen von *A. actinomycetemcomitans* innerhalb der PA-Stadien

	Exakter Test nach Fischer (2-seitige Signifikanz)
p-Wert	0,836

Abb.12 Signifikanz (p-Wert) zum Vorkommen von AA in den PA-Stadien

Bei 131 Patienten (80,9%) erfolgte kein Nachweis von *A. actinomycetemcomitans* (AA-) und bei 31 Patienten (19,1%) erfolgte ein Nachweis (AA+) in der Sulkusflüssigkeit.

Im leichten bis mittelschweren Parodontitisstadium war *A. actinomycetemcomitans* bei 85 (80,2%) Patienten nicht nachweisbar und bei 21 (19,8%) Patienten positiv nachweisbar. Von den an schwerer Parodontitis Erkrankten wurde *A. actinomycetemcomitans* bei 46 (82,1%) Patienten nicht und bei 10 (17,9%) Patienten nachweislich in der Sulkusflüssigkeit gemessen (Abb.11).

Innerhalb der beiden Parodontitisstadien leicht bis mittelschwer und schwer gab es keine signifikanten Unterschiede zum Vorkommen von *A. actinomycetemcomitans* ($p = 0,836$) (Abb.12).

4.1.4.2 Vorkommen von *P. gingivalis* in den einzelnen PA-Stadien

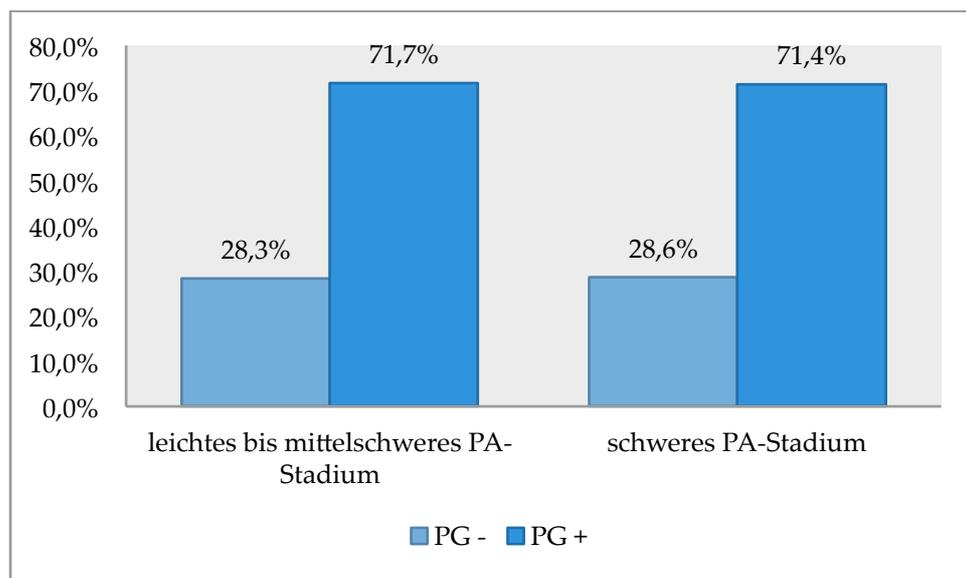


Abb.13 Vorkommen von *P. gingivalis* innerhalb der PA-Stadien

	Exakter Test nach Fischer (2-seitige Signifikanz)
p-Wert	1,000

Abb.14 Signifikanz (p-Wert) zum Vorkommen von PG in den PA-Stadien

46 Patienten (28,4%) wurden negativ (PG-) und 116 Patienten (71,6%) positiv (PG+) auf *P. gingivalis* getestet. Im leichten bis mittelschweren Parodontitisstadium wurden 30 (28,3%) Patienten negativ und 76 (71,7%) Patienten positiv auf *P. gingivalis* getestet. Kein Nachweis von *P. gingivalis* fand bei 16 (28,6%) Patienten, ein positiver Nachweis hingegen bei 40 (71,4%) Patienten im schweren Parodontitisstadium statt (Abb.13). Innerhalb der beiden Parodontitisstadien leicht bis mittelschwer und schwer gab es keine

signifikanten Unterschiede zum Vorkommen von *P. gingivalis* ($p = 1,000$) (Abb.14).

4.1.4.3 Vorkommen von *T. denticola* in den einzelnen PA-Stadien

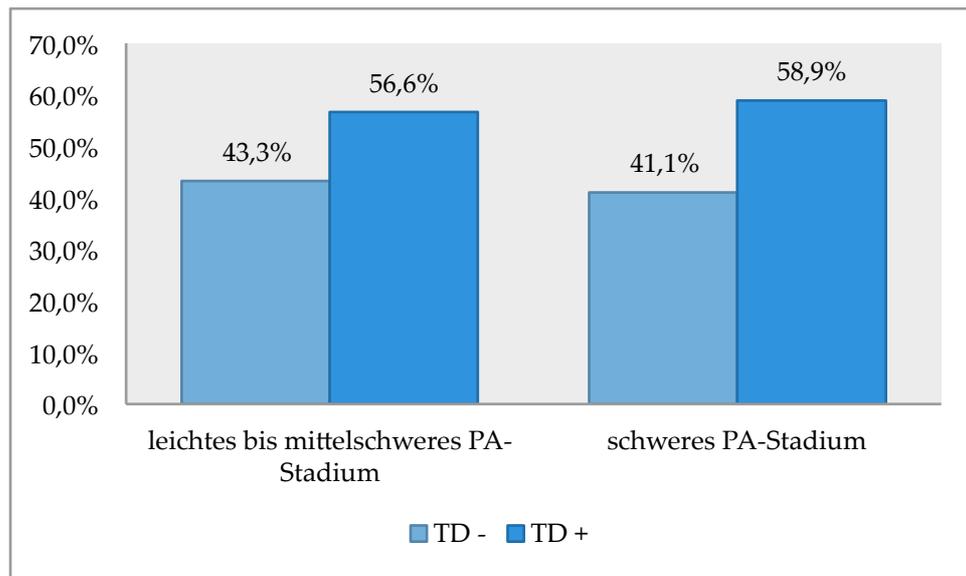


Abb.15 Vorkommen von *T. denticola* innerhalb der PA-Stadien

	Exakter Test nach Fischer (2-seitige Signifikanz)
p-Wert	0,868

Abb.16 Signifikanz (pWert) zum Vorkommen von TD in den PA-Stadien

69 Patienten (42,6%) wurden negativ (TD-) und 93 Patienten (57,4%) positiv (TD+) auf *T. denticola* getestet.

46 (43,4%) Patienten wurden im leichten bis mittelschweren Parodontitisstadium negativ und 60 (56,6%) Patienten positiv auf *T. denticola* getestet. Im schweren Parodontitisstadium erfolgte bei 23 (41,1%) Patienten kein Nachweis, bei 33 (58,9%) Patienten hingegen ein positiver Nachweis von *T. denticola* (Abb.15).

Innerhalb der beiden Parodontitisstadien leicht bis mittelschwer und schwer

gab es keine signifikanten Unterschiede zum Vorkommen von *T. denticola* ($p = 0,868$) (Abb.16).

4.1.4.4 Vorkommen von *T. forsythia* in den einzelnen PA-Stadien

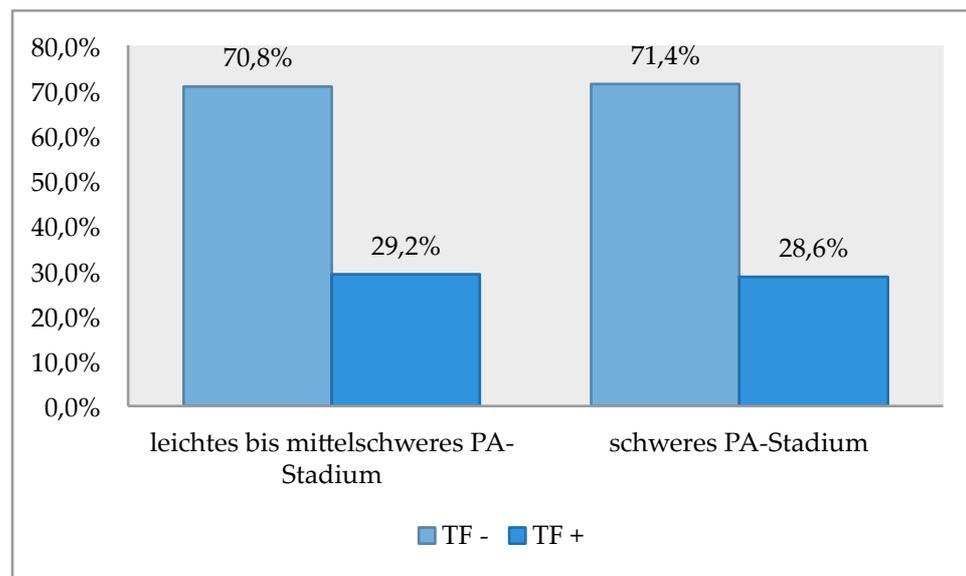


Abb.17 Vorkommen von *T. forsythia* innerhalb der PA-Stadien

	Exakter Test nach Fischer (2-seitige Signifikanz)
p-Wert	1,000

Abb.18 Signifikanz (p-Wert) zum Vorkommen von TF in den PA-Stadien

Bei 115 Patienten (71,0%) konnte *T. forsythia* nicht nachgewiesen werden (TF-), bei 47 Patienten (29,0%) war der Nachweis positiv (TF+).

Im leichten bis mittelschweren Parodontitisstadium war *T. forsythia* bei 75 (70,8%) Patienten nicht nachweisbar und bei 31 (29,2%) Patienten positiv nachweisbar. Von den an schwerer Parodontitis Erkrankten wurde *T. forsythia* bei 40 (71,4%) Patienten nicht und bei 16 (28,6%) Patienten nachweislich in der Sulkusflüssigkeit gemessen (Abb.17). Innerhalb der beiden Parodontitisstadien leicht bis mittelschwer und schwer gab es also keine

signifikanten Unterschiede zum Vorkommen von *T. forsythia* ($p = 1,000$) (Abb.18).

4.1.4.5 Vorkommen von *P. intermedia* in den einzelnen PA-Stadien

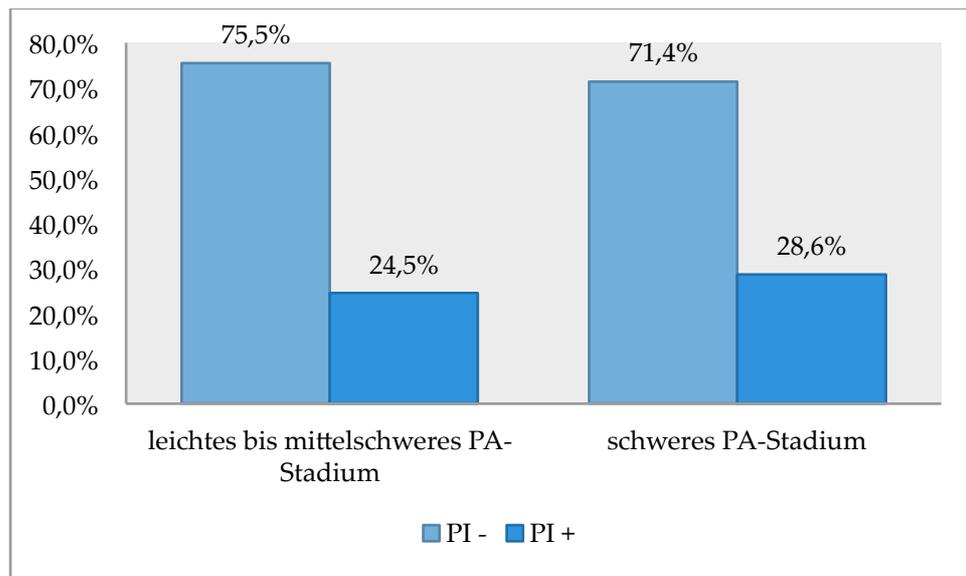


Abb.19 Vorkommen von *P. intermedia* innerhalb der PA-Stadien

	Exakter Test nach Fischer (2-seitige Signifikanz)
p-Wert	0,578

Abb.20 Signifikanz (p-Wert) zum Vorkommen von PI in den PA-Stadien

120 Patienten (74,1%) wurden negativ (PI-) und 42 Patienten (25,9%) positiv (PI+) auf *P. intermedia* getestet.

Im leichten bis mittelschweren Parodontitisstadium wurden 80 (75,5%) Patienten negativ und 26 (24,5%) Patienten positiv auf *P. intermedia* getestet.

Kein Nachweis von *P. intermedia* fand bei 40 (71,4%) Patienten, ein positiver Nachweis hingegen bei 16 (28,6%) Patienten im schweren Parodontitisstadium statt (Abb.19). Innerhalb der beiden Parodontitisstadien leicht bis mittelschwer und schwer gab es also keine signifikanten Unterschiede zum Vorkommen von *P. intermedia* ($p = 0,578$) (Abb.20).

4.1.4.6 Vorkommen von *P. micra* in den einzelnen PA-Stadien

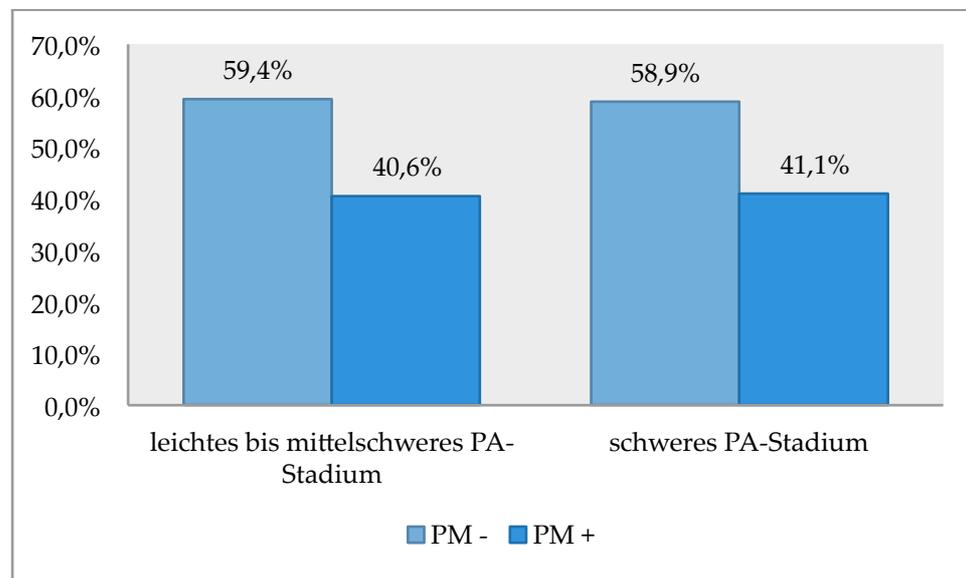


Abb.21 Vorkommen von *P. micra* innerhalb der PA-Stadien

	Exakter Test nach Fischer (2-seitige Signifikanz)
p-Wert	1,000

Abb.22 Signifikanz (p-Wert) zum Vorkommen von PM in den PA-Stadien

Bei 96 Patienten (59,3%) konnte *P.micra* nicht nachgewiesen werden (PM-) und bei 66 Patienten (40,7%) erfolgte ein positiver Nachweis (PM+).

63 (59,4%) Patienten wurden im leichten bis mittelschweren Parodontitisstadium negativ und 43 (40,6%) Patienten positiv auf *P.micra* getestet. Im schweren Parodontitisstadium erfolgte bei 33 (58,9%) Patienten kein Nachweis, bei 23 (41,1%) Patienten hingegen ein positiver Nachweis von *P.micra* (Abb.21). Innerhalb der beiden Parodontitisstadien leicht bis mittelschwer und schwer gab es also keine signifikanten Unterschiede zum Vorkommen von *P. micra* ($p = 1,000$) (Abb.22).

4.1.4.7 Vorkommen von *F. nucleatum* in den einzelnen PA-Stadien

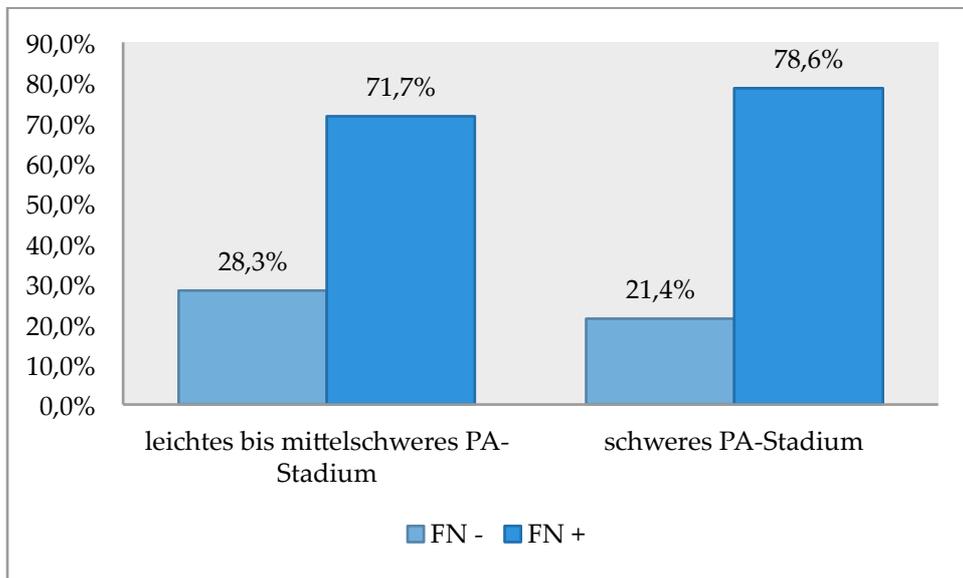


Abb.23 Vorkommen von *F. nucleatum* innerhalb der PA-Stadien

	Exakter Test nach Fischer (2-seitige Signifikanz)
p-Wert	0,451

Abb.24 Signifikanz (p-Wert) zum Vorkommen von FN in den PA-Stadien

F. nucleatum konnte bei 42 Patienten (26,0%) nicht nachgewiesen werden (FN-), 120 Patienten (74,0%) wurden positiv auf *F. nucleatum* getestet (FN+). Im leichten bis mittelschweren Parodontitisstadium war *F. nucleatum* bei 30 (28,3%) Patienten nicht nachweisbar und bei 76 (71,7%) Patienten positiv nachweisbar. Von den an schwerer Parodontitis Erkrankten wurde *F. nucleatum* bei 12 (21,4%) Patienten nicht und bei 44 (78,6%) Patienten nachweislich in der Sulkusflüssigkeit gemessen (Abb.23). Innerhalb der beiden Parodontitisstadien leicht bis mittelschwer und schwer gab es also keine signifikanten Unterschiede zum Vorkommen von *F. nucleatum* ($p = 0,451$) (Abb.24).

4.2 Expression von MMP-8 und PGE2 in Abhängigkeit von Geschlecht, Rauchverhalten und ethnischer Abstammung

4.2.1 Expression von MMP-8 und PGE2 in der Gesamtpopulation

	PA leicht- mittelschwer	PA schwer	p-Wert
MMP-8 ng/ml	325,98 ± 322,65	346,86 ± 464,99	0,235
PGE2 pg/ml	196,92 ± 471,65	195,16 ± 315,83	0,787

Tab.6 Mittelwerte (± Standardabweichung) und p-Werte von MMP-8 und PGE2 der Gesamtpopulation in den einzelnen Parodontitisstadien

Bei Untersuchung der Gesamtpopulation konnten zwischen den Patienten, die an leichter bis mittelschwerer Parodontitis erkrankt waren, hinsichtlich der Expression von MMP-8 (325,98 ng/ml) und PGE2 (196,92 pg/ml) im Vergleich zu denen, die an schwerer Parodontitis erkrankt waren (MMP-8: 346,86 ng/ml, PGE2: 195,16 pg/ml) keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (p (MMP8) = 0,235, p (PGE2) = 0,787) (Tab.6).

4.2.2 Expression von MMP-8 und PGE2 in den einzelnen PA-Stadien in Abhängigkeit vom Geschlecht

4.2.2.1 Expression von MMP-8 und PGE2 bei weiblichen Patienten

	PA leicht- mittelschwer	PA schwer	p-Wert
MMP-8 ng/ml	332,93 ± 336,04	353,76 ± 336,02	0,690
PGE2 pg/ml	178,15 ± 295,99	186,63 ± 223,03	0,099

Tab.7 Mittelwerte (± Standardabweichung) und p-Werte von MMP-8 und PGE2 bei Frauen in den einzelnen Parodontitisstadien

Bei den Frauen waren die Mittelwerte von MMP-8 im leichten bis

mittelschweren (332,93 ng/ml) und im schweren Parodontitisstadium (353,76 ng/ml) sehr ähnlich ($p = 0,690$). Auch die Expression von PGE2 war nicht signifikant unterschiedlich (Mittelwerte: leichtes bis mittelschweren Parodontitisstadium = 178,15 pg/ml, schweres Parodontitisstadium = 186,63 pg/ml, $p = 0,099$) (Tab.7).

4.2.2.2 Expression von MMP-8 und PGE2 bei männlichen Patienten

	PA leicht- mittelschwer	PA schwer	p-Wert
MMP-8 ng/ml	319,90 ± 313,39	341,52 ± 550,06	0,541
PGE2 pg/ml	213,34 ± 586,17	202,04 ± 378,11	0,262

Tab.8 Mittelwerte (\pm Standardabweichung) und p-Werte von MMP-8 und PGE2 bei Männern in den einzelnen Parodontitisstadien

Bei der Untersuchung des männlichen Geschlechts konnte hinsichtlich der Zunahme des Parodontitisschweregrades weder in der Expression von MMP-8 (319,90 ng/ml und 341,52 ng/ml, $p = 0,541$) noch in der von PGE2 (213,34 pg/ml und 202,04 pg/ml, $p = 0,262$) ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte festgestellt werden (Tab.8).

4.2.3 Expression von MMP-8 und PGE2 in den einzelnen PA-Stadien in Bezug auf das Rauchverhalten

4.2.3.1 Expression von MMP-8 und PGE2 bei Nichtrauchern

	PA leicht- mittelschwer	PA schwer	p-Wert
MMP-8 ng/ml	344,55 ± 319,08	383,13 ± 373,00	0,962
PGE2 pg/ml	242,26 ± 591,83	188,21 ± 317,03	0,501

Tab.9 Mittelwerte (\pm Standardabweichung) und p-Werte von MMP-8 und PGE2 bei Nichtrauchern in den einzelnen Parodontitisstadien

Bei den Nichtrauchern im leichten bis mittelschweren Parodontitisstadium war bezüglich der Expression von MMP-8 (344,55 ng/ml) im Gegensatz zur MMP-8-Expression von Nichtrauchern im schweren Parodontitisstadium (383,13 ng/ml) kein signifikanter Unterschied zu beobachten ($p = 0,962$). Die PGE2-Expression zeigte ebenso keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,501$) bei Zunahme mit dem Schweregrad der Parodontitis (leichtes bis mittelschweres Parodontitisstadium: 242,26 pg/ml, schweres Parodontitisstadium: 188,21 pg/ml) (Tab.9).

4.2.3.2 Expression von MMP-8 und PGE2 bei Rauchern

	PA leicht- mittelschwer	PA schwer	p-Wert
MMP-8 ng/ml	296,99 ± 330,00	331,98 ± 501,56	0,791
PGE2 pg/ml	126,14 ± 135,27	198,19 ± 319,40	0,303

Tab.10 Mittelwerte (\pm Standardabweichung) und p-Werte von MMP-8 und PGE2 bei Rauchern in den einzelnen Parodontitisstadien

Bei Rauchern war in den beiden Parodontitisstadien kein signifikanter Unterschied in der Expression von MMP-8 ($p = 0,791$) und PGE2 ($p = 0,303$) zu beobachten (leichtes bis mittelschweres Parodontitisstadium: MMP-8 = 296,99 ng/ml, PGE2 = 126,14 pg/ml, schweres Parodontitisstadium: MMP-8 = 331,98 ng/ml, PGE2 = 198,19 pg/ml) (Tab.10).

4.2.4 Expression von MMP-8 und PGE2 in den einzelnen PA-Stadien in Abhängigkeit von der ethnischen Abstammung

Ethnische Abstammung	leichtes bis mittelschweres PA-Stadium		schweres PA-Stadium		p-Werte	
	MMP-8 ng/ml	PGE2 pg/ml	MMP-8 ng/ml	PGE2 pg/ml	MMP-8	PGE2
kaukasisch	301,16 ± 276,78	151,24 ± 223,87	360,86 ± 488,34	209,99 ± 331,22	0,995	0,349
asiatisch	565,29 ± 669,59	994,53 ± 1711,14	222,70 ± 7,35	63,52 ± 17,84	1,0	0,182
arabisch	454,98 ± 27,74	108,00 ± 80,26	117,09 ± 11,46	117,09 ± 11,46	1,0	0,564

Tab.11 Mittelwerte (± Standardabweichung) und p-Werte von MMP-8 und PGE2 in Bezug auf die ethnische Abstammung in den einzelnen Parodontitisstadien

In der Expression von MMP-8 und PGE2 war in keiner der ethnischen Gruppen ein signifikanter Unterschied zwischen dem leichten bis mittelschweren und dem schweren Parodontitisstadium festzustellen (Kaukasier: MMP-8 p-Wert = 0,995, PGE2 p-Wert = 0,349; Asiaten: MMP-8 p-Wert = 1,0, PGE2 p-Wert = 0,182; Araber: MMP-8 p-Wert = 1,0, PGE2 p-Wert = 0,564) (Tab.11).

Mehrfachvergleich		p-Werte	
Gruppe1	Gruppe2	MMP-8	PGE2
kaukasisch	asiatisch	0,944	0,798
	arabisch	0,523	0,460
asiatisch	kaukasisch	0,944	0,798
	arabisch	0,999	0,743

Tab.12 Darstellung der Signifikanz (p) durch den Mehrfachvergleich von je einer ethnischen Gruppe mit allen anderen ethnischen Gruppen in Bezug auf die Expression von MMP-8 und PGE2

Der Mehrfachvergleich mittels des Games-Howell-Tests zeigte innerhalb der ethnischen Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Expression von MMP-8 und PGE2 (siehe p-Werte Tab.12).

4.3 Alveolarknochenverlust und der Einfluss auf die Expression von MMP-8 und PGE2

Knochenverlust		leichtes bis mittelschweres PA-Stadium		schweres PA-Stadium	
		MMP-8 ng/ml	PGE2 pg/ml	MMP-8 ng/ml	PGE2 pg/ml
10%	Mittelwert	59,22	59,47	-	-
	SD	-	-	-	-
20%	Mittelwert	261,34	122,81	-	-
	SD	172,50	95,61	-	-
30%	Mittelwert	399,68	144,74	-	-
	SD	314,68	111,97	-	-
40%	Mittelwert	275,47	133,82	-	-
	SD	222,04	218,67	-	-
50%	Mittelwert	283,85	180,38	173,68	136,65
	SD	313,25	321,96	194,52	91,80
60%	Mittelwert	313,00	175,33	325,42	134,93
	SD	398,92	247,15	382,98	136,75
70%	Mittelwert	675,10	730,08	280,34	180,50
	SD	472,94	1605,49	280,19	323,30
80%	Mittelwert	242,27	217,15	458,27	285,48
	SD	160,71	213,79	649,87	428,47
90%	Mittelwert	-	-	608,50	109,69
	SD	-	-	461,12	64,52
95%	Mittelwert	-	-	132,33	30,07
	SD	-	-	149,23	2,75
100%	Mittelwert			57,33	64,70
	SD			-	-

Tab.13 Mittelwerte mit Standardabweichungen (SD) von MMP-8 und PGE2 in Bezug auf den Knochenverlust im leichten bis mittelschweren und im schweren PA-Stadium

Bei Betrachtung der Mittelwerte von MMP-8 und PGE2 bei einem Knochenverlust von 50% fällt ein geringer Abfall vom leichten bis mittelschweren zum schweren Parodontitisstadium auf (leichtes bis mittelschweres Stadium: MMP-8 = 283,85 ng/ml, PGE2 = 180,38 pg/ml, schweres Stadium: MMP-8 = 173,68 ng/ml, PGE2 = 136,65 pg/ml). Der Mittelwert von MMP-8 bleibt bei einem Knochenverlust von 60% mit Zunahme des Parodontitisschweregrades in etwa gleich, während der Mittelwert von PGE2 abfällt (leichtes bis mittelschweres Stadium: MMP-8 = 313,00 ng/ml, PGE2 = 175,33 pg/ml, schweres Stadium: MMP-8 = 325,42 ng/ml, PGE2 =

134,93 pg/ml). Bei einem Knochenverlust von 70% waren die MMP-8- und PGE2-Mittelwerte im leichten bis mittelschweren Parodontitisstadium deutlich höher als im schweren (leichtes bis mittelschweres Stadium: MMP-8 = 675,10 ng/ml, PGE2 = 730,08 pg/ml, schweres Stadium: MMP-8 = 280,34 ng/ml, PGE2 = 180,50 pg/ml). Die Mittelwerte von MMP-8 und PGE2 stiegen bei einem Knochenverlust von 80% bei Zunahme des Parodontitisschweregrades wieder deutlich an (leichtes bis mittelschweres Stadium: MMP-8 = 242,27 ng/ml, PGE2 = 217,15 pg/ml, schweres Stadium: MMP-8 = 458,27 ng/ml, PGE2 = 285,48 pg/ml) (Tab.13).

4.4 Parodontalpathogene Bakterien und der Einfluss auf die Expression von MMP-8 und PGE2

4.4.1 Expression von MMP-8 und PGE2 in Abhängigkeit einer Infektion durch *A. actinomycetemcomitans*

	AA-	AA+	p-Wert
MMP-8	348,43 ± 405,25	285,61 ± 224,17	0,888
PGE2	189,75 ± 426,06	205,59 ± 361,37	0,745

Tab.14 Mittelwerte (± Standardabweichung) und p-Werte von MMP-8 und PGE2 bei Nichtbesiedlung/Besiedlung mit dem Keim AA

Die Expression von MMP-8 war bei den Patienten, bei denen ein positiver Nachweis von *A. actinomycetemcomitans* vorlag (285,61 ng/ml) im Gegensatz zu denen, bei denen *A. actinomycetemcomitans* nicht nachweisbar war (348,43 ng/ml) nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,888$). PGE2 zeigte ebenso weder bei den Patienten ohne Infektion durch *A. actinomycetemcomitans* (189,75 pg/ml), noch bei denen mit positivem Nachweis von *A. actinomycetemcomitans* (205,59 pg/ml) signifikante Unterschiede in der Expression ($p = 0,745$) (Tab.14).

4.4.2 Expression von MMP-8 und PGE2 in Abhängigkeit einer Infektion durch *P. gingivalis*

	PG-	PG+	p-Wert
MMP-8	250,53 ± 263,63	372,88 ± 412,40	0,066
PGE2	216,53 ± 384,96	182,76 ± 426,26	0,786

Tab.15 Mittelwerte (± Standardabweichung) und p-Werte von MMP-8 und PGE2 bei Nichtbesiedlung/Besiedlung mit dem Keim PG

Die Expression von MMP-8 war bei Patienten, bei denen ein Nachweis von *P. gingivalis* vorlag (372,88 ng/ml) im Gegensatz zu denen, bei denen *P.*

gingivalis nicht nachweisbar war (250,53 ng/ml) nicht signifikant erhöht ($p = 0,066$).

PGE2 zeigte ebenso weder bei den Patienten ohne Infektion durch *P. gingivalis* (216,53 pg/ml), noch bei denen mit positivem Nachweis von *P. gingivalis* (182,76 pg/ml) signifikante Unterschiede in der Expression ($p = 0,786$) (Tab.15).

4.4.3 Expression von MMP-8 und PGE2 in Abhängigkeit einer Infektion durch *T. denticola*

	TD-	TD+	p-Wert
MMP-8	337,69 ± 424,79	335,57 ± 341,54	0,917
PGE2	204,65 ± 341,98	183,91 ± 461,21	0,826

Tab.16 Mittelwerte (\pm Standardabweichung) und p-Werte von MMP-8 und PGE2 bei Nichtbesiedlung/Besiedlung mit dem Keim TD

Die Expression von MMP-8 war bei den Patienten, bei denen ein Nachweis von *T. denticola* vorlag (335,57 ng/ml) im Gegensatz zu denen, bei denen *T. denticola* nicht nachweisbar war (337,69 ng/ml) nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,917$).

PGE2 zeigte ebenso weder bei den Patienten, bei denen *T. denticola* nicht nachweisbar war (204,65 pg/ml), noch bei denen mit positivem Nachweis von *T. denticola* (183,91 pg/ml) signifikante Unterschiede in der Expression ($p = 0,826$) (Tab.16).

4.4.4 Expression von MMP-8 und PGE2 in Abhängigkeit einer Infektion durch *T. forsythia*

	TF-	TF+	p-Wert
MMP-8	315,39 ± 376,79	386,19 ± 379,13	0,331
PGE2	186,41 ± 300,29	207,84 ± 607,53	0,546

Tab.17 Mittelwerte (± Standardabweichung) und p-Werte von MMP-8 und PGE2 bei Nichtbesiedlung/Besiedlung mit dem Keim TF

Bei den Patienten, bei denen *T. forsythia* nicht nachweisbar war, war kein signifikanter Unterschied in der Expression von MMP-8 (315,39 ng/ml) im Gegensatz zu denen, bei denen *T. forsythia* nachweisbar war (386,19 ng/ml) festzustellen ($p = 0,331$).

Die Expression von PGE2 war bei den Patienten, bei denen ein Nachweis von *T. forsythia* gelang (207,84 pg/ml) im Gegensatz zu denen, bei denen *T. forsythia* nicht nachweisbar war (186,41 pg/ml) ebenso nicht signifikant erhöht ($p = 0,546$) (Tab.17).

4.4.5 Expression von MMP-8 und PGE2 in Abhängigkeit einer Infektion durch *P. intermedia*

	PI-	PI+	p-Wert
MMP-8	346,74 ± 402,53	305,63 ± 293,12	0,674
PGE2	217,43 ± 471,57	118,11 ± 100,10	0,598

Tab.18 Mittelwerte (± Standardabweichung) und p-Werte von MMP-8 und PGE2 bei Nichtbesiedlung/Besiedlung mit dem Keim PI

Bei den Patienten, bei denen *P. intermedia* nicht nachweisbar war, war kein signifikanter Unterschied in der Expression von MMP-8 (346,74 ng/ml) im Gegensatz zu denen, bei denen *P. intermedia* nachweisbar war (305,63 ng/ml) festzustellen ($p = 0,674$).

Auch PGE2 zeigte weder bei den Patienten, bei denen *P. intermedia* nicht

nachweisbar war (217,43 pg/ml), noch bei denen mit positivem Nachweis von *P. intermedia* (118,11 ng/ml) signifikante Unterschiede in der Expression ($p = 0,598$) (Tab.18).

4.4.6 Expression von MMP-8 und PGE2 in Abhängigkeit einer Infektion durch *P. micra*

	PM-	PM+	p-Wert
MMP-8	329,49 ± 421,27	346,97 ± 303,29	0,217
PGE2	242,87 ± 521,01	116,44 ± 101,45	0,378

Tab.19 Mittelwerte (± Standardabweichung) und p-Werte von MMP-8 und PGE2 bei Nichtbesiedlung/Besiedlung mit dem Keim PM

Bei den Patienten, bei denen *P. micra* nicht nachweisbar war, war kein signifikanter Unterschied in der Expression von MMP-8 (329,49 ng/ml) im Gegensatz zu denen, bei denen *P. micra* nachweisbar war (346,97 ng/ml) festzustellen ($p = 0,217$).

Auch in der Expression von PGE2 war kein signifikanter Unterschied ($p = 0,378$) bei den Patienten, bei denen *P. micra* nicht nachweisbar war (242,87 pg/ml) und bei denen mit positivem Nachweis von *P. micra* (116,44 pg/ml) festzustellen (Tab.19).

4.4.7 Expression von MMP-8 und PGE2 in Abhängigkeit einer Infektion durch *F. nucleatum*

	FN-	FN+	p-Wert
MMP-8	315,67 ± 343,09	343,62 ± 390,01	0,433
PGE2	315,39 ± 737,54	150,89 ± 200,56	0,266

Tab.20 Mittelwerte (± Standardabweichung) und p-Werte von MMP-8 und PGE2 bei Nichtbesiedlung/Besiedlung mit dem Keim FN

MMP-8 zeigte weder bei den Patienten ohne Nachweis von *F. nucleatum* (315,67 ng/ml), noch bei denen mit positivem Nachweis von *F. nucleatum* (343,62 ng/ml) signifikante Unterschiede in der Expression ($p = 0,433$).

Auch die Expression von PGE2 war bei den Patienten, bei denen kein Nachweis von *F. nucleatum* vorlag (315,39 pg/ml) im Gegensatz zu denen, bei denen *F. nucleatum* nachweisbar war (150,89 pg/ml) nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,266$) (Tab.20).

4.5 Multivariate Analyse

Korrelationen nach Spearman-Rho	PA-Stadium	Vorhandene Zahnanzahl	Knochenverlust	Rauchen	PGE2 Speichel pg/nm	MMP-8 Speichel ng/ml
PA-Stadium	1	-0,267**	0,670**	0,295**	0,029	-0,023
Vorhandene Zahnanzahl	-0,267**	1	-0,251**	-0,078	0,049	0,050
Knochenverlust	0,670**	-0,251**	1	0,261**	0,031	0,036
Rauchen	0,295**	-0,078	0,261**	1	0,013	-0,117
PGE2 Speichel pg/nm	0,029	0,049	0,031	0,013	1	0,451**
MMP-8 Speichel ng/ml	-0,023	0,050	0,036	-0,117	0,451**	1
AA	-0,024	0,133	-0,141	0,023	-0,025	0,011
PG	-0,003	-0,055	0,042	-0,082	0,021	0,142
FN	0,075	-0,040	0,054	-0,028	-0,086	0,061
PI	0,044	-0,060	-0,007	0,027	-0,041	-0,033
TF	-0,007	0,009	0,035	0,108	0,047	0,075
PM	0,005	-0,063	-0,028	-0,034	-0,068	0,096
TD	0,022	0,067	-0,119	0,042	0,017	0,008

Tab.21 Korrelationen nach Spearman-Rho Teil1

Es ist eine mittelstarke, hochsignifikante Korrelation (0,670**) zwischen den Parameter PA-Stadium und Knochenverlust feststellbar. Die mittleren Werte von PGE2 und MMP-8 weisen eine mittelstarke, hochsignifikante Korrelation (0,451**) zueinander auf. Der Parameter Rauchen weist eine schwache, hochsignifikante Korrelation zu den Parametern PA-Stadium (0,295**) und Knochenverlust (0,261**) auf. Eine schwach negative, hochsignifikante Korrelation (-0,267**) ist zwischen den Mittelwerten der Parameter PA-Stadium und der Anzahl vorhandener Zähne feststellbar. Zwischen den Mittelwerten der Anzahl vorhandener Zähne und dem Knochenverlust ist

ebenso eine schwach negative, hochsignifikante Korrelation (-0,251**) nachweisbar (Tab.21).

Korrelationen nach Spearman-Rho	AA	PG	FN	PI	TF	PM	TD
AA	1	0,047	0,181 [*]	0,073	0,019	0,098	0,083
PG	0,047	1	0,355 ^{**}	0,130	0,077	0,026	0,249 ^{**}
FN	0,181 [*]	0,355 ^{**}	1	0,121	-0,031	0,126	0,220 ^{**}
PI	0,073	0,130	0,121	1	0,289 ^{**}	0,173 [*]	0,332 ^{**}
TF	0,019	0,077	-0,031	0,289 ^{**}	1	0,343 ^{**}	0,273 ^{**}
PM	0,098	0,026	0,126	0,173 [*]	0,343 ^{**}	1	0,005
TD	0,083	0,249 ^{**}	0,220 ^{**}	0,332 ^{**}	0,273 ^{**}	0,005	1

Tab.22 Korrelationen nach Spearman-Rho Teil 2

Die Erfassung der mittleren Werte der parodontalpathogenen Bakterien zeigte untereinander folgende Korrelationen: *A. actinomycetemcomitans* weist eine schwache, signifikante Korrelation (0,181*) zu *F. nucleatum* auf. *P. gingivalis* zeigt eine mittelstarke, hochsignifikante Korrelation (0,355**) zu *F. nucleatum* und eine schwache, hochsignifikante Korrelation (0,249**) zu *T. denticola*. *F. nucleatum* zeigt eine schwache, hochsignifikante (0,220**) Korrelation zu *T. denticola*.

Bei der Analyse von *P. intermedia* ist eine schwache, hochsignifikante Korrelation (0,289**) zu *T. forsythia*, eine schwache, hochsignifikante Korrelation (0,173*) zu *P. micra* und eine mittelstarke, hochsignifikante Korrelation (0,332**) zu *T. denticola* nachweisbar. *T. forsythia* weist eine mittelstarke, hochsignifikante Korrelation (0,343**) zu *P. micra* und eine schwache, hochsignifikante Korrelation (0,273**) zu *T. denticola* auf (Tab.22).

5 Diskussion

5.1 Methoden

5.1.1 Auswahl der Studienpopulation

Es wurden 162 Patienten aus der Zahnklinik der LMU München in die Studie aufgenommen. Eine Differenzierung zwischen chronischer und aggressiver Parodontitis wurde hierbei nicht vorgenommen. Es wurde zwischen Rauchern und Nichtrauchern unterschieden. Ebenso wurden die Patienten in verschiedene ethnische Gruppen und nach dem Geschlecht eingeteilt, um Wechselwirkungen zwischen den Markermolekülen und Risikofaktoren für die Parodontitis testen zu können. Albandar und Rams wiesen auf den ethnischen Bezug der Parodontitis zu Individuen afrikanisch, spanisch und asiatisch genetischer Herkunft hin (Albandar & Rams, 2002). Salvi et al. und Kinane und Chestnutt hoben die Bedeutung von Rauchen bei der Entstehung der chronischen Parodontitis hervor und Deschner wies auf ein höheres Parodontitisrisiko von Rauchern und ehemaligen Rauchern hin (Deschner, 2014; Kinane & Chestnutt, 2000; Salvi et al., 1997). Auch das Geschlecht und das Alter spielen laut DMS V (2014) bei der Entstehung von Parodontitis eine Rolle, was von Jordan und Micheelis in einer Studie bezogen auf die jeweiligen Altersgruppen eindeutig belegt werden konnte (Jordan & Micheelis, 2016).

Um diese möglichen Einflüsse auf das Ergebnis mit zu beurteilen, wurden alle Patienten unabhängig von den Begleitmerkmalen statistisch erfasst und ausgewertet. Die Anteile der Patienten asiatischer und arabischer Herkunft waren jedoch so gering, dass eine valide statistische Aussagekraft zum Einfluss der ethnischen Abstammung auf die Expression der Markermoleküle nicht sicher möglich war.

Trotz gewissenhafter standardisierter Patientenbefragung durch die Untersucher sind Falschangaben durch die Patienten zu ihren Rauchgewohnheiten nicht ausgeschlossen. Sicherheit über das tatsächliche Rauchverhalten könnten z.B. Coitinin-Tests geben (Costa et al., 2010).

Es ist erwiesen, dass durch Scaling die Konzentration von MMP-8 in der Sulkusflüssigkeit signifikant zurückgeht, das haben Sorsa et al. in einer Studie mit 15 Patienten alle 2 Monate über einen Zeitraum von insgesamt 12 Monaten getestet (Sorsa et al., 2010). Ob sich die Patienten der hier vorliegenden Kohorte zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits einer vorangegangenen Parodontitistherapie unterzogen haben, die Einfluss auf die gemessenen MMP-8 und PGE2 Werte gehabt haben könnte, kann durch Befragung ebenfalls nicht sicher evaluiert werden. Folglich wäre es möglich, dass die hier gemessenen MMP-8 und PGE2 Konzentrationen verfälscht sind. Die in der DMS V (2014) bei der Betrachtung des Parodontitisrisikos durchgeführte Trennung nach Geschlechtern wurde in dieser Studie ebenso angewandt und somit die Analyse der Ergebnisse für die Population, sowie die Subpopulationen durch weibliche und männliche Individuen vorgenommen.

5.1.2 Sulkusflüssigkeit als Nachweismedium

In der vorliegenden Studie diente die Sulkusflüssigkeit als Medium zum Nachweis der Entzündungsfaktoren MMP-8 und PGE2 und von bakterieller DNA zur Detektion von parodontalpathogenen Bakterien. Die Analyse von Sulkusflüssigkeit ist eine nicht invasive Methode zur Analyse pathologischer Vorgänge im marginalen Parodont und stellte sich im Rahmen dieser Studie als geeignete Methode dar (Uitto et al., 2003).

Die Probenentnahme zur Gewinnung von Sulkusflüssigkeit mittels steriler Papierspitzen zum Nachweis der Bakterien und GCF-/PISF-Streifen zur Bestimmung der MMP-8 und PGE2 Konzentrationen durch die verschiedenen Behandler hatte den Vorteil einer einfachen Handhabung, zeitsparender Untersuchung und kurzer Einarbeitungszeit in einen standardisierten Ablauf. Ein weiterer Vorteil dieser gut reproduzierbaren Methode ist, dass nur die äußere Schicht des subgingivalen, auf der Zahnwurzeloberfläche adhärierenden Biofilms absorbiert wird, die den vorwiegenden Anteil parodontalpathogener Bakterien enthält (Renvert et al., 1992; Socransky &

Haffajee, 2002; Socransky et al., 1998). Zur Vereinheitlichung bei der Taschentiefenmessung, die durch zahlreiche unterschiedliche Studenten durchgeführt wurde, erfolgte die Nachkontrolle der Messwerte durch einen betreuenden Kursassistenten. Fehlerquoten sind dennoch nicht ausgeschlossen, da es bei der Verwendung druckgeeichter Sonden weniger falsch positive Ergebnisse gibt (Mayfield et al., 1996). Die Entnahme der Sulkusflüssigkeit erfolgte mittels Papierspitzen und GCF-/PISF-Streifen durch multiple Behandler im Studentenkurs, weshalb sie möglicherweise, trotz gründlicher Einweisung in die Methode, nicht ganz einheitlich durchgeführt wurde. Um Fehler bei der Entnahme zu minimieren wurden die Proben jedes Patienten gepoolt.

Die alternative Methode der Kürettage parodontaler Taschen zur Gewinnung subgingivaler Plaque wurde als invasiver Eingriff hier nicht in Erwägung gezogen, da schon die Probeentnahme durch Küretten als Therapiemaßnahme die Keimflora sowie das Level von MMP-8 und PGE2 verfälschen könnte und somit die Untersuchung für prospektive Studien beeinflussen würde. Außerdem gelangt man mit Papierspitzen leichter und zuverlässiger in tiefe, für Küretten nicht zuverlässig erreichbare Taschenbereiche (Geibel & Gleissner, 2007; Mantyla et al., 2006).

5.1.3 Nachweis laborchemischer Parameter

In der vorliegenden Studie wurden die parodontalpathogenen Bakterien mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) detektiert. Anhand der PCR ist es möglich, nahezu jedes bekannte Bakterium nachzuweisen (Chen & Slots, 1999; Zambon & Haraszthy, 1995). Diese Methode ist auch bei Bakterien anwendbar, die schwer kultivierbar sind (Choi et al., 1994). Die Kultivierung bietet zwar die Möglichkeit, die Vitalität und Proliferationsfähigkeit der angezüchteten Spezies zu beurteilen, zum Nachweis anaerober Bakterien ist diese Methode allerdings unzuverlässig, da die Kulturbedingungen, wie die Vermeidung von für diese Bakterien tödlichem Sauerstoff, während aller Schritte, von der Probenentnahme bis zur Auswertung der Ergebnisse, nicht

sicher gewährleistet sind (Renvert et al., 1992; Stelzel, 2003), wodurch eine erhöhte Rate falsch negativer Ergebnisse resultieren kann. Anhand der Dunkelfeldmikroskopie können nur morphologische Eigenschaften, wie die Zellform und Beweglichkeit von Bakterien nachgewiesen werden, weshalb diese Methode für die mikrobiologische Diagnostik in der Parodontologie nicht geeignet ist (Listgarten et al., 1989).

Zum Nachweis der Entzündungsmediatoren MMP-8 und PGE2 in der entnommenen Sulkusflüssigkeit bediente man sich in der vorliegenden Studie der Methode des Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA), einem immunologischen Nachweisverfahren. Dieses Verfahren gilt als sehr sensitive und hochspezifische Methode und erwies sich als geeignet (Ferner et al., 1987; Lottspeich & Zorbas, 1998; Takahashi et al., 1986; Takimoto et al., 2008). Immunoblotting ist eine sehr arbeitsintensive und zeitaufwendige Alternative, weswegen sie bei hohen Anzahlen von Patientenproben weniger geeignet erscheint. Außerdem hat Immunoblotting für quantitative Analysen keine ausreichende Aussagekraft (Uitto et al., 2003).

5.2 Expression der Markermoleküle

5.2.1 Einfluss bakterieller Infektion auf die Expression von MMP-8

Im Gegensatz zu einer Studie von Hernandez-Rios et al. wurde in der hier vorliegenden Studie kein signifikanter Zusammenhang zum Vorkommen von *P. gingivalis* und der Expression von MMP-8 festgestellt. Allerdings fanden die Untersuchungen an Mäusen statt, was ein Grund für den fehlenden Zusammenhang in der hier vorliegenden Studie sein könnte (Hernandez-Rioz et al., 2016).

Anders als in der hier vorliegenden Studie stellten Claesson et al. eine positive Korrelation zwischen der Infektion durch *A. actinomycetemcomitans* und der Expression von MMP-8 fest. Es wurde postuliert, dass diese Beobachtung im wesentlichen durch die Expression von Leukotoxin durch *A. actinomycetemcomitans* ausgelöst wird (Claesson et al., 2002). Es ist

bekannt, dass neutrophile Granulozyten die Hauptquelle von MMP8 sind, jedoch kann das Protein auch durch andere Zellen exprimiert werden (Cole A. A., 1996; Hanemaaijer R., 1997; Salo, 2000). Leukotoxin als wichtiger bakterieller Virulenzfaktor ermöglicht es dem Bakterium, der lokalen Immunabwehr durch Lysieren der neutrophilen Granulozyten zu entgehen und dadurch MMP-8 freizusetzen (Fives-Taylor et al., 1999). Die zytolytische Eigenschaft von Leukotoxin gegen neutrophile Granulozyten wurde von Claesson et al. allerdings nur an menschlichem Blut untersucht (Claesson et al., 2002), was ein Grund dafür sein könnte, dass in der hier vorliegenden Arbeit kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von MMP-8 in Sulusflüssigkeit und dem Vorkommen von *A. actinomycetemcomitans* gefunden werden konnte.

Bei Patienten mit positivem Nachweis von *T. denticola* zeigte sich im Gegensatz zu Patienten ohne Nachweis von *T. denticola* kein signifikanter MMP-8-Anstieg. Yakob et al. allerdings stellten einen signifikanten Zusammenhang des positiven Nachweises von *T. denticola* mit einem Anstieg von MMP-8 in Sulkusflüssigkeit dar. Die Detektion von *T. denticola* erfolgte hier ebenfalls mittels PCR, MMP-8 wurde anhand eines immunfluorometrischen Assays (IFMA) nachgewiesen (Yakob et al., 2013). Trotz ähnlicher Voraussetzungen bezüglich des Probandenalters, der Probandenanzahl und der Labormethoden konnte in der hier vorliegenden Studie kein signifikanter Unterschied bezüglich des Vorkommens von *T. denticola* und der Expression von MMP-8 festgestellt werden.

In der vorliegenden Studie konnte bei keinem der pathogenen Bakterien *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *T. forsythia* oder *P. micra* ein signifikanter Zusammenhang mit der Expression von MMP-8 in Sulkusflüssigkeit festgestellt werden. Bisherige Studien untersuchten zwar den Zusammenhang von *F. nucleatum* mit der Expression von anderen MMPs, nicht jedoch mit der von MMP-8. Gursoy et al. stellten einen Zusammenhang mit dem Vorkommen von *F. nucleatum* aus Epithelzellen und der Expression von MMP-2, MMP-9 und MMP-13 dar, MMP-8 wurde nicht untersucht (Gursoy et al., 2008). Auch Mahtout et al. fanden einen Zusammenhang von *F. nucleatum* in menschlichen Epithelzellen und der Expression von MMP-9. Dabei wurde festgestellt, dass *F. nucleatum* fähig ist, an ein Komplement-

Regulatorprotein (CD 46) zu binden, das sich auf der Oberfläche von Epithelzellen befindet. Die Interaktion von *F. nucleatum* mit CD 46 scheint zu einem Anstieg von MMPs in Parodontaltaschen zu führen (Mahtout et al., 2011). Aufgrund dieses speziell auf gingivale Epithelzellen zutreffenden Mechanismus kann kein Vergleich zu einem anderen Medium, wie im Fall der hier vorliegenden Studie zur Sulkusflüssigkeit, gezogen werden.

Guan et al. stellten zwar eine erhöhte Expression von MMP-8 bei Vorhandensein von *P. intermedia* dar, allerdings wurde die Untersuchung anhand von Desmodont menschlicher extrahierter Prämolaren durchgeführt, nicht jedoch in Sulkusflüssigkeit. Das Desmodont wurde dabei vom mittleren Drittel der Wurzeloberfläche abgeschabt (Guan et al., 2009). Im apikalen Drittel lässt sich noch eine gewisse Mischung aus Zellen vermuten, die der Zusammensetzung der Sulkusflüssigkeit, einem entzündlichen zellhaltigen Exsudat, ähnlich sein könnte. Das mittlere Drittel des Desmodonts enthält wesentlich weniger verschiedene Zellen, weshalb ein Vergleich mit den Eigenschaften der Sulkusflüssigkeit nicht sinnvoll erscheint, was der Grund für die unterschiedlichen Resultate aus der hier vorliegenden Studie und der Studie von Guan et al. sein könnte.

Der positive Nachweis von *T. forsythia* konnte von Bodet et al. bisher zwar mit einem Anstieg von MMP-9 in Sulkusflüssigkeit, nicht jedoch mit einer erhöhten Expression von MMP-8 in Zusammenhang gebracht werden. Bodet et al. führten ihre Untersuchung in vitro in Form einer gemeinsamen Kultivierung aus Epithel-ähnlichen Zellen und Makrophagen-ähnlichen Zellen durch, somit ist auch wieder ein anderes Verfahren als in der hier vorliegenden Studie angewendet worden (Bodet et al., 2006a).

Zum Zusammenhang des Vorkommens von *P. micra* und der Expression von MMP-8 liegen bisher keine Untersuchungen vor.

5.2.2 Einfluss bakterieller Infektion auf die Expression von PGE2

Anders als in den Untersuchungen von Noguchi et al. konnte in der hier vorliegenden Studie kein signifikanter Zusammenhang von *A. actinomycetemcomitans* mit der Expression von PGE2 nachgewiesen werden. Allerdings wurde die Synthese von PGE2 dort nicht in Sulkusflüssigkeit, sondern in menschlichen gingivalen Epithelzellen (> 99% Keratinozyten) mittels Zellkultur analysiert. Durch das Verfahren der Zellkultur sind Epithelzellen viel unmittelbarer dem *A. actinomycetemcomitans* exponiert (Noguchi et al., 2003). Im klinischen Vergleich dazu ist anzunehmen, dass nur ein deutlich kleinerer Anteil der Epithelzellen einer Infektion durch *A. actinomycetemcomitans* ausgesetzt ist. Die in der hier vorliegenden Studie untersuchte Sulkusflüssigkeit, ein Filtrat des Plasmas, enthält zudem nicht nur Saume epithelzellen, sondern auch Fibroblasten, Endothelzellen und viele andere Zellen, weshalb ein Vergleich mit der Studie von Noguchi et al. nur eingeschränkt möglich ist. Desweiteren haben Noguchi et al. den Anstieg der PGE2-Expression ausschließlich nach Exposition gegenüber *A. actinomycetemcomitans* Serotyp b gemessen (Noguchi et al., 2003), von dem angenommen wird, dass er besonders mit der aggressiven Form der Parodontitis vergesellschaftet ist (Yang et al., 2004). Aufgrund dieser Annahme kann es sein, dass in der hier vorliegenden Studie eine Verfälschung vorliegt, da wir nicht zwischen Probanden, die an einer chronischen und denen die an einer aggressiven Parodontitis erkrankt waren unterschieden haben, wodurch sich die fehlende Assoziation von *A. actinomycetemcomitans* für PGE2 erklären könnte.

Auch bezüglich des positiven Nachweises von *P. gingivalis* und der Stimulation der PGE2-Produktion konnte in der hier vorliegenden Studie im Gegensatz zu den vorangegangenen Untersuchungen von Sismey-Durrant und Hopps, sowie Bodet et al. kein direkter Zusammenhang gefunden werden. Sismey-Durrant und Hopps beschrieben dabei die Eigenschaft des Lipopolysaccharids von *P. gingivalis*, PGE2 aus menschlichen gingivalen Fibroblasten freizusetzen. Die Fibroblasten wurden mittels Zellkultur analysiert (Sismey-Durrant & Hopps, 1991), so dass auch wieder, wie bereits oben beschrieben, aufgrund der unterschiedlichen Verfahren zu der hier

vorliegenden Studie kein unmittelbarer Vergleich gezogen werden kann. Bodet et al. führten ihre Untersuchung ebenfalls nicht anhand von Sulkusflüssigkeit, sondern an menschlichem Vollblut durch und analysierten die durch *P. gingivalis* stimulierte Expression von PGE2. Sie fanden dabei eine Abhängigkeit mit der Höhe der Infektionsdosis und dem Stamm von *P. gingivalis* (Bodet et al., 2006b).

Ein Zusammenhang mit dem Vorkommen von *T. denticola* in Sulkusflüssigkeit und der Expression von PGE2 konnte in der hier vorliegenden Studie nicht festgestellt werden. In einer Studie von Kim et al. wurde dieser Zusammenhang nur am Tiermodell anhand von Knochenmark aus Mäusen und nicht in Sulkusflüssigkeit beobachtet. Osteoblasten wurden mit Td92, einem an der Oberfläche von *T. denticola* befindlichen *outer-membrane-Protein*, stimuliert. Dabei konnte ein Anstieg der Expression von PGE2 gemessen werden. Die Ergebnisse legen nahe, dass Td92 die Bildung von Osteoklasten durch die Regulation von RANKL über einen PGE2-abhängigen Mechanismus fördert (Kim et al., 2010).

Es konnte in der vorliegenden Studie auch keine signifikante Korrelation zwischen dem Vorkommen von *F. nucleatum* und der Expression von PGE2 nachgewiesen werden. Bisher existieren noch keine Studien, die den Zusammenhang von *F. nucleatum* und der Expression von MMP-8 untersuchen.

In der vorliegenden Studie konnte weder bei *P. intermedia*, noch bei *T. forsythia* oder bei *P. micra* ein signifikanter Zusammenhang mit der Expression von PGE2 in Sulkusflüssigkeit festgestellt werden. Wie bereits oben erwähnt, untersuchten Guan et al. die Expression von Entzündungsmarkern bei positivem Nachweis von *P. intermedia*, dabei stellten sie auch die erhöhte Expression von PGE2 dar. Die Untersuchung wurde allerdings, wie schon zuvor beschrieben, anhand von Desmodont menschlicher extrahierter Prämolaren durchgeführt, nicht jedoch in Sulkusflüssigkeit (Guan et al., 2011). In ihrer Untersuchung erforschten Airila-Mansson et al. den Zusammenhang eines signifikant erhöhten PGE2-Spiegels bei positivem Nachweis von *T. forsythia*. Die Expression von PGE2 war besonders dann erhöht, wenn die Bakterien *T. forsythia* und *P. gingivalis* gemeinsam nachgewiesen wurden (Airila-Mansson et al., 2006). In der hier vorliegenden Studie war keine

positive Korrelation zwischen diesen beiden Bakterien feststellbar, was ein Grund für die fehlende Assoziation von *T. forsythia* und der Expression von PGE2 sein könnte.

5.2.3 Einfluss des Geschlechts auf die Expression von MMP-8 und PGE2

In der vorliegenden Studie waren bei der Analyse der Expression der Markermoleküle in Abhängigkeit vom Geschlecht in den einzelnen Parodontitisstadien keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Es liegen bisher keine weiteren Untersuchungen zum Verhalten der Expression von MMP-8 und PGE2 in Bezug auf das Geschlecht vor. Man könnte aber vermuten, dass die Expression von PGE2 besonders bei Frauen im schweren Parodontitisstadium erhöht ist. Laut der EPOS Studie leiden etwa 15% der postmenopausalen Frauen im Alter von 50-60 Jahren unter Osteoporose, im Alter von mehr als 70 Jahren steigt das Risiko auf 45% an. Im Gegensatz dazu ist die Knochendichte bei nur 2,4% der 50-60 jährigen Männer und bei 17% der Männer ab 70 Jahren erniedrigt (Scheidt-Nave et al., 2014). Osteoporose ist also eine typische Alterskrankheit, bei der vor allem Frauen aufgrund des Östrogenmangels während und nach der Menopause betroffen sind. Bei der Osteoporose besteht, wie auch bei der Parodontitis ein relativer Knochenmangel. Da PGE2 durch die Aktivierung von Osteoklasten generell bei Knochenabbauvorgängen beteiligt ist (Inada et al., 2006), ist es denkbar, dass dieser PGE2-Anstieg deshalb auch bei Frauen im schweren Parodontitisstadium deutlicher zu beobachten und in der Sulkusflüssigkeit messbar ist.

5.2.4 Zusammenhang mit dem Rauchverhalten

Um genauer differenzieren zu können, ob MMP-8 und PGE2 geeignete Indikatoren zur Parodontaldiagnostik sind und in welchen Untergruppen dies besonders zutreffend ist, wurde eine weitere Analyse in Bezug auf das Rauchverhalten durchgeführt. Der Spiegel an MMP-8 in Sulkusflüssigkeit ist ein aussagekräftiger Entzündungsmarker im Verlauf der Parodontitis, ebenso wie ein erhöhter PGE2-Spiegel in der Sulkusflüssigkeit für eine Entzündung im Parodontium spricht und mit Knochenabbau korreliert (Offenbacher et al., 1981; Uitto et al., 2003).

In der hier vorliegenden Studie konnte weder in der Expression von MMP-8 noch in der von PGE2 ein signifikanter Zusammenhang mit dem Rauchverhalten festgestellt werden. Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zu den Beobachtungen von Soder, welcher einen Anstieg sowohl von MMP-8, als auch von PGE2 bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern in der Sulkusflüssigkeit gemessen hatte, obwohl das Verhältnis der Probanden von Nichtrauchern und Rauchern wie in der hier vorliegenden Studie gleich war (Soder, 1999). Mantyla et al. beobachteten allerdings einen erhöhten Spiegel von MMP-8 bei Nichtrauchern verglichen mit Rauchern (Mantyla et al., 2006). Da bei Rauchern die gingivalen Bereiche schlechter durchblutet sind (Bergstrom & Preber, 1986; Dietrich et al., 2004; Raupach et al., 2006), ist anzunehmen, dass auch aufgrund der schlechteren Perfusion die Immunantwort verringert ist. Die Manifestation der Immunantwort führt normalerweise zur Abgabe von Zytokinen, welche die Gingivazellen zur Synthese von Entzündungsfaktoren veranlassen, die in der Sulkusflüssigkeit nachgewiesen werden können (Birkedal-Hansen et al., 1984; Heath et al., 1987; Meikle et al., 1989; Takada et al., 1991).

6 Zusammenfassung

Anzeichen wie erhöhte Sondierungstiefen und Knochenabbau zeigen klinisch die Manifestation einer Parodontitis an. Mittlerweile gibt es Schnelltests, die den Biomarker MMP-8 im Speichel messen können. Anhand hoher MMP-8 Werte im Speichel soll es möglich sein, parodontalen Gewebeabbau zu erkennen, noch bevor es klinische Anzeichen dafür gibt.

Im Rahmen dieser Studie sollte untersucht werden, ob die Entzündungsmarker MMP-8 und PGE2 zur Identifikation des Schweregrads einer Parodontitis herangezogen werden können. Neben der Korrelation mit den klinischen Parametern wurde untersucht, ob die Expression von MMP-8 und PGE2 in der Sulkusflüssigkeit in Zusammenhang mit der Infektion parodontaler Taschen durch die pathogenen Bakterien *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *T. forsythia*, *P. micra*, *T. denticola* und *P. intermedia* steht. Des Weiteren wurde analysiert, ob geschlechterspezifische sowie durch den Risikofaktor Rauchen hervorgerufene Einflüsse zu einer veränderten Expression von MMP-8 und PGE2 in der Sulkusflüssigkeit führen.

An der Studie nahmen 162 Personen teil, die Auswahl der Probanden erfolgte unabhängig von deren Geschlecht und deren ethnischer Abstammung. Die gingivale Sulkusflüssigkeit zum Nachweis der parodontalpathogenen Bakterien und der Entzündungsfaktoren wurde mittels steriler Papierspitzen entnommen und im Labor weiterverarbeitet. Die Detektion und quantitative Bestimmung der Bakterien und Entzündungsfaktoren erfolgte durch PCR und ELISA mit anschließender photometrischer Messung und Auswertung. Der Verlust an Alveolarknochenhöhe, sowie die zum Zeitpunkt der Röntgenaufnahme vorhandene Zahnzahl und der Schweregrad der Parodontitis wurden anhand von radiologischen Darstellungen beurteilt und dokumentiert. Die Einflussgrößen Geschlecht und ethnische Abstammung, sowie die Angabe des Rauchverhaltens wurden anamnestisch erhoben.

In der Gesamtpopulation und auch geschlechterspezifisch, sowie bei Rauchern konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expression von MMP-8 und PGE2 festgestellt werden.

Bei der Untersuchung, ob der Nachweis der oben genannten parodontal-

pathogenen Bakterien zur erhöhten Expression von MMP-8 und PGE2 führt, gab es keinen signifikanten Zusammenhang. Jedoch konnte eine hochsignifikante Korrelation zwischen den beiden Entzündungsfaktoren MMP-8 und PGE2 festgestellt werden, sodass bei einem positiven Nachweis von MMP-8 mittels eines Schnelltests von einer erhöhten Expression von PGE2 ausgegangen werden kann.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie keine ausreichend sichere Assoziation der Expression der Markermoleküle MMP-8 und PGE2 mit der Stärke der klinischen Ausprägung einer marginalen Parodontitis gefunden werden.

7 Abkürzungsverzeichnis

AA	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
AAP	American Academy of Periodontology
BspA	Bacteroides Surface Protein A
COX	Cyclooxygenase
DIL	Dilution
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FN	Fusobacterium nucleatum
GCF	Gingival Crevicular Fluid
H ₂ O	Wasser
HBA _{1c}	Glykohämoglobin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IL	Interleukin
MGP	Magnetische Glaspartikel
MMP	Matrixmetalloproteinase
OMP	Outer Membrane Proteine
PA	Parodontitis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PG	Porphyromonas gingivalis
PGE	Prostaglandin
PGHS	Prostaglandinsynthase
PI	Prevotella intermedia
PISF	Periimplantäres Sulkusfluid
PM	Parvimonas micra
RANK(L)	Receptor activator of nuclear factor kappa-B (ligand)
rpm	Revolutions per minute
RTX	Repeats in Toxin
TD	Treponema denticola

TF	Tannerella forsythia
TIMP	Tissue Inhibitors of MMP
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor

8 Literaturverzeichnis

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*, 43(11), 5721-5732. doi: 10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005
- Airila-Mansson, S., Soder, B., Kari, K., & Meurman, J. H. (2006). Influence of combinations of bacteria on the levels of prostaglandin E2, interleukin-1beta, and granulocyte elastase in gingival crevicular fluid and on the severity of periodontal disease. *J Periodontol*, 77(6), 1025-1031. doi: 10.1902/jop.2006.050208
- Albandar, J. M., & Rams, T. E. (2002). Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontol 2000*, 29, 7-10.
- Aleksejuniene, J., Holst, D., Eriksen, H. M., & Gjermo, P. (2002). Psychosocial stress, lifestyle and periodontal health. *J Clin Periodontol*, 29(4), 326-335.
- Alfano, M. C. (1974). The origin of gingival fluid. *J Theor Biol*, 47(1), 127-136.
- Bachrach, G., Rosen, G., Bellalou, M., Naor, R., & Sela, M. N. (2004). Identification of a *Fusobacterium nucleatum* 65 kDa serine protease. *Oral Microbiol Immunol*, 19(3), 155-159. doi: 10.1111/j.0902-0055.2004.00132.x
- Beck, J. D., Koch, G. G., Rozier, R. G., & Tudor, G. E. (1990). Prevalence and risk indicators for periodontal attachment loss in a population of older community-dwelling blacks and whites. *J Periodontol*, 61(8), 521-528. doi: 10.1902/jop.1990.61.8.521
- Beck, J. D., Koch, G. G., Zambon, J. J., Genco, R. J., & Tudor, G. E. (1992). Evaluation of oral bacteria as risk indicators for periodontitis in older adults. *J Periodontol*, 63(2), 93-99. doi: 10.1902/jop.1992.63.2.93
- Bergstrom, J., & Preber, H. (1986). The influence of cigarette smoking on the development of experimental gingivitis. *J Periodontal Res*, 21(6), 668-676.
- Birkedal-Hansen, H. (1993). Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res*, 28(6 Pt 2), 500-510.
- Birkedal-Hansen, H., Taylor, R. E., Zambon, J. J., Barwa, P. K., & Neiders, M. E. (1988). Characterization of collagenolytic activity from strains of *Bacteroides gingivalis*. *J Periodontal Res*, 23(4), 258-264.
- Birkedal-Hansen, H., Wells, B. R., Lin, H. Y., Caufield, P. W., & Taylor, R. E. (1984). Activation of keratinocyte-mediated collagen (type I) breakdown by suspected human periodontopathogen. Evidence of a novel mechanism of connective tissue breakdown. *J Periodontal Res*, 19(6), 645-650.
- Bodet, C., Chandad, F., & Grenier, D. (2006a). Inflammatory responses of a macrophage/epithelial cell co-culture model to mono and mixed infections with *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*. *Microbes Infect*, 8(1), 27-35. doi: 10.1016/j.micinf.2005.05.015
- Bodet, C., Chandad, F., & Grenier, D. (2006b). *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammatory mediator profile in an ex vivo human whole blood model. *Clin Exp Immunol*, 143(1), 50-57. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02956.x
- Bodet, C., Chandad, F., & Grenier, D. (2007). [Pathogenic potential of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*, the red bacterial complex associated with periodontitis]. *Pathol Biol (Paris)*, 55(3-4), 154-162. doi: 10.1016/j.patbio.2006.07.045

-
- Bolstad, A. I., Jensen, H. B., & Bakken, V. (1996). Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev*, *9*(1), 55-71.
- Buduneli, E., Vardar-Sengul, S., Buduneli, N., Atilla, G., Wahlgren, J., & Sorsa, T. (2007). Matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and laminin-5 gamma2 chain immunolocalization in gingival tissue of endotoxin-induced periodontitis in rats: effects of low-dose doxycycline and alendronate. *J Periodontol*, *78*(1), 127-134. doi: 10.1902/jop.2007.050451
- Chen, C., & Slots, J. (1999). Microbiological tests for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000*, *20*, 53-64.
- Chi, B., Qi, M., & Kuramitsu, H. K. (2003). Role of dentilisin in *Treponema denticola* epithelial cell layer penetration. *Res Microbiol*, *154*(9), 637-643. doi: 10.1016/j.resmic.2003.08.001
- Choi, B. K., Paster, B. J., Dewhirst, F. E., & Gobel, U. B. (1994). Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis. *Infect Immun*, *62*(5), 1889-1895.
- Christgau, M., Palitzsch, K. D., Schmalz, G., Kreiner, U., & Frenzel, S. (1998). Healing response to non-surgical periodontal therapy in patients with diabetes mellitus: clinical, microbiological, and immunologic results. *J Clin Periodontol*, *25*(2), 112-124.
- Cimasoni, G. (1983). Crevicular fluid updated. *Monogr Oral Sci*, *12*, III-VII, 1-152.
- Claesson, R., Johansson, A., Belibasakis, G., Hanstrom, L., & Kalfas, S. (2002). Release and activation of matrix metalloproteinase 8 from human neutrophils triggered by the leukotoxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res*, *37*(5), 353-359.
- Cole A. A., C. S., Schumacher B. (1996). Chondrocyte Matrix Metalloproteinase-8. *J Biol Chem*, *271*(18), 11023-11026.
- Costa, P. P., Trevisan, G. L., Macedo, G. O., Palioto, D. B., Souza, S. L., Grisi, M. F., Novaes, A. B., Jr., & Taba, M., Jr. (2010). Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8, and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes. *J Periodontol*, *81*(3), 384-391. doi: 10.1902/jop.2009.090510
- Cutler, C. W., Arnold, R. R., & Schenkein, H. A. (1993). Inhibition of C3 and IgG proteolysis enhances phagocytosis of *Porphyromonas gingivalis*. *J Immunol*, *151*(12), 7016-7029.
- De Rycke, J., & Oswald, E. (2001). Cytotoxic distending toxin (CDT): a bacterial weapon to control host cell proliferation? *FEMS Microbiol Lett*, *203*(2), 141-148.
- Deschner, J. (2014). Risikofaktoren für die Entstehung und Progression von Parodontitiden. *PLAQUE N CARE*, *8*(2), 60-63.
- Deshpande, R. G., Khan, M. B., & Genco, C. A. (1998). Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, *66*(11), 5337-5343.
- Dietrich, T., Bernimoulin, J. P., & Glynn, R. J. (2004). The effect of cigarette smoking on gingival bleeding. *J Periodontol*, *75*(1), 16-22. doi: 10.1902/jop.2004.75.1.16
- Duarte, P. M., Neto, J. B., Casati, M. Z., Sallum, E. A., & Nociti, F. H., Jr. (2007). Diabetes modulates gene expression in the gingival tissues of patients with

-
- chronic periodontitis. *Oral Dis*, 13(6), 594-599. doi: 10.1111/j.1601-0825.2006.01348.x
- Dzink, J. L., Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (1988). The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, 15(5), 316-323.
- Ebersole, J. L. (2003). Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. *Periodontol 2000*, 31, 135-166.
- Eickholz, P. (2010). Glossar der Grundbegriffe für die Praxis Parodontologische Diagnostik Teil 5: PSI und Sondierungsparameter. *Quintessenz Journals*, 21(2), 177-187.
- Ellen, R. P., & Galimanas, V. B. (2005). Spirochetes at the forefront of periodontal infections. *Periodontol 2000*, 38, 13-32. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00108.x
- Ferner, W. T., Miskuff, R. L., Yolken, R. H., & Vonderfecht, S. L. (1987). Comparison of methods for detection of serum antibody to murine rotavirus. *J Clin Microbiol*, 25(8), 1364-1369.
- Fives-Taylor, P. M., Meyer, D. H., Mintz, K. P., & Brissette, C. (1999). Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol 2000*, 20, 136-167.
- Geibel, M.-A., & Gleissner, C. (2007). Probennahme für molekularbiologische Testverfahren. *Dtsch Zahnarztl Z*, 62(6), 414-419.
- Grenier, D. (1996). Degradation of host protease inhibitors and activation of plasminogen by proteolytic enzymes from *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. *Microbiology*, 142 (Pt 4), 955-961.
- Grenier, D., & Michaud, J. (1994). Demonstration of human immunoglobulin G Fc-binding activity in oral bacteria. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1(2), 247-249.
- Grenier, D., Uitto, V. J., & McBride, B. C. (1990). Cellular location of a *Treponema denticola* chymotrypsinlike protease and importance of the protease in migration through the basement membrane. *Infect Immun*, 58(2), 347-351.
- Griffen, A. L., Becker, M. R., Lyons, S. R., Moeschberger, M. L., & Leys, E. J. (1998). Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. *J Clin Microbiol*, 36(11), 3239-3242.
- Guan, S. M., Fu, S. M., He, J. J., & Zhang, M. (2011). *Prevotella intermedia* induces prostaglandin E2 via multiple signaling pathways. *J Dent Res*, 90(1), 121-127. doi: 10.1177/0022034510382545
- Guan, S. M., Shu, L., Fu, S. M., Liu, B., Xu, X. L., & Wu, J. Z. (2009). *Prevotella intermedia* upregulates MMP-1 and MMP-8 expression in human periodontal ligament cells. *FEMS Microbiol Lett*, 299(2), 214-222. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01748.x
- Gursoy, U. K., Kononen, E., & Uitto, V. J. (2008). Stimulation of epithelial cell matrix metalloproteinase (MMP-2, -9, -13) and interleukin-8 secretion by fusobacteria. *Oral Microbiol Immunol*, 23(5), 432-434. doi: 10.1111/j.1399-302X.2008.00453.x
- Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Tanner, A., Pollack, R. P., Smith, C., Kent, R. L., Jr., & Socransky, S. S. (1998). Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol*, 25(5), 346-353.
- Han, Y. W., Ikegami, A., Rajanna, C., Kawsar, H. I., Zhou, Y., Li, M., Sojar, H. T., Genco, R. J., Kuramitsu, H. K., & Deng, C. X. (2005). Identification and

-
- characterization of a novel adhesin unique to oral fusobacteria. *J Bacteriol*, 187(15), 5330-5340. doi: 10.1128/JB.187.15.5330-5340.2005
- Han, Y. W., Shi, W., Huang, G. T., Kinder Haake, S., Park, N. H., Kuramitsu, H., & Genco, R. J. (2000). Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infect Immun*, 68(6), 3140-3146.
- Hanemaaijer R., S. T., Konttinen Y.T. (1997). Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor alpha and doxycycline. *Journal of Biological Chemistry*, 272(50), 31504-31509.
- Hanioka, T., Tanaka, M., Takaya, K., Matsumori, Y., & Shizukuishi, S. (2000). Pocket oxygen tension in smokers and non-smokers with periodontal disease. *J Periodontol*, 71(4), 550-554. doi: 10.1902/jop.2000.71.4.550
- Hardy, D. C., Ross, J. H., Schuyler, C. A., Leite, R. S., Slate, E. H., & Huang, Y. (2012). Matrix metalloproteinase-8 expression in periodontal tissues surgically removed from diabetic and non-diabetic patients with periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 39(3), 249-255. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01788.x
- He, T., Hayashi, J., Yamamoto, M., & Ishikawa, I. (1998). Genotypic characterization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from periodontitis patients by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Periodontol*, 69(1), 69-75. doi: 10.1902/jop.1998.69.1.69
- Heasman, P. A., Collins, J. G., & Offenbacher, S. (1993). Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1 beta, leukotriene B4, prostaglandin E2, thromboxane B2 and tumour necrosis factor alpha in experimental gingivitis in humans. *J Periodontal Res*, 28(4), 241-247.
- Heath, J. K., Atkinson, S. J., Hembry, R. M., Reynolds, J. J., & Meikle, M. C. (1987). Bacterial antigens induce collagenase and prostaglandin E2 synthesis in human gingival fibroblasts through a primary effect on circulating mononuclear cells. *Infect Immun*, 55(9), 2148-2154.
- Hellwig, E., Klimek, J., & Attin, T. (2007). Einführung in die Zahnerhaltung. *Elsevier Urban&Fischer*, 4.Auflage, 383-387.
- Hernandez, M., Gamonal, J., Tervahartiala, T., Mantyla, P., Rivera, O., Dezerega, A., Dutzan, N., & Sorsa, T. (2010). Associations between matrix metalloproteinase-8 and -14 and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid from subjects with progressive chronic periodontitis: a longitudinal study. *J Periodontol*, 81(11), 1644-1652. doi: 10.1902/jop.2010.100196
- Hernandez-Rioz, P., Hernandez, M., Garrido, M., Tervahartiala, T., Leppilahti, J. M., Kuula, H., Heikkinen, A. M., Mäntylä, P., Rathnayake, N., Nwhator, S., & Sorsa, T. (2016). Oral fluid matrix metalloproteinase (MMP)-8 as a diagnostic tool in chronic periodontitis. *Metalloproteinases In Medicine*, 3, 11-18.
- Herschman, H. R. (1994). Regulation of prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase-2. *Cancer Metastasis Rev*, 13(3-4), 241-256.
- Holt, S. C., & Bramanti, T. E. (1991). Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2(2), 177-281.
- Holt, S. C., & Ebersole, J. L. (2005). *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000*, 38, 72-122. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00113.x

-
- Honma, K., Mishima, E., & Sharma, A. (2011). Role of *Tannerella forsythia* NanH sialidase in epithelial cell attachment. *Infect Immun*, *79*(1), 393-401. doi: 10.1128/IAI.00629-10
- Imamura, T., Pike, R. N., Potempa, J., & Travis, J. (1994). Pathogenesis of periodontitis: a major arginine-specific cysteine proteinase from *Porphyromonas gingivalis* induces vascular permeability enhancement through activation of the kallikrein/kinin pathway. *J Clin Invest*, *94*(1), 361-367. doi: 10.1172/JCI117330
- Inada, M., Matsumoto, C., Uematsu, S., Akira, S., & Miyaura, C. (2006). Membrane-bound prostaglandin E synthase-1-mediated prostaglandin E2 production by osteoblast plays a critical role in lipopolysaccharide-induced bone loss associated with inflammation. *J Immunol*, *177*(3), 1879-1885.
- Inagaki, S., Kuramitsu, H. K., & Sharma, A. (2005). Contact-dependent regulation of a *Tannerella forsythia* virulence factor, BspA, in biofilms. *FEMS Microbiol Lett*, *249*(2), 291-296. doi: 10.1016/j.femsle.2005.06.032
- Izakovicova Holla, L., Hrdlickova, B., Vokurka, J., & Fassmann, A. (2012). Matrix metalloproteinase 8 (MMP8) gene polymorphisms in chronic periodontitis. *Arch Oral Biol*, *57*(2), 188-196. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.08.018
- Jordan, A., & Micheelis, W. (2016). Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V). *Deutscher Ärzteverlag (DÄV)*.
- Kaplan, J. B., Perry, M. B., MacLean, L. L., Furgang, D., Wilson, M. E., & Fine, D. H. (2001). Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infect Immun*, *69*(9), 5375-5384.
- Kasuga, Y., Ishihara, K., & Okuda, K. (2000). Significance of detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and *Treponema denticola* in periodontal pockets. *Bull Tokyo Dent Coll*, *41*(3), 109-117.
- Khader, Y. S., Bawadi, H. A., Haroun, T. F., Alomari, M., & Tayyem, R. F. (2009). The association between periodontal disease and obesity among adults in Jordan. *J Clin Periodontol*, *36*(1), 18-24. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01345.x
- Kim, M., Jun, H. K., Choi, B. K., Cha, J. H., & Yoo, Y. J. (2010). Td92, an outer membrane protein of *Treponema denticola*, induces osteoclastogenesis via prostaglandin E(2)-mediated RANKL/osteoprotegerin regulation. *J Periodontal Res*, *45*(6), 772-779. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01298.x
- Kinane, D. F., & Chestnutt, I. G. (2000). Smoking and periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, *11*(3), 356-365.
- Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Jr., Rickard, A. H., Jakubovics, N. S., Chalmers, N. I., & Diaz, P. I. (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000*, *42*, 47-79. doi: 10.1111/j.1600-0757.2006.00187.x
- Kremer, B. H., Loos, B. G., van der Velden, U., van Winkelhoff, A. J., Craandijk, J., Bulthuis, H. M., Hutter, J., Varoufaki, A. S., & van Steenberg, T. J. (2000). Peptostreptococcus micros smooth and rough genotypes in periodontitis and gingivitis. *J Periodontol*, *71*(2), 209-218. doi: 10.1902/jop.2000.71.2.209
- Kremer, B. H., & van Steenberg, T. J. (2000). Peptostreptococcus micros coaggregates with *Fusobacterium nucleatum* and non-encapsulated *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*, *182*(1), 57-62.
- Kroes, I., Lepp, P. W., & Relman, D. A. (1999). Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(25), 14547-14552.

-
- Lamont, R. J., Chan, A., Belton, C. M., Izutsu, K. T., Vasel, D., & Weinberg, A. (1995). Porphyromonas gingivalis invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun*, 63(10), 3878-3885.
- Li, M., Liu, Z., & Umemoto, T. (1999). [Collagen-binding proteins of human oral spirochetes]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 34(3), 165-167.
- Li, Y., Samuvel, D. J., Sundararaj, K. P., Lopes-Virella, M. F., & Huang, Y. (2010). IL-6 and high glucose synergistically upregulate MMP-1 expression by U937 mononuclear phagocytes via ERK1/2 and JNK pathways and c-Jun. *J Cell Biochem*, 110(1), 248-259. doi: 10.1002/jcb.22532
- Lim, L. P., Tay, F. B., Sum, C. F., & Thai, A. C. (2007). Relationship between markers of metabolic control and inflammation on severity of periodontal disease in patients with diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*, 34(2), 118-123. doi: 10.1111/j.1600-051X.2006.01032.x
- Listgarten, M. A., Sullivan, P., George, C., Nitkin, L., Rosenberg, E. S., Chilton, N. W., & Kramer, A. A. (1989). Comparative longitudinal study of 2 methods of scheduling maintenance visits: 4-year data. *J Clin Periodontol*, 16(2), 105-115.
- Loos, B. G., Roos, M. T., Schellekens, P. T., van der Velden, U., & Miedema, F. (2004). Lymphocyte numbers and function in relation to periodontitis and smoking. *J Periodontol*, 75(4), 557-564. doi: 10.1902/jop.2004.75.4.557
- Lottspeich, F., & Zorbas, H. (1998). *Bioanalytik*.
- Maeda, N., Okamoto, M., Kondo, K., Ishikawa, H., Osada, R., Tsurumoto, A., & Fujita, H. (1998). Incidence of Prevotella intermedia and Prevotella nigrescens in periodontal health and disease. *Microbiol Immunol*, 42(9), 583-589.
- Mahtout, H., Chandad, F., Rojo, J. M., & Grenier, D. (2011). Fusobacterium nucleatum binding to complement regulatory protein CD46 modulates the expression and secretion of cytokines and matrix metalloproteinases by oral epithelial cells. *J Periodontol*, 82(2), 311-319. doi: 10.1902/jop.2010.100458
- Mantyla, 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. *J Periodontal Res*, 41(6), 503-512. doi: 10.1111/j.1600-0765.2006.00897.x
- Marsh, P. D. (1994). Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*, 8(2), 263-271.
- Mayfield, L., Bratthall, G., & Attstrom, R. (1996). Periodontal probe precision using 4 different periodontal probes. *J Clin Periodontol*, 23(2), 76-82.
- Mealey, B. L., & Ocampo, G. L. (2007). Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol 2000*, 44, 127-153. doi: 10.1111/j.1600-0757.2006.00193.x
- Meikle, M. C., Atkinson, S. J., Ward, R. V., Murphy, G., & Reynolds, J. J. (1989). Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and interleukin 1: evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases. *J Periodontal Res*, 24(3), 207-213.
- Merritt, A. H. (1939). The historical background of periodontology. *J Periodontol*, 10, 7-25.
- Mineoka, T., Awano, S., Rikimaru, T., Kurata, H., Yoshida, A., Ansai, T., & Takehara, T. (2008). Site-specific development of periodontal disease is associated with increased levels of Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia in subgingival plaque. *J Periodontol*, 79(4), 670-676. doi: 10.1902/jop.2008.070398

-
- Moore, W. E., Moore, L. H., Ranney, R. R., Smibert, R. M., Burmeister, J. A., & Schenkein, H. A. (1991). The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. *J Clin Periodontol*, *18*(10), 729-739.
- Moughal, N. A., Adonogianaki, E., Thornhill, M. H., & Kinane, D. F. (1992). Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally-induced gingivitis. *J Periodontal Res*, *27*(6), 623-630.
- Murray, P. A., Kern, D. G., & Winkler, J. R. (1988). Identification of a galactose-binding lectin on *Fusobacterium nucleatum* FN-2. *Infect Immun*, *56*(5), 1314-1319.
- Myneni, S. R., Settem, R. P., Connell, T. D., Keegan, A. D., Gaffen, S. L., & Sharma, A. (2011). TLR2 signaling and Th2 responses drive *Tannerella forsythia*-induced periodontal bone loss. *J Immunol*, *187*(1), 501-509. doi: 10.4049/jimmunol.1100683
- Navarro-Sanchez, A. B., Faria-Almeida, R., & Bascones-Martinez, A. (2007). Effect of non-surgical periodontal therapy on clinical and immunological response and glycaemic control in type 2 diabetic patients with moderate periodontitis. *J Clin Periodontol*, *34*(10), 835-843. doi: 10.1111/j.1600-051X.2007.01127.x
- Noguchi, T., Shiba, H., Komatsuzawa, H., Mizuno, N., Uchida, Y., Ouhara, K., Asakawa, R., Kudo, S., Kawaguchi, H., Sugai, M., & Kurihara, H. (2003). Syntheses of prostaglandin E2 and E-cadherin and gene expression of beta-defensin-2 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Inflammation*, *27*(6), 341-349.
- O'Brien-Simpson, N. M., Veith, P. D., Dashper, S. G., & Reynolds, E. C. (2004). Antigens of bacteria associated with periodontitis. *Periodontol 2000*, *35*, 101-134. doi: 10.1111/j.0906-6713.2004.003559.x
- Offenbacher, S. (1996). Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol*, *1*(1), 821-878. doi: 10.1902/annals.1996.1.1.821
- Offenbacher, S., Farr, D. H., & Goodson, J. M. (1981). Measurement of prostaglandin E in crevicular fluid. *J Clin Periodontol*, *8*(4), 359-367.
- Offenbacher, S., Heasman, P. A., & Collins, J. G. (1993). Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol*, *64*(5 Suppl), 432-444. doi: 10.1902/jop.1993.64.5s.432
- Offenbacher, S., Odle, B. M., & Van Dyke, T. E. (1986). The use of crevicular fluid prostaglandin E2 levels as a predictor of periodontal attachment loss. *J Periodontal Res*, *21*(2), 101-112.
- Page, R. C. (1999). Milestones in periodontal research and the remaining critical issues. *J Periodontal Res*, *34*(7), 331-339.
- Page, R. C., & Beck, J. D. (1997). Risk assessment for periodontal diseases. *Int Dent J*, *47*(2), 61-87.
- Page, R. C., & Kornman, K. S. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*, *14*, 9-11.
- Page, R. C., & Schroeder, H. E. (1976). Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*, *34*(3), 235-249.
- Pashley, D. H. (1976). A mechanistic analysis of gingival fluid production. *J Periodontal Res*, *11*(2), 121-134.
- Paster, B. J., Boches, S. K., Galvin, J. L., Ericson, R. E., Lau, C. N., Levanos, V. A., Sahasrabudhe, A., & Dewhirst, F. E. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*, *183*(12), 3770-3783. doi: 10.1128/JB.183.12.3770-3783.2001

-
- Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S., & Johnson, N. W. (2005). Periodontal diseases. *Lancet*, 366(9499), 1809-1820. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67728-8
- Potempa, J., Pike, R., & Travis, J. (1997). Titration and mapping of the active site of cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* (gingipains) using peptidyl chloromethanes. *Biol Chem*, 378(3-4), 223-230.
- Preshaw, P. M., Foster, N., & Taylor, J. J. (2007). Cross-susceptibility between periodontal disease and type 2 diabetes mellitus: an immunobiological perspective. *Periodontol 2000*, 45, 138-157. doi: 10.1111/j.1600-0757.2007.00221.x
- Rams, T. E., Feik, D., Listgarten, M. A., & Slots, J. (1992). Peptostreptococcus micros in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, 7(1), 1-6.
- Ramseier, C. A., Kinney, J. S., Herr, A. E., Braun, T., Sugai, J. V., Shelburne, C. A., Rayburn, L. A., Tran, H. M., Singh, A. K., & Giannobile, W. V. (2009). Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. *J Periodontol*, 80(3), 436-446. doi: 10.1902/jop.2009.080480
- Raupach, T., Schafer, K., Konstantinides, S., & Andreas, S. (2006). Secondhand smoke as an acute threat for the cardiovascular system: a change in paradigm. *Eur Heart J*, 27(4), 386-392. doi: 10.1093/eurheartj/ehi601
- Renvert, S., Wikstrom, M., Helmersson, M., Dahlen, G., & Claffey, N. (1992). Comparative study of subgingival microbiological sampling techniques. *J Periodontol*, 63(10), 797-801. doi: 10.1902/jop.1992.63.10.797
- Robertson, P. B., Lantz, M., Marucha, P. T., Kornman, K. S., Trummel, C. L., & Holt, S. C. (1982). Collagenolytic activity associated with *Bacteroides* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res*, 17(3), 275-283.
- Rogers, J. E., Li, F., Coatney, D. D., Rossa, C., Bronson, P., Krieder, J. M., Giannobile, W. V., & Kirkwood, K. L. (2007). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. *J Periodontol*, 78(3), 550-558. doi: 10.1902/jop.2007.060321
- Saito, A., Hosaka, Y., Nakagawa, T., Seida, K., Yamada, S., Takazoe, I., & Okuda, K. (1993). Significance of serum antibody against surface antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in patients with adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, 8(3), 146-153.
- Salo, T. T. E. P. A. C. P. M. 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
- Show all authors. *Journal of Dental Research*, 79(12), 1969-1977.
- Salvi, G. E., Beck, J. D., & Offenbacher, S. (1998). PGE2, IL-1 beta, and TNF-alpha responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Ann Periodontol*, 3(1), 40-50. doi: 10.1902/annals.1998.3.1.40
- Salvi, G. E., Carollo-Bittel, B., & Lang, N. P. (2008). Effects of diabetes mellitus on periodontal and peri-implant conditions: update on associations and risks. *J Clin Periodontol*, 35(8 Suppl), 398-409. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01282.x
- Salvi, G. E., Lawrence, H. P., Offenbacher, S., & Beck, J. D. (1997). Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000*, 14, 173-201.
- Sandros, J., Papapanou, P., & Dahlen, G. (1993). *Porphyromonas gingivalis* invades oral epithelial cells in vitro. *J Periodontal Res*, 28(3), 219-226.

-
- Scheidt-Nave, C., Banzer, D., & Abendroth, K. (2014). Schlussbericht Multizentrische Studie zu Verteilung, Determination und prädiktivem Wert der Knochendichte in der deutschen Bevölkerung Förderprojekt des Bundesministeriums für Forschung und Technologie. *Evidenzgrad 2b Oxford, OIKM 9304/0*, 1-45.
- Schifferle, R. E., Wilson, M. E., Levine, M. J., & Genco, R. J. (1993). Activation of serum complement by polysaccharide-containing antigens of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*, 28(4), 248-254.
- Schlagenhauf, U. (2009). Zur Geschichte der Parodontologie in Deutschland. *DZZ*, 64(4), 262-264.
- Sela, M. N. (2001). Role of *Treponema denticola* in periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med*, 12(5), 399-413.
- Shah, H. N., & Gharbia, S. E. (1995). The biochemical milieu of the host in the selection of anaerobic species in the oral cavity. *Clin Infect Dis*, 20 Suppl 2, S291-300.
- Sharma, A. (2010). Virulence mechanisms of *Tannerella forsythia*. *Periodontol 2000*, 54(1), 106-116. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00332.x
- Sharma, A., Inagaki, S., Sigurdson, W., & Kuramitsu, H. K. (2005). Synergy between *Tannerella forsythia* and *Fusobacterium nucleatum* in biofilm formation. *Oral Microbiol Immunol*, 20(1), 39-42. doi: 10.1111/j.1399-302X.2004.00175.x
- Sheets, S. M., Potempa, J., Travis, J., Fletcher, H. M., & Casiano, C. A. (2006). Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* W83 synergistically disrupt endothelial cell adhesion and can induce caspase-independent apoptosis. *Infect Immun*, 74(10), 5667-5678. doi: 10.1128/IAI.01140-05
- Sheiham, A., & Netuveli, G. S. (2002). Periodontal diseases in Europe. *Periodontol 2000*, 29, 104-121.
- Shin, J., Ji, S., & Choi, Y. (2008). Ability of oral bacteria to induce tissue-destructive molecules from human neutrophils. *Oral Dis*, 14(4), 327-334.
- Sigusch, B., Eick, S., Pfister, W., Klinger, G., & Glockmann, E. (2001). Altered chemotactic behavior of crevicular PMNs in different forms of periodontitis. *J Clin Periodontol*, 28(2), 162-167.
- Sigusch, B., Klinger, G., Glockmann, E., & Simon, H. U. (1998). Early-onset and adult periodontitis associated with abnormal cytokine production by activated T lymphocytes. *J Periodontol*, 69(10), 1098-1104. doi: 10.1902/jop.1998.69.10.1098
- Sismey-Durrant, H. J., & Hopps, R. M. (1991). Effect of lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* on prostaglandin E2 and interleukin-1-beta release from rat periosteal and human gingival fibroblasts in vitro. *Oral Microbiol Immunol*, 6(6), 378-380.
- Slots, J., & Genco, R. J. (1984). Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J Dent Res*, 63(3), 412-421.
- Slots, J., & Ting, M. (1999). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol 2000*, 20, 82-121.
- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (1994). Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000*, 5, 7-25.
- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*, 28, 12-55.

-
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L., Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 25(2), 134-144.
- Soder, B. (1999). Neutrophil elastase activity, levels of prostaglandin E2, and matrix metalloproteinase-8 in refractory periodontitis sites in smokers and non-smokers. *Acta Odontol Scand*, 57(2), 77-82.
- Sorsa, T., Hernandez, M., Leppilahti, J., Munjal, S., Netuschil, L., & Mantyla, P. (2010). Detection of gingival crevicular fluid MMP-8 levels with different laboratory and chair-side methods. *Oral Dis*, 16(1), 39-45. doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01603.x
- Sorsa, T., Ingman, T., Suomalainen, K., Haapasalo, M., Konttinen, Y. T., Lindy, O., Saari, H., & Uitto, V. J. (1992). Identification of proteases from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast-type interstitial collagenases. *Infect Immun*, 60(11), 4491-4495.
- Sorsa, T., Tjaderhane, L., & Salo, T. (2004). Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis*, 10(6), 311-318. doi: 10.1111/j.1601-0825.2004.01038.x
- Stelzel, M. (2003). Mikrobiologische Nachweisverfahren in der Parodontologie. *ZWR*, 9, 400-407.
- Sundqvist, G., Carlsson, J., Herrmann, B., & Tarnvik, A. (1985). Degradation of human immunoglobulins G and M and complement factors C3 and C5 by black-pigmented *Bacteroides*. *J Med Microbiol*, 19(1), 85-94.
- Takada, H., Mihara, J., Morisaki, I., & Hamada, S. (1991). Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides* lipopolysaccharides. *Infect Immun*, 59(1), 295-301.
- Takahashi, Y., Okuno, Y., Yamanouchi, T., Takada, N., & Yamanishi, K. (1986). Comparison of immunofluorescence and hemagglutination inhibition tests and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody in rats infected with hemorrhagic fever with renal syndrome virus. *J Clin Microbiol*, 24(5), 712-715.
- Takimoto, K., Taharaguchi, M., Morikawa, S., Ike, F., & Yamada, Y. K. (2008). Detection of the antibody to lymphocytic choriomeningitis virus in sera of laboratory rodents infected with viruses of laboratory and newly isolated strains by ELISA using purified recombinant nucleoprotein. *Exp Anim*, 57(4), 357-365.
- Tam, Y. C., & Chan, E. C. (1985). Purification and characterization of hyaluronidase from oral *Peptostreptococcus* species. *Infect Immun*, 47(2), 508-513.
- Tan, K. S., Song, K. P., & Ong, G. (2002). Cytotoxic distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Occurrence and association with periodontal disease. *J Periodontol Res*, 37(4), 268-272.
- Tanaka, H., Tanabe, N., Shoji, M., Suzuki, N., Katono, T., Sato, S., Motohashi, M., & Maeno, M. (2006). Nicotine and lipopolysaccharide stimulate the formation of osteoclast-like cells by increasing macrophage colony-stimulating factor and prostaglandin E2 production by osteoblasts. *Life Sci*, 78(15), 1733-1740. doi: 10.1016/j.lfs.2005.08.017
- Tervonen, T., & Karjalainen, K. (1997). Periodontal disease related to diabetic status. A pilot study of the response to periodontal therapy in type 1 diabetes. *J Clin Periodontol*, 24(7), 505-510.
- Tervonen, T., Karjalainen, K., Knuutila, M., & Huuonen, S. (2000). Alveolar bone loss in type 1 diabetic subjects. *J Clin Periodontol*, 27(8), 567-571.

-
- Teughels, W., Van Eldere, J., van Steenberghe, D., Cassiman, J. J., Fives-Taylor, P., & Quirynen, M. (2005). Influence of nicotine and cotinine on epithelial colonization by periodontopathogens. *J Periodontol*, *76*(8), 1315-1322. doi: 10.1902/jop.2005.76.8.1315
- Tonetti, M. S., Imboden, M. A., & Lang, N. P. (1998). Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin-8 and ICAM-1. *J Periodontol*, *69*(10), 1139-1147. doi: 10.1902/jop.1998.69.10.1139
- Tsai, C., Hayes, C., & Taylor, G. W. (2002). Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dent Oral Epidemiol*, *30*(3), 182-192.
- Tsai, C. C., Chen, H. S., Chen, S. L., Ho, Y. P., Ho, K. Y., Wu, Y. M., & Hung, C. C. (2005). Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *J Periodontal Res*, *40*(5), 378-384. doi: 10.1111/j.1600-0765.2005.00818.x
- Tsai, C. C., Hong, Y. C., Chen, C. C., & Wu, Y. M. (1998). Measurement of prostaglandin E2 and leukotriene B4 in the gingival crevicular fluid. *J Dent*, *26*(2), 97-103.
- Uitto, V. J., Overall, C. M., & McCulloch, C. (2003). Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*, *31*, 77-104.
- Umamoto, T., Li, M., & Namikawa, I. (1997). Adherence of human oral spirochetes by collagen-binding proteins. *Microbiol Immunol*, *41*(12), 917-923.
- van Winkelhoff, A. J., Loos, B. G., van der Reijden, W. A., & van der Velden, U. (2002). Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol*, *29*(11), 1023-1028.
- van Winkelhoff, A. J., van Steenberghe, T. J., & de Graaff, J. (1988). The role of black-pigmented Bacteroides in human oral infections. *J Clin Periodontol*, *15*(3), 145-155.
- Vlassara, H., Brownlee, M., Manogue, K. R., Dinarello, C. A., & Pasagian, A. (1988). Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science*, *240*(4858), 1546-1548.
- Weinberg, A., & Holt, S. C. (1990). Interaction of Treponema denticola TD-4, GM-1, and MS25 with human gingival fibroblasts. *Infect Immun*, *58*(6), 1720-1729.
- Westfelt, E., Rylander, H., Blohme, G., Jonasson, P., & Lindhe, J. (1996). The effect of periodontal therapy in diabetics. Results after 5 years. *J Clin Periodontol*, *23*(2), 92-100.
- Wiebe, C. B., & Putnins, E. E. (2000). The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology--an update. *J Can Dent Assoc*, *66*(11), 594-597.
- Wilson, M. E., Bronson, P. M., & Hamilton, R. G. (1995). Immunoglobulin G2 antibodies promote neutrophil killing of Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Infect Immun*, *63*(3), 1070-1075.
- Wilson, M. E., & Genco, R. J. (1989). The role of antibody, complement and neutrophils in host defense against Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Immunol Invest*, *18*(1-4), 187-209.
- Yakob, M., Meurman, J. H., Sorsa, T., & Soder, B. (2013). Treponema denticola associates with increased levels of MMP-8 and MMP-9 in gingival crevicular fluid. *Oral Dis*, *19*(7), 694-701. doi: 10.1111/odi.12057
- Yang, H. W., Asikainen, S., Dogan, B., Suda, R., & Lai, C. H. (2004). Relationship of Actinobacillus actinomycetemcomitans serotype b to aggressive periodontitis:

-
- frequency in pure cultured isolates. *J Periodontol*, 75(4), 592-599. doi: 10.1902/jop.2004.75.4.592
- Yang, H. W., Huang, Y. F., Chan, Y., & Chou, M. Y. (2005). Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. *Eur J Oral Sci*, 113(1), 28-33. doi: 10.1111/j.1600-0722.2004.00192.x
- Yoo, J. Y., Kim, H. C., Zhu, W., Kim, S. M., Sabet, M., Handfield, M., Hillman, J., Progulske-Fox, A., & Lee, S. W. (2007). Identification of *Tannerella forsythia* antigens specifically expressed in patients with periodontal disease. *FEMS Microbiol Lett*, 275(2), 344-352. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00906.x
- Yoshioka, M., Grenier, D., & Mayrand, D. (2005). Binding of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharides to *Peptostreptococcus micros* stimulates tumor necrosis factor alpha production by macrophage-like cells. *Oral Microbiol Immunol*, 20(2), 118-121. doi: 10.1111/j.1399-302X.2004.00204.x
- Zambon, J. J., & Haraszthy, V. I. (1995). The laboratory diagnosis of periodontal infections. *Periodontol 2000*, 7, 69-82.
- Zhang, J., Liu, Y., Shi, J., Larson, D. F., & Watson, R. R. (2002). Side-stream cigarette smoke induces dose-response in systemic inflammatory cytokine production and oxidative stress. *Exp Biol Med (Maywood)*, 227(9), 823-829.
- Zieman, S. J., & Kass, D. A. (2004). Advanced glycation endproduct crosslinking in the cardiovascular system: potential therapeutic target for cardiovascular disease. *Drugs*, 64(5), 459-470.
- Zilm, P. S., Bagley, C. J., Rogers, A. H., Milne, I. R., & Gully, N. J. (2007). The proteomic profile of *Fusobacterium nucleatum* is regulated by growth pH. *Microbiology*, 153(Pt 1), 148-159. doi: 10.1099/mic.0.2006/001040-0

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Matthias Folwaczny für die Vergabe des Themas, für die Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit, sowie für seine große Mühe beim Korrekturlesen und seine hilfreichen Tipps.

Dr. Christina Ern danke ich sehr für die Betreuung dieser Arbeit.

Für die aufwendige Einweisung in die Labortechnik, die ständige Hilfe bei Fragen und die motivierenden Worte danke ich Dr. Tamara Berger und Brigitte Hackl.

Meiner Freundin und Laborpartnerin Beate Müller danke ich sehr für die gemeinsamen Stunden bei unseren Versuchen, ihre aufmunternden und immer wieder motivierenden Worte, die mir sehr bei der Entstehung dieser Arbeit geholfen haben.

Unendlich dankbar bin ich meinem Mann David, meiner Familie und meinen Schwiegereltern, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit mental sehr unterstützt und motiviert haben. Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mir das Zahnmedizinstudium ermöglicht haben und immer für mich da waren.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Isabella Kirchhoff, geb. Rüdel
Geburtsdatum: 12. April 1984
Geburtsort: München

Schulbildung

1990 bis 1994 Grundschule Aschheim, Aschheim bei München
1994 bis 1998 Theresia-Gerhardinger-Gymnasium am Anger, München
1998 bis 2002 Pestalozzi Gymnasium, München
2002 bis 2005 Gymnasium mit Abschluss Matura, Salzburg

Studium

2006 bis 2007 Medizinische Universität Wien,
Studium der Zahnmedizin
2008 bis 2013 Ludwig-Maximilians-Universität München,
Studium der Zahnmedizin:
- zahnärztliche Vorprüfung, März 2010
- Zahnärztliche Prüfung, Juli 2013

Berufliche Tätigkeit

Oktober 2013- einschließlich
Dezember 2013 Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis
Dr. Stefan Sonner, Pullach
Februar 2014- einschließlich
Dezember 2014 Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis
Dr. Priska Domide-Wolf, München
Seit Januar 2015 Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis
Dr. Annette Jasper, München

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Isabella Kirchhoff, geboren am 12.04.1984 in München, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchung zur Wertigkeit der parodontalen Expression von PGE2 und MMP-8 in der Diagnose der marginalen Parodontitis

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 15.03.2018
Ort, Datum

Isabella Kirchhoff
Unterschrift Doktorandin/Doktorand