

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

**Prostaglandin E₂ und Matrixmetalloproteinase-8
in der gingivalen Sulkusflüssigkeit von
Patienten nach einer nicht-chirurgischen
Therapie der chronischen Parodontitis**

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

vorgelegt von
Caspar Victor Bumm
aus Duisburg
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Matthias Folwaczny
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Michael Ewers Prof. Dr. Andrea Wichelhaus
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Dr. Christina Ern
Dekan:	Prof. Dr. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	11.10.2018

Eidesstattliche Versicherung

Bumm, Caspar Victor

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Prostaglandin E₂ und Matrixmetalloproteinase-8 in der gingivalen Sulkusflüssigkeit von Patienten nach einer nicht-chirurgischen Therapie der chronischen Parodontitis

selbständig 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, 14.10.2018

Ort, Datum

Caspar Victor Bumm

Unterschrift Doktorand

In Memoriam

Barbara Maria Bumm

12.11.1960 - 21.09.2017

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	Parodontitis	7
1.1.1	Epidemiologie	7
1.1.2	Ätiologie	7
1.1.3	Klinische und histopathologische Veränderungen.....	10
1.1.4	Klassifikation	12
1.1.5	Risikofaktoren.....	12
1.2	Konventionelle Parodontitistherapie	14
1.3	Die Sulkusflüssigkeit.....	15
1.4	Prostaglandin E ₂	18
1.4.1	Synthese	18
1.4.2	Wirkung und Regulation	18
1.4.3	Diagnostikum.....	19
1.5	Matrixmetalloproteinase-8	20
1.5.1	Synthese	20
1.5.2	Wirkung und Regulation	20
1.5.3	Diagnostikum.....	21
2	ZIELSETZUNG DER STUDIE.....	23
3	MATERIALIEN UND METHODEN.....	24
3.1	Studiendesign.....	24
3.2	Studienpopulation.....	24
3.3	Klinische Parameter	24
3.3.1	Sondierungstiefe.....	25
3.3.2	Blutung auf Sondieren	25
3.3.3	Plaque-Index	25
3.4	Probenentnahme.....	26
3.5	PGE ₂ -Analyse	26
3.6	MMP8-Analyse	28
3.7	Analyse der parodontalpathogenen Erreger	29
3.7.1	DNA-Isolation	29
3.7.2	DNA-Amplifikation	30
3.7.3	DNA-Hybridisierung und ELISA-Detektion	31
3.8	Statistische Auswertung	31
3.8.1	Kolmogorov-Smirnov-Test.....	31
3.8.2	Wilcoxon-Test.....	32

3.8.3	Chi-Quadrat-Test nach Pearson/Exakter Fisher-Test	32
3.8.4	Rangkorrelation nach Spearman	32
4	ERGEBNISSE	33
4.1	Studienpopulation.....	33
4.2	Klinische Daten	34
4.2.1	Sondierungstiefen.....	34
4.2.2	Blutung auf Sondieren	35
4.2.3	Plaque-Index	36
4.3	Laborchemische Daten.....	37
4.3.1	PGE ₂	37
4.3.2	MMP-8.....	38
4.3.3	Parodontalpathogene Keime	39
4.3.4	Korrelationen	45
5	DISKUSSION.....	47
5.1	Diskussion der Methode	47
5.1.1	Sulkusflüssigkeit als Medium im Vergleich.....	47
5.1.2	GCF-Probenentnahme	48
5.1.3	PGE ₂ Analyse.....	49
5.1.4	MMP-8 Analyse	50
5.2	Diskussion der Ergebnisse	50
5.2.1	Klinische Daten.....	50
5.2.2	PGE ₂	51
5.2.3	MMP-8.....	52
5.2.4	Parodontalpathogene Keime	52
5.2.5	Risikofaktor Rauchverhalten	53
5.2.6	Risikofaktor Geschlecht.....	57
6	ZUSAMMENFASSUNG	61
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	63
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	65
9	TABELLENVERZEICHNIS	66
10	DIAGRAMMVERZEICHNIS	67
11	DANKSAGUNG	68
12	LITERATURVERZEICHNIS	69

1 Einleitung

1.1 Parodontitis

Die Parodontitis ist eine multifaktorielle, entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates, ausgelöst durch spezifische, überwiegend anaerobe (1) parodontalpathogene Keime und die komplexe immunologische Reaktion des Körpers hierauf (2-4).

1.1.1 Epidemiologie

Die Parodontitis gilt als eine der häufigsten Krankheiten weltweit (5). Dem *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) zufolge, liegt die Gesamtprävalenz milder, moderater und schwerer Parodontitiden in den USA bei 47 %, in der Bevölkerungsgruppe der über 65-Jährigen, sind sogar über 64 % betroffen (6). Im Rahmen der 5. Deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS) von 2014, wurde die Prävalenz moderater und schwerer Parodontitiden verschiedener Altersklassen bestimmt. Demnach leiden auch in Deutschland etwa 52 % der 35- bis 44-Jährigen und sogar 65 % der 65- bis 74-Jährigen an einer Parodontitis (7, 8). Im Vergleich zu den Zahlen der 4. DMS lässt sich zwar ein rückläufiger Trend der Prävalenzen sowohl bei „Jüngeren Erwachsenen“ (35- bis 44-Jährige), als auch bei „Jüngeren Senioren“ (65- bis 74-Jährige) beobachten (8). In Anbetracht des demographischen Wandels und der „Verlagerung chronischer Munderkrankungen in ein höheres Lebensalter“ (8), ist allerdings mit konstant hoher Prävalenz und einem weiterhin gesteigerten Behandlungsbedarf zu rechnen.

1.1.2 Ätiologie

Der zentrale ätiologische Faktor ist die polymikrobielle Infektion mit parodontalpathogenen Keimen, die sich in der subgingivalen Plaque befinden und durch die Freisetzung von Enzymen, Toxinen, Stoffwechsel- und Zerfallsprodukte eine entzündliche Reaktion des Körpers auslösen. Lange Zeit galt die unspezifische Plaquehypothese (9, 10), der zufolge alleine die Menge an subgingivaler bakterieller Plaque die Entstehung und das Ausmaß einer Parodontitis bestimmt. Die genauere Untersuchung des Keimspektrums der subgingivalen Plaque zeigte allerdings, dass nicht alle Bakterienspezies

gleichermaßen an der parodontalen Entzündung beteiligt sind, sondern nur bestimmte, sogenannte parodontalpathogene Keime mit der Ausbildung und der Schwere der Parodontitis assoziiert sind (11). Socransky et al. zeigten darüber hinaus, dass bestimmte parodontalpathogene Keime bevorzugt zusammen, als Komplexe organisiert, in der subgingivalen Plaque vorkommen und hier mit einander interagieren (12). Während die junge supra- und subgingivale Plaque mit gram-positiven aeroben Streptokokken des gelben Komplexes assoziiert ist, zeigt sich im weiteren Verlauf ein vertikales Wachstum der reifenden Plaque und eine Verschiebung des Keimspektrums zu gram-negativen zunächst fakultativen später obligaten anaeroben Stäbchenarten des orangen und roten Komplexes (13, 14). Die Keime des orangen Komplexes (*Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*) nehmen eine herausragende Rolle bei der Interaktion zwischen den Frühkolonialisten des gelben Komplexes und den hochpathogenen obligaten Anaerobiern des roten Komplexes ein und sind somit maßgeblich für Etablierung des roten Komplexes verantwortlich (13). Die Besiedelung der Plaque mit dem roten Komplex (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola*) kann sich klinisch in einer starken Progression der Parodontitis äußern und zeigt eine enge Korrelation zu gesteigertem Attachment- und Knochenabbau, weshalb sein Nachweis als Marker eine gesonderte Stellung in der Parodontitisdiagnostik einnimmt (13).

1.1.2.1 *Fusobacterium nucleatum*

Das *Fusobacterium nucleatum* (Fn) ist ein gram-negatives, anaerobes, langes Stäbchenbakterium des orangen Komplexes, das in den Mundhöhlen von gesunden und erkrankten Patienten zu finden ist (15). Fn gilt als wichtiges „Brückenbakterium“, das mittels spezieller Adhäsine, den Übergang von frühkolonialisierenden aeroben Streptokokken zu den hochpathogenen anaeroben Erregern des roten Komplexes ermöglicht und somit eine entscheidende Rolle im Verlauf parodontaler Erkrankungen einnimmt (15, 16).

1.1.2.2 *Prevotella intermedia*

Leitkeim des orangen Komplexes ist das gram-negative, anaerobe, schwarzpigmentierte Stäbchenbakterium *Prevotella intermedia* (Pi), das eine starke Interaktion mit Fn und Keimen des roten Komplexes zeigt (12). Pi ist eng mit der chronischen Parodontitis assoziiert (12, 17), aber auch an anderen oralen

und extraoralen Infektionen beteiligt (18, 19). Die Virulenzfaktoren von *Pi* verursachen eine reduzierte granulozytäre Chemotaxis im Rahmen der immunologischen Reaktion des Wirtes (20), stimulieren den Abbau kollagener Fasern und wirken über die Steigerung der Prostaglandinsynthese knochenresorptiv (21).

1.1.2.3 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Der *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) nimmt eine Sonderrolle neben den Erregern des roten Komplexes ein. Es handelt sich um ein gram-negatives, fakultativ anaerobes, unbewegliches Stäbchenbakterium (22), das bevorzugt die menschliche Mundhöhle besiedelt und hier sowohl in der supra- und subgingivalen Plaque, im Speichel, der Sulkusflüssigkeit und den Schleimhäuten nachweisbar ist (23, 24). Aa wird dem grünen Keimkomplex zugeordnet und gilt als Haupterreger der aggressiven Parodontitis, findet sich aber auch in akuten Phasen chronischer Parodontitiden, bei der in kurzer Zeit ein massiver Gewebeabbau festzustellen ist (25, 26). Von den sechs bekannten Serotypen (a-f) (27) zeigen nicht alle eine gleichermaßen ausgeprägte parodontalpathogene Wirkung, dies gilt als Erklärung für den regelmäßigen Nachweis von Aa auch in parodontal gesunden Patienten (22).

1.1.2.4 *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis (Pg) ist ein gram-negatives, obligat anaerobes, unbewegliches, schwarzpigmentiertes Stäbchen des roten Komplexes, das eng mit destruktiven parodontalen Läsionen assoziiert ist (28, 29). Die hohe Pathogenität des Erregers geht von seinen zahlreichen Virulenzfaktoren aus. Neben der starken Gewebeinvasivität (30) und proteolytischen Enzymen, die eine direkte kollagenolytische Wirkung zeigen, den Abbau der extrazellulären Matrix aber auch indirekt durch Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen katalysieren, zählen die Lipopolysaccharide (LPS) der äußeren Membran zu den wichtigsten Virulenzfaktoren. Durch direkte Osteoklastenaktivierung und Stimulation von Prostaglandin E₂ (PGE₂), Interleukin-1 (IL-1) und des Tumornekrosefaktors (TNF), sind die LPS von Pg maßgeblich an der Knochenresorption während der Parodontitis beteiligt (31). Die Studie von Griffen et al. (29) zeigte, dass Pg auch in parodontal gesunden Patienten nachgewiesen werden kann. Diese Erkenntnis führt zu der Annahme, dass möglicherweise nicht

nur Aa, sondern auch Pg verschiedene Genotypen ausbildet, die eine unterschiedlich stark ausgeprägte Parodontalpathogenität aufweisen.

1.1.2.5 *Tannerella forsythia*

Tannerella forsythia (Tf) ist ein gram-negatives, obligat anaerobes, fusiformes Stäbchenbakterium, das eng mit Attachmentverlust, Knochendefekten und schweren Formen der chronischen Parodontitis in Verbindung gebracht wird (13, 17). Mit der Spaltung von Proteinen des Wirtsorganismus durch proteolytische Enzyme, sorgt Tf für die Aufrechterhaltung der Substratzufuhr und trägt somit zum Wachstum der subgingivalen Plaque bei (32). Darüber hinaus führt die Interaktion spezieller Lipoproteine von Tf mit Zellen des Wirtes (33) und eine aus Tf freigesetzte Cystein-Proteinase (34) zur Apoptose von Leukozyten und Lymphozyten (35).

1.1.2.6 *Treponema denticola*

Treponema denticola (Td) ist ein beweglicher, gram-negativer, obligat anaerober Erreger aus der Klasse der Spirochäten des roten Komplexes, dessen Anwesenheit eng mit fortgeschrittenen parodontalen Läsionen assoziiert ist (36, 37). Die zahlreichen Virulenzfaktoren des Erregers, die den parodontalen Gewebeabbau fördern (28), aber auch seine Beweglichkeit und die besondere Interaktion und wechselseitige Abhängigkeit mit Pg, im Rahmen der Aggregation, des Stoffwechsels und des Wachstums (38-40), machen Td zu einem weiteren wichtigen Vertreter der parodontalpathogenen Erreger (41).

1.1.3 Klinische und histopathologische Veränderungen

Klinisch zeichnet sich die Parodontitis durch gingivale Entzündung, Blutung, Attachmentverlust und Reduktion des Alveolarknochens, im fortgeschrittenen Stadium aber auch durch Rezessionen, Zahnlockerung, -wanderung und -verlust aus (42). Nach Ausbildung einer parodontalen Tasche ist die Erkrankung überwiegend irreversibel, da eine vollständige Regeneration des pathogen zerstörten Parodontiums nur unzureichend möglich ist (2).

Hierin liegt der entscheidende Unterschied zur Gingivitis, bei der eine Restitutio ad integrum nach Entfernung der Ursache hergestellt werden kann (2, 43, 44).

Pathohistologisch ist neben der Ausbildung parodontaler Taschen, die apikale Verlagerung des Saumepithels, die Zerstörung kollagenen Bindegewebes, eine

massive Leukozytenmigration und ein entzündliches Infiltrat, das reich an Plasmazellen, Lymphozyten und Makrophagen ist, erkennbar (45-47).

Page und Schroeder veröffentlichten bereits 1976 eine Übersicht über die verschiedenen histopathologischen Stadien der plaque-induzierten entzündlichen Veränderung des Zahnhalteapparates und der jeweiligen klinischen Manifestation (48). Die hier beschriebene Initialläsion entsteht nach Ausbildung einer dentalen Plaque in etwa zwei bis vier Tagen und ist durch die Reaktion lokaler Leukozyten und Endothelzellen auf den bakteriellen Biofilm gekennzeichnet. Die Veränderungen sind histologisch nachweisbar, zeigen jedoch keine klinischen Anzeichen einer Entzündungsreaktion. Bakterielle Enzyme und Stoffwechselprodukte stimulieren die Freisetzung von Zytokinen aus dem Saumeepithel und Neuropeptiden, die eine Vasodilatation der lokalen Gefäße auslösen. Das gesteigerte Gefäßlumen und die erhöhte Gefäßpermeabilität führen anschließend zur Migration vorzugsweise neutrophiler Granulozyten.

Im Stadium der frühen Läsion nach etwa 4 bis 10 Tagen kommt es neben der Steigerung der Anzahl neutrophiler Granulozyten auch zur Einwanderung von Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen, Mastzellen und zur Komplementaktivierung. Klinisch deuten die gingivale bzw. parodontale Blutung und eine gesteigerte Flussrate des Sulkusfluids auf eine entzündliche Komponente hin. Histologisch sind eine Epithelproliferation und die Ausbildung von Reteleisten als Reaktion auf einen entzündlichen Stimulus nachweisbar.

Nach etwa zwei bis drei Wochen verlagert sich das Spektrum der Immunantwort vom angeborenen zum erworbenen Immunsystem und es entsteht eine etablierte Läsion, in der Makrophagen, Plasmazelle, T- und B-Lymphozyten dominieren. Die Steigerung der Aktivität verschiedener Kollagenasen sorgt für den fast vollständigen Abbau des gingivalen Stützgewebes, die Destruktion von Knochengewebe hingegen ist noch nicht anzutreffen. Klinisch zeigt sich entsprechend eine moderate bis schwere Gingivitis mit Blutung, Schwellung und Farbveränderung.

Fortgeschrittene Läsionen sind, anders als die vorangegangenen Stadien nicht länger reversibel, sie werden von Plasmazellen dominiert und manifestieren sich klinisch durch eine Fibrose, irreversiblen Knochen- und Attachmentverlust mit Ausbildung einer parodontalen Tasche und Tiefenwachstum des Saumeepithels.

1.1.4 Klassifikation

Die aktuelle allgemeingültige Klassifikation parodontaler Erkrankungen wurde 1999 von der *American Academy of Periodontology* sowie der *European Federation of Periodontology* veröffentlicht (49) und differenziert zunächst zwischen rein gingivabezogenen Erkrankungen, den Gingivopathien und den Parodontopathien mit Attachment- und Knochenbeteiligung. Neben dieser Erweiterung, wurden sowohl die Gingivopathien, als auch die Parodontopathien hinsichtlich ihrer Ätiologie, des klinischen Erscheinungsbildes und des Krankheitsverlaufes klassifiziert. Diese deutlich umfassendere Kategorisierung trägt nicht nur der Komplexität der Erkrankung Rechnung, sie ersetzt auch die zuvor bestehenden Klassifikationen.

Innerhalb dieser Klassifikation der Parodontopathien wird die aggressive von der chronischen Form unterschieden, wobei der nekrotisierend-ulzerierenden Parodontitis als gesonderte Ausprägung geführt wird.

Die chronische Parodontitis ist die häufigste Form der Parodontitiden, sie verläuft in der Regel langsam fortschreitend, kann aber auch mit akuten Phasen einhergehen (45, 50, 51) und wird nach ihrer Schwere, gemessen am klinischen Attachmentverlust (CAL, *clinical attachment loss*), in eine milde (1-2 mm CAL), moderate (3-4 mm CAL) und eine schwere Form (≥ 5 mm CAL) unterteilt. Außerdem wird die lokale ($\leq 30\%$ involvierte Stellen) von der generalisierten ($> 30\%$ involvierte Stellen) Form unterschieden (49).

1.1.5 Risikofaktoren

Neben der primären obligaten bakteriellen Infektion, ist die Anfälligkeit des Wirtes zur Ausbildung einer Parodontitis entscheidend (1, 2, 52), weshalb ein besonderes Augenmerk auf die vielfältigen und zahlreich beschriebenen Risikofaktoren dieser Erkrankung gelegt werden muss.

Da der subgingivale bakterielle Biofilm der wichtigste ätiologische Faktor ist, gilt eine mangelnde Mundhygiene als entscheidender Risikofaktor für die Ausbildung einer Parodontitis (53, 54). Des Weiteren beschreiben viele Autoren Tabakkonsum (54-58), die Erkrankung an Diabetes mellitus, das männliche Geschlecht (55, 56) die ethnische Herkunft (54) und ein hohes Alter (59) als Risikofaktoren.

Studien haben gezeigt, dass Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern, ein um das Fünffache gesteigertes Risiko zur Ausbildung einer Parodontitis haben (60), wobei das Ausmaß der parodontalen Destruktion und die gesteigerte Zahnverlustrate bei Rauchern stark mit der Menge des Tabakkonsums zu korrelieren scheint (61, 62). Die Pathophysiologie geht einerseits von der vasokonstriktorisches Wirkung des in Tabakwaren enthaltenen Nikotins aus, das zu einer verringerten Zirkulation und einer verminderten Transsudation von Sulkusflüssigkeit und somit zu einer reduzierten Immunantwort auf Parodontalpathogene und einer herabgesetzten Wundheilungsfähigkeit führt (63-65). Andererseits kommt es auf zellulärer Ebene in Gegenwart von Nikotin zu einer gestörten Chemotaxis neutrophiler Granulozyten (66), einer verstärkten Exprimierung von Interleukin-1 durch Keratinozyten (67) und einer verminderten Produktion von Antikörpern (68), wodurch die Abwehrleistung des Wirtes und die Fähigkeit zur Wundheilung nochmals reduziert wird.

Ein weiterer wichtiger Risikofaktor parodontaler Erkrankungen ist das männliche Geschlecht. Dem NHANES zufolge zeigen Männer in den Vereinigten Staaten eine um 50 % höhere Prävalenz als Frauen (6). Auch Zahlreiche Studien haben in der Vergangenheit belegt, dass Männer deutlich häufiger an einer Parodontitis erkranken bzw. schwerere Formen aufweisen, als Frauen in vergleichbarem Alter (6, 69, 70). Der Hintergrund für die Korrelation zwischen der Prävalenz parodontaler Erkrankungen und dem Geschlecht ist allerdings bis heute noch nicht vollständig geklärt (55). Genco et al. sagen, dass das biologische Geschlecht genetisch determiniert ist und grundsätzlich keine kongenitalen Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern in Bezug auf die Anfälligkeit für parodontale Erkrankungen bestehen, sondern vielmehr soziale, kulturelle und verhaltensbezogene Geschlechterunterschiede einen Einfluss auf die Zunahme umweltbedingter Risikofaktoren haben (56). Zwar weisen Männer tatsächlich allgemein eine schlechtere Mundhygiene als Frauen auf, allerdings zeigen sie bei Korrektur dieser Hygienedefizite nichtsdestotrotz bei Vergleich der klinischen Attachmentlevels eine größere Assoziation zu schweren Parodontitiden (55), weshalb der geschlechterunterschiedliche Lebenswandel möglicherweise nicht als alleinige Begründung für die höhere Prävalenz dienen kann.

1.2 Konventionelle Parodontitistherapie

Da der bakterielle Biofilm als ätiologischer Hauptfaktor für die Entstehung einer Parodontitis gilt, ist der Erfolg einer Therapie neben einer exzellenten häuslichen Mundhygiene des Patienten maßgeblich von der konsequenten Entfernung supragingivaler Beläge und der subgingivalen Plaque abhängig (71-73).

Unbehandelte Parodontitispatienten weisen eine drei- bis viermal höhere jährliche Zahnverlustrate auf, als Patienten, die einer Therapie zugeführt werden (74). Aufgrund dieser Erkenntnisse gilt die mechanische Plaque- und Zahnsteinreduktion mittels Scaling und Rootplanung (SRP), unabhängig davon, ob mit Hand- oder Schall- bzw. Ultraschallinstrumenten ausgeführt, als Goldstandard in der nichtchirurgischen Parodontitistherapie und wird in der Regel als Primärtherapie durchgeführt, da es sowohl die Inflammation, als auch die Sondierungstiefen reduziert und den Erhalt des Knochenniveaus sichert (74-76). Die Instrumentierung des gesunden Parodonts (ST 1-3 mm) ist hingegen kontraindiziert, da es hierbei zu Attachmentverlust kommt (74).

Auf zellulärer Ebene verschiebt sich nach mechanischer Therapie die pathologische mikrobielle Flora sowohl quantitativ als auch qualitativ zu Gunsten einer physiologisch assoziierten Flora und einer raschen Wiederbesiedelung wird vorgebeugt (77). So weichen Anaerobier Aerobiern, gram-negative Keime grampositiven und Spirochäten und bewegliche Stäbchen nichtbeweglichen Kokken (78). Darüber hinaus sinkt die Fließrate der Sulkusflüssigkeit und die Zahl immunologischer Zellen (78, 79).

Klinisch äußert sich diese Verschiebung in einer Reduktion der Blutung auf Sondierung um bis zu 60 %. Außerdem konnte in zahlreichen Studien nach SRP-Therapie ein klinischer Attachmentgewinn belegt werden, wobei moderate Taschen (4-6 mm) mit vergleichsweise moderatem, tiefe Taschen (> 7mm) mit stärkerem Attachmentgewinn reagieren (74).

Wie histologische Untersuchungen zeigen, handelt es sich hierbei nicht um bindegewebiges Attachment, welches zuvor verloren gegangen ist, sondern um die Ausbildung eines langen Saumepithels (80). Diese Epithelialisierung ist bereits circa eine Woche nach SRP abgeschlossen und verhindert somit die Wiederherstellung bindegewebiger parodontaler Fasern (80, 81).

Prognostisch muss vor Therapiebeginn beachtet werden, dass es sich um ein technisch anspruchsvolles und zeitaufwändiges Verfahren handelt, das an mehrwurzligen Zähnen, insbesondere mit bereits ausgeprägtem Furkationsbefall und solchen mit besonderer Wurzelanatomie grundsätzlich weniger erfolgreich ist, als an einwurzeligen Zähnen (82, 83).

1.3 Die Sulkusflüssigkeit

Die Sulkusflüssigkeit (GCF, *gingival crevicular fluid*) ist ein komplexes Serumfiltrat, das durch das Saumepithel in den gingivalen Sulkus, bzw. in die parodontalen Tasche gelangt (52, 84-86) und hier eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der Struktur des Saumepithels und der antimikrobiellen Abwehrleistung darstellt (86).

Durch die Fähigkeit, Bakterien und Partikel aus dem Sulkus heraus zu spülen, wird ihr einerseits eine mechanische Schutzwirkung zugesprochen (87-89), andererseits wirkt sie als Transportmechanismus für Immunglobuline in die Mundhöhle (90, 91).

Das GCF setzt sich aus über 65 Bestandteilen zusammen (92), hauptsächlich finden sich hier Serumelektrolyte, körpereigene Enzyme und deren Inhibitoren, Immunglobuline, Lipoproteine, Fibrinogen, zelluläre Bestandteile, Entzündungsmediatoren und Antikörper gegen Bakterien der dentalen Plaque sowie Gewebeabbauprodukte. (92-94)

Die zellulären Bestandteile rekrutieren sich allen voran aus neutrophilen Granulozyten, die den wichtigsten Teil des zellulären Abwehrmechanismus im gingivalen Sulkus darstellen (86).

Zahlreiche Autoren befassten sich insbesondere in den 1960er Jahren, aber auch danach, mit der Fragestellung, ob die Sulkusflüssigkeit ein rein entzündliches Exsudat ist, oder ob sie sich auch in parodontal gesunden Geweben findet.

So beschreiben einige Autoren das GCF als Exsudat, das sich im Sulkus oder der parodontalen Tasche entzündlich veränderter Gingiva findet, nicht jedoch in der gesunden Gingiva (85, 95, 96).

Zahlreiche andere Autoren (84, 94, 97-99) hingegen bezeichnen die Sulkusflüssigkeit als eine Flüssigkeit, die physiologischer Weise auch in gesundem nicht entzündetem Gewebe zu finden ist.

In klinischen und histologischen Studien wiesen Löe et al. nach, dass das GCF bereits auftritt, bevor klinische Anzeichen einer Inflammation sichtbar sind, histologisch hingegen sei die entzündliche Gewebeveränderung zu diesem Zeitpunkt bereits erkennbar. Laut Löe et al. hat es daher nur den Anschein, dass auch die gesunde Gingiva Sulkusflüssigkeit produzieren würde (95, 96).

Sowohl die ionische, als auch die zelluläre Zusammensetzung des GCF aus klinisch gesunden Geweben ähnelt der des entzündlichen Exsudates bei Inflammation (84, 94, 98), was die These von Löe et al. stützt. Die Proteinzusammensetzung hingegen unterscheidet sich, wobei sich in dem GCF klinisch gesunder Gewebe geringere Proteinkonzentrationen finden, als bei entzündlichen Veränderungen (84). Der niedrigere Proteingehalt des GCF bei klinisch gesunden Verhältnissen spricht für ein Transsudat, weniger für ein Exsudat.

Alfano sieht außerdem in der zeitlichen Verzögerung zwischen klinischen Anzeichen einer Inflammation und dem Auftreten von Sulkusflüssigkeit als entzündliches Exsudat einen Widerspruch und geht auf Grundlage der Arbeit von Diamond et al. (100) davon aus, dass es verschiedene Mechanismen zur Freisetzung der Sulkusflüssigkeit geben muss.

Er ist der Meinung, die Sulkusflüssigkeit sei sowohl physiologischer, als auch pathologischer Natur und beschreibt hierzu zwei unterschiedliche Mechanismen, die die Entstehung und Steigerung der Sulkusflüssigkeit erklären.

Im nicht entzündlich veränderten Sulkus kommt es durch Ablagerung von bakteriellen Stoffwechselprodukten aus dem dentalen Biofilm an der Basalmembran des Saumepithels zur Generation eines osmotischen Gradienten. Dem Gefälle folgend, wird intrazelluläre Flüssigkeit aus dem Saumepithel in den Sulkus abgegeben, die Sulkusflüssigkeit (84).

Sofern die bakterielle Plaque nicht entfernt wird, kommt es zur Anreicherung der Stoffwechselprodukte, die schlussendlich die Basalmembran durchbrechen können. Dies wiederum führt in Abhängigkeit von den Eigenschaften der Stoffwechselprodukte zur Bildung eines klassischen entzündlichen Exsudates (84).

In einer bemerkenswerten Studie an parodontal gesunden Hunden konnten Brill et al. (101) zeigen, dass eine chemische oder mechanische Irritation die

Produktion von Sulkusflüssigkeit initiiert. So bewirkt bereits der Kauvorgang eine Anregung der GCF-Produktion.

Zusammenfassend sprechen viele Anzeichen dafür, dass die Sulkusflüssigkeit eine sehr komplex zusammengestellte Gewebeflüssigkeit ist, die sich im gesunden gingivalen Sulkus als Transsudat und in einer entzündlich bedingten parodontalen Tasche als Exsudat befindet (84, 94, 97-99, 102).

Trotz der unterschiedlichen Auffassungen bezüglich der Genese, ist es unumstritten, dass die Sulkusflüssigkeit ein einzigartiges diagnostisches Medium darstellt (86), dass bereits früh als Indikator zur Analyse des parodontalen Zustandes herangezogen wurde (86, 95).

Die Menge an GCF steht im direkten Verhältnis zur gesteigerten Gefäßpermeabilität und zum Ausmaß der Ulzerationen des Taschenepithels des entzündlich veränderten Sulkus (92). Oliver et al. (103) sehen eine starke Korrelation zwischen Sulkusfließrate und klinischen Entzündungszeichen, wohingegen Hancock et al. (104) die Wertigkeit Menge an Exsudat zur Vorhersage der Schwere der Inflammation nicht unterstützen.

Demnach könnte die Menge an Sulkusflüssigkeit als ein klinischer Parameter für die Anwesenheit einer entzündlichen Veränderung herangezogen werden, jedoch nicht zur Beurteilung des Schweregrades.

Durch die fortschreitende Technologie konnten im weiteren Verlauf auch eine Vielzahl der Bestandteile der Sulkusflüssigkeit hinsichtlich ihrer Eignung als Biomarker zur Abbildung der Progression einer Parodontitis untersucht werden, wobei sich bei vielen potentiellen Markern der Nachweis als nicht überaus spezifisch darstellte. Weder ist es den meisten Markern möglich, die Schwere der parodontalen Erkrankung korrekt abzubilden, noch lässt sich durch die eher unpräzise Entnahme des diagnostischen Mediums eine erkrankte Stelle eindeutig von einer benachbarten, nicht erkrankten Stelle unterscheiden (92).

Wie zahlreich belegt, nehmen Prostaglandin E₂ und die Matrixmetalloproteinase-8 als Biomarker, aufgrund ihrer hohen Spezifität jedoch eine herausragende Stellung in der Parodontitisdiagnostik ein (52, 105), weshalb sie im Rahmen dieser Studie verwendet wurden und im Folgenden näher erläutert werden sollen.

1.4 Prostaglandin E₂

1.4.1 Synthese

Prostaglandin E₂ ist ein Entzündungsmediator aus der Reihe der Eikosanoiden und wird aus der Arachidonsäure gebildet. Die Arachidonsäure ist eine vierfach ungesättigte Fettsäure, die als Membranbestandteil in nahezu jeder Zelle vorkommt. Zu Beginn wird die Arachidonsäure durch die Phospholipase A₂ aus Phospholipiden der Membran mobilisiert. Sie wird dann einerseits von der Lipoxygenase (LOX) zu den Leukotrienen, andererseits durch die Cyclooxygenasen (COX-1, COX-2) zu den Prostaglandinen, Prostacyclinen und Thromboxanen umgewandelt. Die bioaktiven Prostanoiden PGI₂, PGD₂, PGF_{2α}, TXA₂ und PGE₂ werden schließlich aus PGH₂ durch die Prostaglandin-E-Synthase synthetisiert (106, 107).

1.4.2 Wirkung und Regulation

PGE₂ hat ein komplexes Wirkungsspektrum im menschlichen Körper, das über die vier Subtypen des membranständigen G-Protein-gekoppelten Rezeptors EP vermittelt wird (106, 107). Während die Cyclooxygenase-1 dauerhaft synthetisiert wird, kommt die Cyclooxygenase-2 ausschließlich in entzündlich veränderten Geweben vor, weshalb ihr eine gesonderte Rolle zukommt (108). So hat PGE₂, dass durch den COX-2-Typ gebildet wird, von allen Prostaglandinen die stärkste proinflammatorische und schmerzverstärkende Wirkung (107).

Neben der Verstärkung von Schmerzmediatoren wie Bradykinin und Histamin (109), wirkt PGE₂ hyperalgetisch, indem es die Schwellengrenze von Natriumkanälen an sensorischen Nervenenden herabsetzt (110). Seine pyretische Wirkung vermittelt PGE₂ über den EP₃ Rezeptor der Endothelzellen des Hypothalamus, der die Erhöhung der Körpertemperatur reguliert (111, 112). Zahlreich belegt ist außerdem die vasodilatierende Wirkung von PGE₂ (106, 113), die durch den EP₂-Rezeptor vermittelt wird (114) und zur Ausprägung der klassischen Entzündungszeichen beiträgt. Je nach Gefäßbett kann PGE₂ durch Kontraktion der glatten Muskulatur allerdings auch gefäßverengend wirken (115). Durch Stimulation der Osteoklastenbildung über den EP₄-Rezeptor wirkt PGE₂ darüber hinaus knochenresorptiv (106, 116-120), weshalb es im Rahmen der

Parodontitis mit Knochen- und folglich Attachmentverlust eine Schlüsselrolle einnimmt (106).

Hierzu interagieren PGE₂, Interleukin-1 (IL-1) und Tumor Nekrose Faktor (TNF) synergistisch und stimulieren die Ausbildung des *receptor activator of nuclear factor-κB ligand* (RANKL) an der Oberfläche von Osteoblasten und Stromazellen, was die Proliferation von Präosteoklasten zu Osteoklasten über die Bindung an den *receptor activator of nuclear factor-κB* (RANK) im Rahmen des OPG/RANK/RANKL-Systems vermittelt (121). So induzieren beispielsweise Parodontale Ligamentzellen (PDL-Zellen) unter mechanischer Belastung die Differenzierung von Osteoklasten über RANKL, indem sie vermehrt PGE₂ synthetisieren (122).

PGE₂, IL-1 und TNFα verstärken zudem die Sekretion von Matrixmetalloproteinasen aus Monozyten und sind somit als terminale Effektormoleküle maßgeblich an der Bindegewebsdestruktion in parodontalen Geweben beteiligt (52, 123).

Andererseits zeigt durch Makrophagen synthetisiertes PGE₂ eine immunsupprimierende Wirkung durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels und hemmt die T-Lymphozyten-vermittelte Interleukin-2 (IL-2) und Interferon γ (IFNγ) Produktion sowie das durch Makrophagen freigesetzte IL-1 und TNF (107, 124). Diese negative Rückkoppelung ist der selbstlimitierende Faktor, der eine unbegrenzt überschießende Entzündungsreaktion durch PGE₂ verhindert.

1.4.3 Diagnostikum

Diverse Studien belegen, dass die Konzentration von PGE₂ im GCF gesunder Patienten gering oder nicht messbar ist, parodontal erkrankte Patienten hingegen weisen auch vor klinisch messbarem Attachmentverlust deutlich erhöhte Konzentrationen auf (52, 125-127).

Offenbacher et al. (128) beschreiben in parodontal erkrankten Geweben zwei- bis dreimal höhere, in aktiven Phasen mit Progression fünf- bis sechsmal höhere PGE₂-Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Geweben, wobei in experimentellen Gingivitismodellen binnen vier Wochen ein Anstieg von 20,5 ng/ml auf 53,5 ng/ml festgestellt wurde (129). Aktive Taschen chronischer Parodontitispatienten weisen PGE₂-Konzentrationen von 305,6±56,5 ng/ml auf.

Offenbacher et al. nehmen an, dass eine Konzentration von 300 ng/ml mit einem Attachmentverlust von 0,5 – 1,0 mm/Jahr einhergeht (128).

Der zahlreich belegte korrelierende Attachment- und Knochenverlust, machen PGE₂ nicht nur zu einem wichtigen pathogenen Faktor parodontaler Erkrankungen, sondern auch zu einem spezifischen Biomarker, der die Schwere und die Aktivität einer Parodontalerkrankung widerspiegelt (52, 117, 125, 130, 131). In bestimmten Hochrisikopatienten sind auch in klinisch gesunden Geweben deutlich erhöhte PGE₂-Konzentrationen festzustellen, hierzu gehören vornehmlich Patienten mit nicht eingestelltem Diabetes mellitus, aber auch Patienten mit refraktären Läsionen und aggressiver Parodontitis (52).

Hieraus wird abgeleitet, dass die GCF-Konzentration von PGE₂ nicht nur als lokaler Entzündungsmarker dient, sondern auch mit der allgemeinen Reaktionsbereitschaft eines Organismus auf einen inflammatorischen Prozess korreliert (52).

1.5 Matrixmetalloproteinase-8

1.5.1 Synthese

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind kalziumabhängige, zinkhaltige Endopeptidasen, die in der Regel als Zymogene exprimiert werden (132, 133). Die Aktivierung erfolgt über die Abspaltung der Pro-Domäne entweder autoproteolytisch, durch andere MMPs oder durch Serinproteasen. Im Rahmen des physiologischen Gewebeumbaus katalysieren sie den Abbau von Kollagenen, Elastin, Gelatine, Glykoproteinen und Proteoglykanen aus der extrazellulären Matrix (133, 134).

1.5.2 Wirkung und Regulation

Als Reaktion auf einen entzündlichen Reiz und auf mikrobielle Pathogene, die sich im oralen Biofilm befinden (135) schütten Zellen des PDL vermehrt MMPs aus, die wiederum den Abbau von Kollagen-Typ-I katalysieren. Dies gilt als Hauptursache für klinischen Attachmentverlust (136), da Typ-I-Kollagen den größten Bestandteil der extrazellulären Matrix (ECM) der parodontalen Gewebe darstellt (137, 138) und sich die zunehmende Progression der Parodontitis durch

die Degeneration parodontaler Fasern und des hiermit verbundenen Alveolarknochens auszeichnet (139, 140).

Die Matrixmetalloproteinase-8 (MMP-8) gilt als eine der wichtigsten interstitiellen Kollagenasen im Rahmen der parodontalen Gewebedestruktion, die sich bei parodontal erkrankten Patienten nicht nur im Speichel, sondern auch im GCF/PISF und in den gingivalen Geweben selbst finden lässt (140, 141). Sie ist als einziges Enzym der MMP-Familie dazu in der Lage, sowohl Typ I, als auch Typ III Kollagen zu spalten (142) und daher zu einem hohen Maß mit der Schwere der parodontalen Entzündung assoziiert (140).

Die Regulation der Aktivierung und Inhibition von MMPs ist sehr komplex, wobei die wichtigsten endogenen Inhibitoren die *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) sind. Hierzu gehören das Plasmaprotein alpha-2 Makroglobulin, der *tissue factor pathway inhibitor 2* (TFPI2), Prokollagen Typ I C-terminales Propeptid (PICP), RECK und das *beta-amyloid precursor protein* (143).

Das Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs ist entscheidend zur Aufrechterhaltung der Integrität gesunder parodontaler Gewebe, entsprechend führt eine Verschiebung dieses Gleichgewichts zu Gunsten der MMPs zum Abbau von Bindegewebe und Alveolarknochen (136).

1.5.3 Diagnostikum

Die Synthese und Ausschüttung der MMP-8 geht von verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen, Fibroblasten und neutrophilen Granulozyten aus, wobei letzteren eine entscheidende Bedeutung zugesprochen wird. So korreliert die Konzentration von MMP-8 im GCF deutlich mit der Zahl neutrophiler Granulozyten, weshalb man davon ausgeht, dass deren übermäßige Migration im Rahmen des inflammatorischen Prozesses einen entscheidenden Faktor für die Gewebedestruktion des Parodonts darstellt (144).

Die Korrelation erhöhter Konzentrationen von MMP-8 in Speichel, GCF und den betroffenen Geweben bei Patienten, die an einer chronischen Parodontitis leiden, haben in den letzten Jahren dazu geführt, dass sich MMP-8 als Biomarker etabliert hat (136).

Marcaccini et al. und Kinane et al. belegen die Sensitivität von MMP-8 als Biomarker in ihren Studien. Sie zeigen, dass die MMP-8-Konzentrationen bei Patienten mit chronischer Parodontitis vor Initialtherapie deutlich höher waren,

als nach erfolgreicher Therapie, ohne jedoch ein Konzentrationslevel im Normbereich zu erreichen (139, 145).

Besonders erhöhte MMP-8-Konzentrationen im GCF zeigen sich in Gegenwart von *Treponema denticola* und *Tannerella forsythia*, wofür die Virulenzfaktoren der Keime verantwortlich gemacht werden (146), aber auch in Hochrisikopatienten mit Diabetes mellitus führt die chronische Hypercholesterinämie zu einer verstärkten Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine, welche wiederum für die vermehrte Expression von MMP-8 verantwortlich gemacht wird. Ein bestehender Diabetes mellitus korreliert demnach nicht nur mit erhöhten PGE₂- sondern auch mit erhöhten MMP-8-Konzentrationen (147).

2 Zielsetzung der Studie

Das Ziel dieser Studie war es, den Einfluss einer nicht-chirurgischen Therapie auf PGE₂ und MMP-8 und die wechselseitigen Abhängigkeiten mit klinischen Parametern und sechs parodontalpathogenen Keimen zu untersuchen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine prospektiv beobachtende multiple Kohortenstudie, deren Ziel die Herausstellung von Zusammenhängen zwischen den verschiedenen klinischen und laborchemischen Parametern innerhalb und zwischen den verschiedenen, im Folgenden näher beschriebenen Gruppen nach SRP-Therapie war. Im Vorfeld wurde die Studie durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München geprüft und bewilligt (Referenznummer: 025-11).

3.2 Studienpopulation

Im Rahmen dieser Studie wurden 152 Patienten, davon 70 weiblich und 82 männlich zum Zeitpunkt Null (Initial) sowie 6 Monate später (Recall) in den klinischen Kursen der Konservierenden Zahnheilkunde der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie des Klinikums der Universität München untersucht. Der Altersdurchschnitt der Patienten betrug $52,3 \pm 9,61$ Jahre (18-65). Innerhalb der Studienpopulation befanden sich in der Initialgruppe 93 Nichtraucher und 56 Raucher, in der Recallgruppe 94 Nichtraucher und 56 Raucher. Schwangere Patientinnen und Patienten mit Diabetes mellitus wurden von der Studie ausgeschlossen.

3.3 Klinische Parameter

Die klinische Parodontitisdiagnostik umfasst das Messen der Sondierungstiefe und des entsprechenden Attachmentverlustes, die Erfassung des BOP, des Gingival Index sowie eine röntgenologische Analyse zur Beurteilung des Alveolarknochenabbaus (148).

Das zu Beginn der Initialtherapie angefertigte Orthopantomogramm (OPG) wurde einer röntgenologischen Analyse zur Beurteilung des Alveolarknochenabbaus unterzogen, wobei der jeweilige Knochenabbau durch zwei unabhängige Untersucher vermessen und anschließend als Prozentwert erfasst wurde. Bei unterschiedlichen Messergebnissen der Untersucher wurde ein Mittelwert

gebildet. Zum Zeitpunkt null sowie nach sechs Monaten wurde eine 6-Punkt-Messung durchgeführt, die Blutung auf Sondieren und der Plaque-Index erfasst und eine Entfernung der supragingivalen Plaque vorgenommen. Bei vorhandenen Parodontaltaschen mit $ST \geq 4\text{mm}$ erfolgte zudem eine SRP-Therapie.

3.3.1 Sondierungstiefe

Die Messung der Sondierungstiefen mit kalibrierten Parodontalsonden (Millimeterskalierung 3-6-9-12) ist ein Standardverfahren zur Beurteilung der Ausdehnung parodontaler Gewebedestruktion. Im Rahmen der 6-Punkt-Messung (mesiobukkal, bukkal, distobukkal, mesionlingual/-palatinal, lingual/palatinal, distolingual/-palatinal) eines jeden Zahnes, wurde eine PCP 10 Parodontalsonde (Hu-Friedy Europe, Leimen, Deutschland) drucklos in den Sulkus eingeführt und die Strecke zwischen Taschenboden und dem höchsten Punkt der marginalen Gingiva gemessen (148).

3.3.2 Blutung auf Sondieren

Entzündlich verändertes Parodontalgewebe beginnt bei Sondierung des Sulkus, bzw. der parodontalen Tasche, aufgrund von Mikroulzerationen im Taschenepithel und der Fragilität, des darunterliegenden Gefäßsystems, zu bluten, weshalb die Blutung auf Sondieren (BOP=*bleeding on probing*) ein objektives Anzeichen für das Vorhandensein einer entzündlichen Veränderung darstellt (148).

Die Erstellung eines BOP-Index (Messpunkte mit Blutung/Messpunkte gesamt) erfolgte im Rahmen der 6-Punkt-Messung und stellt eine gute Grundlage zur Feststellung der Ausdehnung des entzündlichen Prozesses dar. Ein BOP-Index ist daher sowohl für den Behandler, als auch für den Patienten ein hilfreiches Diagnostikum (148).

3.3.3 Plaque-Index

Der Sulkus-Blutungs-Index (SBI) dient der Beurteilung der gingivalen Inflammation und wurde in Kombination mit dem Plaque-Index (PI) erstellt. Zur Erfassung des SBI wurde die Parodontalsonde drucklos durch den Sulkus der vestibulären und oralen Zahnflächen, abweichend von der Modifikation durch

Lange (149), aller Zähne gestrichen, eine auftretende Blutung vermerkt und ein Index erstellt. Analog hierzu wurde, zur Beurteilung der Mundhygiene, jede Zahnfläche mithilfe eines Plaquerelevators (Mira-2-Ton, Hager & Werken, Deutschland) bestrichen und anschließend der PI erhoben.

3.4 Probenentnahme

Zum Zeitpunkt Null sowie nach 6 Monaten wurde nach Aufnahme der klinischen Parameter die Sulkusflüssigkeit mithilfe steriler GFC/PISF Collection Stripes (Dentognostics GmbH, D-Jena), die Bakterienproben mittels steriler Papierspitzen der Größe ISO 40 (VDW GmbH, München, Deutschland) in jedem Quadranten aus der jeweils tiefsten parodontalen Taschen gewonnen. Nach schonender Trocknung des betreffenden Zahnes mithilfe von Luft und Watterollen, wurden die GCF-Streifen 2 mm in den jeweiligen Sulkus eingeführt und für 30 Sekunden belassen. Anschließend wurden die Papierspitzen in den Sulkus der gleichen Entnahmestelle bis zum Taschenfundus eingeführt und wiederum für 10 Sekunden belassen. Zur Lagerung und Transport wurden je Patient insgesamt vier GCF-Streifen in Cryo.s Einfrierröhrchen (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) und insgesamt vier Papierspitzen in 1,5 ml-Reagiergefäße (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gegeben. Alle Probenröhrchen wurden mit einer anonymisierten Identifikationsnummer des Patienten versehen und anschließend bei -80° C eingelagert.

3.5 PGE₂-Analyse

Die Messung der PGE₂-Konzentrationen in den Patientenproben erfolgte über ein kompetitives ELISA-Verfahren unter Zuhilfenahme des „PGE₂ high sensitivity EIA-Kits“ (Enzo Life Science, Lörrach, Deutschland).

Die im Folgenden beschriebenen Messungen wurden nach dem vom Hersteller zur Verfügung gestellten Protokoll durchgeführt. Alle Proben und verwendeten Reagenzien wurden unter Zuhilfenahme von verstellbaren Einkanalpipetten (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und dem Aufnahmevolumen entsprechenden Pipettenspitzen (Biozyme Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland), bzw. elektronischen Multikanalpipetten (Thermo Fisher Scientific,

Massachusetts, USA) und elektronischen Multipipetten mit 5 µl-Combitip (Eppendorf AG) verarbeitet.

Standard: Zunächst erfolgte die Herstellung einer Standardreihe, anhand deren optischer Dichte (OD) die PGE₂-Konzentrationen der Patientenproben am Ende einer jeden Versuchsreihe bestimmt wurden. Es wurden für jede Versuchsreihe je acht Standardlösungen in absteigender, genormter Verdünnung des „Prostaglandine E₂ Standard“ in 1,5 ml-Reagenzgefäßen (Sarstedt) hergestellt und anschließend in zweifacher Ausführung pipettiert.

Proben: Die zuvor in 400 µl *phosphate buffered saline* (PBS) gelösten Patientenproben wurden zunächst mit dem mitgelieferten Probenpuffer („Assay Buffer“) im Verhältnis 1:10 verdünnt, mithilfe eines Vortexers (Thermo Fisher Scientific) vermischt und anschließend in je zweifacher Ausführung pipettiert, sodass bei einer Versuchsreihe mit einer 96-Well-Platte 36x2 Patientenproben gemessen werden konnten.

Dem Protokoll folgend, blieben 4x2 Wells zur Bestimmung des Leerwertes (Blank), der nicht-spezifischen Bindung (NSB), der Positiv- und der Negativkontrolle frei von Standards und Proben.

Im Rahmen der Positivkontrolle wurde ausschließlich die Reaktionsfähigkeit der alkalischen Phosphatase während der Dephosphorylierung von Para-Nitrophenylphosphat zu Para-Nitrophenyl überprüft, die Negativkontrolle erfolgte über die Messung der Bindung des „Antibody“ mit dem „Conjugate“, was im Rahmen eines kompetitiven ELISA einer Bindung von 100 % entspricht. Es folgte die Zugabe von „PGE₂ ELISA Conjugate“.

Durch Pipettieren des „PGE₂ HS-ELISA Antibody“, banden sowohl die PGE₂-Moleküle aus den Patientenproben und die Enzym-konjugierten PGE₂-Moleküle („PGE₂ ELISA Conjugate“) in einer kompetitiven Antigen-Antikörper-Reaktion an die monoklonalen Mouse-Anti-PGE₂-Antikörper. Letztere wurden wiederum von den Goat-Anti-Mouse-IgG-Antikörpern gebunden und somit auf der Microtiterplatte fixiert. Je zwei Wells blieben frei von „PGE₂ HS-ELISA Antibody“ und dienten der Erfassung der nicht spezifischen Bindung (NSB). Nach einer Inkubationszeit von 18-24 h bei 4° C, wurden überschüssige Reagenzien aus den Wells unter Verwendung des mitgelieferten Waschpuffers („wash buffer concentrate“) herausgewaschen und Para-Nitrophenylphosphat („pNpp-Substrate“) hinzu pipettiert. Die konjugiert gebundene alkalische Phosphatase

dephosphorylierte die Para-Nitrophenylphosphate während einer Inkubationszeit von 60 min bei 37° C in einem Brutschrank (Thermo Fisher Scientific) zu Para-Nitrophenolen, dessen pH-unabhängiges Absorptionsmaximum bei 405 nm liegt. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von Natriumphosphat („stop solution“) beendet und die OD der Proben bei 405 nm durch ein Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Abweichungen der gemessenen OD durch etwaige Lichtabsorption der Oberflächenbeschaffenheit der Microtiterplatte, wurden nach einer Korrekturmessung bei 590 nm von der Erstmessung subtrahiert und die Ergebnisse digital ausgewertet.

3.6 MMP8-Analyse

Die Messung der MMP-8-Konzentrationen in den Patientenproben erfolgte über ein Sandwich-ELISA-Verfahren unter Zuhilfenahme des „dentoELISA aMMP8 EIA-Kits“ (Dentognostics, Jena, Deutschland).

Alle Messungen wurden nach dem vom Hersteller zu Verfügung gestellten Protokoll durchgeführt. Sämtliche Proben und verwendeten Reagenzien wurden unter Zuhilfenahme von verstellbaren Einkanalpipetten (Eppendorf AG) und dem Aufnahmevermögen entsprechenden Pipettenspitzen (Biozyme Scientific GmbH), bzw. elektronischen Multikanalpipetten (Thermo Fisher Scientific) und elektronischen Multipipetten mit 5 µl-Combitip (Eppendorf AG) verarbeitet.

Standard: Für jede Versuchsreihe wurden die fünf mitgelieferten Kalibratoren („CAL1-5“), anhand deren OD die MMP-8-Konzentrationen der Patientenproben am Ende einer jeden Versuchsreihe bestimmt wurden, in zweifacher Ausführung und in absteigender Konzentration pipettiert.

Proben: Die zuvor in 400 µl PBS gelösten Patientenproben wurden zunächst mit dem mitgelieferten Probenpuffer („DIL“) im Verhältnis 1:400 verdünnt, mithilfe eines Vortexers (Thermo Fisher Scientific) vermischt und anschließend in je zweifacher Ausführung pipettiert, sodass bei einer Versuchsreihe mit einer 96-Well-Platte 40x2 Patientenproben gemessen wurden. In zwei Wells, die frei von Standards und Proben blieben, wurde die mitgelieferte Positivkontrolle („CONTROL“) pipettiert. Zur Bestimmung des Nullwertes wurden nochmals zwei Wells frei von Standards und Proben belassen und der mitgelieferte Probenpuffer („DIL“) pipettiert.

Anschließend wurde die Microtiterplatte bei 37° C für 60 min in einem Brutschrank (Thermo Fisher Scientific) inkubiert, woraufhin überschüssige Reagenzien unter Verwendung des mitgelieferten Waschpuffers („WASHBUF“) aus den Wells herausgewaschen wurden. Durch Zugabe von „CONJ HRP“ und einer erneuten Inkubation bei 37 ° für 30 min konnte der monoklonale, peroxidasegekoppelter anti-aMMP-8-Antikörper an die aMMP-8-Moleküle der Proben und Standards, im Sinne des Sandwich-ELISA-Verfahrens, binden. Es folgte die Zugabe des „SUBSTR TMB“, das während einer Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min auf einem Plattenschüttler (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) durch die anti-aMMP-8-Antikörper-gebundene Peroxidase oxidiert wurde und anschließend ein pH-unabhängiges Absorptionsmaximum von 450 nm aufwies. Die Reaktion wurde im Folgenden durch Zugabe von Schwefelsäure („STOP“) beendet und die OD der Proben mit einem Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific) bei 450 nm gemessen. Abweichungen der OD durch etwaige Lichtabsorptionen der Oberflächenbeschaffenheit der Microtiterplatte, wurden nach einer Korrekturmessung bei 620 nm von der Erstmessung subtrahiert und die Ergebnisse digital ausgewertet.

3.7 Analyse der parodontalpathogenen Erreger

Die Messung der Konzentrationen der parodontalpathogenen Keime Aa, Pg, Td, Tf, Pi und Fn wurde stets nach den vom Hersteller zu Verfügung gestellten Protokollen durchgeführt und erfolgte über den spezifischen Nachweis von Desoxyribonukleinsäuren in drei aufeinander folgenden Schritten:

- DNA-Isolation
- DNA-Amplifikation
- DNA-Hybridisierung und ELISA-Detektion

3.7.1 DNA-Isolation

Aus den gewonnenen Patientenproben wurde zunächst mithilfe des „MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) und einem vollautomatisierten Nukleinsäure-Aufreinigungssystem (MagNA Pure LC, Roche Diagnostics GmbH) bakterielle DNA isoliert.

Nukleinsäuren neigen zur ladungsabhängigen Akkumulation an porösen Glasoberflächen, dieses Phänomen wird durch das MagNa Pure LC-System zur Extraktion von DNA genutzt. Das System verwendet glasbeschichtete Silicapartikel mit einem magnetitbeschichteten Eisenkern. Die Nukleinsäuren binden an die Silicapartikel und können anschließend mithilfe eines Magneten extrahiert werden.

Zunächst wurden die Patientenproben mit Proteinkinase K und dem mitgeliefertem Lysis Buffer versetzt, während der Erhitzung auf zunächst 65° C, dann 95° C im Wasserbad (Thermo Fisher Scientific) wurden die bakteriellen Zellen lysiert und die Nukleinsäuren freigelegt. Anschließend wurden die Proben für eine Minute bei 10 000 rpm zentrifugiert und auf Eis gelegt. Vollautomatisch wurden im Folgenden die magnetischen Silicapartikel (MGP), an deren Oberfläche die freien Nukleinsäuren binden, hinzu pipettiert und durch stringentes dreistufiges Waschen von Überresten und Verunreinigungen befreit. Am Ende eines Extraktionslaufes wurden die Proben bei hoher Temperatur inkubiert wodurch sich die Nukleinsäuren wiederum von den Silicapartikeln ablösen und nach Entfernung der MGPs aufgereinigt zurückblieben. Die nunmehr gereinigte DNA wurde im folgenden Schritt vervielfältigt.

3.7.2 DNA-Amplifikation

Die DNA-Amplifikation erfolgte mittels einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) unter Zuhilfenahme eines Thermocyclers (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und des „Parident-Multiplex-PCR-Systems“ (Amplex Diagnostics GmbH, Gars am Inn, Deutschland).

Der Primer-Mix („PRIMER PAF“) enthält markierte Oligonukleotidprimer zur Amplifikation und späteren Hybridisierung von DNA der Erreger Pg, Aa und Fn, während der Primer-Mix („PRIMER PMT“) Oligonukleotidprimer für die Vervielfältigung und Hybridisierung von DNA der Keime Tf, Pi und Td bereitstellt. Zunächst wurden 5 µl einer jeden Probe aufgereinigter DNA in einem 1,5 ml-Reagenzröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit dem Nukleotid-Mix („dNTP“), einem PCR-Puffer, einer DNA-Polymerase und dem Primer-Mix („PRIMER PAF“), beziehungsweise („PRIMER PMT“) gemischt und anschließend in eine 96-Well-Microtiterplatte pipettiert. Die

Amplifikationsreaktion wurde vollautomatisch mithilfe eines Thermocyclers (Bio-Rad Laboratories GmbH) durchgeführt.

3.7.3 DNA-Hybridisierung und ELISA-Detektion

Unter Verwendung des „Parident-Multiplex-PCR-Systems“ wurden die einzelsträngigen Amplifikate einer jeden Probe anschließend zur sequenzspezifischen Detektion in farbodierte Wells mit immobilisierten, für die sechs genannten Erreger spezifischen Sonden pipettiert („MTS BR XX“) und durch Zugabe des Hybridisierungspuffers („HYBUF“) hybridisiert.

Nach dreißigminütiger Inkubation bei 50° C, folgte das Waschen der Wells zunächst mit der vorgewärmten stringenten Waschlösung („STRGWASH“), dann mit dem Waschpuffer („WASHBUF“). Das anschließend pipettierte Peroxidase-Konjugat („CONJ“) band während einer Inkubationszeit von dreißig Minuten bei Raumtemperatur an die Markierungen der Sonden. Nach einem weiteren Waschgang mit dem Waschpuffer wurde das Substrat TMB („SUBS TMB“) zu pipettiert, das nun während einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37° C im Brutschrank (Thermo Fisher Scientific) durch das Peroxidase-Konjugate oxidiert wurde und anschließend ein pH-unabhängiges Absorptionsmaximum von 450 nm aufwies. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Phosphorsäure („STOP“) beendet und die OD der Proben mit einem Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific) bei 450 nm gemessen. Abweichungen der gemessenen OD durch etwaige Lichtabsorption der Oberflächenbeschaffenheit der Microtiterplatte, wurden nach einer Korrekturmessung bei 620 nm von der Erstmessung subtrahiert und die Ergebnisse digital ausgewertet.

3.8 Statistische Auswertung

3.8.1 Kolmogorov-Smirnov-Test

Mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurde zunächst untersucht, wie die betrachteten klinischen Daten (Sondierungstiefe, BOP, Plaqueindex) und die GFC-Konzentrationen von PGE₂ und MMP-8, in den beiden Gruppen (Initial, Recall) verteilt sind. Bei signifikanten Ergebnissen ($p < 0,05$) wurde die Nullhypothese einer Normalverteilung abgelehnt, andernfalls beibehalten.

3.8.2 Wilcoxon-Test

Zur Bestimmung der Signifikanzen der Unterschiede zwischen den jeweiligen Initial- und Recallgruppen wurde bei nicht normalverteilten Variablen der nicht-parametrische Wilcoxon-Test angewendet, wobei signifikante Testergebnisse ($p < 0,05$) als signifikante Unterschiede interpretiert wurden.

3.8.3 Chi-Quadrat-Test nach Pearson/Exakter Fisher-Test

Zur statistischen Auswertung der parodontalpathogenen Keime wurden Kreuztabellen erstellt, in denen die Anzahl der erkrankten Patienten für jeden Erreger einzeln vor und nach Therapie gegenübergestellt wurden. Zur Bestimmung der Signifikanzen der Unterschiede wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson, bzw. der exakte Fisher-Test durchgeführt.

3.8.4 Rangkorrelation nach Spearman

Im Anschluss an den Wilcoxon-Test wurden die Zusammenhänge der erhobenen Daten mithilfe der Rangkorrelation nach Spearman ausgewertet. Der Rangkorrelationskoeffizient (Spearman's ρ) ist ein Wert zwischen -1 und 1, wobei eine maximale Korrelation zweier Parameter den Wert 1, bzw. eine maximale negative Korrelation den Wert -1 aufweist. Je stärker sich der Rangkorrelationskoeffizient dem Wert 1, bzw. -1 annähert, desto größer ist die Effektstärke der Korrelation.

4 Ergebnisse

4.1 Studienpopulation

Bei einer vergleichsweise großen Anzahl an Studienteilnehmern hat sich bei der Erhebung der klinischen und laborchemischen Daten eine gewisse *Dropout*-, beziehungsweise *Lost-to-follow-up*-Rate nicht vermeiden lassen, weshalb im Folgenden die genauere Zusammensetzung der Studienpopulation im Hinblick auf die erfassten Daten erläutert werden soll. Eine Übersicht über die demographischen Daten der Studienpopulation kann Tabelle 1 entnommen werden.

Initial wurden die Sondierungstiefen (ST) sowie die Blutung auf Sondierung (BOP) und der Plaque-Index (PI) von insgesamt 150 Patienten, davon 71 weiblich und 79 männlich gemessen. Hiervon waren 93 Nichtraucher und 56 Raucher. Zum Recall konnten die ST, der BOP und der PI von 155 Patienten, davon 73 weiblich und 82 männlich gemessen werden. Insgesamt waren hiervon 94 Nichtraucher und 56 Raucher. Die GCF-Konzentrationen von MMP-8 konnte initial bei 152 Patienten, davon 70 weiblich, 82 männlich, 92 Nichtrauchern und 56 Rauchern erhoben werden. Die PGE₂-Konzentrationen wurden hingegen bei nur insgesamt 151 Patienten gemessen. Die Initialgruppe umfasste 70 weibliche und 81 männliche Probanden, 92 Nichtraucher und 55 Raucher. Die Recallgruppe bestand aus insgesamt 148 Patienten, davon 69 weiblich und 79 männlich, 91 Nichtrauchern und 52 Rauchern.

Tabelle 1: Demographische Daten der Studienpopulation

	MMP-8 (N)		PGE₂ (N)		ST/BOP (N)		PI (N)	
	Initial	Recall	Initial	Recall	Initial	Recall	Initial	Recall
Gesamt	152	152	151	148	150	155	150	155
Weiblich	70	70	70	69	71	73	71	73
Männlich	82	82	81	79	79	82	79	82
Nichtraucher	92	94	92	91	93	94	93	94
Raucher	56	53	55	52	56	56	56	56

4.2 Klinische Daten

Ein signifikanter Kolmogorov-Smirnov-Test führte zur Ablehnung der Nullhypothese einer Normalverteilung aller klinisch erhobener Daten, weshalb zur Analyse der Unterschiede zwischen den jeweiligen Initial- und Recallgruppen der nicht-parametrische Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben angewendet wurde.

4.2.1 Sondierungstiefen

Bei Vergleich der Mittelwerte der Initialmessung und der Recallmessung zeigt sich für alle Gruppen eine signifikante Reduktion der Sondierungstiefen nach SRP-Therapie. Darüber hinaus zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Initial- und Recallmessungen der Nichtraucher und Rauchern und ein signifikanter Unterschied zwischen der männlichen und weiblichen Population bei Vergleich der Recallmessungen. Die ST-Mittelwerte und deren Standardabweichungen können Tabelle 2 entnommen werden und sind in Diagramm 1 veranschaulicht.

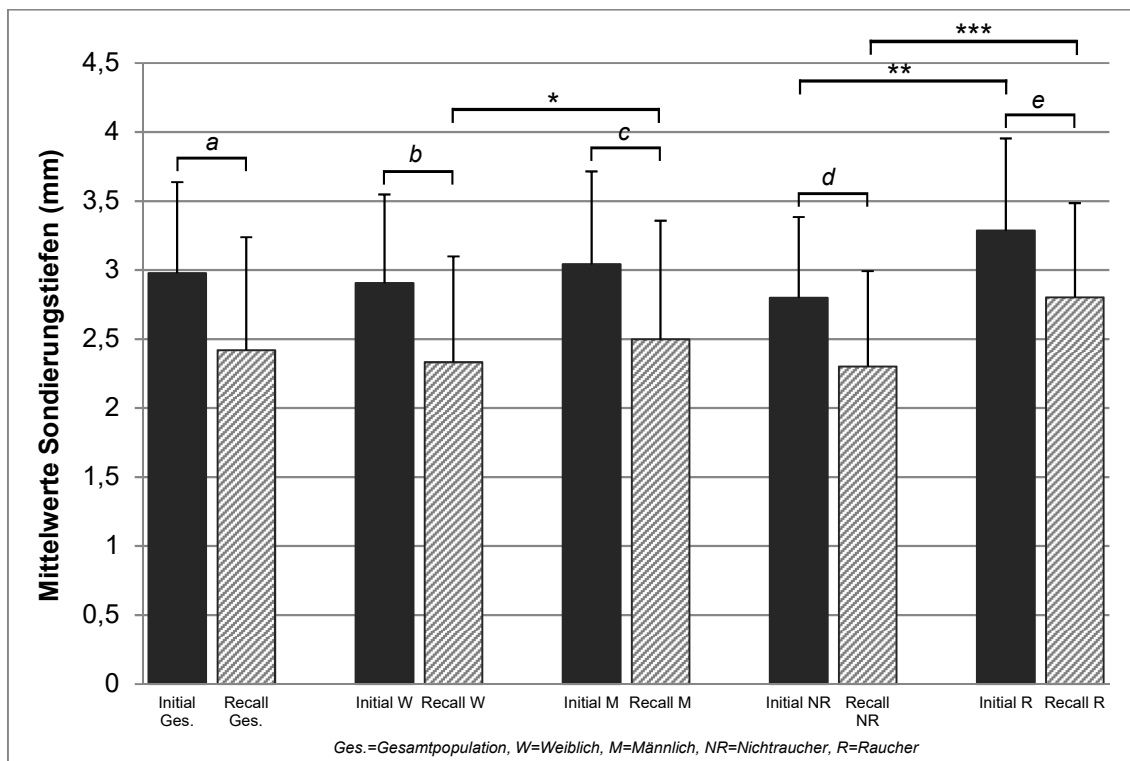


Diagramm 1: Vergleich der ST-Mittelwerte (a, b, c, d, e, **, ***: $p < 0,0001$, *: $p = 0,044$)

Tabelle 2: ST-Ergebnisse

ST-Mittelwerte und Standardabweichung (mm)			
	<i>Initial</i>	<i>Recall</i>	<i>p-Wert</i>
Gesamt	2,976 ± 0,660	2,419 ± 0,818	<0,0001
Weiblich	2,905 ± 0,643	2,332 ± 0,766	<0,0001
Männlich	3,041 ± 0,673	2,497 ± 0,859	<0,0001
Nichtraucher	2,798 ± 0,587	2,300 ± 0,690	<0,0001
Raucher	3,285 ± 0,668	2,802 ± 0,682	<0,0001

4.2.2 Blutung auf Sondieren

Bei Vergleich der Mittelwerte der Initialmessung und der Recallmessung zeigt sich für alle Gruppen eine signifikante Reduktion der Blutung auf Sondieren nach SRP-Therapie. Die BOP-Mittelwerte und deren Standardabweichungen können Tabelle 3 entnommen werden und sind in Diagramm 2 veranschaulicht.

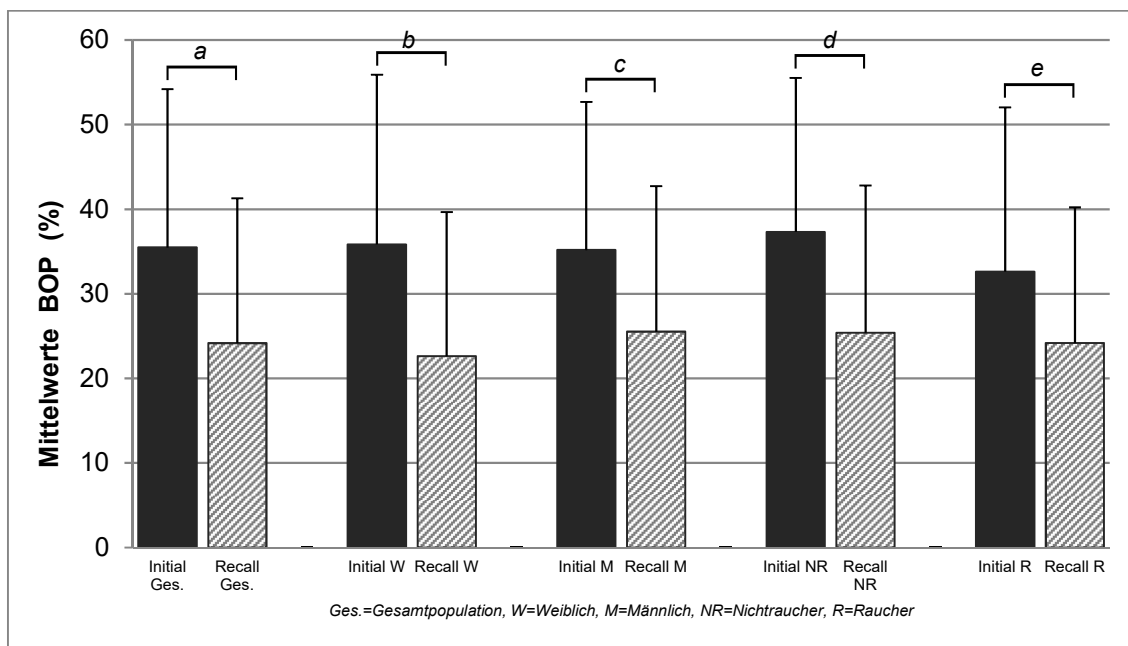
Diagramm 2: Vergleich der BOP-Mittelwerte (a, b, c, d: $p < 0,0001$, e: $p < 0,05$)

Tabelle 3: BOP-Ergebnisse

BOP-Mittelwerte und Standardabweichung (%)			
	<i>Initial</i>	<i>Recall</i>	<i>p-Wert</i>
Gesamt	35,480 ± 18,699	24,167 ± 17,119	<0,0001
Weiblich	35,831 ± 20,065	22,641 ± 17,023	<0,0001
Männlich	35,164 ± 17,505	25,525 ± 17,194	<0,0001
Nichtraucher	37,304 ± 18,199	25,385 ± 17,407	<0,0001
Raucher	32,605 ± 19,439	24,185 ± 16,026	0,005

4.2.3 Plaque-Index

Bei Vergleich der Mittelwerte der Initialmessung und der Recallmessung zeigt sich für die Gesamtpopulation, die männliche und weibliche Population sowie für die Gruppe der Nichtraucher eine signifikante Reduktion des Plaque-Index nach SRP-Therapie. Außerdem zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der männlichen und der weiblichen Population. Die PI-Mittelwerte und deren Standardabweichungen können Tabelle 4 entnommen werden und sind in Diagramm 3 veranschaulicht.

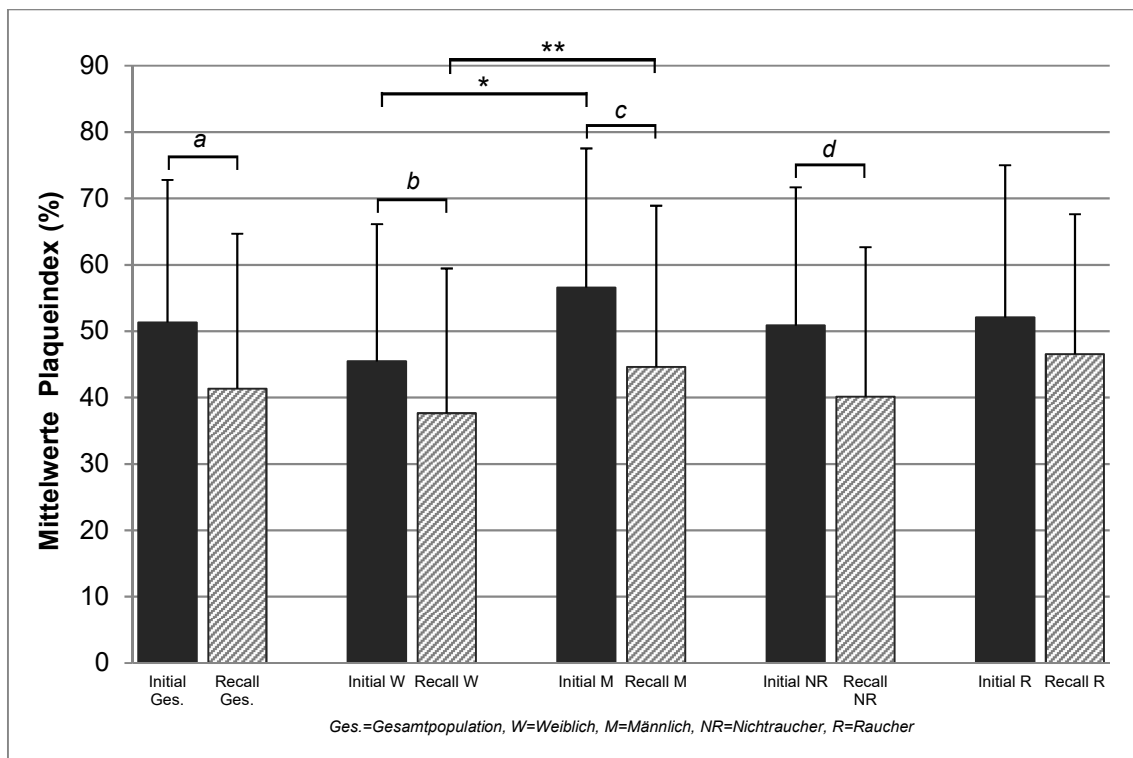


Diagramm 3: Vergleich der PI-Mittelwerte (a: $p < 0,0001$, b, c, d: $p < 0,05$, *: $p = 0,001$, **: $p = 0,009$)

Tabelle 4: PI-Ergebnisse

PI-Mittelwerte und Standardabweichung (%)			
	Initial	Recall	p-Wert
Gesamt	51,303 ± 21,496	41,327 ± 23,346	<0,0001
Weiblich	45,456 ± 20,670	37,645 ± 21,806	0,041
Männlich	56,558 ± 20,981	44,604 ± 24,300	0,004
Nichtraucher	50,853 ± 20,817	40,149 ± 22,507	0,001
Raucher	52,062 ± 22,936	46,536 ± 22,602	0,125

4.3 Laborchemische Daten

Ein signifikanter Kolmogorov-Smirnov-Test führte zur Ablehnung der Nullhypothese einer Normalverteilung der PGE₂- und MMP-8-Konzentrationen, weshalb zur Bestimmung der Signifikanzen der Unterschiede zwischen den jeweiligen Initial- und Recallgruppen der nicht-parametrische Wilcoxon-Test angewendet wurde.

4.3.1 PGE₂

Bei Vergleich der Mittelwerte der Initialmessung und der Recallmessung zeigt sich für die Gesamtpopulation, die weibliche Population und die Nichtraucher eine signifikante PGE₂-Reduktion nach SRP-Therapie. Die PGE₂-Mittelwerte und deren Standardabweichungen können Tabelle 5 entnommen werden und sind in Diagramm 4 veranschaulicht.

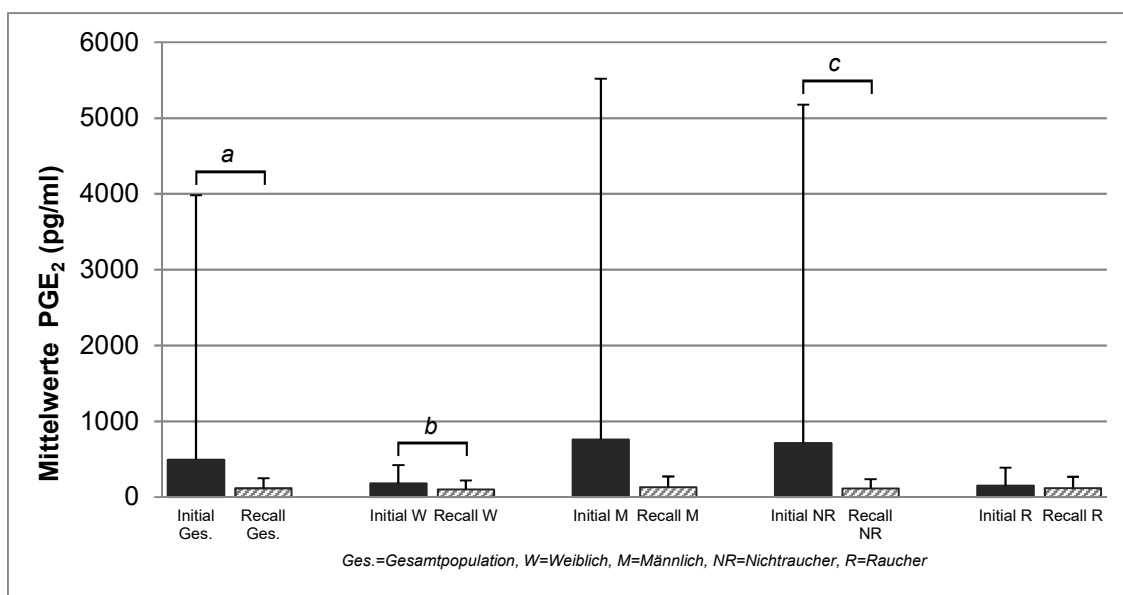


Diagramm 4: Vergleich der PGE₂-Mittelwertkonzentrationen (a, b, c: $p < 0,01$)

Tabelle 5: Ergebnisse PGE₂

PGE ₂ -Mittelwerte und Standardabweichung (pg/ml)			
	<i>Initial</i>	<i>Recall</i>	<i>p-Wert</i>
Gesamt	490,695 ± 3492,196	116,940 ± 132,846	0,003
Weiblich	179,523 ± 243,081	100,263 ± 120,796	0,001
Männlich	759,609 ± 4759,993	131,506 ± 141,697	0,214
Nichtraucher	710,832 ± 4465,678	113,037 ± 124,274	0,004
Raucher	148,661 ± 241,039	119,189 ± 149,090	0,230

4.3.2 MMP-8

Bei Vergleich der Mittelwerte der Initialmessung und der Recallmessung zeigt sich für alle Gruppen eine signifikante MMP-8-Reduktion nach SRP-Therapie. Darüber hinaus zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Nichtrauchern und den Rauchern bei Vergleich der Recallmessungen. Die MMP-8-Mittelwerte und deren Standardabweichungen können Tabelle 6 entnommen werden und sind in Diagramm 5 veranschaulicht.

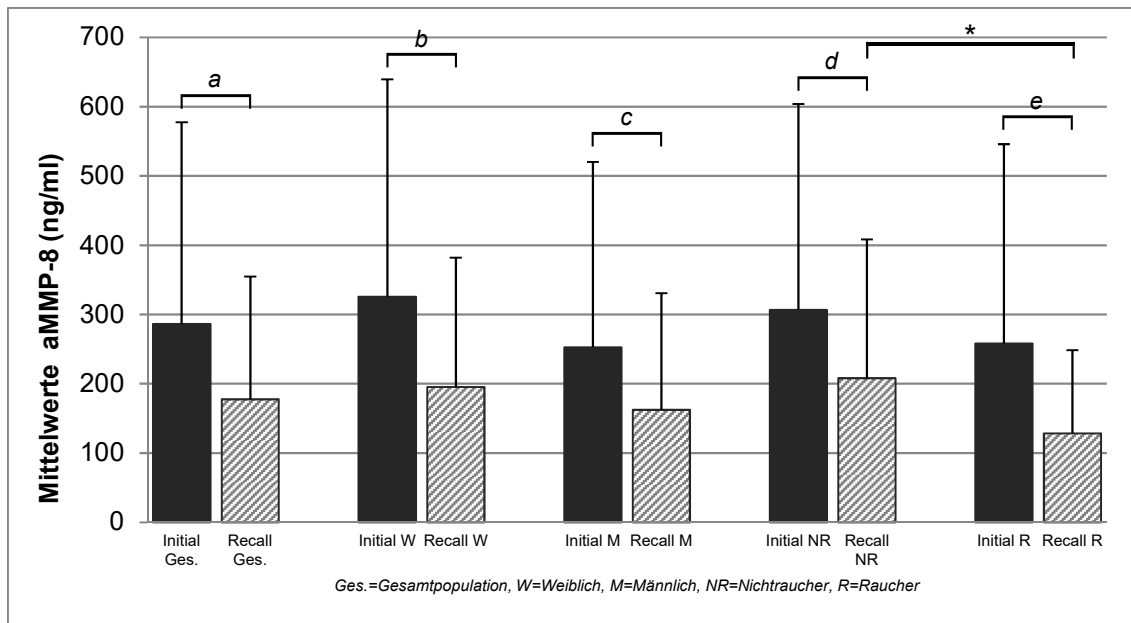


Diagramm 5: Vergleich der MMP-8-Mittelwertkonzentrationen (a: $p < 0,0001$, b, c, d, e: $p < 0,01$, *: $p = 0,023$)

Tabelle 6: Ergebnisse MMP-8

MMP-8-Mittelwerte und Standardabweichung (ng/ml)			
	Initial	Recall	p-Wert
Gesamt	286,091 ± 291,223	177,551 ± 177,304	<0,0001
Weiblich	325,540 ± 313,728	195,350 ± 186,844	0,002
Männlich	252,415 ± 267,896	162,357 ± 168,398	0,008
Nichtraucher	306,522 ± 297,365	208,045 ± 200,150	0,006
Raucher	257,971 ± 287,874	128,510 ± 119,996	0,003

4.3.3 Parodontalpathogene Keime

4.3.3.1 Fn

Bei Vergleich der Fn-positiv getesteten Probanden der Initialmessung und der Recallmessung zeigt sich für die Gesamtpopulation, die Gruppe der Männer und die der Raucher ein Anstieg nach SRP-Therapie. In der Gruppe der Frauen kommt es hingegen zu einer Zunahme der Infektionen mit Fn. Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson/Exakte Fisher-Test ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede. Die Verteilung der Fn-positiv getesteten Patienten innerhalb der verschiedenen Gruppen können Tabelle 7 entnommen werden und sind in Diagramm 6 veranschaulicht.

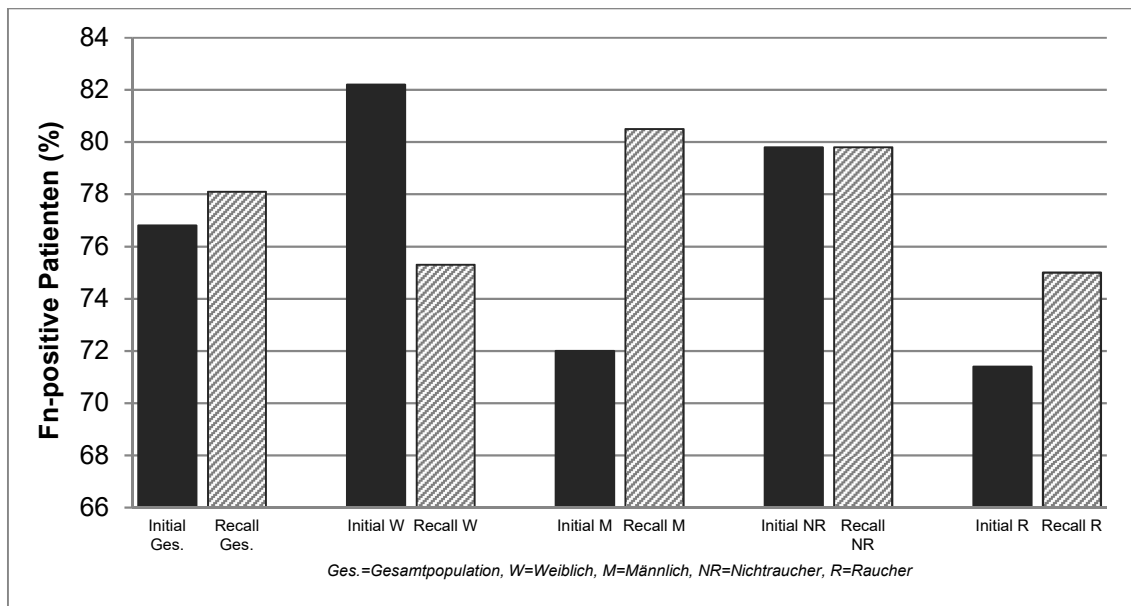


Diagramm 6: *Fusobacterium nucleatum*

Tabelle 7: Vergleich der Fn-Infektionen

	Fn-Infektionen (%)		
	Initial	Recall	p-Wert
Gesamt	76,8	78,1	>0,05
Weiblich	82,2	75,3	>0,05
Männlich	72,0	80,5	>0,05
Nichtraucher	79,8	79,8	>0,05
Raucher	71,4	75,0	>0,05

4.3.3.2 Pi

Bei Vergleich der Pi-positiv getesteten Probanden der Initialmessung und der Recallmessung zeigt sich für alle Gruppen ein signifikanter Anstieg nach SRP-Therapie. Die Verteilung der Pi-positiv getesteten Patienten innerhalb der verschiedenen Gruppen können Tabelle 8 entnommen werden und sind in Diagramm 7 veranschaulicht.

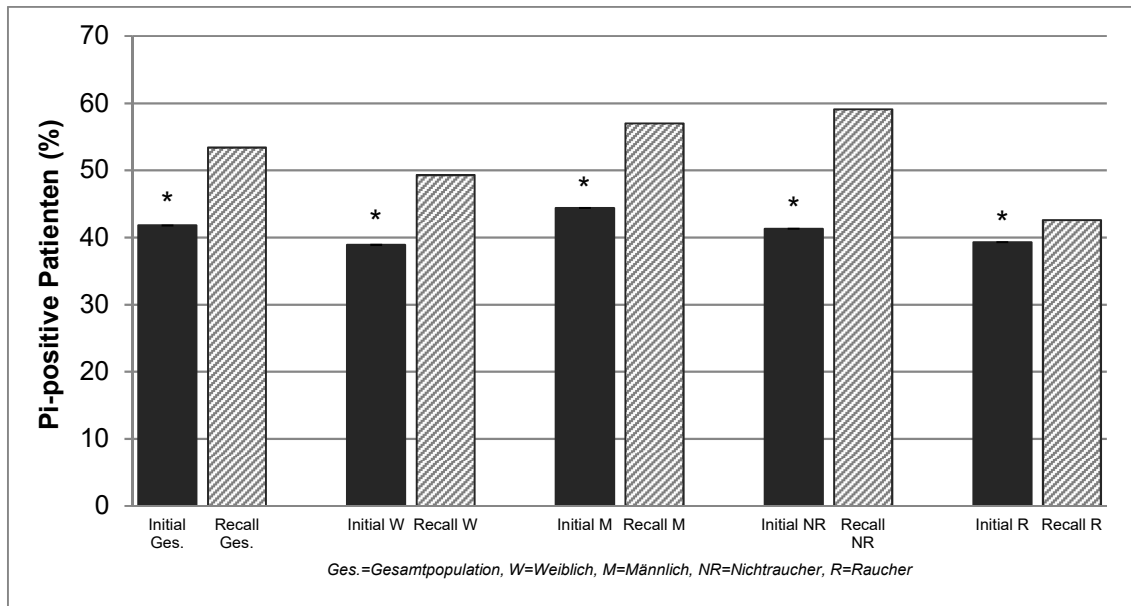


Diagramm 7: *Prevotella intermedia* (*: $p < 0,05$)

Tabelle 8: Vergleich der Pi-Infektionen

Pi-Infektionen (%)			
	<i>Initial</i>	<i>Recall</i>	<i>p-Wert</i>
Gesamt	41,8	53,4	<0,05
Weiblich	38,9	49,3	<0,05
Männlich	44,4	57,0	<0,05
Nichtraucher	41,3	59,1	<0,05
Raucher	39,3	42,6	<0,05

4.3.3.3 Aa

Bei Vergleich der Aa-positiv getesteten Probanden der Initialmessung und der Recallmessung zeigt sich für alle Gruppen, außer für die Population der Raucher eine Reduktion nach SRP-Therapie. Die Verteilung innerhalb der Raucher blieb unverändert. Allerdings zeigt der Chi-Quadrat-Test nach Pearson/Exakte Fisher-Test keine signifikanten Unterschiede. Die Verteilung der Aa-positiv getesteten Patienten innerhalb der verschiedenen Gruppen können Tabelle 9 entnommen werden und sind in Diagramm 8 veranschaulicht.

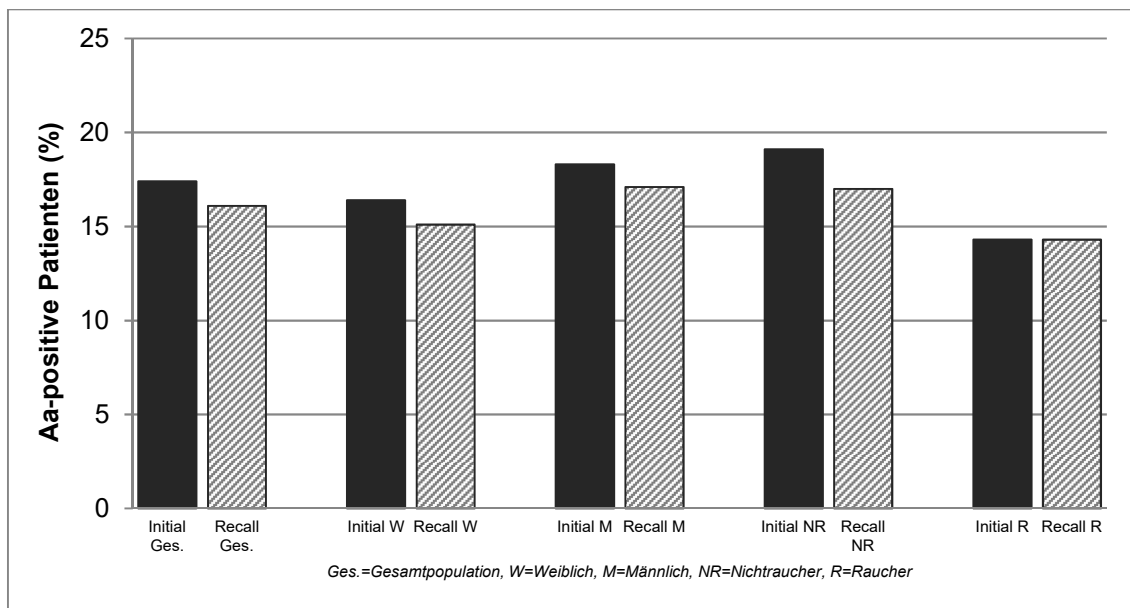


Diagramm 8: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Tabelle 9: Vergleich der Aa-Infektionen

Aa-Infektionen (%)			
	<i>Initial</i>	<i>Recall</i>	<i>p-Wert</i>
Gesamt	17,4	16,1	>0,05
Weiblich	16,4	15,1	>0,05
Männlich	18,3	17,1	>0,05
Nichtraucher	19,1	17,0	>0,05
Raucher	14,3	14,3	>0,05

4.3.3.4 Pg

Bei Vergleich der Pg-positiv getesteten Probanden der Initialuntersuchung und der Recalluntersuchung zeigt sich für die Gesamtpopulation, die Gruppe der Frauen und die der Nichtraucher eine Reduktion nach SRP-Therapie. In der Gruppe der Männer und der Raucher zeigt sich hingegen eine Zunahme der Infektionen mit Pg. Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson/Exakte Fisher-Test ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede. Die Verteilung der Pg-positiv getesteten Patienten innerhalb der verschiedenen Gruppen können Tabelle 10 entnommen werden und sind in Diagramm 9 veranschaulicht.

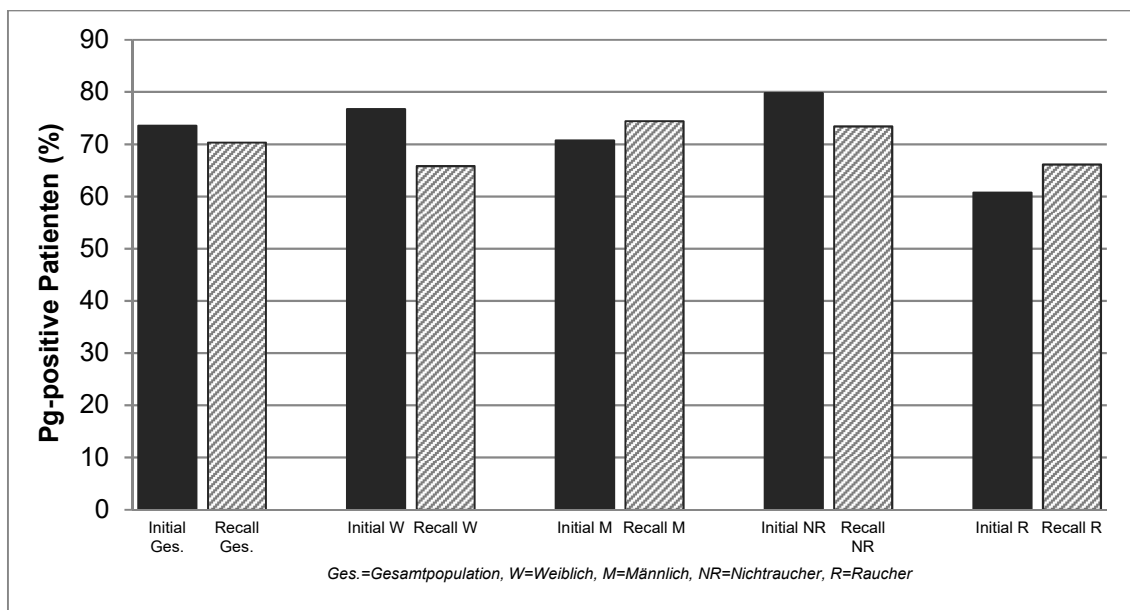


Diagramm 9: Porphyromonas gingivalis

Tabelle 10: Vergleich der Pg-Infektionen

Pg-Infektionen (%)			
	Initial	Recall	p-Wert
Gesamt	73,5	70,3	>0,05
Weiblich	76,7	65,8	>0,05
Männlich	70,7	74,4	>0,05
Nichtraucher	79,8	73,4	>0,05
Raucher	60,7	66,1	>0,05

4.3.3.5 Tf

Bei Vergleich der Tf-positiv getesteten Patienten der Initialuntersuchung und der Recalluntersuchung zeigt sich für die Gesamtpopulation, die Gruppen der Männer und die der Nichtraucher ein signifikanter Anstieg nach SRP-Therapie. Die Verteilung innerhalb der Raucher blieb unverändert, während sich in der Gruppe der Frauen eine nicht signifikante Reduktion zeigt. Die Verteilung der Tf-positiv getesteten Patienten innerhalb der verschiedenen Gruppen können Tabelle 11 entnommen werden und sind in Diagramm 10 veranschaulicht.

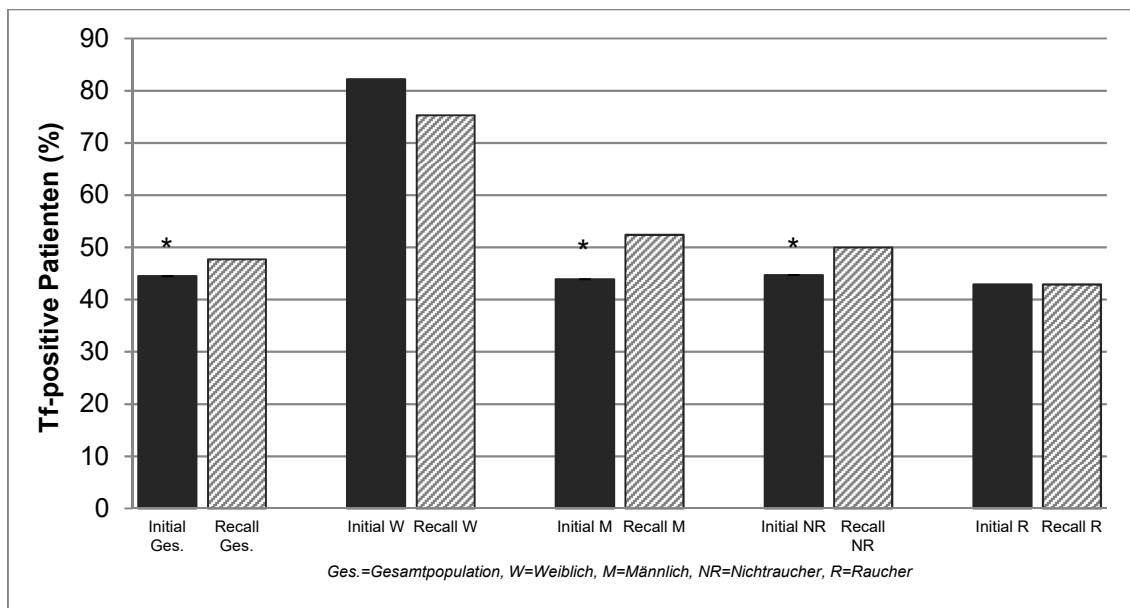


Diagramm 10: *Tannerella forsythia* (*: $p < 0,05$)

Tabelle 11: Vergleich der Tf-Infektionen

	Tf-Infektionen (%)		
	<i>Initial</i>	<i>Recall</i>	<i>p-Wert</i>
Gesamt	44,5	47,7	<0,05
Weiblich	82,2	75,3	>0,05
Männlich	43,9	52,4	<0,05
Nichtraucher	44,7	50,0	<0,05
Raucher	42,9	42,9	>0,05

4.3.3.6 Td

Bei Vergleich der Td-positiv getesteten Patienten der Initialmessung und der Recallmessung zeigt sich für alle Gruppen eine Reduktion, für die Gesamtpopulation, die Gruppe der Frauen und die der Nichtraucher eine signifikante Reduktion nach SRP-Therapie. Die Verteilung der Td-positiv getesteten Patienten innerhalb der verschiedenen Gruppen können Tabelle 12 entnommen werden und sind in Diagramm 11 veranschaulicht.

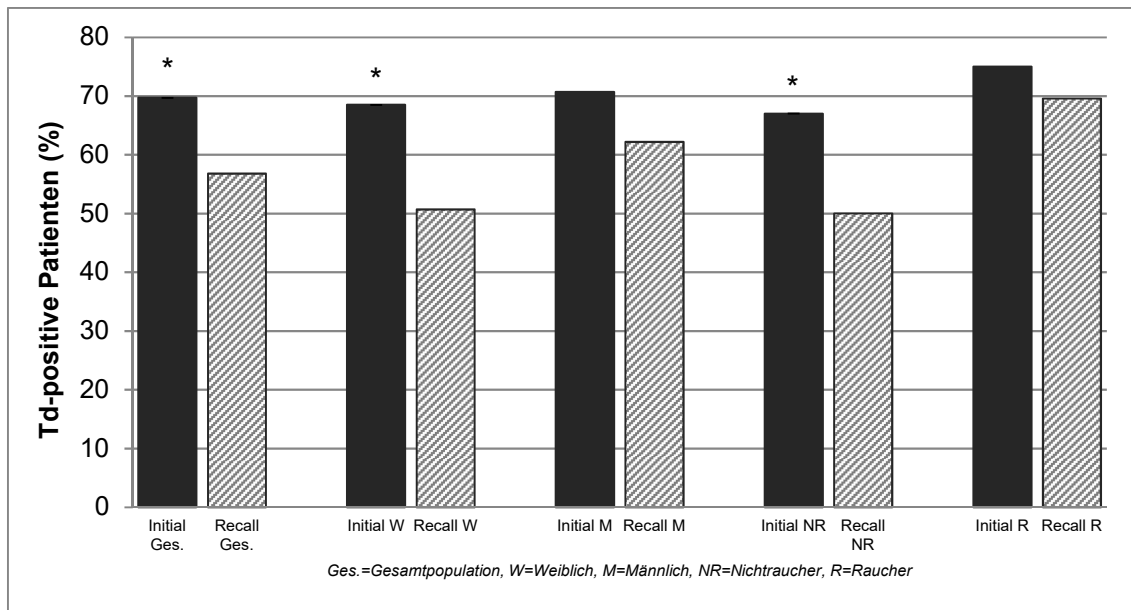


Diagramm 11: *Treponema denticola* (*: $p < 0,05$)

Tabelle 12: Vergleich der Td-Infektionen

	Td-Infektionen (%)		
	Initial	Recall	p-Wert
Gesamt	69,7	56,8	<0,05
Weiblich	68,5	50,7	<0,05
Männlich	70,7	62,2	>0,05
Nichtraucher	67,0	50,0	<0,05
Raucher	75,0	69,6	>0,05

4.3.4 Korrelationen

Tabelle 13 veranschaulicht die Rangkorrelationen zwischen den erhobenen klinischen und laborchemischen Parameter nach Spearman. Wie bereits erwähnt, ist der Rangkorrelationskoeffizient (Spearman's ρ) ein Wert zwischen -1 und 1, wobei eine maximale Korrelation zweier Parameter den Wert 1, bzw. eine maximale negative Korrelation den Wert -1 aufweist. Je stärker sich der Rangkorrelationskoeffizient dem Wert 1, bzw. -1 annähert, desto größer ist die Effektstärke der Korrelation. Die signifikanten Korrelationen sind in der folgenden Darstellung mit einem * gekennzeichnet.

Tabelle 13: Ergebnisse der Rangkorrelation nach Spearman

Spearman's ρ (* = $p < 0,05$)													
	Sex	R	ST	BOP	PI	PGE ₂	MMP-8	FN	PI	AA	PG	TF	TD
Sex	1,000*	0,004	0,133*	0,015	0,184*	0,016	-0,063	-0,038	0,087	0,049	-0,013	0,047	0,078
R	0,004	1,000*	0,336*	-0,073	0,100*	0,060	-0,180*	-0,088	-0,023	-0,066	-0,119*	-0,053	0,105*
ST	0,133*	0,366*	1,000*	0,380*	0,216*	0,098	0,110*	0,000	0,007	0,048	0,024	0,037	0,160*
BOP	0,015	-0,073	0,380*	1,000*	0,308*	0,149*	0,255*	0,092	-0,089	0,137*	0,081	0,064	0,044
PI	0,184*	0,100*	0,216*	0,308*	1,000*	-0,034	-0,068	0,049	0,018	0,032	0,047	0,073	0,132*
PGE ₂	0,016	-0,060	0,098	0,149*	-0,034	1,000*	0,483*	-0,036	-0,032	-0,012	-0,020	0,097*	-0,058
MMP-8	-0,063	-0,180*	0,110*	0,255*	-0,068	0,483*	1,000*	0,098*	-0,070	0,074	0,078	0,161*	0,042
FN	-0,038	-0,088	0,000	0,092	0,049	-0,036	0,098*	1,000*	0,155*	0,198*	0,520*	0,332*	0,225*
PI	0,087	-0,023	0,007	-0,089	0,018	-0,032	-0,070	0,155*	1,000*	0,050	0,137*	0,314*	0,295*
AA	0,049	-0,066	0,048	0,137*	0,032	-0,012	0,074	0,198*	0,050	1,000*	0,114*	0,084	0,127*
PG	-0,013	-0,119*	0,024	0,081	0,047	-0,020	0,078	0,520*	0,137*	0,114*	1,000*	0,216*	0,161*
TF	0,047	-0,053	0,037	0,064	0,073	0,097*	0,161*	0,332*	0,314*	0,084	0,216*	1,000*	0,407*
TD	0,078	0,105*	0,160*	0,044	0,132*	-0,058	0,042	0,225*	0,295*	0,127*	0,161*	0,407*	1,000*

Hervorzuheben sind die signifikanten Zusammenhänge zwischen den klinischen Daten untereinander sowie den klinischen und den laborchemischen Parametern, aber auch die teilweise signifikanten Korrelationen zwischen dem Geschlecht und dem Rauchverhalten der Probanden mit den erhobenen Daten. So korrelieren die in dieser Studie erhobenen klinischen Daten (ST, BOP, PI) miteinander alle signifikant. Weiterhin zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang der Sondierungstiefen mit dem Geschlecht, dem Rauchverhalten und Td. MMP-8 und PGE₂ korrelieren signifikant miteinander, mit der Blutung auf Sondierung und mit Tf. Darüber hinaus zeigt sich ein signifikanter negativer

Zusammenhang von MMP-8 mit dem Rauchverhalten und ein positiver mit den Sondierungstiefen und Fn.

Die nachgewiesenen parodontalpathogenen Keime korrelieren besonders innerhalb des roten Komplexes signifikant miteinander. Pg zeigt darüber hinaus eine negative, Td eine positive signifikante Korrelation zum Rauchverhalten. Aa korreliert des Weiteren signifikant mit Pg, Fn und der Blutung auf Sondierung.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methode

5.1.1 Sulkusflüssigkeit als Medium im Vergleich

In der Literatur werden verschiedene Kompartimente zur Gewinnung von Biomarkern im Rahmen der Parodontitisdiagnostik beschrieben. Neben der Sulkusflüssigkeit finden sich die Speichel- aber auch die Blutprobe als häufig evaluierte Medien.

So enthält der Speichel große Mengen an Serumproteinen, Entzündungsmediatoren, Gewebe- und Zellzerfallsprodukte sowie mikrobielle Metaboliten und Enzyme (150), weshalb es als vielseitiges, leicht zu entnehmendes Medium mit großem diagnostischen Potential gilt, das die Gesundheit der parodontalen Gewebe widerspiegeln kann (151).

Insbesondere zur Diagnostik von MMP-8 gilt die Aussagekraft von Speichelproben jedoch als begrenzt (152), da speziell bei Rauchern deutlich erniedrigte Werte festgestellt wurden (153), weshalb Sorsa et al. die MMP-8-Speichelprobe zur Parodontitisdiagnostik in der Population der Raucher für ungeeignet halten (152).

Neben der Speichelprobe gilt auch die Blutserumprobe als gut untersuchtes Medium, das im Rahmen der Parodontitisdiagnostik insbesondere in Studien betrachtet wurde, die die Zusammenhänge zwischen systemischen Kreislauferkrankungen und parodontaler Destruktion darstellen (154). Zwar sind die MMP-8-Serumkonzentrationen bei parodontal erkrankten Patienten höher als bei gesunden Patienten (155), als problematisch wird jedoch die geringe Spezifität der MMP-8-Serumkonzentration für die Parodontalerkrankung diskutiert (152). So zeigt der Marker im Serum eine hohe Korrelation zu kardiovaskulären Erkrankungen, Arteriosklerose oder dem akuten Koronarsyndrom (156, 157) korreliert aber auch allgemein mit systemischen Entzündungsreaktionen (154), weshalb es zu Überlagerungen und falsch-positiven Ergebnissen in der Parodontitisdiagnostik kommen kann.

Im Gegensatz hierzu nimmt die Sulkusflüssigkeit als Filtrat des Serums, das im Rahmen der Parodontitis vermehrt durch das Saume epithel in die parodontalen

Tasche gelangt (52, 84-86) eine einzigartige Rolle in der Diagnostik parodontaler Erkrankungen ein (86), deren Spezifität die der Serumprobe deutlich übersteigt. Insbesondere die untersuchten Biomarker PGE₂ und MMP-8 gelten im GFC als hoch spezifische Biomarker der Parodontitisdiagnostik (52, 158), weshalb im Rahmen dieser Studie dem GCF als Medium konsequenter Weise der Vorzug gegeben wurde.

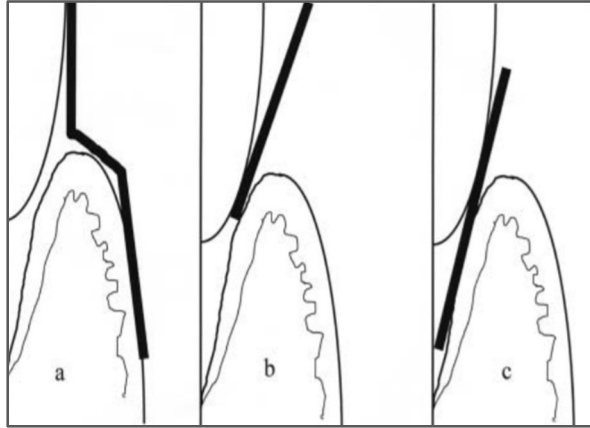
5.1.2 GCF-Probenentnahme

Es gibt verschiedene Methoden zur Entnahme von GCF-Proben. Sowohl hinsichtlich der verwendeten Träger zur Aufnahme der Flüssigkeit (Papierspitzen, Pipetten, Kanülen, Filterstreifen), aber auch hinsichtlich der Entnahmestelle zeigen die zahlreich vorhandenen Publikationen mitunter große methodische Unterschiede. Bei der 1976 von Skapski und Lehner (159) beschriebene Auswaschmethode zur Gewinnung von Sulkusflüssigkeit, wird der Sulkus mehrfach mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und anschließend aspiriert. Mithilfe dieser Methode können zwar sowohl zelluläre als auch lösliche Komponenten der Sulkusflüssigkeit entnommen werden, jedoch gilt das Verfahren als sehr techniksensitiv und schwer reproduzierbar, da es durch die ungleiche Menge an aspirierter und reaspirierter Sulkusflüssigkeit nicht gelingt, einen vergleichbaren Verdünnungsfaktor der Proben zu gewährleisten (160).

Eine vielfach angewandte Alternative hierzu stellt die Entnahme von Sulkusfluid mittels Mikro- bzw. Kapillarpipetten dar, die bereits 1969 von Sueda et al. (161) beschrieben wurde. Hierzu wird eine großengenormte Kapillarpipette oberflächlich in den Sulkus eingeführt und das GCF in die Pipette aufgenommen. Ein deutlicher Vorteil gegenüber der zuvor beschriebenen Methode ist sicherlich die exakt reproduzierbare und unverdünnte Menge an Sulkusflüssigkeit, die hierbei gewonnen werden kann. Kritisch muss hingegen die mitunter traumatische Entnahme der Proben gesehen werden, die insbesondere dann auftritt, wenn parodontal gesunde Patienten untersucht werden, bei denen die Sulkusfließrate erheblich geringer ist, als bei erkrankten und die Pipette entsprechend über einen längeren, bis zu 30 minütigen Zeitraum im Sulkus verweilen muss, um eine adäquate und vergleichbare Menge an Sulkusflüssigkeit zu gewinnen (160).

Die Verwendung von Filterpapierstreifen als GCF-Träger hat sich hingegen als zuverlässig und vergleichsweise atraumatisch und einfach durchzuführen bewährt und ist in der Literatur häufig beschrieben (162-164), weshalb sie in dieser Studie eingesetzt wurde.

Auch hinsichtlich der Entnahmestelle sind verschiedene Methoden beschrieben worden (s. Abbildung 1). Man unterscheidet die extrakrevikuläre von der intrakrevikulären Entnahme, wobei die intrakrevikulären Methoden am weitesten verbreitet sind (160). Als



nachteilig gilt bei intrakrevikulären Entnahmen jedoch die mögliche

Abbildung 1: Methoden zur Entnahme der Sulkusflüssigkeit (a=extrakrevikulär, b=intrakrevikulär „oberflächlich“, c= intrakrevikulär „tief“) (160)

Gewebeirritation, wodurch es leichter zu Messfehlern kommen kann (95). Zur Vermeidung jeglicher Irritationen wurde die Entnahmestelle im Rahmen dieser Studie, analog zu bereits durchgeführten Studien (163, 164) mithilfe von Watterollen und Luft zunächst schonend getrocknet und die Filterpapierstreifen zur Probenentnahme nur ca. 2 mm im Sinne der „oberflächlichen“ intrakrevikulären Entnahmemethode in den Sulkus eingeführt und die GCF-Probe unter Vermeidung von Kontamination mit Speichel oder Blut entnommen.

5.1.3 PGE₂ Analyse

Die Messung der PGE₂ GCF-Konzentrationen erfolgte mithilfe des kompetitiven „PGE₂ high sensitivity EIA-Kit“ (Enzo Life Science). Das Kit zeichnet sich insbesondere durch seine hohe Sensitivität aus, mithilfe derer auch kleinste Mengen (13,4 pg/ml) PGE₂ in der Sulkusflüssigkeit detektiert werden können und eine sehr präzise Aussage über das Entzündungsniveau der jeweiligen Entnahmestelle getroffen werden kann. Alternative Nachweismethoden wie Massenspektrographie, Immunoblot-Verfahren (165) oder Radioimmunoassays (RIA) (166) werden in der Literatur hinsichtlich ihrer Verlässlichkeit als vergleichbar beschrieben, gehen jedoch mit größerem zeitlichen und materiellem Aufwand einher und weisen zum Teil eine geringere Sensitivität auf als die verwendete ELISA-Methode. Dies und die zahlreich belegten Anwendungen des

„PGE₂ high sensitivity EIA-Kit“ durch andere Autoren in der Vergangenheit (167-169) machen das verwendete Verfahren zu einer zuverlässigen und vergleichbaren diagnostischen Methode.

5.1.4 MMP-8 Analyse

Die Messung der MMP-8 GCF-Konzentrationen wurden mit dem „dentoELISA aMMP8 EIA-Kit“ (Dentognostics) durchgeführt. Der hierin verwendete monoklonale Antikörper zeigt eine hohe Sensitivität gegenüber der aktiven Form der MMP-8 (aMMP-8), die eng mit der Schwere der Parodontitis assoziiert ist und daher als effektiver Biomarker gilt. Darüber hinaus konnten Untersuchungen zeigen, dass die Messergebnisse des dentoELISA-Assays signifikant mit Immunofluoreszenzverfahren und anderen Methoden zur Bestimmung von MMP-8-Konzentrationen übereinstimmen (170, 171). Diese Eigenschaften machen das verwendete EIA-Assay zu einer zuverlässigen und belastbaren diagnostischen Methode.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Klinische Daten

Im Vergleich zur Initialmessung zeigen sowohl die Sondierungstiefen, als auch der BOP und der PI der gesamten Studienpopulation eine signifikante Reduktion nach SRP-Therapie. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Daten anderer Studien, die bereits vor über dreißig Jahren gezeigt haben, dass die mechanische Entfernung der subgingivalen Plaque zur Reduktion von Sondierungstiefen und Entzündungszeichen wie der Blutung auf Sondierung führt (74-76). Zwar sind im Rahmen des Recallintervalls auch die PI-Werte signifikant gesunken, jedoch sollte verdeutlicht werden, dass ein mittlerer PI von etwa 51 % vor und ca. 45% nach konventioneller Therapie nicht dem Ziel einer exzellenten häuslichen Mundhygiene entspricht, die neben der konsequenten Entfernung der subgingivalen Plaque als zwingend erforderlich für langfristige Therapieerfolge gilt (71-73). Dieses Ergebnis unterstreicht die hohe Bedeutung der Einhaltung einer Hygienephase zur langfristigen Einstellung einer suffizienten häuslichen Plaquekontrolle.

5.2.2 PGE₂

Bereits Offenbacher et al. zeigten, dass die PGE₂-Konzentrationen im GCF signifikant mit der Schwere parodontaler Läsionen korrelieren und insbesondere auch aktive Phasen mit Progression präzise abbilden können (128). Laut Offenbacher et al. bewirkt eine suffiziente SRP-Therapie einen deutlichen Abfall der PGE₂-Konzentration zum Teil bis auf das Grundniveau gesunder Patienten, obwohl klinische Parameter nicht zwangsläufig eine deutliche Reduktion aufweisen (128). Dieser Zusammenhang zeigt, dass bereits die mechanische Keimreduktion zu einer drastischen Reduktion der systemischen Entzündungsreaktion auf die Bakterienlast führt und die Gewebereparation mit einem gewissen zeitlichen Verzug eintritt. Neben der vorliegenden Studie bestätigen auch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die signifikante Reduktion von PGE₂ in der Sulkusflüssigkeit nach nicht-chirurgischer Therapie. Die PGE₂-Mittelwertkonzentrationen der Gesamtpopulation dieser Studie konnten von einem initial gemessenen Wert von 490,69 pg/ml auf 116,94 pg/ml gesenkt werden, was annähernd mit den Ergebnissen von Kumar et al. (172), die eine Reduktion von 326,62 pg/ml auf 107,64 pg/ml beschreiben und weiteren Autoren (173-175) übereinstimmt. Die von Kumar et al. in der gesunden Kontrollgruppe gemessene mittlere Konzentration von 56,28 pg/ml konnte weder in der vorliegenden, noch deren Studie nach SRP-Therapie erreicht werden, womit Offenbachers These der teilweise vollständigen Reduktion der PGE₂-Konzentrationen auf das Niveau gesunder Patienten nicht bestätigt werden kann. Davon abgesehen stehen die Ergebnisse der vorliegenden Studie jedoch im Einklang mit der Literatur, allerdings weisen die männliche Population und die der Raucher keine signifikante PGE₂-Reduktion auf, was zum einen durch die hohe Standardabweichung der gemessenen Werte in der männlichen Gruppe bedingt sein kann, zum anderen in der Gruppe der Raucher mit vergleichsweise geringer Standardabweichung für eine risikofaktorbedingt schlechtere Therapieantwort sprechen kann.

5.2.3 MMP-8

Im Zusammenhang mit der Literaturrecherche stellt sich der detaillierte Vergleich verschiedener Studienergebnisse untereinander und mit den Ergebnissen dieser Studie aufgrund von teilweise großen Abweichungen in der Methodik und der verwendeten Materialien als erschwert dar.

Verstärkt unterscheiden sich insbesondere die Art der Probenentnahme, die Anzahl der entnommenen Proben und das verwendete laborchemische Analyseverfahren, wodurch die konkreten MMP-8-Konzentrationswerte mitunter stark voneinander abweichen (139, 152, 154, 158, 163, 164, 171, 176-178).

Die in den Ergebnissen beschriebene signifikante Reduktion der MMP-8-Konzentrationen nach SRP-Therapie der Gesamtpopulation stimmen jedoch unabhängig von der oben beschriebenen Problematik mit den Beobachtungen vorangegangener Studien überein (139, 152, 154, 158, 163, 164, 171, 176-178) und bestätigen den häufig beschriebenen engen Zusammenhang parodontaler Erkrankungen und der Matrixmetalloproteinase-8 als zentralem Biomarker parodontaler Destruktion.

5.2.4 Parodontalpathogene Keime

Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass die Infektionen mit den parodontalpathogenen Keime des orangenen Komplexes (Fn und Pi) nach SRP-Therapie und dem vergleichsweise langen Recallintervall von 6 Monaten zunehmen. Die Anzahl der Patienten, bei denen *Prevotella intermedia* nachgewiesen werden konnte, nahm in allen Gruppen signifikant zu, während die Fn-Infektionen zwar ebenfalls in der Gesamtpopulation, der Gruppe der Männer und der der Raucher stiegen, jedoch ohne signifikante Unterschiede aufzuweisen. Als mögliche Ursache für die Rekolonialisierung durch Fn und Pi nach Entfernung der subgingivalen Plaque, kommt die Funktion der Keime des orangenen Komplexes als Brückenbakterien, die den Übergang von frühkolonialisierenden aeroben Streptokokken zu den hochpathogenen anaeroben Erregern des roten Komplexes ermöglichen in Frage (15, 16). Wobei dies für eine erneut reifende subgingivale Plaque sprechen würde.

Anders als die Zahl der Infektionen mit Tf und Td aus dem roten Komplex konnte die parodontale Besiedelung mit Aa und Pg im Rahmen der in dieser Studie durchgeführten SRP-Therapie nicht signifikant verändert werden, was die

Erkenntnis der Resistenz von Aa und Pg gegenüber der alleinigen mechanischen Parodontitistherapie bestätigt (22, 29, 30).

Dem gegenüber zeigt sich eine signifikante Reduktion der mit Td besiedelten Patienten aus der Gesamtpopulation, der weiblichen und der nichtrauchenden Population nach SRP-Therapie.

Im Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren (179), zeigen auch die Daten der vorliegenden Studie signifikante Korrelationen zwischen den Keimen des orangen und denen des roten Komplexes, aber auch die Erreger des roten Komplexes korrelieren untereinander entsprechend der Komplextheorie von Socransky et al. (12) signifikant miteinander.

Anders als Teles et al. (179), die einen starken Zusammenhang zwischen den Keimkomplexen und den MMP-8-Konzentrationen im GCF beschreiben, gilt dies in vorliegender Studie nur für Fn und Tf, nicht aber für alle Erreger der beiden Komplexe. Des Weiteren sprechen die Ergebnisse der Studie von Teles et al. nicht für einen signifikanten Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern und der Besiedelung mit den parodontalpathogenen Keimen der beiden beschriebenen Komplexe (179), weshalb der Einfluss der Rauchgewohnheiten auf die Zusammensetzung der subgingivalen Plaque, im Vergleich zu den bekannten positiven Korrelationen zwischen dem Rauchen und klinischen Parametern, als vergleichsweise klein interpretiert wird.

Diese These kann durch die vorliegenden Daten nicht gänzlich bestätigt werden, da die Rangkorrelation nach Spearman signifikante Zusammenhänge zwischen dem Rauchverhalten und der Besiedelung sowohl mit Pg als auch mit Td zeigt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der Einfluss des Rauchens auf die Zusammensetzung des subgingivalen Biofilms möglicherweise größer ist, als bislang angenommen.

5.2.5 Risikofaktor Rauchverhalten

Rauchen gilt bereits seit Jahrzehnten als einer der wichtigsten Risikofaktoren für parodontale Erkrankungen (58, 61). Im Vergleich zu Nichtrauchern, weisen Raucher ein um das Fünffache gesteigertes Risiko zur Ausbildung einer Parodontitis auf (60), wobei das Ausmaß der parodontalen Destruktion (180, 181) und die deutlich erhöhte Zahnverlustrate (180) bei Rauchern stark mit der Menge des Tabakkonsums zu korrelieren scheint (61, 62). Es wird vermutet, dass die

starke Assoziation zwischen parodontalen Erkrankungen und dem Rauchen durch die reduzierte Immunantwort von Rauchern zustande kommt (61). Einerseits bedingt durch eine verminderte Antikörperproduktion (68), eine gestörte Chemotaxis neutrophiler Granulozyten (66) und die Modifikation von Entzündungsmediatoren (182, 183) in Rauchern, andererseits durch die vasokonstriktorische Wirkung des in Tabakwaren enthaltenen Nikotins, das zu einer verringerten Zirkulation und einer verminderten Transsudation von Sulkusflüssigkeit und somit zu einer reduzierten Immunantwort auf Parodontalpathogene und einer herabgesetzten Wundheilungsfähigkeit führt (63-65).

5.2.5.1 Klinische Ergebnisse von Rauchern

Bei Auswertung der klinischen Ergebnisse zeigen sich mitunter deutliche Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern, was die seit langem beschriebene größere Anfälligkeit von Rauchern für parodontale Erkrankungen bestätigt. Analog zu den Ergebnissen von Luzzi et al. und weiterer Autoren (180, 181, 184), unterscheiden sich die Sondierungstiefen von Rauchern und Nichtrauchern signifikant, sowohl vor als auch nach SRP-Therapie, was die größere Resistenz von Rauchern gegenüber der konventionellen Parodontitistherapie unterstreicht.

Insbesondere die verringerte Blutung auf Sondierung bei Rauchern wurde bereits vor mehr als 30 Jahren beschrieben (57, 185, 186) und geht am ehesten auf die vasokonstriktorische Wirkung des im Tabak enthaltenen Nikotins zurück (187), wodurch der BOP bei Rauchern häufig falsch-negative Ergebnisse in Bezug auf den Entzündungszustand zulässt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen ebenfalls geringere BOP-Werte bei Rauchern, sowohl zur Initial- als auch zur Recalluntersuchung nach Therapie, allerdings ohne signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Die erhobenen PI-Werte zur Beurteilung der häuslichen Mundhygiene unterscheiden sich zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant, allerdings konnte bei den Nichtrauchern eine signifikante Reduktion über das Recallintervall erzielt werden, während die Werte der Raucher nicht signifikant gesunken sind. Auch diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse aus vorangegangenen Studien. Sowohl Söder et al. als auch Luzzi et al. (184, 188) haben signifikante

Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern bei Betrachtung der Plaquewerte beobachtet und sehen hierin eine Ursache für die gesteigerte Anfälligkeit von Rauchern für parodontale Läsionen. Grundsätzlich gelten die vergleichsweise stärkeren klinischen Entzündungszeichen der parodontalen Gewebe in Rauchern als Konsens und belegen andersherum die gesteigerte Prädisposition von Rauchern für die Ausbildung von Parodontitiden.

5.2.5.2 PGE₂ im GCF von Rauchern

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen deutlich höhere PGE₂-Konzentrationen von Nichtrauchern (710,83 pg/ml) als von Rauchern (148,66 pg/ml), allerdings nur für die Gruppe der Nichtraucher eine signifikante Reduktion nach SRP-Therapie ($p=0,007$). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen von Rauchern und Nichtrauchern konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die beschriebenen Ergebnisse stimmen mit der 2015 veröffentlichten Studie von Camargo et al. (189) überein, die ebenfalls geringere PGE₂-Konzentrationen in Rauchern gemessen haben und deshalb annehmen, dass Zigarettenrauch einen inhibitorischen Effekt auf die PGE₂-Ausschüttung hat. Eine in-vitro Studie von Romero et al. (190) zeigt, dass Zigarettenrauch die PGE₂-Synthese durch Fibroblasten reduziert, womit eine mögliche biochemische Erklärung für die klinischen Zusammenhänge zwischen dem Rauchen und erniedrigter PGE₂-Konzentrationen im GCF gegeben wäre.

Andere Studien, wie die von Kurtis et al. (191) hingegen haben keine signifikanten Unterschiede zwischen PGE₂-Konzentrationen im GCF von Rauchern und Nichtrauchern ergeben, weder vor noch nach SRP-Therapie. Auch Söder et al. (188) kamen zu dem Ergebnis, dass die PGE₂-Konzentrationen bei Rauchern geringer sind, als in Nichtrauchern, sich jedoch nicht signifikant voneinander unterscheiden. Die unterschiedlichen Ergebnisse der bislang durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass weitere Studien mit größeren Fallzahlen benötigt werden, um die Auswirkungen von Zigarettenrauch auf Entzündungsmediatoren wie PGE₂ zu verdeutlichen.

5.2.5.3 MMP-8 im GCF von Rauchern

Sowohl die Raucher, als auch die Nichtraucher zeigen eine signifikante Abnahme der MMP-8-Konzentrationen nach SRP-Therapie. Diese vom Rauchverhalten unabhängige effektive MMP-8-Reduktion einer Gesamtpopulation durch eine

nicht-chirurgische Therapie deckt sich wieder mit Ergebnissen einiger anderer Arbeiten (164, 176, 178).

Demgegenüber zeigen sich in der Literatur unterschiedliche Angaben bei Vergleich der MMP-8-Konzentrationen von Rauchern und Nichtrauchern sowohl vor als auch nach Therapie. So beschreiben einige Autoren höhere Konzentrationen bei Rauchern, als bei Nichtrauchern, wobei kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte (176-178). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Leppilathi, Mänytlä und Sorsa (152, 164, 192) weist die Gruppe der Raucher in dieser Studie eine geringere MMP-8-Konzentration auf, als die der Nichtraucher. Darüber hinaus zeigen Raucher eine signifikant höhere MMP-8-Reduktion nach SRP-Therapie ($p=0,023$).

Das Rauchverhalten korreliert darüber hinaus negativ signifikant ($p<0,001$) mit der MMP-8-Konzentration, der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman zeigt mit $-0,180$ ρ allerdings eine kleine Effektstärke, weshalb der Zusammenhang kritisch zu hinterfragen ist.

Genauere Untersuchungen von Leppilathi und Sorsa geben Anlass zur Annahme, dass in Rauchern verschiedene „Taschenprofile“ bestehen, wodurch sich die geringeren durchschnittlichen MMP-8-Konzentrationen einerseits und die bekanntermaßen schlechte Therapieantwort von Rauchern andererseits erklären lassen würden (152, 164).

Demnach zeigen Parodontaltaschen von Rauchern mit hohen initialen MMP-8-Konzentrationen im GCF eine starke Reduktion, sowohl in Bezug auf die MMP-8-Konzentration, als auch auf die klinischen Parameter. Taschen mit vergleichsweise geringen Konzentrationen, bei denen zuvor angenommen wurde, sie würden eine gute Therapieantwort zeigen, wiesen paradoxer Weise hingegen kaum reduzierte klinische Werte auf und die MMP-8-Konzentrationen steigen nach Therapie an.

Diese These würde erklären, warum Raucher vergleichsweise geringere MMP-8-Konzentrationen zeigen als Nichtraucher und trotzdem ein größeres Risiko für fortschreitende parodontale Gewebedestruktion haben.

Anders als in den Studien von Leppilathi und Sorsa (152, 164), wurden die GCF-Proben in der vorliegenden Studie im Sinne einer Poolprobe entnommen, weshalb sich die einzelnen Parodontaltaschen der Patienten und die darin enthaltenen MMP-8-Konzentrationen nicht differenzieren lassen. Auch der

signifikanter Unterschied der MMP-8-Konzentrationen von Rauchern und Nichtrauchern nach Therapie lässt sich nicht schlussendlich erklären. Aus diesem Grund kann die aufgestellte These von Leppilathi und Sorsa durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht abschließend bestätigt werden.

5.2.6 Risikofaktor Geschlecht

Wie bereits einleitend erwähnt, gilt das männliche Geschlecht seit mehreren Jahrzehnten als wichtiger und zahlreich belegter Risikofaktor für die Prävalenz aber auch die Ausprägung und die Schwere parodontale Erkrankungen (2, 6, 54-56, 69, 70). In der Regel wird diese Ausprägung mit einem sozial-, kulturell- und verhaltensbedingtem geschlechterunterschiedlichen Lebenswandel und einer sich daraus ergebenden gesteigerten Anfälligkeit von Individuen männlichen Geschlechts für weitere parodontal relevante umweltbedingte Risikofaktoren begründet (56).

Allerdings muss beachtet werden, dass sich die Geschlechter nicht nur durch geschlechtsspezifische Verhaltensmuster und einer hieraus hervorgehenden unterschiedlich ausgeprägten Anfälligkeit für gesundheitliche Risikofaktoren voneinander abgrenzen lassen, sondern auch grundlegend unterschiedliche anatomische, physiologische und biologische Voraussetzungen aufweisen, die mitunter das Auftreten und den Verlauf von Erkrankungen begünstigen können (193, 194).

Besonderes Augenmerk sollte in diesem Zusammenhang auf die in der Literatur beschriebenen immunologischen Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern gelegt werden, um eine mögliche Verbindung zur geschlechterabhängigen Ausprägung parodontaler Erkrankungen herstellen zu können.

Grundsätzlich zeigen Studien beispielsweise, dass erwachsene Frauen eine mitunter deutlich stärkere Aktivierung des Immunsystems aufweisen, als Männer, wobei sich sowohl Komponenten des angeborenen, als auch des erworbenen Immunsystems unterscheiden (193). Insbesondere die Unterschiede der angeborenen Immunantwort geben wiederum Anlass zu der Vermutung, dass X-chromosomal gelegene Gene einen wichtigen Anteil an der unterschiedlich stark ausgeprägten immunologischen Reaktion haben (193). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass sowohl Anteile des angeborenen, als auch des adaptiven

Immunsystem der geschlechterunterschiedlichen Regulation durch Sexualhormone unterliegen, weshalb neben den sozialen und verhaltensbedingten Verschiedenheiten ein klarer immunologischer Unterschied zwischen den Geschlechtern nicht von der Hand zu weisen ist (194).

5.2.6.1 Klinische Ergebnisse nach Geschlecht

Die in dieser Studie erhobenen klinischen Ergebnisse bestätigen die in der Literatur beschriebenen geschlechterspezifischen Unterschiede. So zeigen Männer genauso wie Frauen zwar eine signifikante ST-Reduktion nach Therapie, Männer jedoch weisen signifikant geringere Attachmentgewinne auf als Frauen und reagieren entsprechend schlechter auf die SRP-Therapie. Im Rahmen der Rangkorrelation nach Spearman lässt sich zusätzlich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem männlichen Geschlecht und den Sondierungstiefen erkennen. Diese Beobachtung stimmt mit der generellen Annahme überein, dass Männer stärker zu parodontalen Läsionen neigen und auch die Schwere der Erkrankung geschlechterbedingt ist (6, 56, 69, 70, 195).

Die durch Genco et al. beschriebene deutlich schlechtere Mundhygiene von Männern im Gegensatz zu Frauen (55) spiegelt sich auch in den Ergebnissen der vorliegenden Studie wider. So ist der PI der männlichen Studienpopulation signifikant höher sowohl vor als auch nach Therapie im Vergleich zur weiblichen Gruppe, was eindeutig für eine schlechter häusliche Plaquekontrolle und eine geringere Motivationsfähigkeit zur Mundhygiene der männlichen Studienteilnehmer spricht. Auch die signifikante Rangkorrelation zwischen dem PI und dem männlichen Geschlecht nach Spearman bestätigt die in der Regel durch verhaltensbedingte Geschlechterunterschiede begründeten Beobachtungen zahlreicher Autoren in der Vergangenheit.

5.2.6.2 PGE₂ nach Geschlecht

Bei Vergleich der Mittelwerte der Initialmessung und der Recallmessung zeigt sich für die weibliche Population eine signifikante PGE₂-Reduktion nach SRP-Therapie, die Konzentrationen in der männlichen Population hingegen sanken nicht signifikant. Wie bereits zuvor erwähnt, sollte jedoch beachtet werden, dass die vergleichsweise hohe Standardabweichung der Mittelwerte in der Gruppe der Männer, die Aussagekraft des p-Wertes bei der statistischen Auswertung womöglich schmälert.

In der Vergangenheit durchgeführte Studien, beziehen sich allen voran auf die Zusammenhänge zwischen Sexualhormonen und den zellulären Mechanismen in parodontal erkrankten Geweben. So beschreiben Ferris et al. in ihrer Publikation einen deutlichen Zusammenhang zwischen den weiblichen Sexualhormonen Östrogen und Progesteron und der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (196). Insbesondere Progesteron wirkt laut dieser Studie stimulierend auf PGE₂ und verstärkt sowohl die Akkumulation als auch die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten in parodontalen Geweben.

Diese parodontal relevanten Regulationen durch Sexualhormone treten insbesondere dann in den Vordergrund, wenn sich der hormonelle Haushalt verändert. So können die Pubertät (197, 198), der Menstruationszyklus (199, 200), aber auch die Schwangerschaft (201, 202) und die Menopause (203, 204) von Frauen erhebliche Auswirkungen auf den parodontalen Zustand haben.

Anders als die zahlreichen Arbeiten der zuvor genannten Autoren, können die Ergebnisse dieser Studie die These, Frauen seien durch die geschlechterspezifische hormonelle Regulation einem größeren Risiko für parodontale Erkrankungen ausgesetzt, nicht stützen. Ein möglicher Grund für diese Divergenz lässt sich bei der Zusammensetzung der Studienpopulation vermuten. So wurden schwangere Frauen und Heranwachsende im Vorfeld von der Studie ausgeschlossen. Darüber hinaus muss angenommen werden, dass bei einem Altersdurchschnitt der Probanden dieser Studie von ca. 60 Jahren, die meisten Studienteilnehmerinnen bereits postmenopausal und dementsprechend weniger stark hormonellen Schwankungen ausgesetzt waren.

Auf der anderen Seite haben Mascarenhas et al. gezeigt, dass eine suffiziente Plaquekontrolle die Auswirkungen hormoneller Dysbalancen auf den Parodontalzustand minimieren können (199), was angesichts der signifikant niedrigeren PI-Werte der weiblichen Studienteilnehmer ein weiterer Grund für die Richtigkeit der Ergebnisse sein könnte.

5.2.6.3 MMP-8 nach Geschlecht

Sowohl die MMP-8-Konzentrationen der Initialmessung, aber auch die der Recallmessung sind in der männlichen Population geringer, als in der weiblichen. Allerdings weisen die Unterschiede keine Signifikanz auf und auch die Rangkorrelation nach Spearman ist nicht signifikant.

Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass Frauen und Nichtraucher vergleichbare Konzentrationen zeigen, ebenso Männer und Raucher, wobei zu beachten ist, dass für die Studienpopulation kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und Rauchverhalten festgestellt wurde. Eine mögliche Erklärung für die Parallelen zwischen Rauchern und Männern ist die hormonelle Regulation des Immunsystems, bei der sich bestimmte Unterschiede auch auf die Erkrankung des Zahnhalteapparates beziehen lassen.

Während die MMP-8-Konzentrationen von Rauchern mit parodontaler Erkrankung in zahlreichen Studien untersucht wurde und die geringeren Werte gegenüber der Nichtraucher allen voran mit der bekanntermaßen reduzierten Funktion neutrophiler Granulozyten in Rauchern erklärt wird, gibt es nur wenige Studien, die auf den geschlechterspezifischen Unterschied eingehen.

Bekannt ist allerdings, dass sowohl Androgene als auch Östrogene die funktionellen Eigenschaften neutrophiler Granulozyten beeinflussen und die Zellanzahl steigern (193). Die tatsächliche Degranulation neutrophiler Granulozyten, dem Zelltyp, dem die wichtigste Rolle im Rahmen der MMP-8-Synthese in parodontalen Geweben zugesprochen wird (144), wird hingegen nur durch Östrogene gesteigert, nicht aber durch Androgene (193). Ferris et al. beschreiben darüber hinaus, dass Progesteron die Anreicherung neutrophiler Granulozyten bewirkt und deren Chemotaxis im Parodontium anregt (196). Molloy et al. konnten zeigen, dass die neutrophilen Granulozyten von Frauen eine reduzierte Apoptoserate im Vergleich zu denen von Männern aufweisen (205), wodurch sich, ähnlich wie bei Diabetikern, die Leukozyten womöglich in parodontal erkrankten Geweben anreichern und es zur verstärkten Freisetzung von gewebeabbauenden Enzymen wie MMPs kommt (206).

Weitere Studien müssen in der Zukunft den Zusammenhang zwischen dem biologischen, aber auch dem sozialen Geschlecht und den Entzündungsmediatoren in parodontalen Geweben genauer beleuchten, um die Hintergründe des gesteigerten Risikos von Männern für parodontale Erkrankungen besser verstehen zu können.

6 Zusammenfassung

Das Verständnis über die Zusammenhänge und die Pathogenese parodontaler Erkrankungen ist seit Jahrzehnten Gegenstand der Forschung und bis heute noch nicht abschließend geklärt. Insbesondere die großen Fortschritte im Bereich der molekularbiologischen Diagnostik haben in den letzten Jahren dazu geführt, die immunologischen Einflüsse auf die meist chronische Destruktion des Zahnhalteapparates besser nachvollziehen zu können, stellen die Forschung aber zu gleich vor neue Herausforderungen und unterstreichen die große Komplexität der Erkrankung.

In der vorliegenden Studie wurden 152 an einer chronischen Parodontitis erkrankten Patienten (70 weiblich, 82 männlich, 93 Nichtraucher, 56 Raucher) zum Zeitpunkt Null (Initial) sowie 6 Monate später (Recall) in den klinischen Kursen der Konservierenden Zahnheilkunde der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie des Klinikums der Universität München untersucht und anschließend einer geschlossenen SRP-Therapie zugeführt. Neben der Auswertung der klinischen Befunde (ST, BOP, PI), wurden die GCF-Konzentrationen von MMP-8 und PGE₂ analysiert und das Vorkommen sechs verschiedener parodontalpathogener Keime (Aa, Pg, Tf, Td, Pi, Fn) bestimmt.

Im Vergleich zu den initial erhobenen Daten zeigt sich zum Recalltermin nach 6 Monaten eine signifikante Reduktion aller klinischen Parameter ($p < 0,05$) mit Ausnahme des Plaqueindex der Raucher. Hervorzuheben sind die signifikant größere Reduktion der Sondierungstiefen und des Plaqueindex ($p < 0,05$) der weiblichen Population im Vergleich zur männlichen und die signifikant geringere Abnahme der Sondierungstiefen ($p < 0,0001$) bei Rauchern verglichen mit Nichtrauchern. Die GCF-Konzentrationen von MMP-8 weisen bei der Recallmessung unabhängig vom Geschlecht und Rauchverhalten eine hoch signifikante Reduktion ($p < 0,01$) auf und korrelieren außerdem signifikant ($p < 0,05$) mit den klinischen Befunden ST und BOP. Mit Ausnahme der Raucher und der männlichen Population, zeigen auch die GCF-Konzentrationen von PGE₂ eine signifikante Reduktion ($p > 0,05$) nach SRP-Therapie und korrelieren darüber hinaus signifikant mit den erhobenen MMP-8-Werten.

Diese Ergebnisse decken sich mit denen zahlreicher in der Vergangenheit durchgeführter Studien kleineren Umfangs und unterstreichen die Belastbarkeit und Verlässlichkeit der beiden untersuchten Biomarker in der Verlaufskontrolle der chronischen Parodontitis.

Die angewandte molekularbiologische Diagnostik erlaubt somit Rückschlüsse auf die immunologischen Abläufe und zeigt, dass mit Hilfe des PGE₂ und vor allem des MMP-8 die posttherapeutische Verlaufskontrolle der chronischen Parodontitis möglich ist. Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse können in der Zukunft optimierte Präventions- und Therapieformen ermöglichen, die sehr viel spezifischer an die jeweiligen Risikoprofile angepasst werden können.

7 Abkürzungsverzeichnis

μ

μl..... Mikroliter

A

Aa Aggregatibacter
actinomycetemcomitans

B

BOP...Blutung auf Sondierung (bleeding on
probing)

C

CAL..... clinical attachment loss

cAMP .. Cyclisches Adenosinmonophosphat

COX..... Cyclooxygenase

D

DMS..... Deutschen Mundgesundheitsstudie

DNA Deoxyribonucleic acid

E

ECM..... Extrazelluläre Matrix

EIA.....enzyme immunoassay

ELISA enzyme-linked immunosorbent
assay

EP Prostaglandin E-Rezeptor

F

Fn Fusobacterium nucleatum

G

GCF Sulkusflüssigkeit (gingival crevicular
fluid)

I

IFN γ Interferon γ

IL-1 Interleukin-1

IL-2 Interleukin-2

L

LOX Lipoxygenase

LPS.....Lipopolysaccharide

M

MMännlich

MGP Magnetische Silicapartikel

ml Milliliter

mmMillimeter

MMP.....Matrixmetalloproteinase

MMP-8..... Matrixmetalloproteinase-8

N

ng Nanogramm

NHANES National Health and Nutrition
Examination Survey

NRNichtraucher

NSB Nicht-spezifische Bindung

O

ODOptische Dichte

OPGOrthopantomogramm,
Osteoprotegerin

P

PBS phosphate buffered saline

PDL-Zellen Parodontale Ligamentzellen

pgPikogramm

Pg.....Porphyromonas gingivalis

PGD₂ Prostaglandin D₂

PGE₂ Prostaglandin E₂

PGF_{2 α} Prostaglandin F_{2- α}

PGH₂ Prostaglandin H₂

PGI₂.....Prostglandin I₂

Pi Prevotella intermedia

PI..... Plaque-Index

PICP..... Prokollagen Typ I C-terminales
Propeptid

PISF.....peri-implant sulcular fluid

R

R.....Raucher

RANK... receptor activator of nuclear factor- κ B

RANKL. receptor activator of nuclear factor- κ B ligand

RECK.....reversion-inducing cystein-rich protein with kazal motifs

rpm revolutions per minute

S

SBI..... Sulkus-Blutungs-Index

SRP.....scaling and rootplanning

ST..... Sondierungstiefen

T

Td..... Treponema denticola

Tf..... Tannerella forsythia

TFPI2 tissue factor pathway inhibitor 2

TIMP.. tissue inhibitor of metalloproteinases

TNF Tumornekrosefaktor

TXA₂..... Thromboxan A₂

W

W..... Weiblich

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Methoden zur Entnahme der Sulkusflüssigkeit 49

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verteilung der Studienpopulation.....	33
Tabelle 2: ST-Ergebnisse	35
Tabelle 3: BOP-Ergebnisse	35
Tabelle 4: PI-Ergebnisse	36
Tabelle 5: Ergebnisse PGE ₂	37
Tabelle 6: Ergebnisse MMP-8	38
Tabelle 7: Vergleich der Fn-Infektionen.....	39
Tabelle 8: Vergleich der Pi-Infektionen.....	40
Tabelle 9: Vergleich der Aa-Infektionen	41
Tabelle 10: Vergleich der Pg-Infektionen	42
Tabelle 11: Vergleich der Tf-Infektionen.....	43
Tabelle 12: Vergleich der Td-Infektionen.....	44
Tabelle 13: Ergebnisse der Rangkorrelation nach Spearman	45

10 Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Vergleich der ST-Mittelwerte.....	34
Diagramm 2: Vergleich der BOP-Mittelwerte.....	35
Diagramm 3: Vergleich der PI-Mittelwerte.....	36
Diagramm 4: Vergleich der PGE ₂ -Mittelwertkonzentrationen.....	37
Diagramm 5: Vergleich der MMP-8-Mittelwertkonzentrationen.....	38
Diagramm 6: <i>Fusobacterium nucleatum</i>	39
Diagramm 7: <i>Prevotella intermedia</i>	40
Diagramm 8: <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	41
Diagramm 9: <i>Porphyromonas gingivalis</i>	42
Diagramm 10: <i>Tannerella forsythia</i>	43
Diagramm 11: <i>Treponema denticola</i>	44

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Matthias Folwaczny für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und die persönliche Betreuung während der Promotion.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. Christina Ern und Frau Brigitte Hackl für die intensive wissenschaftliche Betreuung vor Ort und die hingebungsvolle Unterstützung im Rahmen des klinischen und experimentellen Teils dieser Dissertation bedanken.

Meinen Großeltern danke ich für ihre unbedingte Hilfsbereitschaft in jeder Lage meines Lebens und besonders für ihre großzügige Unterstützung während des Studiums.

Ich danke meiner Verlobten für jeden Tag unseres gemeinsamen Weges und ihre unaufhörliche Motivation und moralische Unterstützung für diese Doktorarbeit.

Mein größter Dank gilt meiner Mutter, Frau Barbara Maria Bumm. Ohne ihre bedingungslose Liebe und immerwährende Unterstützung auf meinem Weg, stünde ich nicht, wo ich heute stehe, ohne sie wäre ich nicht, wer ich heute bin.

Ihrem Andenken zur Ehre widme ich diese Dissertation.

12 Literaturverzeichnis

1. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005;38:135-87.
2. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *The Lancet*. 2005;366(9499):1809-20.
3. Bascones-Martinez A, Figuero-Ruiz E. Periodontal diseases as bacterial infection. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2004;9 Suppl:101-7; 92-0.
4. Loe H. Principles of aetiology and pathogenesis governing the treatment of periodontal disease. *International dental journal*. 1983;33(2):119-26.
5. Pussinen PJ, Paju S, Mantyla P, Sorsa T. Serum microbial- and host-derived markers of periodontal diseases: a review. *Current medicinal chemistry*. 2007;14(22):2402-12.
6. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res*. 2012;91(10):914-20.
7. Jordan RA, Bodechtel C, Hertrampf K, Hoffmann T, Kocher T, Nitschke I, et al. The Fifth German Oral Health Study (Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie, DMS V) - rationale, design, and methods. *BMC Oral Health*. 2014;14:161.
8. IDZ. Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V) Kurzfassung.
9. Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 1986;13(10):905-11.
10. Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral sciences reviews*. 1976;9:65-107.
11. Loesche WJ. Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. *J Dent Res*. 1979;58(12):2404-12.
12. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134-44.
13. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000. 2002;28:12-55.
14. Listgarten MA. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol*. 1976;47(1):1-18.
15. Kapatral V, Anderson I, Ivanova N, Reznik G, Los T, Lykidis A, et al. Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. *Journal of bacteriology*. 2002;184(7):2005-18.
16. Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clinical microbiology reviews*. 1996;9(1):55-71.
17. Tanner AC, Socransky SS, Goodson JM. Microbiota of periodontal pockets losing crestal alveolar bone. *J Periodontal Res*. 1984;19(3):279-91.
18. Haapasalo M, Ranta H, Ranta K, Shah H. Black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis. *Infect Immun*. 1986;53(1):149-53.
19. Loesche WJ, Syed SA, Laughon BE, Stoll J. The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol*. 1982;53(4):223-30.

20. Shenker BJ, Vitale L, Slots J. Immunosuppressive effects of *Prevotella intermedia* on in vitro human lymphocyte activation. *Infect Immun*. 1991;59(12):4583-9.
21. Slots J, Genco RJ. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J Dent Res*. 1984;63(3):412-21.
22. Henderson B, Ward JM, Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A* periodontopathogen? *Periodontol* 2000. 2010;54(1):78-105.
23. Müller HP, Heinecke A, Fuhrmann A, Eger T, Zöller L. Intraoral distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in young adults with minimal periodontal disease. *Journal of periodontal research*. 2001;36(2):114-23.
24. Asikainen S, Alaluusua S, Saxen L. Recovery of *A. actinomycetemcomitans* from teeth, tongue, and saliva. *J Periodontol*. 1991;62(3):203-6.
25. Bragd L, Dahlen G, Wikstrom M, Slots J. The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis; a retrospective study. *J Clin Periodontol*. 1987;14(2):95-9.
26. Henderson B, Wilson M, Sharp L, Ward JM. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of medical microbiology*. 2002;51(12):1013-20.
27. Kaplan JB, Perry MB, MacLean LL, Furgang D, Wilson ME, Fine DH. Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infect Immun*. 2001;69(9):5375-84.
28. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology* 2000. 2005;38(1):72-122.
29. Griffen AL, Becker MR, Lyons SR, Moeschberger ML, Leys EJ. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and Periodontal Health Status. *Journal of clinical microbiology*. 1998;36(11):3239-42.
30. Watanabe K, Yilmaz O, Nakhjiri SF, Belton CM, Lamont RJ. Association of mitogen-activated protein kinase pathways with gingival epithelial cell responses to *Porphyromonas gingivalis* infection. *Infect Immun*. 2001;69(11):6731-7.
31. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR. 1998;62(4):1244-63.
32. Tan KS, Song KP, Ong G. *Bacteroides forsythus* prtH genotype in periodontitis patients: occurrence and association with periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2001;36(6):398-403.
33. Hasebe A, Yoshimura A, Into T, Kataoka H, Tanaka S, Arakawa S, et al. Biological activities of *Bacteroides forsythus* lipoproteins and their possible pathological roles in periodontal disease. *Infect Immun*. 2004;72(3):1318-25.
34. Nakajima T, Tomi N, Fukuyo Y, Ishikura H, Ohno Y, Arvind R, et al. Isolation and identification of a cytopathic activity in *Tannerella forsythia*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;351(1):133-9.

35. Arakawa S, Nakajima T, Ishikura H, Ichinose S, Ishikawa I, Tsuchida N. Novel apoptosis-inducing activity in *Bacteroides forsythus*: a comparative study with three serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*. 2000;68(8):4611-5.
36. Simonson LG, Goodman CH, Morton HE. Quantitative immunoassay of *Treponema denticola* serovar C in adult periodontitis. *Journal of clinical microbiology*. 1990;28(7):1493-6.
37. Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994;5:66-77.
38. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ, Jr. Communication among oral bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2002;66(3):486-505, table of contents.
39. Grenier D. Characterization of the trypsin-like activity of *Bacteroides forsythus*. *Microbiology*. 1995;141(4):921-6.
40. Nilius AM, Spencer SC, Simonson LG. Stimulation of in vitro growth of *Treponema denticola* by extracellular growth factors produced by *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res*. 1993;72(6):1027-31.
41. Byrne SJ, Dashper SG, Darby IB, Adams GG, Hoffmann B, Reynolds EC. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in subgingival plaque. *Oral microbiology and immunology*. 2009;24(6):469-77.
42. Flemmig TF. Periodontitis. *Annals of Periodontology*. 1999;4(1):32-7.
43. Mariotti A. Dental Plaque-Induced Gingival Diseases. *Annals of Periodontology*. 1999;4(1):7-17.
44. Ranney RR. Classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1993;2:13-25.
45. Loe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol*. 1986;13(5):431-45.
46. Selvig KA. Ultrastructural Changes in Cementum and Adjacent Connective Tissue in Periodontal Disease. *Acta Odontologica Scandinavica*. 1966;24(4):459-500.
47. Seymour GJ, Greenspan JS. The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease. *J Periodontal Res*. 1979;14(1):39-46.
48. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1976;34(3):235-49.
49. Armitage GC. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Annals of Periodontology*. 1999;4(1):1-6.
50. Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, Lindhe J. New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1984;11(1):21-32.
51. Jeffcoat MK, Reddy MS. Progression of Probing Attachment Loss in Adult Periodontitis. *Journal of Periodontology*. 1991;62(3):185-9.
52. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol*. 1996;1(1):821-78.
53. Newton JT, Asimakopoulou K. Managing oral hygiene as a risk factor for periodontal disease: a systematic review of psychological approaches to behaviour change for improved plaque control in periodontal management. *J Clin Periodontol*. 2015;42 Suppl 16:S36-46.

54. Pihlstrom BL. Periodontal risk assessment, diagnosis and treatment planning. *Periodontol 2000*. 2001;25:37-58.
55. Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol*. 1996;67(10 Suppl):1041-9.
56. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2013;62(1):59-94.
57. Bergstrom J. Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology / the Society of the Nippon Dental University*. 2004;92(1):1-8.
58. Johnson GK, Slach NA. Impact of tobacco use on periodontal status. *Journal of dental education*. 2001;65(4):313-21.
59. Reynolds MA. Modifiable risk factors in periodontitis: at the intersection of aging and disease. *Periodontol 2000*. 2014;64(1):7-19.
60. Stoltenberg JL, Osborn JB, Pihlstrom BL, Herzberg MC, Aepli DM, Wolff LF, et al. Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status. *J Periodontol*. 1993;64(12):1225-30.
61. Kinane DF, Chestnutt IG. Smoking and periodontal disease. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 2000;11(3):356-65.
62. Nunn ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontol 2000*. 2003;32:11-23.
63. Kinane DF, Radvar M. The effect of smoking on mechanical and antimicrobial periodontal therapy. *J Periodontol*. 1997;68(5):467-72.
64. Clarke NG, Shephard BC, Hirsch RS. The effects of intra-arterial epinephrine and nicotine on gingival circulation. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1981;52(6):577-82.
65. Preber H, Bergstrom J. Effect of cigarette smoking on periodontal healing following surgical therapy. *J Clin Periodontol*. 1990;17(5):324-8.
66. Kenney EB, Kraal JH, Saxe SR, Jones J. The effect of cigarette smoke on human oral polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res*. 1977;12(4):227-34.
67. Johnson GK, Organ CC. Prostaglandin E2 and interleukin-1 concentrations in nicotine-exposed oral keratinocyte cultures. *J Periodontal Res*. 1997;32(5):447-54.
68. Hayman L, Steffen MJ, Stevens J, Badger E, Tempio P, Fuller B, et al. Smoking and periodontal disease: discrimination of antibody responses to pathogenic and commensal oral bacteria. *Clin Exp Immunol*. 2011;164(1):118-26.
69. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol*. 1994;65(3):260-7.
70. Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R, et al. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol*. 1995;66(1):23-9.
71. Suomi JD, Greene JC, Vermillion JR, Doyle J, Change JJ, Leatherwood EC. The Effect of Controlled Oral Hygiene Procedures on the Progression of Periodontal Disease in Adults: Results After Third and Final Year. *Journal of Periodontology*. 1971;42(3):152-60.
72. Axelsson P, Lindhe J. Effect of controlled oral hygiene procedures on caries and periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol*. 1978;5(2):133-51.

73. Axelsson P, Lindhe J, Nystrom B. On the prevention of caries and periodontal disease. Results of a 15-year longitudinal study in adults. *J Clin Periodontol*. 1991;18(3):182-9.
74. Cobb CM. Non-Surgical Pocket Therapy: Mechanical. *Annals of Periodontology*. 1996;1(1):443-90.
75. Wennström A, Wennström J, Lindhe J. Healing following surgical and non-surgical treatment of juvenile periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 1986;13(9):869-82.
76. Buchanan SA, Robertson PB. Calculus Removal by Scaling/Root Planing with and without Surgical Access. *Journal of Periodontology*. 1987;58(3):159-63.
77. Mousques T, Listgarten MA, Phillips RW. Effect of scaling and root planing on the composition of the human subgingival microbial flora. *J Periodontal Res*. 1980;15(2):144-51.
78. Consensus Report Non-Surgical Pocket Therapy: Mechanical, Pharmacotherapeutics, and Dental Occlusion. *Annals of Periodontology*. 1996;1(1):581-8.
79. Biagini G, Checchi L, Miccoli MC, Vasi V, Castaldini C. Root Curettage and Gingival Repair in Periodontitis. *Journal of Periodontology*. 1988;59(2):124-9.
80. Waerhaug J. Healing of the Dento-Epithelial Junction Following Subgingival Plaque Control: II: As Observed on Extracted Teeth. *Journal of Periodontology*. 1978;49(3):119-34.
81. Caton JG, Zander HA. The Attachment Between Tooth and Gingival Tissues After Periodic Root Planing and Soft Tissue Curettage. *Journal of Periodontology*. 1979;50(9):462-6.
82. Haffajee AD, Socransky SS, Goodson JM. Clinical parameters as predictors of destructive periodontal disease activity. *J Clin Periodontol*. 1983;10(3):257-65.
83. Albandar JM. A 6-year study on the pattern of periodontal disease progression. *J Clin Periodontol*. 1990;17(7 Pt 1):467-71.
84. Alfano MC. The origin of gingival fluid. *Journal of theoretical biology*. 1974;47(1):127-36.
85. Cimasoni G. Crevicular fluid updated. *Monographs in oral science*. 1983;12:lil-vii, 1-152.
86. Uitto VJ. Gingival crevice fluid--an introduction. *Periodontol 2000*. 2003;31:9-11.
87. Waerhaug J. The gingival pocket; anatomy, pathology, deepening and elimination. *Odontologisk tidskrift*. 1952;60(Suppl 1):1-186; 70 figures.
88. Waerhaug J, Steen E. The presence or absence of bacteria in gingival pockets and the reaction in healthy pockets to certain pure cultures; a bacteriological and histological investigation. *Odontologisk tidskrift*. 1952;60(1-2):1-24.
89. Brill N. Removal of Particles and Bacteria from Gingival Pockets by Tissue Fluid. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2009;17(4):431-40.
90. Holmberg K, Killander J. Quantitative determination of immunoglobulins (IgG, IgA and IgM) and identification of IgA-type in the gingival fluid. *J Periodontal Res*. 1971;6(1):1-8.
91. Shillitoe EJ, Lehner T. Immunoglobulins and complement in crevicular fluid, serum and saliva in man. *Arch Oral Biol*. 1972;17(2):241-7.

92. Armitage GC. Analysis of gingival crevice fluid and risk of progression of periodontitis. *Periodontol* 2000. 2004;34:109-19.
93. Rahnema M, Czupkałło Ł, Kozicka-Czupkałło M, Łobacz M. Gingival Crevicular Fluid – Composition and Clinical Importance in Gingivitis and Periodontitis. *Polish Journal of Public Health*. 2014;124(2).
94. Egelberg J. CELLULAR ELEMENTS IN GINGIVAL POCKET FLUID. *Acta Odontol Scand*. 1963;21:283-7.
95. Loe H, Holm-Pedersen P. ABSENCE AND PRESENCE OF FLUID FROM NORMAL AND INFLAMED GINGIVAE. *Periodontics*. 1965;3:171-7.
96. Loe H, Theilade E, Jensen SB. EXPERIMENTAL GINGIVITIS IN MAN. *J Periodontol*. 1965;36:177-87.
97. Browne RM. A preliminary study of the fluid flow from the gingival sulcus. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. 1962;55:486-8.
98. Krasse B, Egelberg J. The relative proportions of sodium, potassium and calcium in gingival pocket fluid. *Acta Odontol Scand*. 1962;20:143-52.
99. Bader HI, Goldhaber P. The passage of intravenously administered tetracycline in the gingival sulcus of dogs. *Journal of oral therapeutics and pharmacology*. 1966;2(5):324-9.
100. Diamond JM, Tormey JM. Role of long extracellular channels in fluid transport across epithelia. *Nature*. 1966;210(5038):817-20.
101. Brill N, Krasse B. Effect of Mechanical Stimulation on Flow of Tissue Fluid Through Gingival Pocket Epithelium. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2009;17(2):115-30.
102. Waerhaug J. Anatomy, physiology and pathology of the gingival pocket. *Revue belge de médecine dentaire Belgisch tijdschrift voor tandheelkunde*. 1966;21(1):9-15.
103. Oliver RC, Holm-Pederen P, Loe H. The correlation between clinical scoring, exudate measurements and microscopic evaluation of inflammation in the gingiva. *J Periodontol*. 1969;40(4):201-9.
104. Hancock EB, Cray RJ, O'Leary TJ. The relationship between gingival crevicular fluid and gingival inflammation. A clinical and histologic study. *J Periodontol*. 1979;50(1):13-9.
105. Gursoy UK, Kononen E, Huuonen S, Tervahartiala T, Pussinen PJ, Suominen AL, et al. Salivary type I collagen degradation end-products and related matrix metalloproteinases in periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2013;40(1):18-25.
106. Noguchi K, Ishikawa I. The roles of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2007;43:85-101.
107. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev*. 2004;56(3):387-437.
108. Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, Needleman P. The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem*. 1990;265(28):16737-40.
109. Ferreira SH. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nature: New biology*. 1972;240(102):200-3.
110. England S, Bevan S, Docherty RJ. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *The Journal of physiology*. 1996;495 (Pt 2):429-40.

111. Cao C, Matsumura K, Yamagata K, Watanabe Y. Cyclooxygenase-2 is induced in brain blood vessels during fever evoked by peripheral or central administration of tumor necrosis factor. *Brain research Molecular brain research*. 1998;56(1-2):45-56.
112. Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, Murata T, Matsuoka T, Kobayashi T, et al. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature*. 1998;395(6699):281-4.
113. Richardson PD, Withrington PG. The vasodilator actions of isoprenaline, histamine, prostaglandin E2, glucagon and secretin on the hepatic arterial vascular bed of the dog. *British journal of pharmacology*. 1976;57(4):581-8.
114. Solomon LM, Juhlin L, Kirschenbaum MB. Prostaglandin on cutaneous vasculature. *The Journal of investigative dermatology*. 1968;51(4):280-2.
115. FitzGerald GA, Pedersen AK, Patrono C. Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular disease. *Circulation*. 1983;67(6):1174-7.
116. Raisz LG, Dietrich JW, Simmons HA, Seyberth HW, Hubbard W, Oates JA. Effect of prostaglandin endoperoxides and metabolites on bone resorption in vitro. *Nature*. 1977;267(5611):532-4.
117. Roberts FA, Houston LS, Lukehart SA, Mancl LA, Persson GR, Page RC. Periodontitis vaccine decreases local prostaglandin E2 levels in a primate model. *Infect Immun*. 2004;72(2):1166-8.
118. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*. 1999;18:7908-16.
119. R. JJ, M.P. S, C.H. K, Willoughby DA, Winkler JD. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J*. 1997;11:457-65.
120. Sakuma Y, Tanaka K, Suda M, Yasoda A, Natsui K, Tanaka I, et al. Crucial involvement of the EP4 subtype of prostaglandin E receptor in osteoclast formation by proinflammatory cytokines and lipopolysaccharide. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2000;15(2):218-27.
121. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *Journal of immunology research*. 2015;2015:615486.
122. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2002;17(2):210-20.
123. Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res*. 1993;28(6 Pt 2):500-10.
124. Bareis DL, Manganiello VC, Hirata F, Vaughan M, Axelrod J. Bradykinin stimulates phospholipid methylation, calcium influx, prostaglandin formation, and cAMP accumulation in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983;80(9):2514-8.
125. Offenbacher S, Odle BM, Van Dyke TE. The use of crevicular fluid prostaglandin E2 levels as a predictor of periodontal attachment loss. *J Periodontal Res*. 1986;21(2):101-12.
126. Ohm K, Albers HK, Lisboa BP. Measurement of eight prostaglandins in human gingival and periodontal disease using high pressure liquid chromatography and radioimmunoassay. *J Periodontal Res*. 1984;19(5):501-11.

127. ElAttar TM. Prostaglandin E2 in human gingiva in health and disease and its stimulation by female sex steroids. *Prostaglandins*. 1976;11(2):331-41.
128. Offenbacher S, Collins JG, Heasman PA. Diagnostic Potential of Host Response Mediators. *Advances in dental research*. 1993;7(2):175-81.
129. Heasman PA, Offenbacher S, Collins JG, Edwards G, Seymour RA. Flurbiprofen in the prevention and treatment of experimental gingivitis. *J Clin Periodontol*. 1993;20(10):732-8.
130. Derkx HHF, Bruin KF, Jongeneel CV, de Waal LP, Brinkman BMN, Verweij CL, et al. Familial differences in endotoxin-induced TNF release in whole blood and peripheral blood mononuclear cells in vitro; relationship to TNF gene polymorphism. *Journal of Endotoxin Research*. 1995;2(1):19-25.
131. Smith MA, Braswell LD, Collins JG, Boyd DL, Jeffcoat MK, Reddy M, et al. Changes in inflammatory mediators in experimental periodontitis in the rhesus monkey. *Infect Immun*. 1993;61(4):1453-9.
132. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand*. 2007;65(1):1-13.
133. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2007;15(6):2223-68.
134. Thomas GT, Lewis MP, Speight PM. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral oncology*. 1999;35(3):227-33.
135. Ozcaka O, Bicakci N, Pussinen P, Sorsa T, Kose T, Buduneli N. Smoking and matrix metalloproteinases, neutrophil elastase and myeloperoxidase in chronic periodontitis. *Oral Dis*. 2011;17(1):68-76.
136. Sapna G, Gokul S, Bagri-Manjrekar K. Matrix metalloproteinases and periodontal diseases. *Oral Dis*. 2014;20(6):538-50.
137. Konopka L, Pietrzak A, Brzezinska-Blaszczyk E. Effect of scaling and root planing on interleukin-1beta, interleukin-8 and MMP-8 levels in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res*. 2012;47(6):681-8.
138. Kinney JS, Ramseier CA, Giannobile WV. Oral fluid-based biomarkers of alveolar bone loss in periodontitis. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1098:230-51.
139. Kinane DF, Darby IB, Said S, Luoto H, Sorsa T, Tikanoja S, et al. Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. *J Periodontal Res*. 2003;38(4):400-4.
140. Sorsa T, Tjaderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Annals of medicine*. 2006;38(5):306-21.
141. Sorsa T, Uitto VJ, Suomalainen K, Vauhkonen M, Lindy S. Comparison of interstitial collagenases from human gingiva, sulcular fluid and polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res*. 1988;23(6):386-93.
142. Rai B, Kharb S, Jain R, Anand SC. Biomarkers of periodontitis in oral fluids. *J Oral Sci*. 2008;50(1):53-6.
143. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*. 2003;92(8):827-39.
144. Romanelli R, Mancini S, Laschinger C, Overall CM, Sodek J, McCulloch CA. Activation of neutrophil collagenase in periodontitis. *Infect Immun*. 1999;67(5):2319-26.

145. Marcaccini AM, Meschiari CA, Zuardi LR, de Sousa TS, Taba M, Jr., Teofilo JM, et al. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2010;37(2):180-90.
146. Yakob M, Kari K, Tervahartiala T, Sorsa T, Soder PO, Meurman JH, et al. Associations of periodontal microorganisms with salivary proteins and MMP-8 in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol.* 2012;39(3):256-63.
147. Hardy DC, Ross JH, Schuyler CA, Leite RS, Slate EH, Huang Y. Matrix metalloproteinase-8 expression in periodontal tissues surgically removed from diabetic and non-diabetic patients with periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2012;39(3):249-55.
148. Armitage GC. The complete periodontal examination. *Periodontol 2000.* 2004;34:22-33.
149. Lange DE, Plagmann HC, Eenboom A, Promesberger A. [Clinical methods for the objective evaluation of oral hygiene]. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift.* 1977;32(1):44-7.
150. Buduneli N, Kinane DF. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2011;38 Suppl 11:85-105.
151. Taylor JJ, Preshaw PM. Gingival crevicular fluid and saliva. *Periodontol 2000.* 2016;70(1):7-10.
152. Sorsa T, Gursoy UK, Nwhator S, Hernandez M, Tervahartiala T, Leppilahti J, et al. Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2016;70(1):142-63.
153. Ding Y, Liede K, Leppa S, Ingman T, Sepper R, Konttinen YT, et al. Gingival crevicular fluid and salivary matrix metalloproteinases of heavy smokers as indicators of periodontal health. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;732:453-5.
154. Sorsa T, Tervahartiala T, Leppilahti J, Hernandez M, Gamonal J, Tuomainen AM, et al. Collagenase-2 (MMP-8) as a point-of-care biomarker in periodontitis and cardiovascular diseases. Therapeutic response to non-antimicrobial properties of tetracyclines. *Pharmacol Res.* 2011;63(2):108-13.
155. Marcaccini AM, Novaes AB, Jr., Meschiari CA, Souza SL, Palioto DB, Sorgi CA, et al. Circulating matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) and MMP-9 are increased in chronic periodontal disease and decrease after non-surgical periodontal therapy. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* 2009;409(1-2):117-22.
156. Pussinen PJ, Sarna S, Puolakkainen M, Ohlin H, Sorsa T, Pesonen E. The balance of serum matrix metalloproteinase-8 and its tissue inhibitor in acute coronary syndrome and its recurrence. *International journal of cardiology.* 2013;167(2):362-8.
157. Tuomainen AM, Kormi I, Havulinna AS, Tervahartiala T, Salomaa V, Sorsa T, et al. Serum tissue-degrading proteinases and incident cardiovascular disease events. *European journal of preventive cardiology.* 2014;21(7):806-12.
158. Leppilahti JM, Hernandez-Rios PA, Gamonal JA, Tervahartiala T, Brignardello-Petersen R, Mantyla P, et al. Matrix metalloproteinases and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid provide site-specific diagnostic value for chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2014;41(4):348-56.
159. Skapski H, Lehner T. A crevicular washing method for investigating immune components of crevicular fluid in man. *J Periodontal Res.* 1976;11(1):19-24.

160. Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*. 2003;31:32-42.
161. Sueda T, Bang J, Cimasoni G. Collection of gingival fluid for quantitative analysis. *J Dent Res*. 1969;48(1):159.
162. Lamster IB. Evaluation of components of gingival crevicular fluid as diagnostic tests. *Ann Periodontol*. 1997;2(1):123-37.
163. Mantyla P, Stenman M, Kinane DF, Tikanoja S, Luoto H, Salo T, et al. Gingival crevicular fluid collagenase-2 (MMP-8) test stick for chair-side monitoring of periodontitis. *J Periodontal Res*. 2003;38(4):436-9.
164. Leppilahti JM, Kallio MA, Tervahartiala T, Sorsa T, Mantyla P. Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels predict treatment outcome among smokers with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2014;85(2):250-60.
165. Cao H, Xiao L, Park G, Wang X, Azim AC, Christman JW, et al. An improved LC-MS/MS method for the quantification of prostaglandins E(2) and D(2) production in biological fluids. *Analytical biochemistry*. 2008;372(1):41-51.
166. Raisz LG, Alander CB, Fall PM, Simmons HA. Effects of prostaglandin F2 alpha on bone formation and resorption in cultured neonatal mouse calvariae: role of prostaglandin E2 production. *Endocrinology*. 1990;126(2):1076-9.
167. Yalcin F, Basegmez C, Isik G, Berber L, Eskinazi E, Soydinc M, et al. The effects of periodontal therapy on intracrevicular prostaglandin E2 concentrations and clinical parameters in pregnancy. *J Periodontol*. 2002;73(2):173-7.
168. Maloney CG, Kutchera WA, Albertine KH, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils. *J Immunol*. 1998;160(3):1402-10.
169. Reinold H, Ahmadi S, Depner UB, Layh B, Heindl C, Hamza M, et al. Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E receptors of the EP2 subtype. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(3):673-9.
170. Sorsa T, Hernandez M, Leppilahti J, Munjal S, Netuschil L, Mantyla P. Detection of gingival crevicular fluid MMP-8 levels with different laboratory and chair-side methods. *Oral Dis*. 2010;16(1):39-45.
171. Leppilahti JM, Ahonen MM, Hernandez M, Munjal S, Netuschil L, Uitto VJ, et al. Oral rinse MMP-8 point-of-care immuno test identifies patients with strong periodontal inflammatory burden. *Oral Dis*. 2011;17(1):115-22.
172. Kumar AK, Reddy NR, Babu M, Kumar PM, Reddy VS, Chavan CV. Estimation of prostaglandin E2 levels in gingival crevicular fluid in periodontal health, disease and after treatment. *Contemporary clinical dentistry*. 2013;4(3):303-6.
173. Preshaw PM, Lauffart B, Zak E, Jeffcoat MK, Barton I, Heasman PA. Progression and treatment of chronic adult periodontitis. *J Periodontol*. 1999;70(10):1209-20.
174. Tsai CC, Hong YC, Chen CC, Wu YM. Measurement of prostaglandin E2 and leukotriene B4 in the gingival crevicular fluid. *Journal of dentistry*. 1998;26(2):97-103.
175. Alexander DC, Martin JC, King PJ, Powell JR, Caves J, Cohen ME. Interleukin-1 beta, prostaglandin E2, and immunoglobulin G subclasses in gingival crevicular fluid in patients undergoing periodontal therapy. *J Periodontol*. 1996;67(8):755-62.

176. Akbari G, Prabhuji ML, Karthikeyan BV, Raghunatha K, Narayanan R. Analysis of matrix metalloproteinase-8 levels in gingival crevicular fluid and whole mouth fluid among smokers and nonsmokers using enzyme-linked immune-sorbent assay and a novel chair-side test. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2015;19(5):525-30.
177. Victor DJ, Subramanian S, Gnana PP, Kolagani SP. Assessment of Matrix Metalloproteinases-8 and -9 in Gingival Crevicular Fluid of Smokers and Non-smokers with Chronic Periodontitis Using ELISA. *J Int Oral Health*. 2014;6(6):67-71.
178. Kurtis B, Tuter G, Serdar M, Pinar S, Demirel I, Toyman U. GCF MMP-8 levels in smokers and non-smokers with chronic periodontitis following scaling and root planing accompanied by systemic use of flurbiprofen. *J Periodontol*. 2007;78(10):1954-61.
179. Teles R, Sakellari D, Teles F, Konstantinidis A, Kent R, Socransky S, et al. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J Periodontol*. 2010;81(1):89-98.
180. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol*. 2001;28(5):377-88.
181. Feldman RS, Bravacos JS, Rose CL. Association between smoking different tobacco products and periodontal disease indexes. *J Periodontol*. 1983;54(8):481-7.
182. Ryder MI. The influence of smoking on host responses in periodontal infections. *Periodontol 2000*. 2007;43:267-77.
183. Barbour SE, Nakashima K, Zhang JB, Tangada S, Hahn CL, Schenkein HA, et al. Tobacco and smoking: environmental factors that modify the host response (immune system) and have an impact on periodontal health. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 1997;8(4):437-60.
184. Luzzi LI, Greggi SL, Passanezi E, Sant'ana AC, Lauris JR, Cestari TM. Evaluation of clinical periodontal conditions in smokers and non-smokers. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2007;15(6):512-7.
185. Ah MK, Johnson GK, Kaldahl WB, Patil KD, Kalkwarf KL. The effect of smoking on the response to periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 1994;21(2):91-7.
186. Bergstrom J, Preber H. The influence of cigarette smoking on the development of experimental gingivitis. *J Periodontal Res*. 1986;21(6):668-76.
187. Bergstrom J. Oral hygiene compliance and gingivitis expression in cigarette smokers. *Scandinavian journal of dental research*. 1990;98(6):497-503.
188. Soder B. Neutrophil elastase activity, levels of prostaglandin E2, and matrix metalloproteinase-8 in refractory periodontitis sites in smokers and non-smokers. *Acta Odontol Scand*. 1999;57(2):77-82.
189. Gabriela AdCGC, Marcelo PdS, Natalia LCS, Ana LPdM, Jorge LMT. Levels of prostaglandin E2 (PGE2) in gingival crevicular fluid from smokers and non-smokers with gingivitis and chronic periodontal disease. *Journal of Dentistry and Oral Hygiene*. 2015;7(5):54-9.
190. Romero A, Caceres M, Arancibia R, Silva D, Couve E, Martinez C, et al. Cigarette smoke condensate inhibits collagen gel contraction and prostaglandin

- E2 production in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2015;50(3):371-9.
191. Kurtis B, Tuter G, Serdar M, Pinar S, Demirel I, Toyman U. Gingival crevicular fluid prostaglandin E(2) and thiobarbituric acid reactive substance levels in smokers and non-smokers with chronic periodontitis following phase I periodontal therapy and adjunctive use of flurbiprofen. *J Periodontol.* 2007;78(1):104-11.
192. Mantyla P, Stenman M, Kinane D, Salo T, Suomalainen K, Tikanoja S, et al. Monitoring periodontal disease status in smokers and nonsmokers using a gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8-specific chair-side test. *J Periodontal Res.* 2006;41(6):503-12.
193. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nature reviews Immunology.* 2016;16(10):626-38.
194. Oertelt-Prigione S. The influence of sex and gender on the immune response. *Autoimmunity reviews.* 2012;11(6-7):A479-85.
195. Shiau HJ, Reynolds MA. Sex differences in destructive periodontal disease: a systematic review. *J Periodontol.* 2010;81(10):1379-89.
196. Ferris GM. Alteration in female sex hormones: their effect on oral tissues and dental treatment. *Compendium (Newtown, Pa).* 1993;14(12):1558-64, 66; quiz 71.
197. Mombelli A, Lang NP, Burgin WB, Gusberti FA. Microbial changes associated with the development of puberty gingivitis. *J Periodontal Res.* 1990;25(6):331-8.
198. Tiainen L, Asikainen S, Saxen L. Puberty-associated gingivitis. *Community dentistry and oral epidemiology.* 1992;20(2):87-9.
199. Mascarenhas P, Gapski R, Al-Shammari K, Wang HL. Influence of sex hormones on the periodontium. *J Clin Periodontol.* 2003;30(8):671-81.
200. Lindhe J, Attsfrom R. Gingival exudation during the menstrual cycle. *J Periodontal Res.* 1967;2(3):194-8.
201. Raber-Durlacher JE, van Steenberghe TJ, Van der Velden U, de Graaff J, Abraham-Inpijn L. Experimental gingivitis during pregnancy and post-partum: clinical, endocrinological, and microbiological aspects. *J Clin Periodontol.* 1994;21(8):549-58.
202. Amar S, Chung KM. Influence of hormonal variation on the periodontium in women. *Periodontol 2000.* 1994;6:79-87.
203. Zachariassen RD. Oral manifestations of menopause. *Compendium (Newtown, Pa).* 1993;14(12):1584, 6-91; quiz 92.
204. Lopez-Marcos JF, Garcia-Valle S, Garcia-Iglesias AA. Periodontal aspects in menopausal women undergoing hormone replacement therapy. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal.* 2005;10(2):132-41.
205. Molloy EJ, O'Neill AJ, Grantham JJ, Sheridan-Pereira M, Fitzpatrick JM, Webb DW, et al. Sex-specific alterations in neutrophil apoptosis: the role of estradiol and progesterone. *Blood.* 2003;102(7):2653-9.
206. Graves DT, Liu R, Alikhani M, Al-Mashat H, Trackman PC. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis--impact on periodontal pathology. *J Dent Res.* 2006;85(1):15-21.