

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

**Interleukin 8 Konzentrationen in Sulkusfluid und Mundwasser bei Patienten mit  
marginaler Parodontitis, mit und ohne Raucherhistorie.**

Dissertation

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

vorgelegt von

Till Gisbert Hennessen

aus

Augsburg

2019

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München**

Berichterstatter	Prof. Dr. rer. nat. Franz-Xaver Reichl
Mitberichterstatter	Prof. Dr. Ernst Rainer Weissenbacher Prof. Dr. Johannes Randzio
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter	Dr. med. dent. Richard Heym
Dekan	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung	12.02.2019

# **IL-8 Konzentrationen in Sulkusfluid und Mundwasser bei Patienten mit marginaler Parodontitis, mit und ohne Raucherhistorie.**

Till Gisbert Hennesen

05.07.2018

Abbildung 0.1.: LMU



München

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt,  
dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe verfasst,  
andere als die in ihr angegebene Literatur nicht benutzt und dass ich alle ganz oder annähernd  
übernommenen Textstellen sowie verwendete Grafiken, Tabellen und Auswertungsprogramme  
kenntlich gemacht habe. Außerdem versichere ich, dass die vorgelegte elektronische mit der  
schriftlichen Version der Dissertation übereinstimmt und die Abhandlung in dieser oder ähn-  
licher Form noch nicht anderweitig als Promotionsleistung vorgelegt und bewertet wurde.

---

05.07.2018, Bad Wörishofen, Till Gisbert Hennessen



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung mit Literaturübersicht</b>	<b>9</b>
1.1. Vorwort . . . . .	9
1.2. Parodontitis . . . . .	9
1.2.1. Definition, Klassifikation, Epidemiologie . . . . .	9
1.2.2. Aufbau und Funktion des Parodont . . . . .	12
1.2.3. Pathogenese und deren Mechanismen . . . . .	14
1.2.4. Risiken . . . . .	17
1.3. Sulkusflüssigkeit . . . . .	17
1.4. Mundwasser . . . . .	18
1.5. Interleukin 8 . . . . .	19
1.6. Auswirkungen durch Nikotinabusus . . . . .	22
1.7. Fragestellung . . . . .	25
<b>2. Material und Methode</b>	<b>27</b>
2.1. Überblick . . . . .	27
2.2. Klinische Daten . . . . .	28
2.2.1. Übersicht - Klinische Daten . . . . .	28
2.2.2. Erhebung Anamnesedaten . . . . .	30
2.2.3. Erhebung zahnärztlicher Befund . . . . .	30
2.2.4. Erhebung Parodontalbefund . . . . .	31
2.2.5. Kontrolle der Befunde . . . . .	31
2.3. Studienkollektiv . . . . .	32
2.3.1. Minimale Kollektivgröße . . . . .	32
2.3.2. Gesamtes Studienkollektiv . . . . .	34
2.3.3. Gruppeneinteilung . . . . .	34
2.4. Parameterwahl - Interleukin 8 . . . . .	35
2.5. Probenentnahme - Überblick . . . . .	36
2.5.1. Mundwasserentnahme . . . . .	36
2.5.2. Sulkusflüssigkeitsentnahme . . . . .	36
2.6. Lagerung der Proben . . . . .	37
2.7. Methode zur Messung der Interleukin 8 Konzentrationen . . . . .	37
2.8. Messung der Interleukin 8 Konzentrationen . . . . .	38
2.9. Messung von Keimkonzentrationen . . . . .	38
2.10. Durchführung der Messungen der Keimkonzentrationen . . . . .	39
2.10.1. DNA-Isolation . . . . .	39
2.10.2. PCR zur Amplifizierung der bakteriellen DNA-Fragmente . . . . .	39
2.10.3. ELISA . . . . .	39
2.11. Pseudonymisierung und Verknüpfung der Daten . . . . .	40
2.12. Importierung der Konzentrationswerte . . . . .	40
2.13. Statistische Auswertung . . . . .	41

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>43</b>
3.1. Studienpopulation	43
3.2. Analyse und Behandlung von Extremfällen bei Interleukin-8-Werten	45
3.3. Klinische Daten	46
3.4. Interleukin 8 Konzentrationen	53
3.4.1. Sulkusflüssigkeit	53
3.4.2. Mundwasser	56
3.5. Multiples lineares Regressionsmodell - Interleukin-8 in Mundwasser und Sulkusflüssigkeit	60
3.5.1. Anamnesedaten	60
3.5.2. Parodontaldaten	60
3.5.3. Keimdaten	61
3.6. Post-Hoc-Power-Analyse	62
3.7. Zusammenfassung der Ergebnisse	62
<b>4. Diskussion</b>	<b>65</b>
4.1. Überblick	65
4.2. Diskussion der Methodik	65
4.2.1. Studienpopulation	65
4.2.2. Datenerfassung	66
4.2.3. Validität der Interleukin-8-Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie	67
4.2.4. Validität der Keimlast mittels ELISA	67
4.2.5. Proben- und Parameterwahl	67
4.3. Diskussion der Ergebnisse	69
4.3.1. Beziehungen zwischen Rauchgewohnheiten und der parodontal-klinischen Situation	69
4.3.2. Einfluss der parodontalen Erkrankung auf die Interleukin-8-Konzentrationen	71
4.3.3. Einfluss des Rauchverhaltens auf die Interleukin-8-Konzentrationen	71
4.3.4. Zusammenhang parodontalpathogener Keime (AA und PG) und der klinischen Befundsituation	73
4.3.5. Zusammenhang parodontalpathogener Keime (AA und PG) und den vorliegenden Interleukin-8-Konzentrationen	73
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>75</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>91</b>
<b>9. Lebenslauf</b>	<b>93</b>
<b>Anhang</b>	<b>95</b>
<b>A. Mess- und Ablaufprotokolle</b>	<b>97</b>
A.1. Messprotokoll - Interleukin-8-Konzentrationsbestimmung	97
A.2. Ablaufprotokoll - DNA-Isolation	98
A.3. Ablaufprotokoll - Amplifizierung bakterieller DNA-Fragmente	98

*Inhaltsverzeichnis*

A.4. Ablaufprotokoll - ELISA . . . . .	99
<b>B. Sonstige Grafiken</b>	<b>103</b>
<b>C. Sonstige Tabellen</b>	<b>105</b>
<b>D. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>109</b>
<b>E. Tabellenverzeichnis</b>	<b>113</b>



# 1. Einleitung mit Literaturübersicht

## 1.1. Vorwort

Die marginale Parodontitis stellt eine multifaktorielle und nicht vollständig verstandene Erkrankung dar [1]. Die Diagnose basiert in großen Teilen auf klinischen und radiologischen Parametern. Alle Befunde sind solitär betrachtet wenig aussagefähig, jedoch bilden sie zusammen ein detailliertes Bild der Erkrankung. Parodontale Destruktion, Aktivität und Prognose sind nur im Kompendium der erhobenen Befunde beurteilbar. So können einzelne Befunde beispielsweise Aufschluss über die Aktivität der Entzündung, andere wiederum für die bisher abgelaufene Destruktion des marginalen Parodonts geben.

Die Aktivität einer Parodontitis lässt sich mit der Messung von Zytokinen im Mundraum einschätzen und bewerten. Dies wird derzeit in Deutschland aber noch nicht großflächig angewandt. Ein entsprechender Test wäre wenig invasiv und kostengünstig durchzuführen (vgl. [2]) und könnte sich als praktikables Instrument in der parodontalen Diagnostik erweisen.

Raucher stellen eine besondere Herausforderung bei der parodontalen Diagnostik dar, da einige Parameter verzerrt oder teilweise sogar kontrovers ausfallen können. Tabakkonsum wird allgemein als Risikofaktor der marginalen Parodontitis angesehen (vgl. [3] [4]), jedoch sind die Pathomechanismen nicht vollständig verstanden. Der Konsum von Tabak durch Inhalation scheint einen starken Effekt auf die Pathogenese der Erkrankung zu haben.

Die vorliegende Untersuchung hat zum Ziel einen möglichen Einfluss des Rauchverhaltens parodontal-erkrankter Patienten auf die Interleukin 8 (IL-8)-Konzentrationen im Mundwasser und der Sulcusflüssigkeit aufzuzeigen. Die Ergebnisse werden Aufschluss über eine mögliche chemotaktische Modulation durch Zigarettenrauch im parodontalen Ligament geben.

## 1.2. Parodontitis

### 1.2.1. Definition, Klassifikation, Epidemiologie

Die Parodontitis, ein komplexes Krankheitsbild, ist definiert als eine entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates, hervorgerufen durch einzelne oder Gruppen spezifischer Mikroorganismen. Im späten 18. Jahrhundert, als die Keimtheorie von Pasteur und Semmelweis ihren Höhepunkt hatte, versuchte man klassische, pathogene Mikroorganismen für die parodontale Erkrankung verantwortlich zu machen [1], konnte aber keinen speziellen Erreger identifizieren. Es rückte die

## 1. Einleitung mit Literaturübersicht

“unspezifische Plaquehypothese“ in den Fokus, die die Quantität und nicht die individuellen spezifischen Erregerspezies in Betracht zog[1]. Mit der Untersuchung der Sulkusflüssigkeit und der Plaque im gesunden wie im erkrankten Individuum konnten Erkenntnisse über die Komposition der Bakterienflora gewonnen werden. In jüngerer Literatur geht man davon aus, dass die marginale Parodontitis, ähnlich wie bei anderen polymikrobiellen Erkrankungen (Darm, Vagina, etc.) Folge einer Dysbakterie ist. Hierbei weicht die Zusammensetzung der Bakterienflora von der Norm ab. Die benefizialen Keime verringern sich, während die pathogenen Keime überhand nehmen (“microbial-shift disease“)[1].

Die orale Mikroflora hängt stärker von lokalen Faktoren, als von genetischen Faktoren ab, was Untersuchungen mit eineiigen Zwillingen gezeigt haben [5]. Die klinische Manifestation der parodontalen Erkrankung ist oft durch eine Überexpression proinflammatorischer Zytokine und Entzündungsmediatoren im Bereich des Parodonts begründet [6]. Osteolytische Mediatoren wie Interleukin 1 (IL-1), IL-8, Receptor-activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL), Matrixmetalloproteinase (MMP)-2, MMP-8 und MMP-9 sind gerade bei zusätzlicher Raucherhistorie involviert [6][7].

Das Voranschreiten der Erkrankung wirkt sich destruktiv auf das parodontale Ligament und den Alveolarknochen aus und hat klinisch erhöhte Sondierungstiefen und/oder Rezessionen zur Folge [8]. Sie ist weltweit der häufigste Grund für Zahnverlust[1]. Parodontale Erkrankungen sind höchst verbreitet und betreffen je nach Definition bis zu 82% der Weltbevölkerung [9]. Die Verteilung variiert weltweit, wie viele Studien zeigen. Albandar, Brunelle und Kingman zeigen auf, dass 35% der 30 bis 90 Jahre alten, bezahnten Amerikaner zwischen 1988 und 1994 parodontal erkrankt waren. Einige Patientengruppen waren schwerer betroffen als andere. Hierzu zählten Männer, Amerikaner mit mexikanischem Ursprung und Menschen mit dunkler Hautfarbe [10]. Eine aktuellere Studie mit Daten aus den Jahren 2009 und 2010 zeigte, dass in den Vereinigten Staaten über 47% der über 30-jährigen parodontal erkrankt waren [11]. In der Provinz Schonen (Schweden) wurden Patienten im Alter von 20 bis 89 Jahren untersucht, wovon 11% parodontal erkrankt waren [12]. Dolan et al. fanden 1997 in ihrem untersuchten Patientekollektiv bei 92% mindestens eine Tasche von 4mm und bei 35% eine Tasche von 7mm [13]. Die 4. Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV) zeigt ebenfalls ein erhebliches parodontal-erkranktes Patientekollektiv. Die Gruppe der Erwachsenen (35-44 Jahre) zeigt eine mittelschwere Erkrankung von 52,7% und sogar 20% mit einer schweren Form (Community Periodontal Index, Grad 4). Bei den Senioren (65-74 Jahre) leidet jeder 3. an einer schweren Parodontalerkrankung. Uneinheitliches Design und diverse Messkriterien führen zu nur bedingt vergleichbaren Ergebnissen.

Im Jahr 1999 entwickelte ein Internationaler Arbeitskreis eine neue Einteilung verschiedener Formen der Parodontalerkrankungen. Diese Einteilung [14] wurde von der „American Academy of Periodontology“ (AAP) akzeptiert. Einteilung ohne Unterkategorien:

### **Einteilung (ohne Unterkategorien):**

1. Gingivale Erkrankungen
2. Chronische Parodontitis

3. Aggressive Parodontitis
4. Parodontitis als Manifestation der Systemerkrankung
5. Nekrotisierende Parodontalerkrankung
6. Parodontalabszesse
7. Parodontitis im Zusammenhang mit endodontalen Läsionen
8. Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformationen und Zustände

Weiter wird zwischen apikaler und marginaler, lokalisierter und generalisierter und der milden, moderaten und schweren Parodontitis unterschieden [8, S. 162 ff].

Genetische Risikofaktoren haben ebenfalls Einfluss, können aber nicht allein die Varianz der verschiedenen Formen wie der aggressiven oder chronischen Parodontopathien erklären. Studien zeigen signifikante Zusammenhänge zwischen bestimmten genetischen Faktoren und demographischen Eigenschaften, darunter eine mögliche modifizierende Wirkung des Rauchens und eine Varianz des Genotyps in unterschiedlichen ethnischen Gruppen [15].

Tabakkonsum scheint Auswirkungen auf die Vaskularisierung, das humorale und zelluläre Immunsystem, die Zytokinproduktion und deren Funktion und das Netzwerk aus Adhäsionsmolekülen im parodontalen Gewebe zu haben [3].

Klinisch werden quantitative Angaben zum Tabakkonsum eines Individuums gerne in packyears (PY) (siehe Formel 2.1) angegeben. Eine Querschnittsstudie von Grossi et al. 1995 untersuchte 1361 Personen im Alter zwischen 25-74 Jahren auf ihren interproximalen Knochenverlust und dazu mögliche erklärende Variablen wie Alter, Geschlecht, Vorerkrankungen, die Anwesenheit ausgewählter subgingivaler Bakterienarten und deren Rauchgewohnheiten [16]. Sie gaben erhöhte Wahrscheinlichkeiten für schweren Knochenverlust bei leichten Rauchern (5,2-15 PY) von 3,25 (Odd ratio) und schweren Rauchern (> 30 PY) von 7,28 (Odd ratio) an [16]. Eine weitere Querschnittsstudie von Bergström et al. 1991 untersuchte erwachsene Oralhygienikerinnen, von denen 30% Raucherinnen, 32% ehemalige Raucherinnen und 38% Nichtraucherinnen waren. Es konnte ein signifikanter Knochenverlust mithilfe von Bissflügelaufnahmen bei Raucherinnen im Vergleich zu Nichtraucherinnen und eine positive Korrelation von Knochenverlust ( $P < 0,001$ ) zum Zigarettenkonsum (<100 Zigaretten/Jahr : >200 Zigaretten / Jahr) beobachtet werden, wobei dieser Knochenverlust plaqueunabhängig war und deshalb allein auf den Tabakkonsum zurückgeführt wurde [4]. Norderyd und Hugoson postulierten 1998 nach der Auswertung von 540 Schweden zwischen 20-70 Jahren, dass Rauchen, ein fortgeschrittenes Alter und erhöhte Plaqueindices potentielle Risikofaktoren für eine schwere Parodontitis darstellen [17][3]. Eine schwedische, longitudinale Studie über 10 Jahre zeigte das Rauchen als signifikanten Prädiktor für zukünftigen Knochenverlust an [18][3]. Ehemalige Raucher zeigen in Bezug auf eine parodontale Erkrankung eine geringere Prävalenz als Raucher sind aber ebenfalls erhöht gefährdet [3].

## 1.2.2. Aufbau und Funktion des Parodont

### Aufbau

Das Parodont besteht aus Gingiva, Desmodont, Wurzelzement und der Lamina cribriformis des Alveolarknochens. Die keratinisierte Gingiva geht über in den Sulkus und heftet sich dann als nicht-keratinisiertes Epithel, das sogenannte Saumepithel an der Schmelzoberfläche an und zieht nach apikal bis zur Schmelzzementgrenze des Zahnes, dabei verkleinert es sich konisch von ca. 30 auf 1-3 Zellschichten [2]. Das Saumepithel entsteht entwicklungsgeschichtlich bei Durchbruch des Zahnes aus verschmolzenen Enameloblasten und reduziertem Schmelzepithel und ist im gesunden Zustand ungefähr 2mm hoch. Listgardien zeigte eine vollständige Erneuerung nach Gingivektomie innerhalb von 20 Tagen [2]. Das Saumepithel kann folglich als hochdynamisches, adaptives, erneuerungsfähiges Gewebe angesehen werden. Dem gingivalen Bindegewebe liegt die externe Basalmembran unverzahnt an. Auf der externen Basalmembran liegt das teilungsfähige Stratum basale und darauf das Stratum suprabasale, welches von der inneren Basalmembran zur mineralisierten Zahnoberfläche abgegrenzt ist. Das Saumepithel stellt eine mehrschichtige, durchlässige, nicht-keratinisierte Gewebeschicht dar, die im Gegensatz zu vielen anderen Epithelien keine physikalische Barriere darstellt [2] [19] und dennoch einen engen Verbund zur mineralisierten Zahnoberfläche ausformt. Dieser Verbund wird als epitheliales Attachment bezeichnet. Die der Zahnoberfläche anliegenden Zellen des Saumepithels (sogenannte DAT-Zellen) sind mit den angrenzenden Zellen des Saumepithels über Hemidesmosomen verbunden. Die DAT-Zellen migrieren sulkuswärts und sorgen dadurch für ein stetiges, dynamisches Remodelling des gingivodentalen Attachments [2]. Experimentell konnte an Marmosetten (Primaten) ein ununterscheidbares Attachment bereits fünf Tage nach kompletter Abtragung beobachtet werden [2]. Nach Bosshardt und Lang spricht die Zytokinproduktion des Saumepithels und der Makrophagen, im koronalen Teil des gingivalen Sulkus, für eine aktive Rolle im Abwehrmechanismus gegen die bakterielle Herausforderung [2]. Das Saumepithel repräsentiert einen Schlüsselbaustein in der Wirtsabwehr, weil es nicht nur passiv einen Abschluss zur Zahn- und Taschenoberfläche bildet, sondern aktiv mit seinen zahlreichen Mechanismen und seiner speziellen Struktur beteiligt ist. Völlig gesundes Zahnfleisch ohne jegliches Abwehrzeichen (nur experimentell erreichbar) zeigt keinen Sulkus, kein Sulkus- beziehungsweise Gingivafluid [20], keinerlei Entzündungszeichen und glattes am Schmelz haftendes Saumepithel auf [21]. Klinisch gesundes Zahnfleisch dagegen zeigt milde Entzündungszeichen. Ein gingivaler Sulkus von 0,2mm bis 0,7mm Tiefe [22] und Saumepithel mit geweiteten interzellulären Spalten, die eine erhöhte Konzentration von neutrophilen Granulozyten und kleine Herde von Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen haben, zählen ebenfalls zu einem klinisch gesunden Parodont [21]. Die auf niedrigem Niveau aktivierte angeborene Immunabwehr erschwert die Kolonisierung parodontalpathogener Keime im gesunden Saumepithel [5].

Es wurden von Brex et al. Lymphozyten (18,4%), polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNs)(20,6%), Plasmazellen (0,1%), Makrophagen (1,5%), Fibroblasten (57,7%) und andere Zellen gefunden, die die erste Abwehrlinie gegen eine frühe bakterielle Besiedelung und/oder

Traumata darstellen [23]. Aufgrund der fehlenden physikalischen Barriere wird das Saumepithel den Angriffen der Bakterien und deren Produkten stetig ausgesetzt [2]. Die externe Basallamina kommt einer physikalischen Barriere eher nahe; sie kompartimentiert, filtert und erfüllt Aufgaben wie Adhäsion und Migration. Verglichen mit anderen Epithelien sind die Zellen des Saumepithels nur spärlich mit Desmosomen und Gap junctions verbunden [21][19]. So erklärt sich histologisch eher ein funktionelles Kompartiment und weniger eine physikalische Barriere, welches sich topographisch um den Zahn legt und wohl einer eigenen Aufgabe nachgeht.

Das terminale Blutgefäßsystem formt zwei unterschiedliche Netzwerke in der Lamina propria aus. Weniger mit der parodontalen Abwehr belegt ist das Gefäßnetz, das sich unterhalb des oralen Gingivaepithels bis hin zum Zahnfleischsaum ausbreitet und in ihrer papillären Schicht pro Papille je eine arterio-venöse Schleife ausbildet. Das zweite Netzwerk ist lateral des eher glatten Saumepithels, kragenförmig lokalisiert. Es bildet im gesunden Parodont einen dünnen, anastomosierenden Plexus, der hauptsächlich aus postkapillären Venolen besteht und vom koronalen bis apikalen Ende des Saumepithels reicht [21]. Dieses Netzwerk, der gingivale Plexus, ist beteiligt an der Abwehrleistung des Parodonts und bildet aufgrund spezifischer Entzündungsmediatoren hochendotheliale Venolen aus, die die Lymphozytenauswanderung ermöglichen (siehe auch Kapitel 1.2.3).

Das Saumepithel ist ein offenes System und zeigt eine bemerkenswerte Permeabilität [2]. Zum einen können Zellen und andere Substanzen gingivaler Bindegewebe in den Sulkus wandern (Abwehr- und Spülfunktion), zum anderen können Bakterien und ihre Produkte in entgegengesetzter Richtung ins Saumepithel vordringen [2]. Die interne Basallamina stellt sich in Struktur und Zusammensetzung weniger wie eine typische Basallamina dar, vor allem in Bezug auf ihre physikalischen Eigenschaften, und kann auch nicht als solche betrachtet werden [2]. Eine weitere außergewöhnliche Eigenschaft ist der hohe zelluläre Umsatz [21][24, S.610]. Die hohe Erneuerungsrate und die damit verbundene Abschilferung wird durch die relativ geringe Zahl an Desmosomen und Gap Junctions noch begünstigt [19][21] und beeinflusst die Zusammensetzung der Sulkusflüssigkeit. Die interzellulären Räume nehmen zwischen 1-2 Vol.-% im entzündungsfreien und bis 30 Vol.-% und höher im entzündlich aktivierten Gewebe in Anspruch und werden von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten besetzt [25].

### **Funktion**

Die Zellen des Saumepithels dürften eine sehr viel größere Rolle im kongenitalen Abwehrmechanismus spielen, als anfänglich gedacht. Sie haben eine hohe Proliferationsrate [24, S.610] und sezernieren eine Vielzahl von Molekülen, die direkt in den Abwehrmechanismus gegen Bakterien und deren Metaboliten eingreifen. Zusätzlich exprimieren sie Moleküle, die zur Migration polymorphkerniger Leukozyten in Richtung Sulkus führen [2]. Schiött und Löe haben berechnet, dass annähernd 30000 PMNs pro Minute durch das Saumepithel aller Zähne migrieren. Das nicht keratinisierte Saumepithel schützt nur unzulänglich gegen traumatische Einflüsse. Assistierende Leukozyten, die sich in den interzellulären Räumen sammeln und der hohe Zellumsatz

## 1. Einleitung mit Literaturübersicht

bilden eine effektive Barriere gegen bakterielle Penetration [21]. Speichelsekretion bietet weiteren Schutz vor bakterieller Besiedelung durch physikalische Reinigung und antimikrobiell wirksamer Substanzen [21]. Die Lamina propria mit ihrem Faserapparat und zellulären Bestandteilen stellt die hauptsächliche Verankerung zwischen Zahn und Gingiva dar. Ebenfalls birgt sie zelluläre Mechanismen die gegen eine bakterielle Invasion wirken und andere die der Geweberegeneration Rechnung tragen [21]. Die oberflächlichen oralen Epithelzellen und damit ersten Zellen, die mit Noxen diverser Art in Kontakt kommen, bilden nicht nur eine physikalische Barriere sondern antworten aktiv auf bakteriogenen Kontakt mit der Synthese proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin (IL)-1, IL-8 und Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) [26].

### 1.2.3. Pathogenese und deren Mechanismen

Das angeborene Immunsystem ist selbst im klinisch gesunden Parodont hoch aktiv und kann durch ein auftretendes Ungleichgewicht oder eine Unterbrechung der Expression wichtiger Entzündungsmediatoren zur Zerstörung des Zahnhalteapparates beitragen [1]. Bei allen Formen der Parodontalerkrankungen spielen vier Faktoren eine bedeutende Rolle [5]:

1. subgingivale Plaque mit parodontalpathogenen Keimen
2. Abwesenheit oder Unterdrückung kommensaler Keime
3. Einschränkung der Wirtsabwehr (vererbt oder erworben)
4. geeignetes Mikromilieu

Die subgingivale Plaque mit parodontalpathogenen Keimen beeinflusst das Saum- und Taschenepithel maßgebend. Die stetige Zellwanderneuerung der Bakterien innerhalb des Biofilms gibt in Membranvesikel verpackte Lipopolysaccharide (LPS), sogenannte PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) ab [27]. Diese penetrieren durch das Saum- oder Taschenepithel und aktivieren Makrophagen, polymorphkernige neutrophile Monozyten, Epithel-, Bindegewebs- und Endothelzellen. Die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, gewebeabbauender Enzyme (Kollagenasen, Gelatinasen, etc.), Entzündungsmediatoren wie zum Beispiel Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und eine Schädigung der Immunabwehr beispielsweise durch Störung des chemotaktischen Gradienten, Bildung von Leukotoxinen oder Unterdrückung der Lymphozytenfunktion sind mögliche Auswirkungen [5]. Insbesondere *Porphyromonas gingivalis* (PG), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AA), *Tannerella forsythensis* (TF) und *Treponema denticola* (TD) sind anerkannte parodontalpathogene Keime. Es zeigte sich die Möglichkeit der Behandlung einer multimikrobiellen Erkrankung, wie der Parodontitis, mit gezieltem Einsatz gegen einzelne Keime (PG), wodurch diesen eine Schlüsselstellung zuerkannt wurde [1]. Im gesunden Gleichgewicht der oralen Keimflora überwiegen die grampositiven Keime [1][5]. Kommt es zu einer Verschiebung dieser, ändert sich auch ihr grampositives/gramnegatives Profil. Die Verschiebung der mikrobiellen Komposition in der dentalen Plaque stellt einen guten Prädiktor dar und ist mit dem klinischen Zustand des

Parodonts assoziiert [1]. Obwohl Bakterien den initialen/treibenden Auslöser des pathologischen Umschwungs darstellen, scheint es, dass endogene Signalwege, die in einer Gewebedegradation münden, für die Schäden im Hart- und Weichgewebe verantwortlich sind [28]. Die oben genannten, anerkannten parodontalpathogenen Keime sind über ihre Zellwand mit einer LPS-Schicht überzogen (gramnegativ), welche sie kontinuierlich erneuern und partiell abschilfern. Die in den Sulkus gelangten LPS werden gebunden (Ausnahme: Lipopolysaccharid von *Porphyromonas gingivalis* (PG-LPS)) und anschließend von bestimmten Zellen (Makrophagen, PMNs, Endothelzellen) erkannt. Darauf startet die Signalübertragung in der Zelle und löst die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren aus, die die entsprechende Zytokin- und Chemokinbildung (z.B.: IL-8) triggern [5]. Die gebildeten Zytokine aktivieren über diverse Wege die Endothelzellen und sorgen so für eine reaktive PMNs-Migration. PMNs sind Zellen der initialen Entzündungsreaktion und führen signifikant zur Reduktion mikrobieller Invasion und Penetration durch Phagozytose [29]. Die IL-8-Inhibition in Epithelzellen und die Toll-like-Rezeptor (TLR)-4-Antagonisierung sind beispielhafte Mechanismen, die die Verschiebung der Homöostase durch bakterielle Einflüsse (z.B.: PG) aufzeigen [1]. Dadurch werden entscheidende Abwehrmechanismen außer Kraft gesetzt und der Weg für andere, primär nicht-pathogene Keime geebnet [1]. Ein bakteriell induziertes Ungleichgewicht in der Homöostase stellt einen Hauptfaktor bei der Entwicklung einer parodontalen Erkrankung dar [1]. Bei fortschreitender Entzündung wächst der gingivale Gefäßplexus im Bereich des Saumepithels in Zahl und Größe an und die aktivierten [5], postkapillären Venolen zeigen sich histologisch wie hochendotheliale Venolen in parakortikalen Regionen der Lymphknoten, die die Lymphozytenauswanderung erleichtern [21][30]. Die hochendothelialen Venolen im Plexus gingivalis exprimieren zahlreiche Oberflächenproteine, die verschiedene immunologische Funktionen zeigen können und ein topographisches Muster aufweisen; beispielsweise steigt im Saumepithel von apikal nach koronal und von basal nach superfizial der Gradient an [31]. Es kommt zur hydrodynamischen Margination und Adhäsion (Tethering [32]) der PMNs an die Endothelwand [33]. Die Bindungsaktivität der Leukozytenmembran wird durch die Wirkung von Chemokinen wie IL-8 erhöht [34]. Es folgt die Diapedese der Granulozyten durch die Endothelwand. Die Leukozytenmembran bildet einen Pol an der Stelle, die mit den meisten Chemokinen besetzt ist. In Richtung dieses Pols bewegt sich dann die Zelle mithilfe ihres Actinomyosinapparats [32]. Schröder zeigte eine prädominante PMN-Konzentration. Es konnten signifikant höhere IL-8 und IL-6 Konzentrationen im sulkulären Bindegewebe (Fibroblasten) beim parodontal erkrankten Patienten im Vergleich zum Gesunden gemessen werden [28]. Zu den sehr wirksamen Chemokinen zählen das bakterielle Chemotaxin Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) [32] und die endogenen Chemokine IL-8, Leukotrien B4 und Komplementfaktor C5a [31]. Aus teleologischer Sicht kann die Granulozytenmigration erwartet werden, da die angelockten Abwehrzellen hoch effektiv Mikroorganismen abtöten und beseitigen können [35].

Die Umformung vom Saumepithel zum Taschenepithel stellt eine entscheidende Stufe im Fortschritt der Erkrankung, speziell zwischen der Gingivitis und Parodontitis dar [2]. Eine akute Gin-

## 1. Einleitung mit Literaturübersicht

ginitis sollte noch nicht als anfängliche Parodontitis betrachtet werden [2]. Normalerweise ist das periphere Immunsystem in der Lage ein Fortschreiten der sich entwickelnden Läsion in Richtung Gewebedegeneration zu verhindern [2]. Erst wenn die Zellkontinuität beziehungsweise die Adhäsion der direkt dem Zahn anliegenden Zellen an der Zahnhartsubstanz unterbrochen ist, setzt eine Degeneration ein. Unterschiedliche Degenerationsprozesse wurden beschrieben [2][36][37]. Beispielsweise zeigte dies die Arginin-spezifische Cysteinproteinasen, die die Adhäsionsmoleküle, wie Fibronectin zwischen den Fibroblasten selbst und auch zur extrazellulären Matrix hin zerstört [38]. Sie ist außerdem in der Lage Kollagen Typ I und IV, Laminin, Immunglobulin G und A, Interferon- $\gamma$ , IL-8, TNF $\alpha$  und den Komplementfaktor C5a zu schädigen [38] und so die beschriebene Degradation auszulösen.

Eine moderate, konstante Transmigration neutrophiler Granulozyten durch das Saumepithel (<30%) resultiert noch nicht in Degradation des Gewebes. Es bleibt intakt [21]. Ein Grund dafür könnte die dosisabhängige Beeinflussung der PMNs sein. Die zur Enzymausschüttung notwendige halbmaximale IL-8-Konzentration ist deutlich höher als die der Chemotaxis und ist im Vergleich zu den Zytokinen C5a und fMLP weniger potent einen "oxidativen Burst" auszulösen [35] (siehe auch Abb.: 1.2). Homöostatische Veränderungen in der IL-8-Konzentration im Gewebe haben Einfluss auf die protektive Abwehrleistung des Immunsystems. Je nach Dosis verändert sich die Reaktion der Effektorzelle. Geringe Dosen modulieren die Motilität der PMNs, zum Beispiel durch eine erhöhte Bindungsfähigkeit an Integrinen; hohe Dosen führen eher zur Degranulation abakterieller Enzyme[32][33] und dadurch zur Gewebedegeneration.

Bemerkenswert ist auch, dass der entzündliche Prozess nicht einfach abklingt, indem der entzündliche Stimulus wegfällt und die Mediatoren unter ihre effektive Konzentrationsgrenze fallen. Eher ist es ein aktiver Prozess, der durch anti-inflammatorische und entzündungsauflösende Mediatoren (RvE1, BLT1) die PMN-Infiltration behindern, deren Apoptose einleiten und die Zytokinsekretion abschwächen [1]. Ergebnisse mit ähnlichen Tendenzen konnte Van Dyke im Jahre 2007 erzielen. Er schreibt, dass spät im entzündlichen Prozess aus Arachidonsäure stammende Lipid-Moleküle (transzelluläre Biosynthese), sog. Lipoxine, auftauchen. Diese Lipoxine werden ebenfalls für die aktive Auflösung der Entzündung verantwortlich gemacht [39]. Beispielsweise bildet Lipoxin A<sub>4</sub> (LA<sub>4</sub>) an einen spezifischen Rezeptor auf PMNs und inhibiert die Chemotaxis, die Bildung von Superoxiden und die Sekretion von proinflammatorischen und proteolytischen Molekülen, einschließlich PGE<sub>2</sub>, woraufhin die PMNs ihre Apoptose einleiten [39]. Zwar zeigt LA<sub>4</sub> chemotaktische Effekte zu mononuklearen Phagozyten, beeinflusst diese aber nur in ihren nicht-phlogistischen Funktionen [39]. Sie phagozitieren zwar apoptotische PMNs, schütten aber keine proinflammatorischen Zytokine und Interleukine [40] aus [39]. Van Dykes Untersuchungen mit PG an Hasen bestärken die Theorie, dass pathogene Keime wie PG aufgrund der tiefen Taschenbildung und nicht die Tasche aufgrund des pathogenen Keimes besteht [39]. PG verschwand im Biofilm bei den mit E1 (Lipoxin/Resolvin) monotherapierten Taschen, die ansässige Mikroflora kam wieder ins Gleichgewicht und zu normaler Mischung und Anzahl zurück [39]. Vermutlich finden die Gingipaine der PGs keine verwertbaren Peptide mehr, um für den Keim essentielle

Aminosäuren spalten zu können [39]. Diese Ergebnisse stärken die Theorie, dass erst die parodontale Tasche und danach die Besiedelung mit parodontalpathogenen Keimen stattfindet.

#### 1.2.4. Risiken

Das sich ein entzündlicher Prozess im Sinne einer Gingivitis unangemessen entwickelt und sich nicht selbst auflöst hängt mit multiplen Risikofaktoren zusammen. Genetische oder erworbene Risikofaktoren (z.B.: unkontrollierter Diabetes mellitus) sowie modifizierbare Risikofaktoren (z.B.: Rauchverhalten) können den entzündlichen Prozess beeinflussen. Einer der wichtigsten Risikofaktoren stellt das Rauchen dar[41][42] [43]. Die Aufgabe des Rauchens zählt zu den wichtigsten präventiven Maßnahmen gegen die Parodontitis [44][45]. PMNs, die nicht geregelt per Apoptose, sondern durch Noxen (Tabakrauch) nekrotisierend zu Grunde gehen, verlieren ihre intrazellulären Komponenten, wie zum Beispiel Proteasen und reaktive Sauerstoffspezies, unkontrolliert an ihre Umgebung. Dies wurde bei COPD-Erkrankten im Sputum nachgewiesen [46][29]. Bevor es zur Nekrose der PMNs kommt, können weitere negative Aspekte durch Zigarettenrauch beobachtet werden. Zappacosta et al. zeigten eine stark inhibierte Chemolumineszenz, Glykolyseaktivität und Phagozytosefähigkeit bei mit wasserlöslichen Rauchextrakten inkubierten PMNs auf. Sie schlossen auf eine durch Zigarettenrauch induzierte Effektivitätsschwächung PMNs gegen Bakterien und einen ungünstigen Einfluss auf umliegendes Gewebe[47]. Güntsch et al. konnten einen signifikanten, dosisabhängigen Zusammenhang zwischen dem Rauchverhalten der Patienten und der Phagozytoseleistung von PMNs beweisen [48]. Natürliche Killerzellen sind bei Rauchern in ihrer Anzahl vermindert und zeigen verminderte zytotoxische und zytokinproduzierende Aktivität [29][49]. Ebenfalls kann allgemein von einem immunsuppressiven Effekt auf Antigen präsentierende Zellen ausgegangen werden [29].

Zusammenfassend kann nur festgestellt werden, dass sich die parodontalpathogenen Mechanismen höchst komplex darstellen und durch eine Vielzahl an isolierter Untersuchungen Stück für Stück ein noch unvollständiges Bild der Pathogenese der Parodontitis geschaffen wurde.

### 1.3. Sulkusflüssigkeit

Nach Bosshardt und Lang [2] entstammt die Sulkusflüssigkeit (Gingivafluid) aus den subepithelialen Blutgefäßen der Lamina propria. Sie spült den Sulkus, transportiert hauptsächlich PMNs, die ebenfalls aus den subepithelialen Blutgefäßen (siehe 1.2.2) stammen und ist ein Teil des Abwehrmechanismus. Die Sulkusflüssigkeit in erkrankten Taschen enthält Enzyme, Komplementfaktoren, Serumproteine, Bakterien, Entzündungszellen und inflammatorische Mediatoren, wie beispielsweise IL-8 und IL-1 $\beta$  [20][50]. Schon 1960 wurde ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Entzündungsmediatoren und klinisch befundeter Gingivitis bewiesen [50]. Die Flußrate [2][51][52] und die Konzentration der PMNs [53] korreliert mit dem Grad der Entzündung. Die Flußrate kann an erkrankten Stellen bis zu 30fach erhöht sein [52]. In experimentell

## 1. Einleitung mit Literaturübersicht

entzündungsfreier Gingiva ist keine Sulkusflüssigkeitsexsudation nachweisbar [20], denn diese benötigt eine durch Traumata oder Entzündungsinitiatoren bedingt erhöhte vaskuläre Permeabilität. Mononukleäre Zellen machen nur 5% aller Leukozyten in der Sulkusflüssigkeit aus. Bei normalem sowie krankhaft verändertem Zustand der Gingiva liegt die Verteilung der PMNs bei 95% aller Leukozyten im Sulkus [21]. Schroeder und Listgarden zeigen, dass die Neutrophilentransmigration und die Exsudation der Sulkusflüssigkeit separate, nicht von einander abhängige Phänomene sind, diese aber miteinander einhergehen [51]. Sie schließen daraus auf eine aktive Migration der neutrophilen Granulozyten.

Aufgrund einer nikotininduzierten Vasokonstriktion in peripheren Blutgefäßen [54] zeigen Raucher eine verminderte Flussrate der Sulkusflüssigkeit [55][56] im Vergleich zu Nichtrauchern. Es scheint als würden die aktiven Inhaltsstoffe (z.B.: Nikotin) mit dem Speichel in der Mundhöhle verteilt werden und so der gleiche Effekt auch auf die nicht direkt dem Rauch ausgesetzten Flächen (z.B.: bukkal im Oberkiefer) eintreten [3] [55]. Die Sulkusflussrate fällt im allgemeinen am entzündeten Parodont höher aus als bei nicht entzündeten Parodontien [52]. Parodontal erkrankte Stellen bei Rauchern zeigen zwar ebenfalls erhöhte Sulkusflussraten, im Vergleich zu Gesunden, jedoch sind sie im Vergleich zu erkrankten Flächen bei Nichtrauchern deutlich vermindert [52]. Die Sulkusflüssigkeit bei erkrankten Sulki unter Raucheinfluss zeigt, trotz vermindertem Volumen, erhöhte Konzentrationen entzündungsassoziierter Mediatoren (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12) [52]. Raucher zeigen ebenfalls geringere Gingivablutungsindizes [57] und geringere Zeichen einer Gingivitis [58] als Nichtraucher. Diese Beobachtungen sprechen für eine verminderte Durchblutung. Die daraus resultierende erniedrigte Flussrate hat mehrere wichtige Auswirkungen: eine verringerte Anzahl aus dem Blut stammender Antikörper und andere zur Abwehrleistung beitragenden Moleküle, eine geringere Spülleistung des Sulkus und die damit verbundene Entfernung von Bakterien und bakteriellen Produkten, aber auch eine geringere Anlieferung bakterieller Nährstoffe [3].

Als Diagnostikum scheint die Sulkusflüssigkeit hervorragend geeignet zu sein. Die Gewinnung der Sulkusflüssigkeit ist durch eine sehr geringe Invasivität gekennzeichnet (siehe 2.5.2). Außerdem können in der Sulkusflüssigkeit inflammatorisch modulierende Zytokine und Chemokine nachgewiesen und quantitativ gemessen werden.

### 1.4. Mundwasser

Mundwasserproben dienen bereits einigen biochemischen Schnelltests und laborchemischen Untersuchungen als Grundlage zur Parodontaldiagnostik. Eine allgemeine Aktivität bestimmter Enzyme oder der Hinweis auf veränderte Mediatorkonzentrationen stehen im Vordergrund. Mundwasserproben sind leicht zu gewinnen und stellen ein weiteres Instrument zur Diagnosesicherung und Prognoseeinschätzung dar. Die gewonnenen Proben sollen eine Übersichtsuntersuchung aller Zahnfleischtaschen und Zahnoberflächen im Patientenmund darstellen. Eine Gesamtkonzentration des gesuchten Stoffes wird durch Summation der durchmischten Sulkusflüssigkeiten gewon-

nen und ausgewertet.

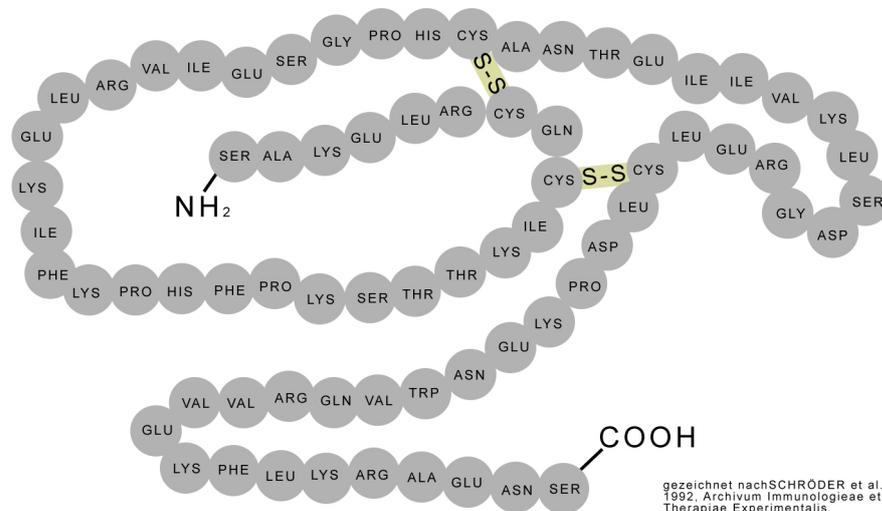
## 1.5. Interleukin 8

Chemokine sind Polypeptide mit zwei Cysteinresten. Das Wort Chemokin ist eine Komposition: "chemotaktisches Zytokin" [59]. In der Literatur gibt es keine einheitliche Nomenklatur der Chemokine. Beispielsweise wird IL-8 von einigen Autoren als NAP (neutrophil-activating peptide) [33] oder MONAP (monocyte-derived neutrophil-activating peptide) [60] bezeichnet. Diverse weitere Abkürzungen kommen vor (LYNAP, NAF, GLP, NAP-1, MDNCF) [35]. Der Chemokinrezeptor ist G-proteingekoppelt in der Plasmamembran mit sieben  $\alpha$ -Helix-Domänen eingelagert. Biochemisch kommt es bei Bindung mit einem passenden Chemokin zu einer Konformitätsveränderung des transmembranösen Rezeptors und zum Austausch des gebundenen GDP mit GTP am G-Protein. Das so aktivierte G-Protein löst sich vom Rezeptor, spaltet seine  $\alpha$ -Untereinheit ab und aktiviert die Phospholipase C (PLC). Über Inositol-Triphosphat, DAG und Calciumkanäle werden die zahlreichen Reaktionen eingeleitet. Die molekulare Struktur der IL-8-Familie ist gekennzeichnet durch 4 Cysteine in identischer Relation mit ausgebildeten Disulfidbrücken [35] (siehe Bild 1.1. IL-8 zeigt eine gute Resistenz gegenüber bakterieller Proteolyseangriffe und ist dadurch auch in infizierten Arealen gut wirksam [31]. Die langanhaltende Wirkung erklärt sich durch die bemerkenswerte Resistenz gegen Inaktivierung durch Plasmapeptidasen und die geringe Degradationsrate durch Proteasen [61]. Alle IL-8 vermittelten Reaktionen können durch das Bordetella pertussis Toxin inhibiert werden [33]. IL-8 ist nicht speziesspezifisch und kann dadurch in vitro an verschiedenen Labortieren gut untersucht werden [33]. Endothelzellen, Fibroblasten und Hepatozyten exprimieren IL-8 nach Aktivierung durch IL-1- $\alpha$ , IL-1- $\beta$  und TNF- $\alpha$ . Desweiteren können Monozyten, Alveolarmakrophagen, Keratinozyten [26] und ebenfalls Endothelzellen durch den Kontakt mit bakteriellen LPS das Chemokin IL-8 produzieren [33]. Lymphozyten zeigen nach Stimulation keine IL-8-Produktion [61]. LPS von PG sind TLR-2 Liganden [26] und können über den TLR-Rezeptor intrazelluläre Signale auslösen, die zur IL-8-Produktion führen (ebenso über TLR-2, -3 oder -5 [26]). Jedoch ist PG in der Lage lokal durch die phosphoserin Phosphatase SerB IL-8 zu inhibieren und den IL-8-Gradienten im Gewebe negativ zu beeinflussen (lokale Chemokin Paralyse), wodurch der chemokingeleitete PMN-Pfad gestört wird [1].

Dongari-Bagtzoglou und Ebersole konnten im Durchschnitt IL-8-Konzentrationen von 69pg/0,2ml beim Gesunden und 372,5pg/0,2ml beim Erkrankten messen [28]. Sie konnten signifikant höhere IL-8 und IL-6 Konzentrationen im sulkulären Bindegewebe (Fibroblasten) beim parodontal erkrankten Patienten im Vergleich zum gesunden Probanden aufzeigen [28]. Der IL-8-Gradient steigt im Saumeepithel von apikal nach koronal und von basal nach superfizial an und stimmt mit dem topographischen granulozytären Migrationspfad überein [31]. Aus immunologischer Sicht macht die beschriebene Topographie ebenfalls Sinn, weil die Konzentrationen der Exotoxine und bakteriellen Lipopolysaccharide in gleicher Anordnung zu erwarten sind und so einen chemotaktischen Gradienten bildet.

## 1. Einleitung mit Literaturübersicht

Abbildung 1.1.: IL-8-Molekülstruktur



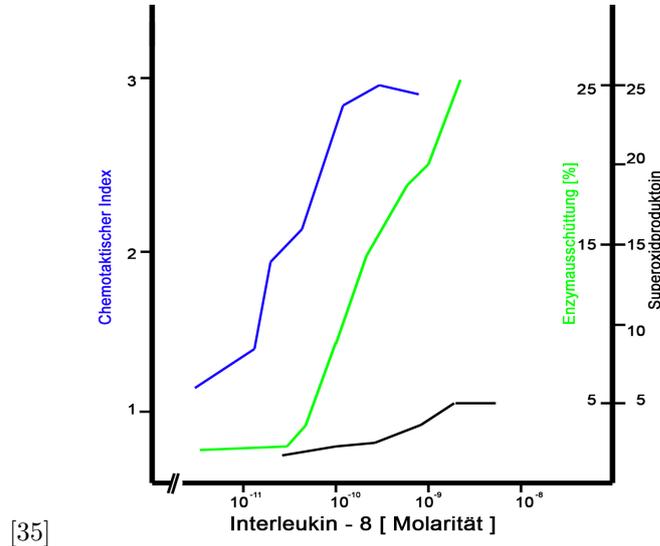
[35]

IL-8 bindet selektiv an PMNs [31][33] und zeigt eine höhere Expression im parodontalen Ligament bei Erkrankten im Vergleich zu Gesunden [28]. Die Zytokine C5a, fMLP, PAF und Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) wirken nicht nur auf PMNs, auch Monozyten und andere Granulozyten zeigen eine Reaktion auf deren Stimulus. IL-8 scheint dagegen deutlich selektiver zu sein. IL-8 stimuliert keine mononukleären Phagozyten und Blutplättchen und nur sehr begrenzt eosine und basophile Granulozyten [33][60]. PMNs präsentieren im Durchschnitt pro Zelle 20.000 IL-8-affine Rezeptoren [33]. Zu ihren wichtigsten Abwehrreaktionen zählen die Exozytose spezifischer Granula und der sogenannte "Respiratory Burst", eine Formation aus Superoxiden und Hydrogenperoxiden [61]. Es ist anzunehmen, dass PMNs und IL-8 funktional eng miteinander verbunden sind und eine wichtige Rolle bei der initialen Abwehr bakterieller Penetration inne haben.

Der durch gramnegative Zellwandantigene indirekt und direkt beeinflusste Plexus gingivalis bildet hochendotheliale Venolen aus und ermöglicht durch Margination (Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 vermittelt), Adhäsion (Tethering; ICAM-1 und  $\beta_2$ -Integrin vermittelt) und Diapedese die anschließende Migration der PMNs. IL-8 und andere Chemokine sind an Proteoglykane der extrazellulären Matrix gebunden und bilden so eine feste Unterlage für die Migration der Granulozyten [32]. Der Migrationspfad erstreckt sich vom extravaskulären Bindegewebe durch die externe Basallamina ins Saumepithel (siehe 1.2.3). Der chemotaktische Gradient, der den zellulären Pol beeinflusst, weist ihnen den Weg. Durch aktive Lokomotion nehmen sie ihren Pfad [1] durch die zum Teil weiten Interzellularspalten bis zum Sulkusboden auf. Unterwegs phagozitierten sie angetroffene Bakterien und entfernen sie so auf ihrem intraepithelialen Pfad [21]. Bei Rhesusaffen wurde beobachtet, dass ein neutrophiler Granulozyt vom Plexus gingivalis bis zum Sulkus zwischen 20-30 Minuten benötigt [62]. Patienten die an Agranulozytose, einem Leuko-

zytenadhäsionsdefekt (LAD-1), Down-Syndrom oder antimitotisch induzierter Neutrozytopenie leiden entwickeln ausnahmslos eine parodontale Erkrankung [1][5]. Diese Beobachtungen heben die wesentliche Bedeutung dieses Prozesses in der parodontalen Pathogenese hervor.

Abbildung 1.2.: Biologische Aktivität von IL-8 (MONAP) in menschlichen PMNs



Die zur Enzymausschüttung notwendige halbmaximale IL-8-Konzentration ist 20 mal höher als die halbmaximale IL-8-Konzentration der Chemotaxis und ist im Gegensatz zu den Zytokinen C5a und fMLP wenig potent, im Sinne eines Stimulus, der zum Oxidativen Burst oder zur Ausschüttung von Superoxidanionen führt [35]. Laborversuche zeigten, dass IL-8 schneller in seinen chemotaktischen Eigenschaften als LPS oder IL-1 [35] ist. Peveri et al. konnten, unter Laborbedingungen, eine dosis-abhängige Superoxidproduktion in PMNs durch IL-8 darstellen, die mit einer zwei sekundigen Verzögerung einsetzt. Eine Vorbehandlung mit Plättchenaktivierender Faktor (PAF) verstärkte den "Respiratory Burst" der PMNs noch [61]. Für die Chemokine C5a und fMLP konnten ähnliche Dauer und Intensität der Superoxidproduktion bei PMNs festgestellt werden [61].

Kommensale Bakterien werden für den IL-8-Gradienten verantwortlich gemacht [1]. Scheinbar gibt es an erkrankten Stellen Subpopulationen von Fibroblasten, die eine erhöhte Anzahl von CD40-Rezeptoren exprimieren und dadurch eine höhere Kapazität der IL-6 und IL-8 Sekretion aufweisen [28][63]. CD40 ist ein Membranglykoprotein, welches sich auf hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen, wie Fibroblasten wiederfindet. Dieses Rezeptormolekül erhöht regulatorisch die IL-6 und IL-8 Expression in Fibroblasten und anderen Zellen (höchstwahrscheinlich durch den Transkriptionsfaktor nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- $\kappa$ B), dieser kann auch durch Nikotin beeinflusst werden) [28].

Zusammenfassend kann IL-8 als hauptsächlich chemotaktisches Zytokin betrachtet werden. Es bildet ein wichtiges Glied in der initialen Abwehrkette des Immunsystems, da es sehr selektiv

## 1. Einleitung mit Literaturübersicht

auf PMNs wirkt und nachweislich an erkrankten Stellen verstärkt sezerniert wird. Inhaltsstoffe des Tabakrauchs oder die LPS bestimmter parodontalpathogener Keime beispielsweise, haben Einfluss auf die IL-8-vermittelte Abwehrreaktion. Das Chemokin ist ein bedeutender Parameter in der modernen Parodontologie.

### 1.6. Auswirkungen durch Nikotinabusus

Tabakkonsum ist einer der wichtigsten, wenn nicht sogar der wichtigste Risikofaktor in Bezug auf die Inzidenz und Progression parodontaler Erkrankungen. Besonders wichtig zum Verständnis des Einflusses von Tabakkonsum auf die Pathogenese stellt die Interaktion der pathogenen Inhaltsstoffe auf die Mikroflora und die Immunabwehr dar [64]. Tabak kann zur immunologischen Disbalance, einer damit verbundenen Entzündungsprogredienz und weiter zu destruktiven Vorgängen im Parodont führen [64]. Im Gewebe, Blutserum, Speichel, Sulkusfluid und sogar in den Zellen kann man niedrige (chronisch) und hohe (akut) Level an Tabakprodukten aus dem Tabakrauch finden [64]. Während des Rauchaktes finden sich hundert bis tausendfach gesteigerte Konzentrationsanstiege dieser wieder [64]. Einige Studien implizieren eine Veränderung flacher, parodontaler Taschen dahingehend, dass sich parodontalpathogene Keime besser ansiedeln können [64]. Es scheint als fördere das Rauchen destruktive Funktionen und Aktivitäten der PMNs. Immunglobulin (Ig)-G und Ig-A Konzentrationen sinken, die Phagozytoseleistung und Chemotaxis (unter akut hohen Dosen) der PMNs nehmen ab, gleichzeitig steigt deren Superoxid- und Hydrogenperoxidproduktion (Respiratory Burst) und ebenfalls ihre Migrationsfähigkeit [65] (Zahl der Adhäsionsmoleküle in Blutgefäßen steigt an). Die Anzahl der T-Zellen soll, durch das Integrin-/Selectin-System gesteuert, ebenfalls durch Tabakkonsum erhöht werden [66]. Diskutiert wird auch die Stellung der körpereigenen Enzyminhibitoren und deren Aktivität. Diesen wird zum Teil ein noch größerer Einfluss auf die Homöostase im Gewebe zugesprochen, als den Entzündungsmediatoren und den gewebedestruierenden Enzymen [64]. In der zweiten Abwehrphase spielen die Mononukleozyten und deren Zytokinproduktion eine große Rolle. Das Zytokinprofil kann in zwei Richtungen abdriften: das inflammatorische, destruktive Profil, gekennzeichnet durch große Mengen an Zytokinen wie: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 und/oder IL-8, oder das protektive, reparative Profil mit erhöhten Zytokinen wie beispielsweise Interferonen, Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (engl. Insulin-like growth factor (IGF) und Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  [64]. Giannapoulou et al. zeigten in ihrem Patientenkollektiv eine umgekehrte Proportionalität zwischen der IL-4 Konzentration, welches als protektiv gilt, und den Zytokinen IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8, welche wiederum erhöht bei parodontal Geschädigten zu verzeichnen war, auf [67]. Es wurden allerdings auch schon erhöhte, als protektiv geltende TGF-Konzentrationen bei rauchexponierten mononukleären Zellpopulationen gefunden, die wiederum als verstärktes Reparaturbedürfnis nach rauchkorreliertem, parodontalem Gewebeuntergang verstanden wurden [64]. Es zeichnet sich trotzdem eine klare Tendenz ab, die auf einen Zusammenhang zwischen Tabakkonsum, dessen Einflüsse und der Ausbildung des destruktiven Zytokinprofils zeigt [68].

Die Third National Health and Nutrition Examination Survey zeigte bei Rauchern ein 4-fach erhöhtes Risiko eine parodontale Erkrankung auszubilden [69]. Tabakrauch stellt den Hauptrisikofaktor [41][42] [43] der chronischen Parodontitis dar und erhöht die Prävalenz signifikant und relevant [70]. Der durchschnittliche Nikotingehalt in einer Zigarette beträgt 1-1,8 mg [6]. Im Speichel konnten Nikotinkonzentrationen bis 115ng/ml festgestellt werden [6]. Der in Tabak enthaltene aktive Inhaltsstoff Nikotin ist einer unter 2000-3000 Inhaltsstoffen, wie beispielsweise Nitrosamine, Benzolverbindungen und Kohlenstoffdioxid [64] und sollte deshalb nicht isoliert betrachtet werden. Dennoch konnte festgestellt werden, dass Nikotin die Produktion diverser Zytokine und Entzündungsmediatoren in verschiedenen Zelltypen beeinflussen kann [3][26][71]. Durch Tabakkonsum werden bestimmte Mechanismen ausgelöst, die zur parodontalen Destruktion führen können. Hierzu zählen eine veränderte parodontale Mikroflora, Immunantwort, vaskuläre Funktionen, PMN- und Monozytenaktivitäten, Antikörperproduktion, Freisetzung von Zytokinen, Freisetzung inflammatorischer Mediatoren und die Expression von Zelladhäsionsmolekülen [72][71][64][3]. Lokal durch Nikotin und Bakterien beeinflusste Gewebe reagieren mit einer gesteigerten Produktion proinflammatorischer Zytokine wodurch es zu verstärktem Gewebeuntergang (bei Rauchern mit schlechter Mundhygiene) kommen kann [72].

Je nach Studie konnten unterschiedliche Reaktionen durch den Einfluss von Nikotin und weiterer Kofaktoren auf diverse Zelltypen festgestellt werden (siehe 1.1). Zum Teil können sogar scheinbar benefiziale, antiinflammatorische Effekte beobachtet werden [64]. Johnson et al. untersuchten die Reaktionen von Keratinozyten auf die LPS von *E. coli* oder PG alleine und in Kombination mit hohen (1mM) und niedrigen (0,1 $\mu$ M) Nikotinkonzentrationen. Bei gleichzeitiger Stimulation mit den LPS von *E. coli* oder PG und hohen Nikotindosen (1mM) zeigte sich eine signifikant erhöhte IL-1 $\alpha$ - und IL-8-Produktion [72]. Sie schlossen dadurch auf eine begünstigte Gewebeerstörung [72]. Die Hypothese bezieht sich auf Nikotin, einer von vielen Stoffen in Tabakrauch, und kann deshalb nur auf Nikotin-Exposition und nicht generell auf Raucher bezogen werden.

Johnson et al. stellten einen zusammenhängenden Effekt des Rauchens und bakterieller Faktoren auf die Wirtsabwehrleistung fest, konnten aber nicht sicher darstellen, ob dieser Effekt additiv oder synergistisch wirkt. Sie machten in ihren Untersuchungen Nikotin als Hauptursache für die gesteigerte IL-1 $\alpha$  [72] und die LPS (von *E. coli* und PG) für eine gesteigerte Produktion von IL-8 [26][72] aus. Dies wurde bei Johnson et al. nur für Keratinozyten untersucht und variiert anscheinend je nach Zelltypus, wie andere Studien zeigten. Einige Studien konnten sogar gegenteilige Beobachtungen zur Produktion dieser Zytokine bei anderen Zellen ausmachen ( $\beta$ -Defensin-2 [26])[52][63][73][74][75]. Tappia et al. zeigten erhöhte IL-6 (16%, P=0,07) und TNF $\alpha$  (38%, P=0,01) Werte im Vollblut nach LPS Stimulation bei Rauchern im Gegensatz zu den nicht rauchenden Probanden [68]. Ebenfalls bei Rauchern und ehemaligen Rauchern erhöhte TNF $\alpha$ -Konzentrationen im Sulkusfluid konnten Boström et al. aufzeigen [76] [77]. Wendell und Stein zeigten eine nikotin-induzierte Produktionssteigerung der Interleukine IL-6 und IL-8 bei Fibroblasten [63]. Giannopoulou et al. fanden bei ihrem Patientenkollektiv signifikant erhöhte IL-4, IL-

## 1. Einleitung mit Literaturübersicht

Tabelle 1.1.: Stimulusinduzierte Effekte auf die Zytokinproduktion diverse Zelltypen

Zelltyp/Substrat	Stimulus	IL-2	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-8	PGE <sub>2</sub>	TNF $\alpha$
Monozyten	0,617 mM Nikotin		0				
Monozyten	0,617-6,17 mM Nikotin, LPS-primed		-				
Monozyten	Nikotin (dosisabhängig)	-	-**				-
Neutrophile	Nikotin (dosis- und zeitabhängig)		0		+		
Fibroblasten	1 nM (low)				+		
Fibroblasten	AA od. TNF $\alpha$		0	+	+	0	
Fibroblasten	IL-1 $\alpha$ od. IL-1 $\beta$		0	+	+	+	
Fibroblasten	1mM Nikotin + LPS			+	+		
Keratinocyten	1mM Nikotin		+		0*		
Keratinocyten	1mM Nikotin + LPS		+		+		

- = erniedrigt; 0 = ohne Unterschied; + = erhöht; \* = nicht signifikant; \*\* = unrealistisch hohe Nikotinkonzentrationen verwendet; [26][28][63][72][73][74][75][78]

6 und IL-8 Konzentrationen im Sulkusfluid bei Rauchern, im Vergleich zu Nichtrauchern [67]. Die unterschiedlichen Reaktionen der verschiedenen Zelltypen auf Nikotin- und LPS-Behandlungen reflektieren wahrscheinlich unterschiedliche Rezeptor-Präsentationen und Stoffwechselwege [72]. In einer klinischen Studie mit insgesamt 52 Probanden konnte gezeigt werden, dass Raucher verringerte IL-8-Konzentrationen an parodontal erkrankte Flächen im Vergleich zu Nichtrauchern aufwiesen [52].

Wang et al. zeigten, dass nikotinische Azetylcholinrezeptoren (nAChRs) auch auf nicht-neuronalen Zellen wie dem oralen Epithel ( $\alpha 7$  nAChR) exprimiert werden [70]. Desweiteren zeigten sie, dass Nikotin über den cholinergen Signalweg mit Hilfe von  $\alpha 7$  nAChR, aus dem parodontalen Ligament gewonnene Zellen, beeinflusst [70]. nAChRs sind cholinerge Rezeptoren, die einen ligandengesteuerten Ionenkanal bilden und nicht nur durch Azetylcholin, sondern auch durch Nikotin, getriggert werden können [70]. NF- $\kappa$ B ist ein spezifischer, in fast allen Zellen vorhandener Transkriptionsfaktor und wird mit der Entstehung entzündlicher Prozesse zusammengebracht. Der Transkriptionsfaktor steht am Endpunkt einer Reihe von Signaltransduktionen, welche durch eine Vielzahl an Stimuli indiziert werden kann [79][75]. Die bei Säugetieren derzeit bekannten Untereinheiten sind:

### Untereinheiten: [79]

1. NF- $\kappa$ B1 (p105)
2. NF- $\kappa$ B2 (p100)
3. NF- $\kappa$ B3 RelA (p65)
4. RelB
5. c-Rel

Wu et al. und Iho et al. zeigten eine Regulation der Zytokine IL-1 und IL-8 durch den  $\alpha 7$  nAChR/NF- $\kappa$ B-Mechanismus unter anderem in PMNs. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B wird

durch Nikotin aktiviert [6][75], insbesondere die Untereinheit NF- $\kappa$ B3 p65 [70]. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die nikotinstimulierte IL-1- und IL-8-Produktion eine signifikante Steigerung erfährt. Das RANKL/Osteoprotegrin (OPG)-Verhältnis wird durch Entzündungsmediatoren wie z.B.: IL-1 und TNF $\alpha$  erhöht und führt so direkt zu knöchernen Abbauprozessen [1]. NF- $\kappa$ B ist deutlich aktiver bei Patienten mit einer chronischen Parodontitis im Vergleich zu gesunden Patienten [80]. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Konopka et al., die einen erhöhten IL-1-Spiegel bei Patienten mit chronischer Parodontitis und eine verminderte Konzentration nach parodontaler Behandlung aufzeigten [81]. Iho et al. machen die durch nikotininduzierte, IL-8-produzierende, erhöhte Neutrophilenstimulation über den nAChR mitunter für die Leukozytose bei Rauchern verantwortlich [75].

In einer klinischen Studie konnten Tymkiw et al. bei parodontal erkrankten Rauchern eine signifikant verminderte Konzentration von IL-8, IL-1 $\alpha$ , IL-6 und weiteren Zytokinen und Mediatoren im Vergleich zu parodontal erkrankten Nichtrauchern, in der Sulkusflüssigkeit, feststellen [52]. Wobei Erkrankte generell erhöhte Konzentrationen zur gesunden Kontrollgruppe zeigten [52]. Kamma et al. zeigten ebenfalls eine geringere Konzentration von IL-8 in der Sulkusflüssigkeit von Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern, sowie bei parodontal Erkrankten, als auch bei Gesunden [82].

In Anbetracht der Komplexität der beobachteten Effekte und der Anzahl an Komponenten im Tabakrauch ist es klinisch wahrscheinlich relevanter den Tabakkonsum als Ganzes zu betrachten [64]. Die zum Teil gegensätzlichen Ergebnisse deuten auf den scheinbar nicht unerheblichen Einfluss einer Vielzahl von Variablen, wie beispielsweise Studienmodell, Probenentnahmeart, verwendete Stimulantien, Detektionsverfahren und viele mehr, hin [52].

## 1.7. Fragestellung

Die Aktivität und die damit oft verbundenen irreversiblen, destruktiven Mechanismen einer parodontalen Entzündungsreaktion im marginalen Parodont sind therapeutisch zu bekämpfende Ziele, die derzeit nur unzureichend diagnostiziert werden können. Das Chemokin IL-8 könnte sich diesbezüglich als passender Parameter darstellen, der minimalinvasiv durch Sulkus- oder Mundwasserproben gewonnen werden kann und zudem ökonomisch auswertbar ist.

Die Parodontitis ist gekennzeichnet durch eine Reihe von Entgleisungen immunmodulierender Antworten, ausgelöst durch bakterielle Reize und andere pathogene Umstände. Das Chemokin IL-8 scheint ein wichtiges Zytokin für die korrekte Steuerung, vor allem initialer Abwehrleistungen im parodontalen Gewebe zu sein. Eine Über- oder Unterexpression dieses Chemokins könnte sich als einflussreicher Faktor im Entzündungsprozess herausstellen.

Bisher durchgeführte Studien deuten darauf hin, dass die Expression von IL-8 durch Tabakkonsum gestört werden kann. Allerdings sind die Ergebnisse uneinheitlich, was auf unterschiedliche Studiendesigns und kleine Untersuchungsgruppen zurückgeführt werden könnte. Auch beeinflussen sich die unterschiedlichen Faktoren untereinander.

### *1. Einleitung mit Literaturübersicht*

Um den Einfluß des Rauchens auf die Expression von IL-8 bei Patienten mit marginaler Parodontitis genauer zu untersuchen, wurden einer relativ großen und klinisch gut charakterisierten Patientengruppe mikrobiologische Sulkus- und Mundwasserproben entnommen und auf parodontopathogene Keime und die Konzentration von IL-8 hin untersucht.

Die Ergebnisse sollen auf folgende Fragestellungen hin überprüft werden:

1. Unterscheiden sich Raucher und Nichtraucher im klinischen Erscheinungsbild?
2. Wie wirken sich die Parameter BOP-, Sulkusblutungs- und Plaqueindex und die Befunde der Schwere der Parodontitis und Anwesenheit von AA und PG auf die Konzentration von IL-8 im Sulkusfluid und im Mundwasser aus?
3. Lassen sich Rückschlüsse auf die IL-8-Konzentrationen in Abhängigkeit auf das Rauchverhalten ableiten?
4. Lassen sich aus den Ergebnissen Anwendungsmöglichkeiten für einen Schnelltest zur Parodontitisaktivität ableiten?

## 2. Material und Methode

### 2.1. Überblick

Die Studie wurde von der Ethikkommission der LMU München unter der Projektnummer 025-11 genehmigt. Die Studienpopulation stammt aus dem Patientenkollektiv der Zahnerhaltung und Parodontologie der Zahnklinik München, Goethestrasse 70 in 80336 München. Inkludiert wurden Patienten mit einer parodontalen Erkrankung, Einverständnis zur Probenentnahme und vollständig aufgenommenen und kontrollierten klinischen und anamnestischen Daten. Eine Beschränkung auf eine ethnische Gruppe wurde nicht vorgenommen. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Hinweisen auf ein angeborenes oder erworbenes Blutungsübel und Zuständen, die mit einer vorübergehenden oder dauerhaften Einschränkung der immunologischen Potenz einhergehen. Hierzu zählten:

- angeborene oder erworbene Immundefekte
- medikamentös induzierte Immunsuppression (z.B.: Cortison, Cyclosporin)
- malignen hämatologischen oder lymphoproliferative Erkrankungen
- maligne Tumoren
- HIV-Infektion
- therapiebedürftige Erkrankungen autoimmuner Genese (z.B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen, rheumatische Erkrankungen).

Zum Ausschluss führten auch:

- eine Erkrankung an Diabetes mellitus
- angeborene oder erworbene Herzvitien
- Z.n. künstlichem Herzklappenersatz
- eingeschränkte Leberfunktion
- zerebrale Krampfleiden, sowie schwere sonstige neurologische oder psychische Erkrankungen
- systemische Infektionskrankheiten

## 2. Material und Methode

- angeborene oder erworbene Defekte der Kollagensynthese
- schwere Durchblutungsstörungen der oberen Extremitäten

Die anamnestischen und klinischen Daten, sowie die Sulkus- und Speichelproben wurden im Rahmen der Parodontaltherapie in den studentischen Behandlungskursen Kons I und Kons II erhoben und später im Labor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der LMU München und im Labor der Dermatologischen Klinik der LMU München (Sulkusfluid und Mundwasserproben) ausgewertet. Für die klinischen und anamnestischen Daten, sowie der pseudonymisierten Auswertung der Labordaten wurde eine eigens konzipierte Software entwickelt. Zur statistischen Auswertung mittels SPSS (Firma: IBM, Sitz: Armonk) konnte die Software die notwendigen Daten in geeignetem Format liefern. Die erwähnte Software, Parodontales-Befundungs-Programm (PAP), ist eine Anwendungsentwicklung dessen Programmcode (HTML, PHP, JAVASCRIPT, AJAX) mit einer Datenbank (MYSQL) interagiert und über einen geeigneten Browser (z.B.: Firefox 46.0.1, Mozilla Corporation, 331 E. Evelyn Avenue Mountain View, CA 94041 USA) sein Interface präsentiert. Das PAP ist eine individuelle und eigenständige Umgebung, kommunizierte jedoch in ausgewählten Bereichen (fehlende Zähne, PA-Status: Sondierungstiefen, Rezessionen) mit dem Dokumentationsprogramm (HiDent, CompuGroup Medical Deutschland AG, Koblenz) der Abteilung für Zahnerhaltung und Parodontologie.

## 2.2. Klinische Daten

### 2.2.1. Übersicht - Klinische Daten

Die klinischen Daten wurden in den Studentenkursen “Konservierende Zahnerhaltung I und II“ der Zahnerhaltung und Parodontologie in der Zahnklinik München, Goethestrasse 70, erhoben. Die Patienten wurden im Rahmen der parodontalen Therapiesitzung vom behandelnden Studenten, unterstützt durch ein vorgegebenes Schema im PAP, anamnestisch befragt. Die erhobenen Daten wurden optional durch eine Assistenz oder den behandelnden Studenten selbst im PAP während der Befragung eingetragen. Das PAP wurde im laufenden Einsatz weiterentwickelt und verbessert. Hauptsächlich kamen Erweiterungen wie detailreichere Anamnesefragen und Verbesserungen in der Benutzerfreundlichkeit sowie des Designs hinzu.

Die Studenten meldeten sich im Dokumentationsprogramm HiDent mit dem entsprechenden Benutzerkonto an und kamen über eine implementierte Schaltfläche in HiDent per Weiterleitung ins PAP. Die Schnittstelle diente zur Übertragung der als fehlend klassifizierten Zähne (zahnärztlicher Befund in HiDent) und zur Übermittlung der Matrikelnummer des Studenten. Eine Übersicht im PAP (siehe 2.1) der bisherigen Sitzungen, leitete zur richtigen Sitzung (Initialtherapie, Reevaluation, Recall 1, etc.). Die Schnittstelle wurde nach der Erfassung der parodontal-relevanten Daten genutzt, diese in kontradirektionaler Richtung ins Dokumentationsprogramm HiDent einzupflegen.

Abbildung 2.1.: Übersichtsinterface PA-Programm (PAP)

Übersicht - Patient
Initialtherapie
Reevaluation

**Mustermann, Max**

Anrede: Mann

Geburtsdatum: 1951-12-11

Hauptwunsch: ---

Auswertung

**Reevaluation** 2014-08-11

- Befund (✓) EDE wieder öffnen
- Röntgenbefund EDE aktivieren
- Diagnose Prognose Planung EDE aktivieren
- Mundhygiene EDE aktivieren
- Sitzungsauswertung

Einverständniserklärung ✓

Pseudonymisierungsnummer 0

**Status:** verifiziert

Möchten Sie weiter zu: **Recall 1**

ja - weiter

**Initialtherapie** Kein Datum eingetragen!  
Rätscheln und nachtragen!

- Befund (✓) EDE wieder öffnen
- Röntgenbefund EDE aktivieren
- Diagnose Prognose Planung EDE aktivieren
- Mundhygiene EDE aktivieren
- Sitzungsauswertung

Einverständniserklärung ✓

Fragebogen zur Studie X

Pseudonymisierungsnummer 0

**Status:** verifiziert

## 2. Material und Methode

### 2.2.2. Erhebung Anamnesedaten

Ein elektronisches Handout und eine vorangestellte Vorlesung wiesen die Studenten ins Programm ein. Ein modularer Aufbau führte den Behandler während der Sitzung durch die segmentierte Datenerhebung. Die Module konnten nur geöffnet werden, wenn im vorherigen Modul alle Daten vollständig ausgefüllt wurden und damit die Ampel auf grün schaltete (siehe 2.2). Die studentisch erhobene Anamnese wurde dem Assistenzarzt gemeldet. Eine Überprüfung der Anamnesedaten wurde stichprobenartig vom betreuenden Assistenzarzt durchgeführt. Erhoben wurden Daten in den Modulen: Anamnese, spezielle Anamnese, Anamnese Kariesrisiko, Schleimhautbefund, Speicheldrüsenbefund und funktioneller Befund. Fast die komplette Datenerhebung war auf bestimmte Antwortmöglichkeiten ausgerichtet, so dass fast alle Anamnesefragen per Auswahlliste beantwortet werden konnten und so eine statistisch auswertbare, konsistente Datensammlung erreicht wurde. Lediglich spezifische Angaben zur Medikamenteneinnahme und Art der Allergie mussten als Freitext beantwortet werden. Bei Angaben wie Größe und Gewicht wurden die Eingabewerte automatisch auf Plausibilität geprüft und bei Abweichungen eine Warnmeldung ausgegeben.

Abbildung 2.2.: Anamnesedaten PA-Programm

The screenshot shows a web-based form for patient history. The main section is titled 'Anamnese' and contains several rows of input fields. Each row has a dropdown menu for selection and a text input field for free text. The fields include: 'Sind Sie in Deutschland geboren?', 'Allergien', 'Infektionskrankheiten', 'Krankheitstage/Jahr wg. akuten Infekten', 'Rauchgewohnheiten aktuell?', 'Herkunft - Mutter', 'Anaphylaxie in der Vergangenheit', 'Krebskrankung', 'Selbsteinschätzung Stress 1-10', 'Herkunft - Vater', 'Größe', 'Gewicht', 'Diabetes', 'Hypertonie', 'Immunsuppression', 'Endokarditisrisiko', 'entz. Erkrankungen in Magen und Speiseröhre', and 'entzündliche Erkrankung des Darms'. A dropdown menu for 'Herkunft - Vater' is open, showing a list of countries including Bern, Bermuda, Bolivien, Brasilien, etc. Below the form are several status indicators with colored bars (green, red, yellow) for 'spezielle Anamnese (seit letzter Sitzung)', 'Anamnese Kariesrisiko', 'Schleimhautbefund', and 'Speicheldrüsenbefund'.

### 2.2.3. Erhebung zahnärztlicher Befund

Bereits beim Anmelden ins PAP wurden über die Schnittstelle die fehlenden Zähne aus dem aktuellen Arbeitsbefund aus HiDent im Hintergrund übertragen. Beim ersten Aufruf des Moduls "Zahnärztlicher Befund" wurden die fehlenden Zähne dem Behandler zur Überprüfung angezeigt und mussten im Folgenden korrigiert oder bestätigt werden. Alle als fehlend gekennzeichneten Zähne wurden in sämtlichen Modulen der Sitzung inaktiviert. Dadurch konnten Versatz- und Folgefehler beim Diktat aller 6-Punktmessungen minimiert werden. In den Kategorien Befund, Zahnersatz (ZE), Perkussion, Sensibilität und Lockerung mussten ebenfalls vorgefertigte Antworten aus einem Drop-Down-Menü ausgewählt werden (siehe 2.1).

Tabelle 2.1.: Optionen im Zahnärztlichen Befund

Kategorie	Wert
Befund	ohne Befund / insuffiziente Versorgung, nicht kariöse Läsion / Karies / zerstört / fehlt (Zahn ursprünglich in Funktion oder unbekannt) / fehlt (nicht angelegt, retiniert, wegen Platzmangel entfernt)
ZE	keine Restauration / Füllung / Teilkrone/Krone / Brückenglied / Implantat / herausnehmbarer Ersatz
Sensibilität	keine / nicht sicher auslösbar / sicher auslösbar
Perkussion	keine / unsicheres Ergebnis / Perkussion eindeutig positiv
Lockerung	keine / Grad I / Grad II / Grad III

#### 2.2.4. Erhebung Parodontalbefund

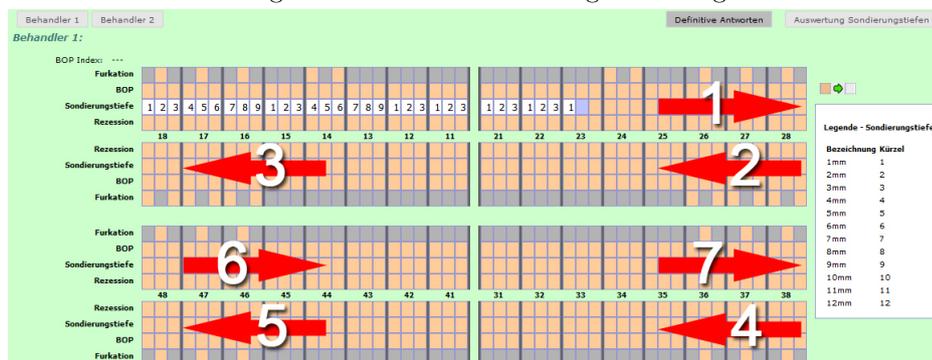
Der Parodontalstatus wurde mit folgenden Parametern erhoben: Sondierungstiefe, Rezession, Bleeding on Probing (BOP) und Furkation, und in ein durch das PAP zur Verfügung gestelltes digitales Befundblatt am Computer eingetragen. Jeder Parameter wurde nach einem definierten Schema erfasst. Die Messungen wurden immer im ersten Quadranten distovestibulär begonnen (siehe Abb. 2.3. Nach Eingabe des Wertes durch Tastendruck sprang der Cursor automatisch auf die nächste, schemafokale, zu messende Fläche. Bei Überschreiten der Mittellinie ertönte ein Signal, damit der Behandler und der Protokollant ihre Kongruenz beim Messen und Erfassen bestätigen konnten. Die Messung endete nach Durchschreiten aller Quadranten und Flächen im dritten Quadranten distolingual. Sondierungstiefen wurden vorsichtig bis zum ersten Weichgewebswiderstand aussondiert und bei Grenzwerten immer abgerundet. Zur Messung der Sondierungstiefen und Rezessionen wurde die Sonde PCP 12 (Hu-Friedy Europe, Leimen, Deutschland) verwendet. Furkationen wurden mit einer Naberssonde PQ2N (Hu-Friedy Europe, Leimen, Deutschland) erfasst. Plaque und Blutungswerte wurden dichotom und mit gleicher Strategie wie bei den PA-Werten erhoben. Blutungswerte wurden analog dem Gingiva-Blutungs-Index nach Ainamo und Bay [83] erhoben. Plaquewerte wurden analog dem Plaque-Control-Record-Index (PCR) nach O’Leary et al.[84] erhoben. Der Erhebung ging keine professionelle Zahnreinigung voraus.

#### 2.2.5. Kontrolle der Befunde

Nach erfolgreicher Beendigung der Messungen überprüften zwei kalibrierte Prüffärzte die Befunde (Dr. Richard Heym oder Dr. Christina Ern). Die anamnestischen Fragen waren durch die Beschränkung der Antwortmöglichkeiten und die Ampelfunktion der Abfragemaske immer vollständig ausgefüllt und wurden stichprobenartig auf Richtigkeit überprüft. Der zahnärztliche Befund, die Rezessions- und Furkationsmessung, der BOP und die Mundhygienewerte wurden ebenfalls stichprobenartig überprüft. Alle Sondierungstiefen wurden, ohne Kenntnis der ersten Messung, von den kalibrierten Prüffärzten in einem Passwort geschützten, digitalen Befundblatt erneut gemessen und protokolliert. Im Anschluss wurden die beiden parodontalen Befunde durch

## 2. Material und Methode

Abbildung 2.3.: Parodontale Messung - PA-Programm



das PAP automatisch miteinander abgeglichen und die Differenzen visualisiert (siehe 2.4). Abweichungen von 2 mm oder mehr mussten von der Prüferin / vom Prüfer nachgemessen werden und wurden in einem weiteren Befundblatt notiert. Anschließend wurden die Werte der Prüferin / des Prüfers durch die nachgemessenen Werten ergänzt und bildeten den für die Auswertung verwendeten parodontalen Befund. Das PAP speicherte alle vier Werte (erste Messung, zweite Messung, Nachmessung und definitive Messung) automatisch bei Eingabe in der Datenbank ab. Jede Sitzung wurde anschließend vom betreuenden Prüfer bestätigt und per Passwort abgeschlossen. Abgeschlossene Daten konnten nur noch im Sinne eines Nachtrags oder einer Korrektur von autorisierten Benutzern verändert werden.

## 2.3. Studienkollektiv

### 2.3.1. Minimale Kollektivgröße

Die minimale Größe des Kollektivs, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurde durch eine Fallzahlberechnung vorab bestimmt. Dazu wurde eine Literatursuche durchgeführt, um mittlere Konzentrationswerte des Zytokins in anderen aussagefähigen Studien zu finden (siehe [85], [86], [87], [88], [89], [90]). Des Weiteren wurden elf zufällig ausgewählte Proben auf die Konzentration des Zytokins untersucht. Die Laboruntersuchungen ergaben eine mittlere Konzentration von 263 pg/ml.

Zur Berechnung wurde eine mittlere Konzentration von 300 pg/ml angenommen. Für die Berechnung wurde ein Konfidenzniveau von 95% und eine Güte von 0,8 festgelegt. Damit die Null-Hypothese verworfen werden kann, musste ein p-value von  $\leq 0,05$  erreicht werden. Die Berechnungen ergaben eine minimale Gruppengröße bei gleich großen Gruppen von mindestens 129 Patienten pro Gruppe. Bei ungleich großen Gruppen müssten mindestens 97 Fälle und 194 Kontrollfälle erhoben werden.

Die Fallzahlplanung mit verschiedenen Ausgangswerten beeinflusst das Ergebnis der Fallzahlauswahl.



### 2.3.2. Gesamtes Studienkollektiv

Das gesamte Studienkollektiv stammte aus dem Patientengut der Abteilung für konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie der Zahnklinik München (Goethestrasse 70, 80336 München). Alle untersuchten Patientinnen und Patienten waren im Vorfeld als parodontal erkrankt eingestuft worden. Die Auswahl erfolgte über den Parodontalen Screening Index (PSI) und einer Kurzkontrolle durch den Oberarzt im jeweiligen Studentenkurs. Weitere anamnestische Kriterien mussten erfüllt sein (siehe hierzu Ethikantrag 025-11 und Abschnitt 3.1).

### 2.3.3. Gruppeneinteilung

#### Nichtraucher und Raucher

Das Studienkollektiv wurde in Raucher und Nichtraucher eingeteilt (Gruppenbezeichnung RNR). Als Raucher wurde jeder Patient klassifiziert, der zum Untersuchungszeitpunkt mindestens ein Rauchverhalten von einer Zigarette pro Tag aufzeigte. Kushner et al. weisen aufgrund ihrer Ergebnisse darauf hin, dass die Gruppe der Raucher differenziert in Bezug auf die Intensität betrachtet werden sollte [91]. Zur differenzierten Betrachtung wurden Packyears berechnet und im linearen Regressionsmodell mit einbezogen. Ein Packyear (siehe Formel 2.1) entspricht einem Rauchverhalten von insgesamt einem Jahr mit 20 Zigaretten pro Tag.

Die Gruppe der Raucher (R) hatte ein mittleres Alter von 48,52 Jahren (Standardabweichung (Std.abw.): 8,605 Jahre, Median: 48,00 Jahre), die der Nichtraucher (NR) ein mittleres Alter von 50,34 Jahren (Std.abw.: 10,491 Jahre, Median: 52,00 Jahre). Die Verteilung der ethnischen Zugehörigkeit zwischen Rauchern und Nichtrauchern war annähernd gleich verteilt und kann der Tabelle C.4 entnommen werden.

$$PY = \frac{Y \times z}{20}$$

mit  $PY$  = Packyears (2.1)

$Y$  = Anzahl der Jahre mit Raucherhistorie

$z$  = Zigaretten pro Tag

Nichtraucher wurden zur genaueren Auswertung noch nach ehemaliger Raucherfahrung untergliedert, im Folgenden als Gruppe RNR-3 bezeichnet. Jeder Nichtraucher, der einmal in seinem Leben geraucht hatte, undifferenziert nach Zeitraum, Intensität und Zeitpunkt, wurde in die Gruppe der ehemaligen Raucher einbezogen. Dies ergab folgende Gruppengrößen: 94 Raucher (R3), 107 absolute Nichtraucher (NR3) und 49 ehemalige Raucher (eR3). Das Durchschnittsalter stellte sich wie folgt dar: R3 mit 48,52 Jahren, NR3 mit 49,47 Jahren und eR3 mit 52,00 Jahren.

### **Einteilung der Schwere der Parodontitis**

Durch die Erhebung einer vollständigen 6-Punkt-Messung aller Zahnflächen eines Patienten konnte die tiefste Sondierungstiefe zur Gruppeneinteilung herangezogen werden. Wie bereits beschrieben, sollten so die Patienten nach Aktivität und Schwere der parodontalen Situation klassifiziert werden. Mehrere sinnvolle Gruppenvarianten wurden gewählt, so dass eine differenzierte Betrachtung der Ergebnisse möglich gemacht wurde.

Anhand der tiefsten gemessenen Sondierungstiefe wurden die Patienten in Gruppen eingeteilt (tiefste Sondierungstiefe (tSD)). Die Werte der tSD wurden wiederum in fünf Gruppen zusammengefasst: Gruppe 1 = 1-3mm, Gruppe 2 = 4-5mm, Gruppe 3 = 6-7mm, Gruppe 4 = 8-9mm und Gruppe 5 > 10mm. Die tiefste Sondierungstiefe wurde als zentraler Parameter des aktuellen klinischen Verlaufs der aktivsten parodontalen Entzündungsreaktion im marginalen Parodont eingestuft. Das Chemokin IL-8 wird vermutlich am aktiven Entzündungsprozess teilnehmen. Eine bereits abgelaufene, ausgeheilte parodontale Erkrankung, die mittels einer Panoramaschichtaufnahme über den radiologischen Knochenverlust diagnostiziert werden könnte, wird theoretisch keine erhöhten Chemokine mehr aufweisen. Deswegen wird hier die tiefste Sondierungstiefe favorisiert, um eine akut ablaufende Phase der parodontalen Erkrankung zu erfassen. Die Gruppeneinteilung erfolgte nach empirischer Empfindung in die genannten fünf Gruppen (tSD).

## **2.4. Parameterwahl - Interleukin 8**

Im Vorfeld der Datenerhebung wurde an einem kleinen Patientenkollektiv Proben gewonnen und deren Auswertbarkeit auf verschiedene inflammatorische Zytokine, Chemokine und Faktoren hin untersucht. Auch diese Untersuchung war durch das Ethikvotum 025-11 abgedeckt. Desweiteren wurden Untersuchungen zum Prozess der diversen Einlagerungsmethoden vorgenommen.

Insgesamt wurden 45 Speichelproben gewonnen und auf folgende Inhaltsstoffe untersucht: IL-8, IL-6, IL-2, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-10, Granulozyten-Monozyten koloniestimmulierender Faktor (GM-CSF), Interferon (IFN) $\gamma$  und Tumor Nekrose Faktor (TNF) $\alpha$ . Die Parameter IL-8 und IL-1 $\beta$  zeigten die geringsten Leerwerte, bei den Testproben, mit 4,4% Leerwerte bei IL-8 und 15,6% Leerwerte bei IL-1 $\beta$ . Die Wahl des zu untersuchenden Parameters fiel zu Gunsten des Chemokins IL-8 aus. Die Lagerung der Proben wurde, um systematische Fehler auszuschließen, folgendermaßen erprobt: Drei zufällig ausgewählte Probanden wurden in kurzer zeitlicher Abfolge insgesamt je drei Proben Mundwasser abgewonnen und sofort eingefroren. Den Probanden wurden weitere Proben abgenommen und diese unterschiedlich lange vorgelagert. Die Verweildauer der Proben vor definitiver Lagerung im Gefrierschrank betrug 15 Minuten, 30 Minuten, 45 Minuten, 60 Minuten, 120 Minuten, 180 Minuten und 240 Minuten. Die verschiedenen Verweilzeiten wurden je einmal mit Zwischenlagerung auf Eis und einmal mit Zwischenlagerung ohne Eis vollzogen. Die Daten ließen keinen Verdacht aufkommen, dass die unterschiedlichen Lagerungsarten einen Einfluss auf die Messergebnisse hatten. Die Probenabnahme während des laufenden Studentenkurses, mit fakultativ auftretenden Verzögerungen aus organisatorischen und anderen Gründen,

## 2. Material und Methode

schien dadurch unproblematisch und durchführbar zu sein.

### 2.5. Probenentnahme - Überblick

Jede Probenentnahme wurde nach einem festgelegten Protokoll durchgeführt. Es wurden Speichel- und Sulkusflüssigkeitsproben entnommen.

Jeder Patient musste zuvor eine Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie mit der Projektnummer 025-11 unterschrieben haben. Desweiteren wurde anamnestisch abgeklärt, ob eine Infektion des Respirationstraktes vorlag und ob in den letzten 6 Monaten ein Antibiotikum eingenommen wurde.

Bei Teilnahme an der Studie wurde ein verschließbares Plastikbeutelchen ausgegeben, auf dem eine Pseudonymisierungsnummer auf einem Etikett als lesbarer Code und als Strichcode aufgeklebt waren. Für die Herstellung der Etiketten wurde eine wiederum eigens entwickelte Software verwendet, die Etiketten waren kälteunempfindlich bis zu  $-80$  Grad Celsius. In dem Plastikbeutelchen befanden sich je ein leeres verschließbares Plastikgefäß mit 50 ml (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz), ein Plastikbecher und ein steril abgepacktes Gefäß mit 10 ml destilliertem Wasser für die Mundwasserentnahme, ein Kryoröhrchen (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) und Gingival-Crevicular-Fluid (GCF)-Streifen für die Sulkusprobenentnahme und ein weiteres verschließbares Röhrchen und sterile Papierspitzen für die Entnahme der mikrobiologischen Proben. Alle 3 Aufbewahrungsbehältnisse waren ebenfalls mit Etiketten mit der Pseudonymisierungsnummer in lesbarer Form und als Strichcode versehen.

#### 2.5.1. Mundwasserentnahme

Der Patient spülte mit Leitungswasser für 30 Sekunden seinen Mundraum und spuckte anschließend die gesamte Flüssigkeit in die Speichale der Behandlungseinheit aus. Während einer einminütigen Zwischenzeit wurde die Probenflüssigkeit 10ml Aqua dest. vollständig in den beigelegten Becher vorgelegt und nach Ablauf dieser, dem Patienten zum Spülen (ohne Gurgeln) gereicht. Die Flüssigkeit sollte intensiv im Mundraum verteilt und möglichst durch die Zahnzwischenräume gepresst werden. Nach 30 Sekunden wurde die Flüssigkeit vollständig vom Patienten zurück in den Becher gespuckt. Der gesamte Inhalt des Bechers wurde vom Behandler in ein verschließbares 50 ml Röhrchen umgeschüttet. Dieses wurde in eine mit Namen und Geburtsdatum beschriftete Tüte gesteckt und zum pseudonymen Einlagern im Labor, abgeholt.

#### 2.5.2. Sulkusflüssigkeitsentnahme

Nach dem Erheben eines vollständigen Parodontalstatus, wurde an den tiefsten Sondierungstiefen eines jeden Quadranten eine Sulkusflüssigkeitsprobe entnommen. Dazu wurde ein steriler Gingival-Crevicular-Fluid (GCF)-Streifen entnommen. Die probennahen Zahnflächen wurden relativ getrocknet und vom Speichel befreit, wobei gleichzeitig ein Übertrocknen vermieden wurde.

Der GCF-Streifen wurde per Pinzette am blau markierten Ende gefasst und vom Träger abgezogen. Der GCF-Streifen wurde mit der nicht gefärbten Spitze in den Sulkus unter schwachem Druck, unvollständig eingeführt und für 30 Sekunden dort belassen. Die inserierten GCF-Streifen wurden nach der Verweildauer im Sulkus vorsichtig entnommen und möglichst ohne weitere Kontamination in ein Kryoröhrchen mit blau gekennzeichnetem Deckel gegeben.

## 2.6. Lagerung der Proben

Alle Proben mussten in einer Kühlbox im Raum C0.31 PC-Eingabe-Studenten zwischengelagert werden. Die Proben wurden aliquotiert und anschließend auf  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert. Bis zur Messung der Proben wurden diese bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingelagert.

## 2.7. Methode zur Messung der Interleukin 8 Konzentrationen

Für die Messung von Interleukinen können unterschiedliche Verfahren angewendet werden. Eines dieser Verfahren ist die, auf Antigen-Antikörper-Reaktionen basierende, Durchflusszytometrie. Es dient der Quantifizierung von Oberflächenmolekülen, Peptiden, DNA und intrazellulären Proteinen, die durch Fluoreszenzfarbstoffe markiert werden (gefärbte Einzelzellsuspension). Die durch einen fokussierten Laserstrahl geführten Zellen senden charakteristische Lichtsignale Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter) (FSC) und Seitwärtsstreulicht (Side Scatter) (SSC) aus. Dieses Streu- und Fluoreszenzlicht wird separiert erfasst und aufgezeichnet. Meist dienen Antikörper-gekoppelte Fluorophore zur Emission fluoreszierenden Lichts. Das FSC hängt vom Volumen der Zelle und damit der Beugung des Lichts ab. Das SSC ist ein Maß zur Brechung des Lichts im 90 Grad Winkel und beschreibt den Inhalt der Zelle (Vesikel, Granula, Struktur, Komplexität).

Der Aufbau eines Durchflusszytometers besteht aus einem Flüssigkeitssystem (Transport und Fokussierung), einer Optik mit Anregungsoptik und Erfassungsoptik und einer ganzen Reihe Elektronik. Die Zellen werden suspendiert und gelangen einzeln über das Flüssigkeitssystem durch eine Kapillare in die Durchflusszelle (flow cell), in der sie den Laserstrahl passieren. Eine Mantelflüssigkeit erzeugt eine laminare Strömung in der Durchflusszelle und eine Fokussierung der Probe durch eine Querschnittsverringerng in der Messküvette. Violette (405 nm), blaues (488 nm) und rotes (633 nm) Laserlicht wird von der Anregungsoptik ausgesandt. Zum Strahl geformt (Prismen), durch eine achromatische Fokussierungslinse gelangt der Strahl in die Durchflusszelle zu den dort passierenden Proben. Das emittierte Licht gelangt zur Erfassungsoptik, mit ihren zwei Detektorarrays, und wird von der verbauten Elektronik in ein, analog zum optischen, digitales Signal gewandelt. Die Daten werden von einem Computer empfangen, gespeichert und mithilfe der Software FCAP Array™ System Software Softflow ausgewertet. In der Studie wurde ein BD FACSCanto™ Durchflusszytometer verwendet, welches ebenfalls Bead-basierte quantitative Zytokinmessungen durchführen kann.

## 2. Material und Methode

Zur Messung der Zytokinkonzentration mit einem Durchflusszytometer wurde das von der Firma BD Biosciences vertriebene Cytometric Bead Array (CBA) verwendet. Zytokinspezifische Antikörper binden das zu detektierende Zytokin und einen markierten Zweitantikörper, welcher aufgrund der Markierung angeregt und detektiert werden kann. Die Zytokinmenge und die emittierte Fluoreszenzintensität verhalten sich proportional zueinander. Dadurch kann mit zuvor erstellten Standards auf die Zytokinkonzentration der jeweiligen Probe geschlossen werden. Die einzelnen Beads, mit ihren zwei individuell konzentrierten Fluoreszenzfarbstoffen können durch ihre individuelle Zusammenstellung nach der Anregung durch einen Laser über ihr emittiertes Lichtprofil unterschieden werden.

### 2.8. Messung der Interleukin 8 Konzentrationen

Die Zytokinkonzentration des IL-8 wurde mit einem Durchflusszytometer BD FACSCanto™ der Firma BD Biosciences (US-New Jersey, Franklin Lakes) gemessen. Alle obligaten Reagenzien zur Bestimmung des Zytokins IL-8 waren im Zytokin Flex Set und dem Master Buffer Kit der Firma BD Biosciences enthalten. Um die spätere Umrechnung der Zytokinkonzentration zu ermöglichen und zur Validierung des CBA-Verfahrens wurde zunächst eine Standardreihe aus lyophilisierten Standards hergestellt. Die Proben (Mundwasser und Sulkusflüssigkeit) wurden aufbereitet (siehe Anhang A.1). Analog wurde ein Detection Reagent Gemisch vorbereitet, welches für das Zytokin bestimmten PE-gekoppelten Nachweisantikörper enthielt. Zur Datenauswertung wurde die Software FCAP Array™ von BD Biosciences verwendet. Die Einstellungen des Bioanalyzers wurden aus der CBA-Anleitung übertragen. Die Software konnte automatisch aus der Standardreihe eine Standardkurve produzieren. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten konnten einzeln darauf bezogen werden und so die Konzentrationen des Zytokins IL-8 der Proben generiert werden.

### 2.9. Messung von Keimkonzentrationen

Es wurde das Parident™-Testsystem der AMPLEX Diagnostics GmbH (Gars am Inn, Deutschland) verwendet. Die Sulkusproben wurden auf ihre Keimkonzentration mit Hilfe eines Enzyme linked immuno-sorbent Assay (ELISA) untersucht. Es handelt sich um ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von spezifischen Antikörpern gegen das zu untersuchende Antigen. Die Parident™PCR-Reagenzien können in einer Polykinase Kettenreaktion (PCR)-Reaktion simultan über markierte Oligonukleotidprimer verschiedene DNS-Bereiche amplifizieren. Die erzeugten Amplifikate der zu untersuchenden Bakterien werden folgend mit verschiedenen Hybridisierungsmodulen visualisiert. Auf einer Polystyroloberfläche der Mikroplatten sind spezifische, einzelsträngige Sonden immobilisiert. Auf diese werden die Amplifikate der PCR, nachdem sie denaturiert (Hitze) wurden, gegeben. Durch die Hybridisierung komplementärer Sequenzen mittels eines Hybridisierungspuffers, konnten diese mittels ELISA-Prinzip detektiert werden. Dazu wurde nach mehreren stringenten Waschschritten ein Konjugat (Peroxidase) hinzugefügt, wel-

## 2.10. Durchführung der Messungen der Keimkonzentrationen

ches hochspezifisch an den Einzelstrang (an Oligonukleotidsonde gebunden) der PCR bindet. Nach Waschungen und Zugabe von Substratlösung erfolgt der Farbumschlag von blau nach gelb durch das Peroxidasekonjugat. Der Farbumschlag kann photometrisch ausgewertet werden. Die Anwesenheit bestimmter DNS-Bereiche und die damit verbundene Anwesenheit korrelierter Bakterienspezies wird durch positive Signale gezeigt.

## 2.10. Durchführung der Messungen der Keimkonzentrationen

Der molekulargenetische In-vitro-Test Parident™ ist ein Diagnostikum zum Nachweis sieben parodontalpathogener Keime:

- AA
- PG
- TF
- Parvimonas micra (PM)
- TD
- Prevotella intermedia (PI)
- Fusobacterium nucleatum (FN)

Alle Arbeitsschritte wurden nach dem Kit beiliegendem Originalprotokoll durchgeführt. Alle Proben wurden im Duplikat kontrolliert.

### 2.10.1. DNA-Isolation

Die Isolation der bakteriellen Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurde mit dem MagNA Pure LC (Firma: Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim) durchgeführt. Verwendete Kits, weitere Materialien und das Ablaufprotokoll sind im Anhang A.2 zu finden.

### 2.10.2. PCR zur Amplifizierung der bakteriellen DNA-Fragmente

Durch PCR wurden die spezifischen, bakteriellen DNA-Fragmente amplifiziert. Verwendete Kits, weitere Materialien und das Ablaufprotokoll sind im Anhang A.3 zu finden.

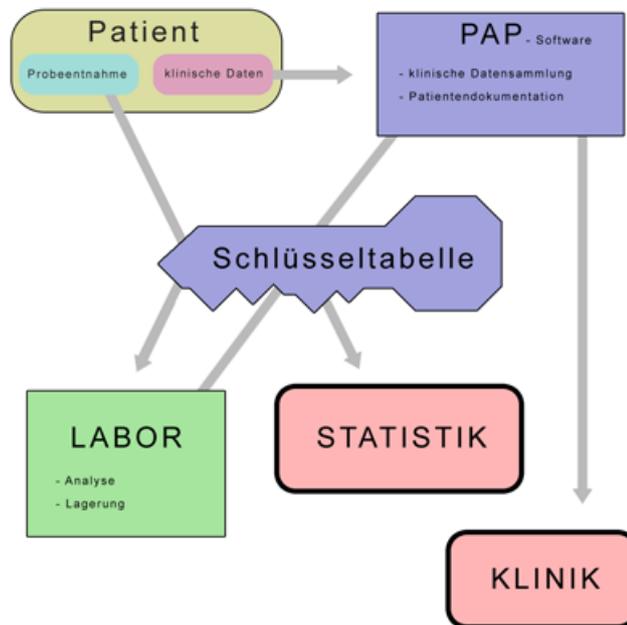
### 2.10.3. ELISA

Durch das ELISA wurde die bakterielle DNA zur spezifischen Detektion der bakteriellen Spezies nachgewiesen. Verwendete Kits, weitere Materialien und Ablaufprotokoll sind im Anhang A.4 zu finden.

## 2.11. Pseudonymisierung und Verknüpfung der Daten

Die abgenommenen Proben wurden pseudonymisiert gelagert und analysiert. Der Pseudonymisierungsvorgang (siehe Abbildung 2.5) wurde ausschließlich von einer beauftragten Laborantin durchgeführt. Jede Probe bekam eine Identifikationsnummer. Diese Zahlenfolge enthielt keine interpretierbaren Hinweise auf den Patienten und dessen Daten. Eine geschützte Schlüssel-tabelle diente der Zuordnung der Probe zur Person; dadurch wurden Identifikationsmerkmale und Labordaten getrennt und konnten nicht in die klinische Situation der Patienten einfließen.

Abbildung 2.5.: Pseudonymisierung - Schaubild



## 2.12. Importierung der Konzentrationswerte

Alle im Labor erhobenen Daten lagen in einem speziellen Format als Rohdaten vor. Das vom jeweiligen Gerät (ELISA / Durchflusszytometer) erzeugte Rohdatenformat wurde über eine dafür konstruierte Schnittstelle in die Datenbank importiert. Übertragungsfehler durch fehlerhafte Bedienung während des Imports der Rohdaten in die Datenbank, sowie beim Export für die statistischen Auswertungen konnten so ausgeschlossen werden. Die ermittelten Werte lassen sich jederzeit vollständig zurückverfolgen.

## 2.13. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS Version 23.0.0.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) verwendet. Alle Daten wurden per individuell entwickeltem Skript exportiert und in ein passendes Format (CSV) gebracht. Dieses Format wurde per integrierter Importfunktion in SPSS eingelesen. Alle Variablen wurden validiert, Metadaten wurden vorbereitet (gültige Werte definiert, Beschriftungen eingefügt, Messniveau bestimmt) und nötige Transformationen zur Durchführung der geplanten Modelle wurden ausgeführt.

Die angestrebte Testpower sollte mindestens 80% erreichen und ein Signifikanzniveau von 5% wurde erwartet. Mittels einer Post-hoc-Poweranalyse wurden Fehler 2. Art in den Modellen Mundwasser und Sulkusflüssigkeit überprüft.

Die IL-8-Konzentrationen waren nicht normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov-Test) und wurden mit dem nicht-parametrischen Man-Whitney-U-Test verglichen. Der Man-Whitney-U-Test ermittelt an rangsortierten Werten, ob zwei Gruppen aus der gleichen Grundgesamtheit entstammen. Alle Werte beider Gruppen werden in aufsteigende Reihenfolge gebracht, wodurch der kleinste Wert den niedrigsten Rang erhält. Beide Gruppen werden wieder getrennt und anhand der Rangsummen wird die Null-Hypothese, beide Stichproben entstammen der gleichen Grundgesamtheit, getestet. Entstammen beide Stichproben der gleichen Grundgesamtheit, so werden sich die mittleren Ränge beziehungsweise die Rangsummen kaum unterscheiden. Der Man-Whitney-U gibt an, wie viele Werte der ersten Gruppe einem Wert der zweiten Gruppe vorausgehen. Daraus wurde eine asymptotische Signifikanz berechnet. Die relativ primitive Information der mittleren Ränge wird so erweitert und kann nun anhand der berechneten Signifikanz bewertet werden. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $<5\%$  ( $p < 0,05$ ) wurde als signifikant betrachtet. Zusätzlich wurde Wilcoxon's W berechnet. W gibt die Rangsumme der kleineren Gruppe an. Mehrere unabhängige Stichproben wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test verglichen (z.B.: tSD in Gruppen); auch als Rangvarianzanalyse bekannt. Es werden wie beim Man-Whitney-U-Test Ränge gebildet und diese miteinander verglichen. Anhand des Wertes Kruskal-Wallis-H, der annähernd Chi-Quadrat verteilt ist, wird ein Signifikanzwert für die Nullhypothese berechnet. Außerdem werden die durchschnittlichen Ränge, die Anzahl der Fälle und die Anzahl der Freiheitsgrade angegeben. Muss die Null-Hypothese verworfen werden, lässt die Alternativhypothese lediglich darauf schließen, dass mindestens eine Gruppe zu den anderen unterschiedlich ist. Die Gruppen der männlichen und weiblichen Nichtraucher und Raucher wurden mit diesem Test verglichen. Ebenfalls wurde der Test auf die Gruppe RNR-3 angewandt. Korrelationen wurden mit Spearmans Rangkorrelationskoeffizient untersucht, z.B.: IL-8-Konzentrationen zu PG-Status.

Drei Modelle der multiplen linearen Regressionsanalyse wurden berechnet. Die Einschluss-Modelle (ENTER) enthielten unabhängige Variablen aus den Bereichen: Anamnesedaten, Parodontaldaten und Keime. Die Einschluss-Methode fügte alle Variablen gleichzeitig in die Modelle ein. Jede Variable wurde bewertet, als ob sie nach allen anderen unabhängigen Variablen eingegeben worden wäre. Sie wurde anhand dessen bewertet, was sie zur Vorhersage der abhängigen Variable leistete, die sich von den Vorhersagen der anderen in das Modell eingegebenen Variablen un-

## *2. Material und Methode*

terschieden. Die abhängigen Variablen sind IL-8-Mundwasser- und IL-8-Sulkusflüssigkeitswerte. Regressiert wurde auf die entsprechenden Variablen in den drei Modellen (siehe 3.7, 3.9 und 3.8).

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Studienpopulation

Das Kollektiv bestand aus insgesamt 250 Patienten. 113 Personen waren weiblichen, 137 Personen waren männlichen Geschlechts (Verhältnis 45,2 % zu 54,8 %). Der Altersdurchschnitt lag bei 49,56 Jahren (9,751 Standardabweichung). Der jüngste Patient war 20 Jahre alt, der älteste war 64 Jahre alt. Nähere Angaben zu Körpergewicht, Körpergröße, BMI, Alter, detaillierte Aufschlüsselung in Altersdekaden und gängigen Body-Mass-Index-Grenzen, Verteilung nach Herkunft und sozioökonomische Informationen zu Schulabschluss, Berufsausbildung, ständiger Lebenspartnerschaft und Lebensverhältnisse sind dem Anhang zu entnehmen (siehe Tabellen C.2, C.3, C.4, C.5, C.6, C.7, C.8). Die Patienten des Kollektives waren zu 79,6 % kaukasischer Herkunft. 107 Patienten des gesamten Kollektivs, damit 42,8%, waren aktive Raucher. Unter den 143 Nichtraucher waren 49 ehemalige Raucher (19,6%) vertreten. Aktive Raucher erreichten im Mittel 19,93 packyears (ehemalige Raucher = 16,51 packyears) und rauchten im Schnitt pro Tag 14,95 Zigaretten pro Tag (ehemalige Raucher = 17,45 Zigaretten pro Tag). Genauere Informationen zum Zigarettenkonsum kann den Tabelle C.9 und C.10 entnommen werden. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität bewilligt (Nr. 025-11).

In der gesamten Studienpopulation lag anamnestisch keine Schwangerschaft vor. Patienten mit Diabetes Typ I, Diabetes Typ II, Diabetes Typ II (medikamentepflichtig) und Patienten die eine Immunsuppression angaben wurden kategorisch ausgeschlossen (siehe Ethikantrag). Ob eine Parodontitis in der Familie aufgetreten oder bekannt sei, bejahten 89 Patienten (35,6 %), 82 Patienten (32,8%) negierten die Frage und 79 Patienten (31,6 %) gaben an es nicht zu wissen. Der subjektive Stresslevel wurde abgefragt. Dieser kann gegliedert in Raucher und Nichtraucher der Grafik 3.1 entnommen werden. Der mittlere Stresslevel unterschied sich zwischen den Gruppen nur gering und zeigte keine statistische Stabilität, dennoch konnte bei Rauchern ein leicht erhöhter mittlerer Stresslevel berechnet werden (5,00 bei Rauchern zu 4,57 bei Nichtrauchern). Bei Stratifizierung der Nichtraucher in zwei Untergruppen (absolute Nichtraucher 4,51 und ehemalige Raucher 4,69) zeigten sich ähnliche Werte.

Im Mittel fehlten den Patienten des Studienkollektivs 7,52 Zähne im gesamten Gebiss und 4,49 Zähne ohne Einbezug der Weisheitszähne. Die Verteilung der fehlenden Zähne ist anschaulich in den Grafiken 3.2 und 3.3 dargestellt. Die oberen Weisheitszähne waren zu ca. 20%, die unteren zu ca. 28,5% vorhanden.

### 3. Ergebnisse

Abbildung 3.1.: Stresslevel (subjektiv)

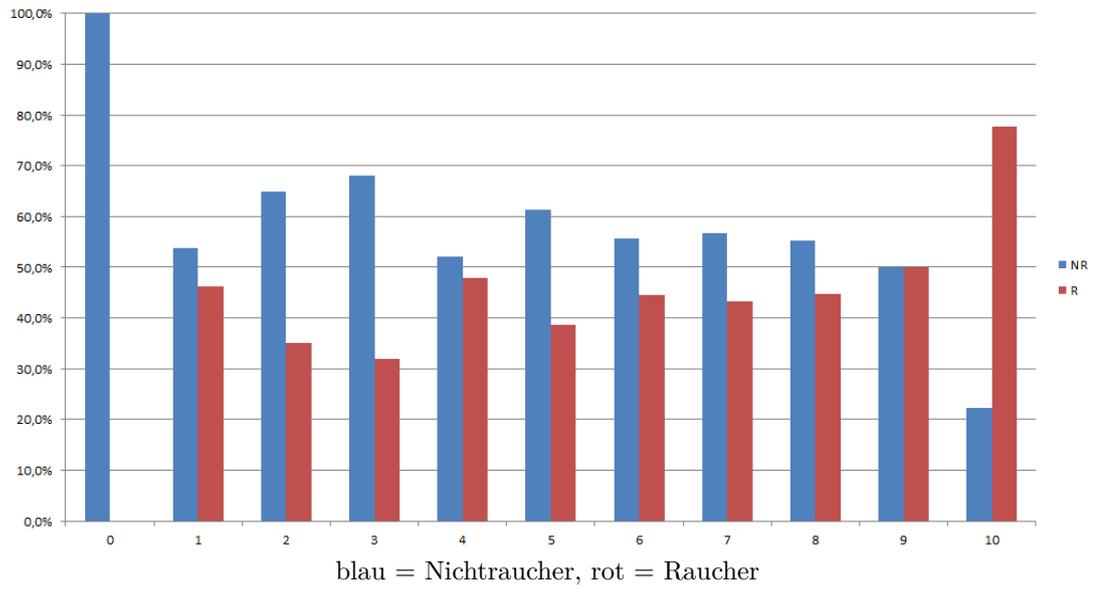
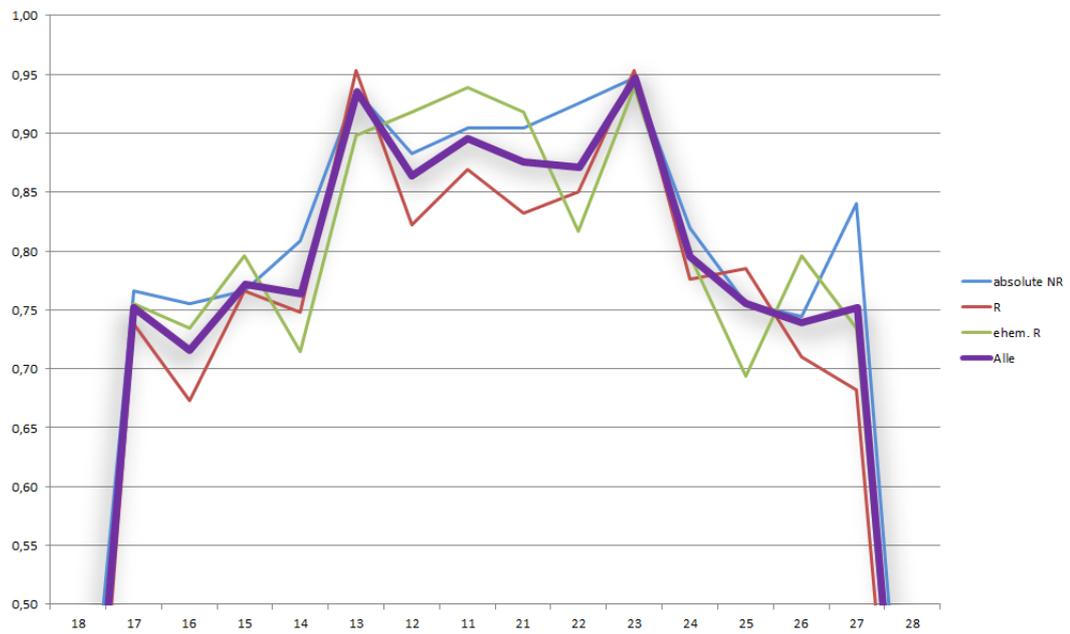
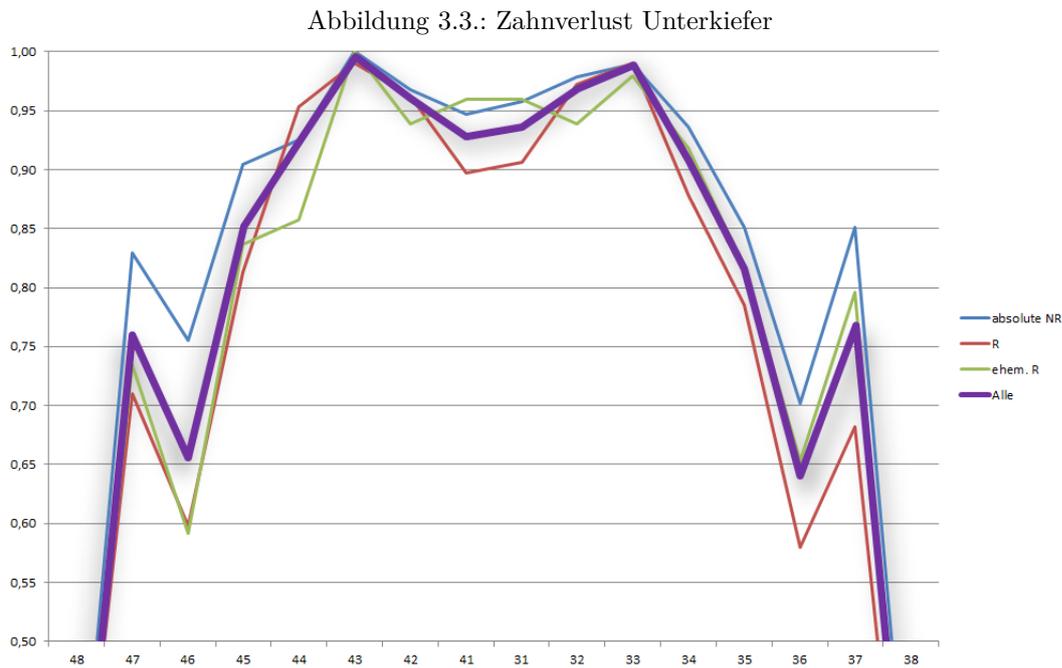


Abbildung 3.2.: Zahnverlust Oberkiefer





### 3.2. Analyse und Behandlung von Extremfällen bei Interleukin-8-Werten

Initial waren 250 vollständige Patientenfälle in den Daten vorhanden. Die Variablen IL-8-Sulkusflüssigkeit und IL-8-Mundwasser zeigten einzelne Fälle mit Extremwerten auf. Diese Extremwerte wurden als Ausreißer klassifiziert und entfernt, um die Ergebnisse nicht zu beeinflussen. Als Ausreißer wurden alle Werte, die um die vierfache Standardabweichung vom Mittelwert (siehe Gleichung 3.1) abwichen, definiert. Initiale Werte können der Tabelle 3.1 entnommen werden. Die Grenzen lagen bei 1911,98 pg/ml für Sulkuswerte und 1340,87 pg/ml bei Werten für Mundwasser. Es wurden insgesamt sieben Fälle aus dem Datensatz entfernt (zwei Ausreißer im Sulkusfluid, vier im Mundwasser). Die deskriptiven Werte des bereinigten Datensatzes können der Tabelle

### 3. Ergebnisse

Tabelle 3.1.: Deskriptive Statistik der initialen IL-8-Daten

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
IL8-Mundwasser	232	0,00	2075,50	202,5163	284,58822
IL8-Sulkus	249	0,00	5917,59	202,3139	427,41542

N = Anzahl

Tabelle 3.2.: Deskriptive Statistik der von Ausreißern bereinigten IL-8-Daten

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
IL8-Mundwasser	228	0,00	1187,59	175,0842	193,9999
IL8-Sulkus	247	0,00	1233,24	171,3983	188,2255

N = Anzahl

3.2 entnommen werden.

$$G = 4 \times s + m$$

$$G_M = 4 \times 284,58822 + 202,5163 = 1340,87$$

$$G_S = 4 \times 427,41542 + 202,3139 = 1911,98$$

mit  $G$  = ermittelte Grenze für Ausreißer (3.1)

$G_M$  = ermittelte Grenze (Mundwasser)

$G_S$  = ermittelte Grenze (Sulkusflüssigkeit)

$s$  = Standardabweichung

$m$  = Mittelwert

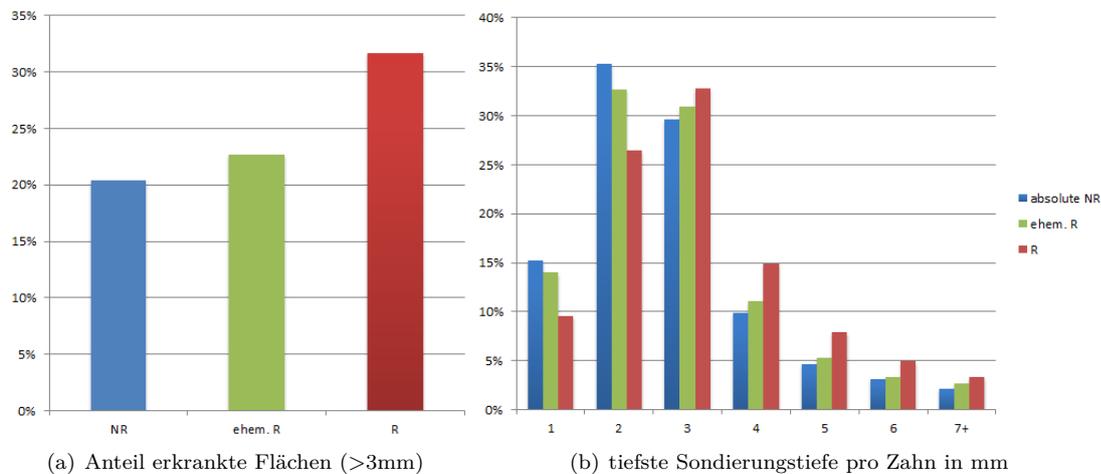
## 3.3. Klinische Daten

### Verteilung Sondierungstiefen

Aktive Raucher zeigten prozentual die meisten erkrankten Flächen (Sondierungstiefe > 3mm) an (siehe Grafik 3.4 (a)). Nichtraucher hatten im Durchschnitt nur 20,42 % (mittlerer Rang = 106,37) erkrankte Flächen, im Gegensatz zur Gruppe der Raucher mit 31,67 % (mittlerer Rang = 146,14). Die Gruppe der ehemaligen Raucher lag zwischen den beiden Gruppen mit 22,64 % (mittlerer Rang = 117,13). Die Gruppen gehörten nicht der gleichen Grundgesamtheit an, sie unterschieden sich statistisch signifikant ( $p=0,000$ , Kruskal-Wallis-Test).

Die Grafik 3.4 (b) zeigt die durchschnittliche Verteilung der tiefsten Sondierungstiefe (6-Punktmessung) pro Zahn bei Nichtrauchern, ehemaligen Rauchern und Rauchern auf (Gruppeneinteilung RNR-3). Raucher zeigten deutlich mehr Anteile an tiefen Sondierungstiefen, absolute Nichtraucher hingegen mehr Anteile niedriger Sondierungstiefen auf. Ehemalige Raucher lagen zwischen den

Abbildung 3.4.: Klinische Parameter (Gruppen RNR-3)



Gruppen, mit tendenzieller Annäherung an die Gruppe der absoluten Nichtraucher. Die Gruppen unterschieden sich signifikant bei 1 mm ( $p=0,001$ ), 2 mm ( $p=0,000$ ), 4 mm ( $p=0,000$ ) und 5 mm ( $p=0,005$ ).

Wurden die ehemaligen Raucher den Nichtrauchern zugeordnet, so ergab sich ein ähnliches Bild der Verteilung (siehe Grafik 3.5). Der Anteil erkrankter Flächen unterschied sich signifikant zwischen Rauchern und Nichtrauchern ( $p=0,000$ ) und Frauen und Männern ( $p=0,037$ ) (siehe Grafik 3.5 (a)). Die tiefsten Sondierungstiefen zwischen Männern und Frauen unterschieden sich nur zum Teil signifikant. Frauen wiesen vermehrt Anteile an 1 mm ( $p=0,015$ ) und verminderte Anteile bei 4 mm ( $p=0,024$ ) und 6 mm ( $p=0,034$ ) auf. Die restlichen Werte waren nicht signifikant, jedoch waren die prozentualen Anteile für Männer ab Sondierungstiefen von 3 mm generell höher. Raucher zeigten im Vergleich, wie in Abbildung 3.4 (b) ersichtlich, ebenfalls erhöhte Anteile tieferer Sondierungstiefen pro Zahn bei den höheren Werten auf. Signifikant waren die Unterschiede für die Werte 1 mm ( $p=0,000$ ), 2 mm ( $p=0,000$ ), 4 mm ( $p=0,000$ ) und 5 mm ( $p=0,002$ ). Die mittleren Ränge für 6 mm und 7+ mm waren ebenfalls erhöht, jedoch statistisch nicht signifikant ( $p=0,093$  und  $p=0,324$ ). Bei 3 mm kam es zur Inversion der Verhältnisse.

### BOP, Blutung und Plaque nach Rauchstatus

Die Abbildung 3.6 (a) zeigt die prozentuale Verteilung der Parameter Blutung, Plaque und BOP auf Grundlage einer 6-Punktmessung zur Gruppeneinteilung RNR-3. Statistisch signifikant konnte nur eine unterschiedliche Gruppe ( $p=0,020$ ) und zwar für den Parameter Blutung berechnet werden. Raucher zeigten hier eine verminderte Blutung. Beim BOP-Parameter lag das p-value grenzsignifikant bei 0,072 (Kruskal-Wallis-Test). Raucher hatten einen mittleren BOP-Index von 33,77 %, absolute Nichtraucher 35,97 % und ehemalige Raucher zeigten den höchsten Wert mit 41,46 %. Der Plaqueindex war bei Rauchern am höchsten (53,95 %), gefolgt von der Grup-

### 3. Ergebnisse

Abbildung 3.5.: Klinische Parameter (Gruppe RNR und nach Geschlecht)

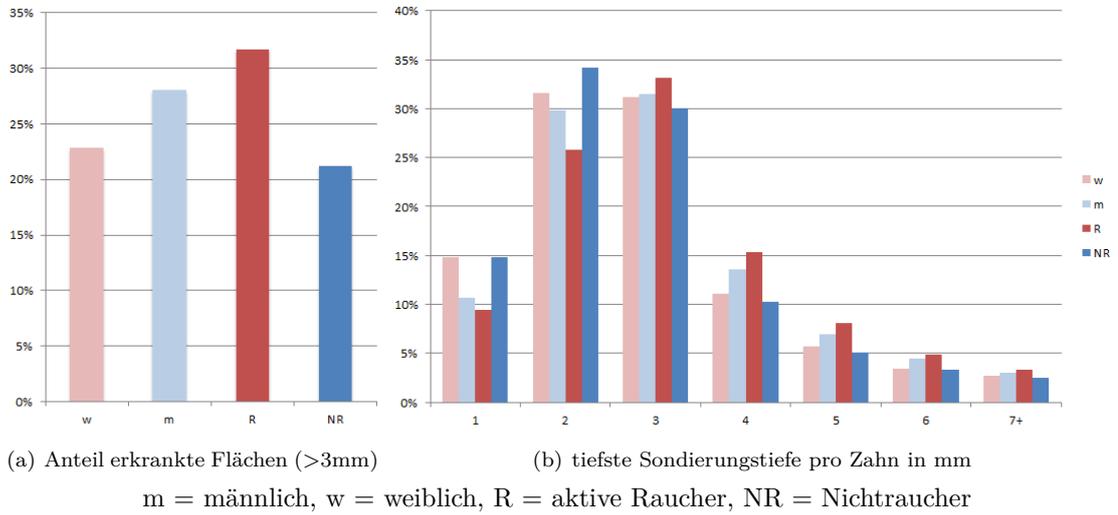
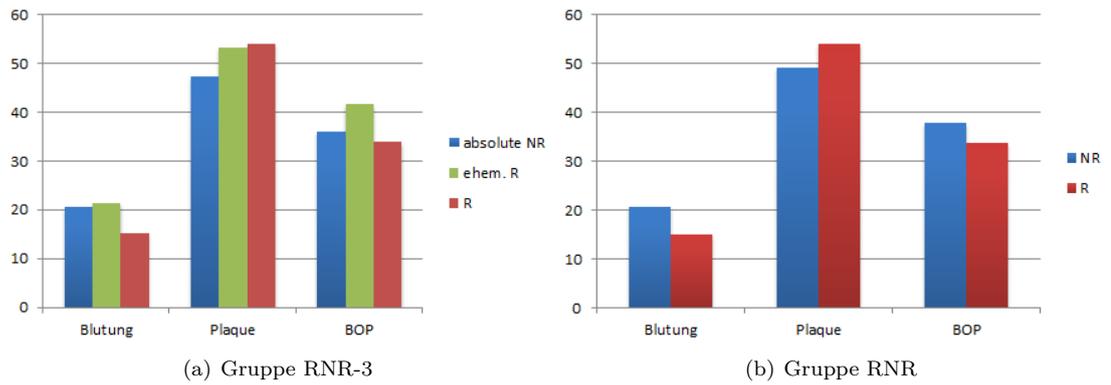
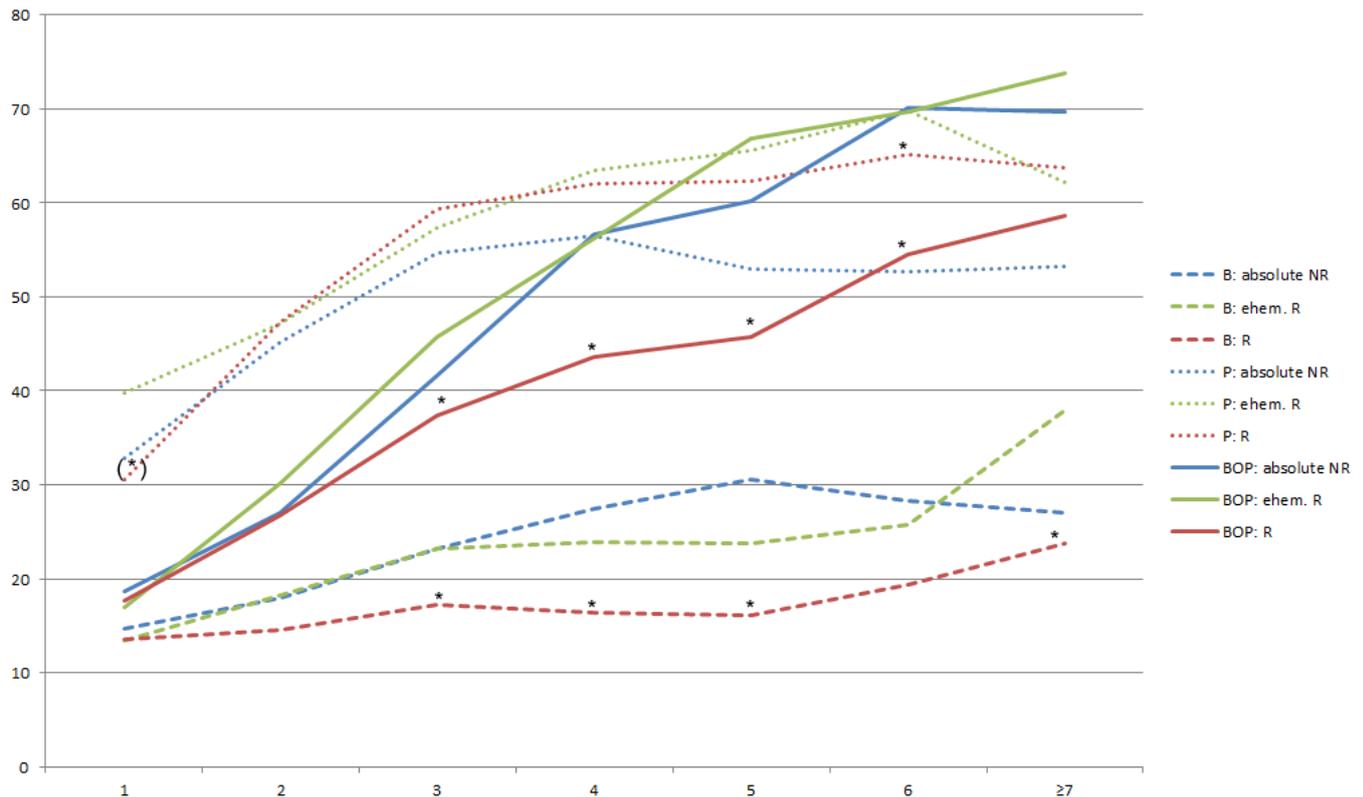


Abbildung 3.6.: Blutung-, Plaque- und BOP-Verteilung



pe der ehemaligen Raucher (53,09 %) und deutlich niedriger die Nichtraucher (47,26 %). Es konnten keine statistisch stabilen Unterschiede berechnet werden ( $p=0,099$ ). Wurden die ehemaligen Raucher zu den Nichtrauchern gezählt, so konnten ähnliche Verhältnisse dargestellt werden (siehe Abbildung 3.6). Der Blutungsunterschied war mit  $p=0,005$  statistisch signifikant, BOP- ( $p=0,090$ ) und Plaque ( $p=0,105$ )-Verteilung unterschieden sich nicht beweisbar.

Abbildung 3.7.: Blutung-, Plaque- und BOP-Verteilung (%) bezogen auf Sondierungstiefen (mm)



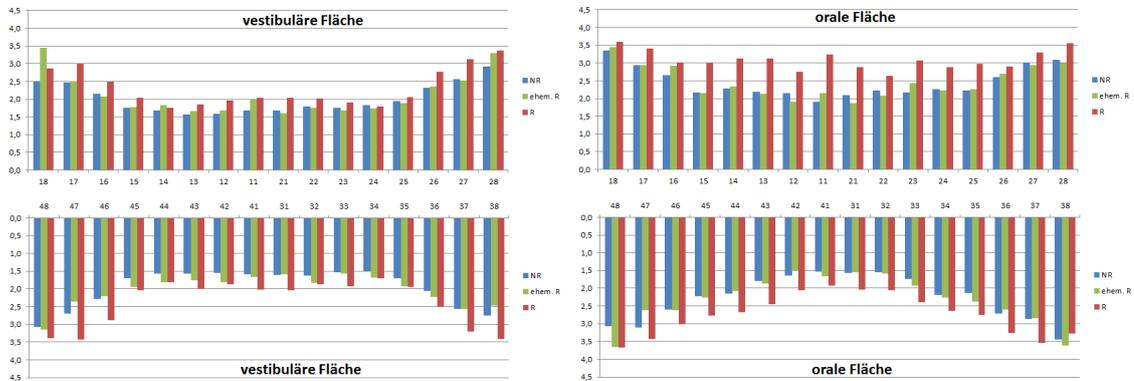
B = Blutungswerte, P = Plaqueswerte, BOP = Blutung auf Sondierungswerte, absolute NR = absolute Nichtraucher (RNR-3), ehem. R = ehemalige Raucher (RNR-3), R = Raucher (RNR-3)

Der Abbildung 3.7 kann die prozentuale Verteilung der klinischen Parameter Plaque-, Blutungs- und BOP-Messungen aufgeteilt nach Sondierungstiefe entnommen werden. Ob ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen vorlag, wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test ermittelt und ab einem Signifikanzniveau unter  $p < 0,05$  mit einem Sternchen gekennzeichnet. Der BOP-Index unterschied sich bei Rauchern signifikant bei Werten von 3 mm bis 6 mm ( $p=0,043$ ,  $p=0,001$ ,  $p=0,000$ ,  $p=0,005$ ) und war durchgehend vermindert. Raucher zeigten somit eine verminderte Blutungsneigung auf Sondierung. Ähnliche Tendenz zeigte der Blutungsindex, hier waren die Werte bei 3 mm ( $p=0,042$ ), 4 mm ( $p=0,004$ ), 5 mm ( $p=0,003$ ) und 7+ mm ( $p=0,037$ ) signifikant. Der Plaqueindex zeigte lediglich bei einer Sondierungstiefe von 6 mm ( $p=0,022$ ) einen

### 3. Ergebnisse

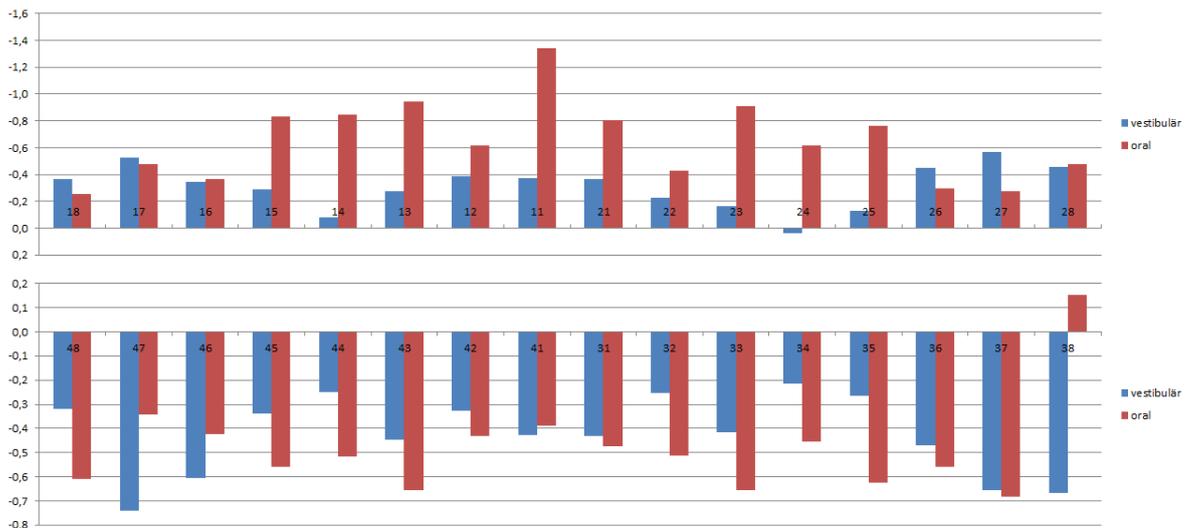
signifikanten Wert an. Allgemein wiesen Nichtraucher niedrigere Werte als ehemalige und aktive Raucher auf.

Abbildung 3.8.: Sondierungstiefen im Flächenvergleich der medialen Flächen



Es wurden nur zwei Flächen pro Zahn berücksichtigt: oral und vestibulär.

Abbildung 3.9.: Differenz zwischen Nichtrauchern und Rauchern (nur mediale Flächen)



Es wurden nur zwei Flächen pro Zahn berücksichtigt: oral und vestibulär. Ehemalige Raucher wurden nicht berücksichtigt (NR - R)

Das Rauchverhalten wurde in Bezug auf die Ausprägung der Sondierungstiefen jedes Zahnes und jeder Fläche untersucht. Um eine bessere topografische Übersicht zu erhalten, wurden in Abbildung B.1 (siehe Anhang) alle drei oralen (mesiooral, oral und distooral) und alle drei vestibulären Flächen (mesiovestibulär, vestibulär und disto-vestibulär) zusammengefasst und als Durchschnittsangabe ausgewertet. In Abbildung 3.8 wurde nur die (medio)orale und die (medio)vestibuläre Fläche berücksichtigt. In beiden Darstellungen stellte sich eine erhöhte Sondie-

rungstiefe bei Rauchern, vor allem im Bereich der oralen Flächen im Oberkieferfrontzahn- und Prämolarenbereich, im Vergleich zu Nichtrauchern und ehemaligen Rauchern dar. Tendenziell waren Nichtraucher am geringsten betroffen, ehemalige Raucher lagen in der Schwere der Ausprägung der Sondierungstiefen zwischen der Gruppe Raucher und der Gruppe absolute Nichtraucher.

Die Abbildungen B.2 (siehe Anhang) und 3.9 zeigen die Differenzen zwischen absoluten Nichtrauchern und Rauchern pro Zahn für die jeweiligen Flächen. In Abbildung 3.9 ist die deutlich stärkere Ausprägung der Sondierungstiefen bei Rauchern im palatinalen Bereich zwischen Zahn 15 und Zahn 25 im Gegensatz zu absoluten Nichtrauchern zu erkennen.

#### **Verteilung fehlender Zähne nach Rauchstatus**

Die prozentuale Verteilung fehlender Zähne bei parodontal erkrankten Rauchern sowie Nichtrauchern ist sehr ähnlich verteilt. Die Linie der sich in situ befindlichen Zähne (siehe Abbildung 3.2 und 3.3) ist bei Rauchern (rote Linie) in der Gesamtansicht am tiefsten und bei den Nichtrauchern (blaue Linie) am höchsten gelagert, was zeigt, dass im Mittel bei der Gruppe der Raucher weniger Zähne in situ verblieben sind. Außerdem ist die Gruppe der Raucher jünger und weist dadurch auf einen früher eintretenden oder progredienter fortschreitenden parodontalpathogenen Prozess hin. Im Mittel fehlten absoluten Nichtrauchern 20,28 %, ehemaligen Rauchern 24,11 % und Rauchern 26,05 % ihrer Zähne. Parodontal erkrankte Patienten mit positivem Rauchstatus sind nicht nur jünger sondern auch schwerer betroffen als nicht rauchende Patienten.

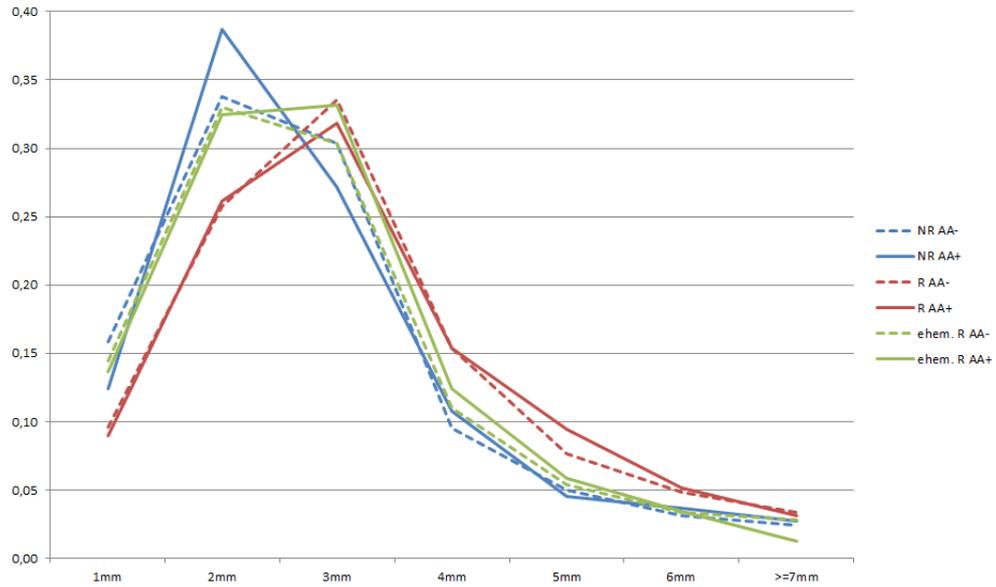
#### **Dichotome Keimlast (AA,PG) nach Rauchstatus**

Zwischen Rauchern und Nichtrauchern gab es keine signifikanten Unterschiede im Vergleich bezogen des Keimes AA (Gruppe RNR: R = 23,36 %, NR = 19,58 %,  $p=0,470$ ) (Gruppe RNR-3: R3 = 23,36 %, eR3 = 14,29 %, NR3 = 22,34 %,  $p = 0,413$ ). Die Durchseuchung des Keimes PG zeigte sich ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen, jedoch war der prozentuale Anteil insgesamt deutlich höher, als bei AA ausgefallen (Gruppe RNR: R = 60 %, NR = 69 %,  $p=0,123$ ) (Gruppe RNR-3: R3 = 60 %, eR3 = 71 %, NR3 = 65 %,  $p = 0,236$ ).

Die Abbildungen 3.10 und 3.11 sollen den Einfluss der Keime und des Rauchverhaltens auf die klinische Situation der Sondierungstiefen veranschaulichen. Vor allem beim Vorliegen des Keim PG konnte eine konsistente Beobachtung gemacht werden. Im Bereich 1mm und 2 mm liegen die keimnegativen Verteilungen der Sondierungstiefen immer höher, als bei den keimpositiven Werten. Dieser Sachverhalt dreht sich bei 3 mm um und Sondierungstiefen größer gleich 4 mm sind öfter keimpositiv als keimnegativ ausgefallen. Aktive Raucher zeigen das gleiche Verhalten zu den anderen Gruppen. Dies lässt sich für die Beobachtungen bei AA weniger gut, wie beim Keim PG darstellen. Der Rauchstatus und die Keimbelastung nehmen Einfluss auf die Verteilung der pathologischen Sondierungstiefen.

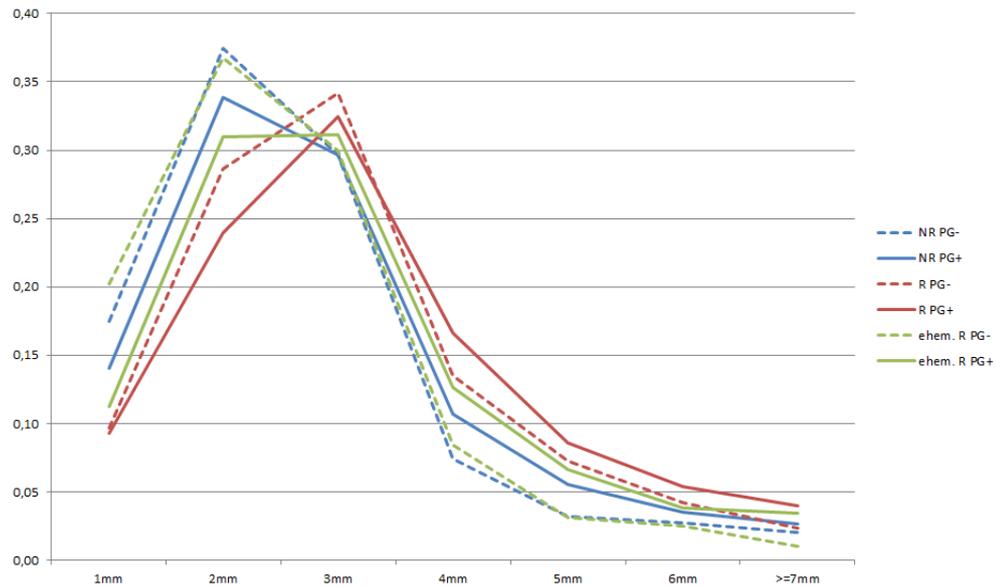
### 3. Ergebnisse

Abbildung 3.10.: Verteilung der Sondierungstiefen nach AA- und Rauchstatus



Gruppeneinteilung RNR-3; NR = Nichtraucher, R = aktive Raucher, ehem. R = ehemalige Raucher

Abbildung 3.11.: Verteilung der Sondierungstiefen nach PG- und Rauchstatus



Gruppeneinteilung RNR-3; NR = Nichtraucher, R = aktive Raucher, ehem. R = ehemalige Raucher

## 3.4. Interleukin 8 Konzentrationen

### 3.4.1. Sulkusflüssigkeit

#### Unterschied Nichtraucher und Raucher

Die IL-8-Konzentration wurde im Patientenkollektiv gemessen und statistisch ausgewertet (siehe Abbildung 3.12). 247 Patienten konnten in den Test einbezogen werden, davon 141 Nichtraucher mit einem mittleren Rang von 135,28 (Rangsumme 19075,00) und 106 Raucher mit einem mittleren Rang von 108,99 (Rangsumme 11553,00). Der Mann-Whitney-U betrug 5882,000, der Wilcoxon-W lag bei 11553,000. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist hochsignifikant mit einem p-value von 0,004. Nichtraucher zeigten einen Mittelwert von 197,98 pg/ml mit einer Standardabweichung von 210,211 pg/ml. Raucher hatten einen Mittelwert von 136,04 pg/ml mit einer Standardabweichung von 147,90 pg/ml. Es zeigte sich eine signifikant höhere IL-8-Konzentration bei Nichtrauchern im Vergleich zu Rauchern.

Wurde in die Gruppe RNR-3 unterteilt konnte ebenfalls ein statistisch signifikantes Ergebnis errechnet werden ( $p=0,013$ ). Aktive Raucher hatten den niedrigsten mittleren Rang mit 108,99 und einen Mittelwert von 136,04 pg/ml. Ehemalige Raucher zeigten die höchsten Werte mit 140,82 beim mittleren Rang und 200,80 pg/ml beim Mittelwert. Absolute Nichtraucher zeigten ähnliche Werte wie die ehemaligen Raucher mit einem Mittelwert von 196,52 pg/ml und einem mittleren Rang von 132,42. Mit dem Kruskal-Wallis-Test wurde die Nullhypothese verworfen, dass alle Gruppen aus der gleichen Grundgesamtheit stammen. Mindestens eine Gruppe unterscheidet sich statistisch signifikant von den anderen.

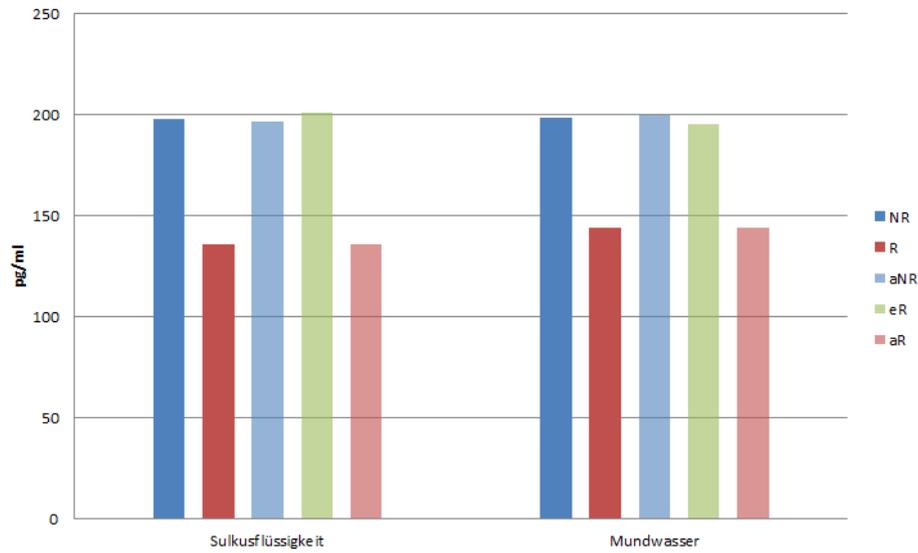
#### Unterschied zu klinischen Parametern

Zu den klinischen Parametern wurde unter anderem die tiefste Sondierungstiefe pro Patient berechnet und herangezogen. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen an ( $p=0,017$ ). Die Ergebnisse können der Abbildung 3.13 entnommen werden. Die Mittelwerte zeigten annähernd positiv-lineare Verhältnisse zwischen tiefer werdender durchschnittlicher Sondierungstiefe und ansteigender mittlerer IL-8-Konzentrationen in der Sulkusflüssigkeit an. Ebenfalls konnte durch bivariate Korrelation ein positiver Zusammenhang zwischen durchschnittlicher Sondierungstiefe (nicht stratifiziert, sondern absolute Werte) und gesteigerter IL-8-Konzentration aufgezeigt werden. Die zweiseitige Signifikanz ergab einen Wert von 0,026. Der Korrelationswert nach Pearson war positiv und lag bei 0,142. Ebenfalls war eine signifikante bivariate Korrelation zwischen der tiefsten gemessenen Sondierungstiefe eines Patienten und der gemessenen IL-8-Konzentration zu finden ( $p=0,000$ , Korrelationswert nach Pearson = 0,230).

Die Ergebnisse der BOP-, Plaque- und Blutungswerte nach Stratifikation in Bezug auf die IL-8-Konzentration können den Abbildungen 3.14 (a), (b) und (c) und der Tabelle 3.3 entnommen werden. Die IL-8-Konzentration stieg mit höherer BOP-Gruppe signifikant an (Alle:  $p=0,002$ , RNR:  $p=0,003$ ). Dieses Ergebnis konnte auch für die Blutungsgruppe beobachtet werden (Alle:

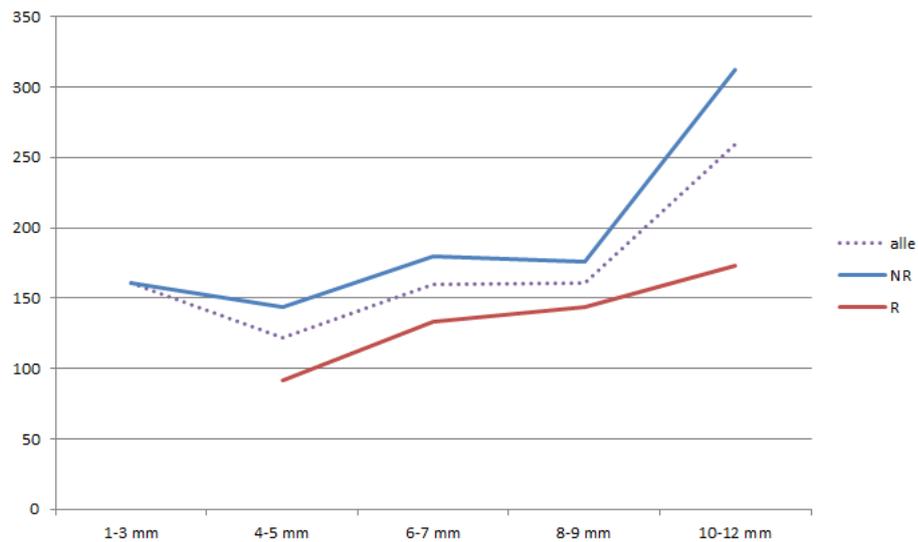
### 3. Ergebnisse

Abbildung 3.12.: IL-8-Konzentrationen in pg/ml



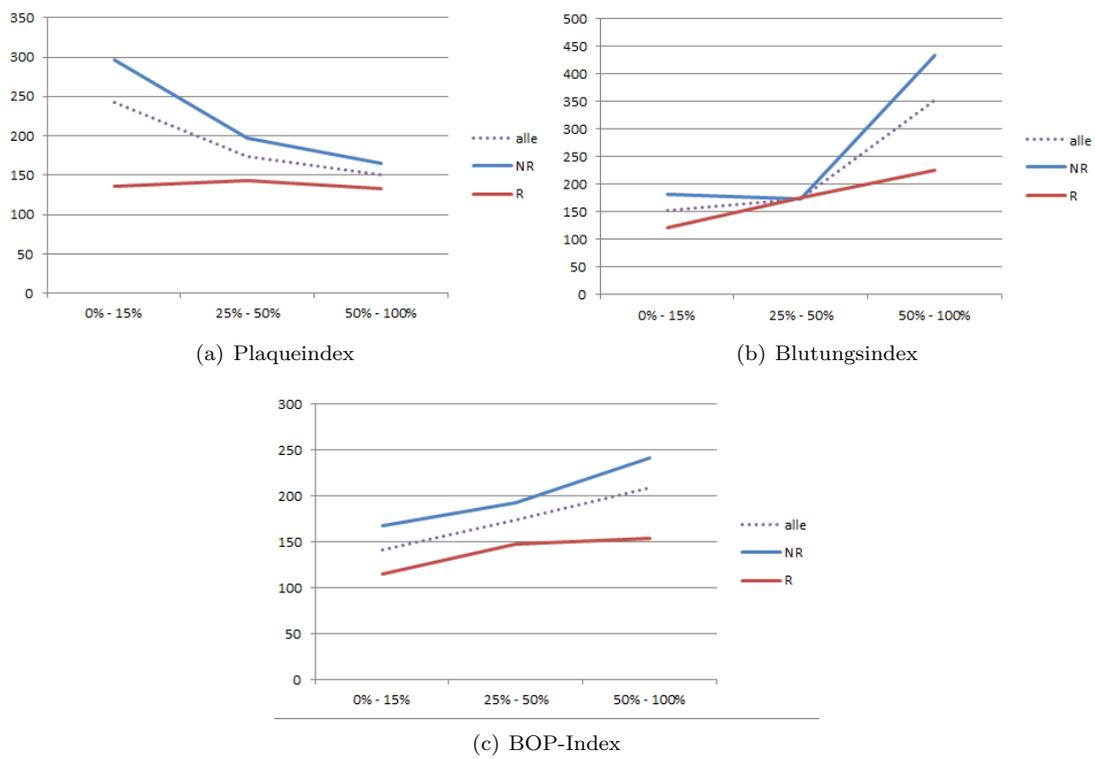
NR = Nichtraucher (Gruppe RNR), R = Raucher (Gruppe RNR), aNR = absolute Nichtraucher (Gruppe RNR-3), eR = ehemalige Raucher (Gruppe RNR-3), aR = aktive Raucher (Gruppe RNR-3)

Abbildung 3.13.: IL-8-Konzentrationen in pg/ml zur maximalen Sondierstiefe pro Patient in Gruppen zusammengefasst (Sulcusflüssigkeit)



### 3.4. Interleukin 8 Konzentrationen

Abbildung 3.14.: Il-8 Konzentrationen (pg/ml) zu Plaque-, Blutungs- und BOP-Index



### 3. Ergebnisse

Tabelle 3.3.: IL-8-Konzentration im Sulkusfluid nach BOP-, Plaque- und Blutungsgruppen

	Gruppe	N	Mittelwert alle	N	Mittelwert Nichtraucher	N	Mittelwert Raucher
BOP	0-25%	84	141,19	42	167,48	42	114,90
	25-50%	104	174,31	62	192,30	42	147,76
	50-100%	59	209,28	37	242,12	22	154,04
	p-value	247	0,002	141	0,003	106	0,003
Plaque	0-25%	38	241,83	25	296,78	13	136,17
	25-50%	71	173,89	40	197,48	31	143,44
	50-100%	138	150,72	76	165,74	62	132,32
	p-value	247	0,230	141	0,017	106	0,017
Blutung	0-25%	170	151,48	86	180,76	84	121,50
	25-50%	59	173,56	44	172,81	15	175,75
	50-100%	18	352,47	11	433,29	7	225,48
	p-value	247	0,000	141	0,000	106	0,000

N = Anzahl, BOP = Bleeding on probing, Mittelwerte in pg/ml

p=0,000, RNR: p=0,000). Der Plaqueindex zeigte keinen statistisch auswertbaren Zusammenhang mit der IL-8-Konzentration. Raucher zeigten wie bereits oben beobachtet ein erniedrigtes IL-8-Konzentrationsniveau.

#### Keime PG und AA

In der Sulkusflüssigkeit konnten keine statistisch stabilen IL-8-Konzentrationsunterschiede bei Anwesenheit von PG noch AA festgestellt werden (siehe Tabelle 3.4. Der Mittelwert der IL-8-Konzentration lag bei Abwesenheit von AA bei 163,90 pg/ml (Std.abw. 185,97 pg/ml) und bei Anwesenheit bei 198,86 pg/ml (Std.abw. 195,60 pg/ml). Der Mittelwert der IL-8-Konzentration lag bei Abwesenheit von PG bei 152,22 pg/ml (Std.abw. 170,08 pg/ml) und bei Anwesenheit bei 181,64 pg/ml (Std.abw. 196,98 pg/ml).

#### 3.4.2. Mundwasser

##### Nichtraucher und Raucher

Die IL-8-Konzentration wurde im Mundwasser gemessen und statistisch ausgewertet (siehe Abbildung 3.12). 228 Patienten konnten bei den Mundwasserproben ausgewertet werden, davon 131 (57,46 %) Nichtraucher mit einem mittleren Rang von 122,40 (Rangsumme 16035,00) und 97 (42,54 %) Raucher mit einem mittleren Rang von 103,82 (Rangsumme 10071,00). Der Mann-Whitney-U betrug 5318,000, der Wilcoxon-W 10071,000. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist hochsignifikant mit  $p = 0,035$ . Nichtraucher zeigten einen Mittelwert von 198,22 pg/ml mit einer Standardabweichung von 215,99 pg/ml. Raucher hatten einen Mittelwert von 143,84 pg/ml

Tabelle 3.4.: IL-8-Konzentrationsmuster - Keime - Sulkusflüssigkeit

Gruppe	N	Mittelwert (pg/ml)	Standardabweichung	Mittlerer Rang
AA -	194	163,90	185,97	121,49
AA +	53	198,86	195,60	133,18
p-value				0,291
PG -	86	152,22	170,08	117,30
PG +	161	181,64	196,98	127,58
p-value				0,282

AA- = AA-Photometriewert  $\leq 0,300$ , AA+ = AA-Photometriewert  $> 0,300$ , PG+ = PG-Photometriewert  $> 0,300$ , PG- = PG-Photometriewert  $\leq 0,300$ , N = Anzahl

mit einer Standardabweichung von 155,25 pg/ml. Im Mundwasser wiesen Nichtraucher eine signifikant höhere IL-8-Konzentration als die Vergleichsgruppe Raucher auf.

Nach zusätzlicher Stratifikation in ehemalige Raucher (RNR-3) konnte nur noch eine Grenzsignifikanz von  $p=0,076$  errechnet werden. Aktive Raucher hatten den niedrigsten mittleren Rang (103,82) und Mittelwert von 143,84 pg/ml. Nichtraucher und ehemalige Raucher wiesen höhere Werte auf. Die mittleren Ränge lagen bei 118,79 (Nichtraucher) und 129,09 (ehemalige Raucher). Die mittlere IL-8-Konzentrationen wurden mit 199,73 pg/ml für Nichtraucher und 195,42 pg/ml für ehemalige Raucher berechnet. Mit dem Kruskal-Wallis-Test wurde die Nullhypothese überprüft.

### Unterschied zu klinischen Parametern

Zu den klinischen Parametern wurde unter anderem die durchschnittliche sowie die tiefste Sondierungstiefe pro Patient berechnet und in Bezug zur IL-8-Konzentration im Mundwasser gebracht. Bei der Betrachtung der tiefsten Sondierungstiefe pro Patient ergab der Kruskal-Wallis-Test einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p=0,023$ ). Die Ergebnisse können der Abbildung 3.15 entnommen werden. Die Mittelwerte zeigten annähernd positiv-lineare Verhältnisse zwischen tiefer werdender durchschnittlicher Sondierungstiefe und ansteigender mittlerer IL-8-Konzentrationen in der Sulkusflüssigkeit an. Ebenfalls konnte eine bivariate Korrelationsanalyse einen positiven Zusammenhang zwischen durchschnittlicher Sondierungstiefe (nicht stratifiziert, sondern absolute Werte) und gesteigerter IL-8-Konzentration aufzeigen. Die zweiseitige Signifikanz ergab einen Wert von 0,000. Der Korrelationswert nach Pearson war positiv und lag bei 0,251. Ebenfalls war eine signifikante bivariate Korrelation zwischen der tiefsten gemessenen Sondierungstiefe eines Patienten und der gemessenen IL-8-Konzentration zu finden ( $p=0,000$ , Korrelationswert nach Pearson = 0,268).

Die Ergebnisse der BOP-, Plaque- und Blutungswerte nach Stratifikation in Bezug auf die IL-8-Konzentration können den Abbildungen 3.16 (a), (b) und (c) und der Tabelle 3.5 entnommen werden. Im Mundwasser konnten keine eindeutigen Unterschiede der klinischen Parameter Plaque, Blutung und BOP in Bezug auf die IL-8-Konzentration gefunden werden. Nebenbefund-

### 3. Ergebnisse

Abbildung 3.15.: IL-8-Konzentrationen in pg/ml zur maximalen Sondierungstiefe pro Patient in Gruppen zusammengefasst (Mundwasser)

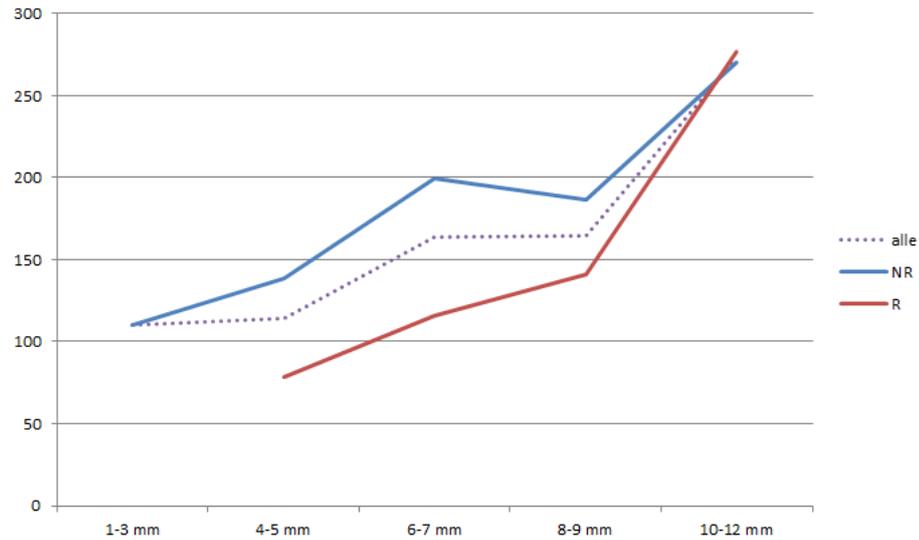


Abbildung 3.16.: IL-8 Konzentrationen (pg/ml) zu Plaque-, Blutungs- und BOP-Index (Mundwasser)

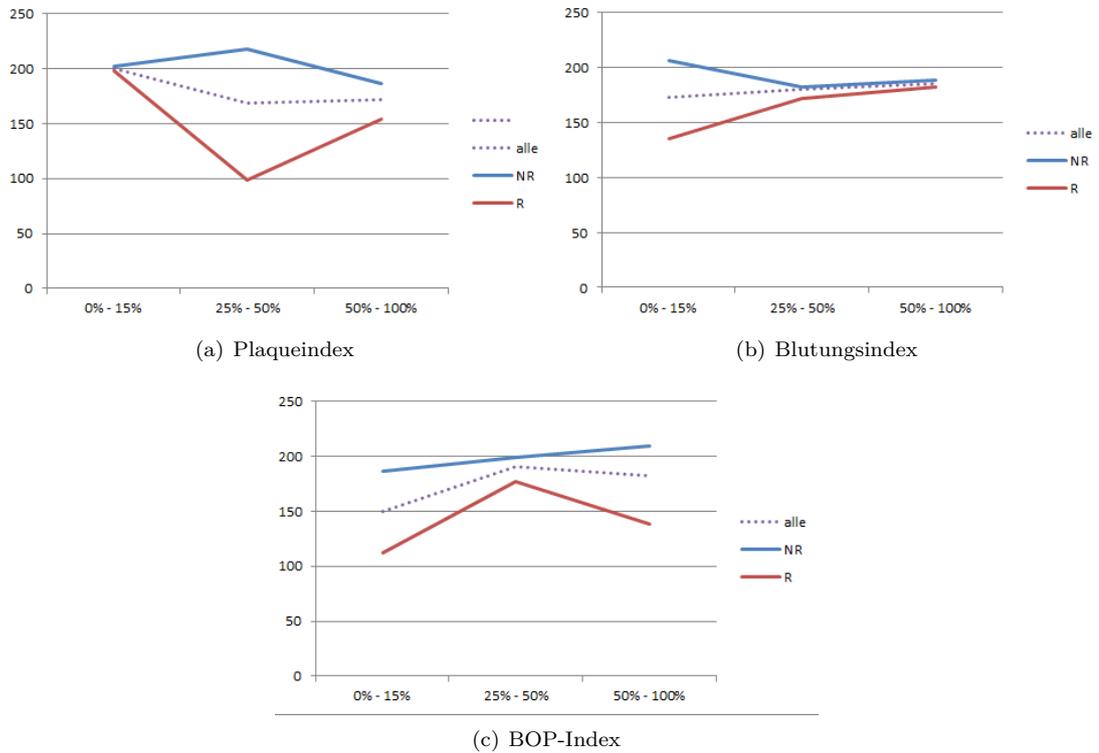


Tabelle 3.5.: IL-8-Konzentration im Mundwasser nach BOP-, Plaque- und Blutungsgruppen

	Gruppe	N	Mittelwert alle	N	Mittelwert Nichtraucher	N	Mittelwert Raucher
BOP	0-25%	75	149,80	38	186,46	37	112,14
	25-50%	98	190,27	59	199,16	39	176,81
	50-100%	55	182,51	34	209,73	21	138,45
	p-value	228	0,237	131	0,189	97	0,189
Plaque	0-25%	34	200,39	23	201,75	11	197,55
	25-50%	66	169,03	39	217,64	27	98,82
	50-100%	128	171,48	69	186,07	59	154,43
	p-value	228	0,417	131	0,116	97	0,116
Blutung	0-25%	160	172,44	83	206,59	77	135,64
	25-50%	51	179,81	38	182,54	13	171,86
	50-100%	17	185,74	10	188,34	7	182,02
	p-value	228	0,466	131	0,227	97	0,227

N = Anzahl, BOP = Bleeding on probing, Mittelwerte in pg/ml

Tabelle 3.6.: IL-8-Konzentrationsmuster - Keime - Mundwasser

Gruppe	N	Mittelwert (pg/ml)	Standardabweichung	Mittlerer Rang
AA -	182	175,57	195,53	114,93
AA +	46	173,15	189,94	112,79
p-value				0,844
PG -	79	158,46	173,96	108,48
PG +	149	183,90	203,84	117,69
p-value				0,316

AA- = AA-Photometriewert  $\leq 0,300$ , AA+ = AA-Photometriewert  $> 0,300$ , PG+ = PG-Photometriewert  $> 0,300$ , PG- = PG-Photometriewert  $\leq 0,300$ , N = Anzahl

lich zeigten Raucher wie bereits anfangs beschrieben ein erniedrigtes IL-8-Konzentrationsniveau im Mundwasser im Vergleich zu Nichtrauchern. Bivariate Korrelationsanalysen zwischen IL-8-Konzentrationen im Mundwasser und Plaque-, oder Blutungs- oder BOP-Indices lieferten keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

### Keime PG und AA

Im Mundwasser konnten keine statistisch stabilen IL-8-Konzentrationsunterschiede zwischen An- und Abwesenheit der Keime PG oder AA festgestellt werden (siehe Tabelle 3.6).

### 3. Ergebnisse

Tabelle 3.7.: Regressionsmodell - Anamnesedaten

Modell	IL8-Mundwasser				IL8-Sulkusflüssigkeit			
	Reg. B	T	95% C.I.	p-value	Reg. B	T	95% C.I.	p-value
(Konst.)	168,885	1,843	-11,7:349,4	0,67	395,478	4,657	228,1:6,8	0,000
Geschl.	55,122	2,115	3,8:106,5	0,036	-4,862	-0,202	-52,3:42,6	0,840
Alter	0,189	0,141	-2,4:2,8	0,888	-2,472	-2,0	-4,9:-0,1	0,045
R.st.	-62,289	-2,392	-113,6:-10,9	0,018	-65,707	-2,739	-112,9:-18,4	0,007

Konst. = Konstante, Geschl. = Geschlecht, R.st. = Rauchstatus, Reg. B = Regressionskoeffizient B, C.I. = Konfidenzintervalle

## 3.5. Multiples lineares Regressionsmodell - Interleukin-8 in Mundwasser und Sulkusflüssigkeit

Es wurden drei Einschluss-Modelle (Enter) für die Bereiche Anamnesedaten, Parodontaldaten und Keime berechnet. Diese Methode fügte alle Variablen gleichzeitig in die Modelle ein und eignet sich besonders bei Modellen, die auf theoretischen Überlegungen basieren. Jede Variable wurde so bewertet, als ob sie nach allen anderen unabhängigen Variablen eingegeben worden wäre. Sie wurde anhand dessen bewertet, was sie zur Vorhersage der abhängigen Variable leistete, die sich von den Vorhersagen der anderen in das Modell eingegebenen Variablen unterschieden. Die abhängigen Variablen waren IL-8-Mundwasser- und IL-8-Sulkusflüssigkeitswerte und wurden auf die entsprechenden Variablen in den drei Regressionsmodellen regressiert (siehe Tabellen 3.7, 3.8 und 3.9).

### 3.5.1. Anamnesedaten

Die Modellgüte, beziehungsweise das Bestimmtheitsmass (korrigierte R-Quadrat), lag beim Modell mit der abhängigen Variable Mundwasser bei 0,026 und beim Modell für die Sulkusflüssigkeit bei 0,031. Die Werte zeigen, dass lediglich 2,6% und 3,1 % der Gesamtstreuung der abhängigen Variable durch die unabhängigen Variablen (hier Rauchstatus, Alter und Geschlecht) erklärt werden konnten. Der T-Wert stellte sich im Mundwassermodell für Geschlecht und Rauchstatus signifikant unterschiedlich von Null dar. Eine Zunahme beim Alter um ein Jahr beeinflusste die IL-8-Konzentration im Mundwasser um 55,122 pg/ml. Ein positiver Rauchstatus senkte hingegen die Konzentration um 62,289 pg /ml (siehe Tabelle 3.7).

### 3.5.2. Parodontaldaten

Es wurden der BOP-, Plaque- und Blutungsindex stratifiziert (drei Gruppen: 0-25%, 25-50%, >50%), sowie die tiefste Sondierungstiefe und die stratifizierte durchschnittliche Sondierungstiefe (fünf Gruppen: < 2,5 mm, 2,5 mm - 3 mm, 3 mm - 3,5 mm, 3,5 mm - 4 mm, > 4 mm) in

### 3.5. Multiples lineares Regressionsmodell - Interleukin-8 in Mundwasser und Sulkusflüssigkeit

Tabelle 3.8.: Regressionsmodell - Parodontaldaten

Modell	IL8-Mundwasser				IL8-Sulkusflüssigkeit			
	Reg. B	T	95% C.I.	p-value	Reg. B	T	95% C.I.	p-value
(Konst.)	51,555	0,791	-76,9:180,0	0,430	57,748	0,998	-56,3:171,8	0,319
BOP	2,736	0,140	-35,8:41,2	0,889	10,311	0,583	-24,5:45,1	0,560
Plaque	-17,275	-0,990	-51,7:17,1	0,323	-54,809	-3,504	-85,6:-24,0	0,001
Blutung	-7,705	-0,342	-52,1:36,6	0,732	66,565	3,257	26,3:106,8	0,001
tSD	20,285	2,917	6,6:34,0	0,004	17,479	2,874	5,5:29,5	0,004
dSD	12,092	0,960	-12,7:36,9	0,338	1,660	0,148	-20,4:23,8	0,882

Konst. = Konstante, Reg. B = Regressionskoeffizient B, C.I. = Konfidenzintervalle, tSD = tiefste Sondierungstiefe, dSD = durchschnittliche Sondierungstiefe

Tabelle 3.9.: Regressionsmodell - Keime

Modell	IL8-Mundwasser				IL8-Sulkusflüssigkeit			
	Reg. B	T	95% C.I.	p-value	Reg. B	T	95% C.I.	p-value
(Konst.)	159,305	7,157	115,4:203,2	0,000	148,329	7,191	107,7:189,0	0,000
AA	-6,666	-0,206	-70,5:57,2	0,837	30,420	1,031	-27,7:88,5	0,303
PG	26,204	0,959	-27,6:80,0	0,339	25,377	0,998	-24,7:75,5	0,319

Ref = Referenz, AA = Aggregatibacteractinomycetem comitans, PG = Porphyromonas gingivalis

das Modell mit einbezogen. Das korrigierte R-Quadrat betrug bei den Mundwasserberechnungen 0,059 und 0,122 beim Sulkusmodell. Der F-Wert beim Sulkusmodell betrug 7,819 mit einem Signifikanzwert von 0,000 und erklärt somit, dass die Erklärungsleistung des Regressionsmodells kein Zufallswert ist. Signifikante Werte konnten für die Variablen Plaqueindex ( $p=0,001$ ), Blutungsindex ( $p=0,001$ ) und tiefste Sondierungstiefe ( $p=0,004$ ) ermittelt werden. BOP-Index und durchschnittliche Sondierungstiefe zeigten keine signifikanten Werte. Beim Modell des Mundwassers fiel F mit 3,825 ( $p=0,002$ ) geringer aus. Es wurde nur für tiefste Sondierungstiefen ein hochsignifikantes Ergebnis berechnet. Alle Werte sind der Tabelle 3.8 zu entnehmen.

#### 3.5.3. Keimdaten

Die Modelle der Keimdaten zeigten sehr geringe korrigierte R-Quadrate von 0,005 (Mundwasser) und 0,002 (Sulkusflüssigkeit) auf; beide Modelle zeigten keine statistische Signifikanz ( $p_s=0,298$  und  $p_M=0,630$ ). Die berechneten Werte können der Tabelle 3.9 entnommen werden.

### 3.6. Post-Hoc-Power-Analyse

Die statistischen Anforderungen an ein Teststärkeniveau von 80 % wurde im Modell der Sulkusflüssigkeit mit 85,8 % erreicht. Für das Mundwassermodell ergab die Post-Hoc-Power-Analyse einen geringeren Wert von 71,5 %, welches eine milde Reduktion unter das angestrebte Niveau darstellt.

### 3.7. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Studienpopulation bestand aus einem 250 Patienten zählenden Kollektiv mit nahezu ausgeglichenem Verhältnis an Frauen (45,2 %) und Männern (54,8 %). Raucher und Nichtraucher waren ebenfalls ähnlich verteilt, wobei aktive Raucher mit 42,8 % etwas geringer vertreten waren. Die Gruppe der Raucher war im Durchschnitt knapp 2 Jahre jünger und zeigte 3,85 % weniger verbliebenen Zähne in situ. Raucher hatten mit 31,67 % über 10 % mehr erkrankte Flächen (Sondierungstiefe > 3 mm) als Nichtraucher; ebenfalls zeigten Raucher größere Anteile bei den tiefen Sondierungstiefen. Raucher unterschieden sich statistisch signifikant von Nichtrauchern. Wurden die Nichtraucher noch in absolute Nichtraucher und ehemalige Raucher unterteilt, so lag der Wert der ehemaligen Raucher stets zwischen dem der aktiven Raucher und dem der absoluten Nichtraucher. Die Verteilung der Sondierungstiefen wurden topografisch analysiert. Aktive Raucher zeigten deutlich tiefere Taschen an oralen Flächen im Oberkiefer zwischen den Zähnen 15 bis 25, im Vergleich zu absoluten Nichtrauchern auf. Im Allgemeinen waren Zähne umso stärker betroffen, je weiter distal sie standen.

Tendenziell zeigten Raucher erniedrigte BOP- und Blutungsindices, gegenläufig einen erhöhten Plaqueindex auf. Je nach Gruppeneinteilung (RNR oder RNR-3) wurden für den Blutungsindex signifikante, für den BOP-Index grenzsignifikante und für den Plaqueindex nicht signifikante Unterschiede ermittelt.

Die flächenbezogenen Messwerte des BOP-, Blutungs- und Plaqueindex wurden den jeweiligen flächengleichen Sondierungstiefen zugeordnet und ausgewertet (3.7). Raucher zeigten bei tiefen Sondierungstiefen signifikant weniger positive BOP-Werte als Nichtraucher auf. Ebenfalls waren die Blutungswerte für pathologische Sondierungstiefen vermindert ausgefallen, im Sinne weniger häufigen Blutungen nach Ausstreichen des Sulkus. Plaquewerte waren bei Rauchern zwar erhöht, jedoch nur bei 6 mm signifikant.

Die durchschnittliche Keimbelastung lag für AA bei 21,2% und für PG bei 65,2 %. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern festgestellt. Wurden jedoch die dichotome Keimlast gegen die Sondierungstiefen aufgetragen und in Gruppen (RNR-3) aufgeteilt, so konnte vor allem beim Keim PG eine klare Tendenz ausgemacht werden. Die physiologischen Sondierungstiefen von 1 mm und 2 mm waren häufiger nicht infiziert, als infiziert. Pathologische Sondierungstiefen, vor allem größer gleich 4 mm waren häufiger mit dem Keim belastet. Zugleich konnten die schon aufgeführte Beobachtung bestätigt werden, dass Raucher mehr pathologische Sondierungstiefen aufweisen als ehemalige Raucher und diese

wiederum mehr als absolute Nichtraucher.

Nach Bereinigung der Daten von Ausreißern ergaben sich im Mittel höhere IL-8-Konzentrationen im Mundwasser (175,08 pg/ml) im Vergleich zur Sulkusflüssigkeit (171,40 pg/ml). Die Ergebnisse sind keine tatsächlichen Konzentrationen, sondern stellen die Konzentrationen in der jeweiligen Verdünnungsmethode dar und können deshalb nur untereinander verglichen und in Bezug gebracht werden. Messwerte der Sulkusflüssigkeit können aus genanntem Grunde nicht mit Messwerten des Mundwassers direkt verglichen werden.

Die IL-8-Untersuchungen in der Sulkusflüssigkeit ergab signifikant niedrigere Werte für Raucher (136,04 pg/ml) im Gegensatz zu Nichtrauchern (197,98 pg/ml). Wurde in die Gruppe RNR-3 unterteilt, so zeigten ehemalige Raucher die höchsten Werte (200,80 pg/ml), gefolgt von Nichtrauchern mit 196,52 pg/ml und diese wiederum gefolgt von aktiven Rauchern mit dem niedrigsten Mittelwert von 136,04 pg/ml. Der durchgeführte Kruskal-Wallis-Test bestätigte das Ergebnis mit einem p-value von 0,018.

Allgemein und auch speziell innerhalb der Gruppeneinteilung nach Rauchstatus konnte ein Zusammenhang zwischen ansteigender IL-8-Konzentration und pathologisch gesteigerter Sondierungstiefe berechnet werden. Ebenfalls korrelierten, statistisch signifikant, erhöhte IL-8-Konzentrationen mit gesteigerten BOP-Werten und auch gesteigerten Blutungswerten. Die Keimbelastung hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die IL-8-Konzentrationen im Sulkusfluid; jedoch konnte bei positiver Keimbelastung ein erhöhter Mittelwert der IL-8-Konzentration erfasst werden.

Die IL-8-Untersuchungen im Mundwasser ergab, wie in der Sulkusflüssigkeit auch gesehen, signifikant niedrigere Werte für Raucher (143,84 pg/ml) im Gegensatz zu Nichtrauchern (198,22 pg/ml). Wurde in die Gruppe RNR-3 unterteilt, so zeigten ehemalige Raucher (195,42 pg/ml) und Nichtraucher (199,73 pg/ml) die höchsten Werte auf. Aktive Raucher waren mit einer Konzentration von 143,84 pg/ml deutlich abgeschlagen. Der durchgeführte Kruskal-Wallis-Test fiel mit einer Grenzsignifikanz von 0,076 aus.

Allgemein und auch speziell innerhalb der Gruppeneinteilung nach Rauchstatus konnte ein Zusammenhang zwischen ansteigender IL-8-Konzentration im Mundwasser und pathologisch gesteigerter Sondierungstiefe berechnet werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Sulkusflüssigkeit konnten im Mundwasser keine klaren Zusammenhänge zwischen der IL-8-Konzentration und den klinischen Parametern BOP, Plaque und Blutung berechnet werden. Die Keimbelastung hatte ebenfalls keine signifikanten Auswirkungen auf die IL-8-Konzentrationen im Mundwasser gezeigt. Drei Regressionsmodelle wurden auf das gesamte Studienkollektiv angewandt, um theoretische Zusammenhänge und mögliche Erklärungen der Varianz der IL-8-Konzentrationen im Mundwasser und Sulkusflüssigkeit zu finden. Das erste Modell bezog drei anamnestiche Daten ein (Geschlecht, Alter und Rauchstatus (RNR)). Die Modellgüten lagen im niedrigen einstelligen Bereich, dennoch konnte ein gewisses Maß an Streuung der Varianz statistisch erklärt werden. Im Mundwassermodell hatte das Geschlecht „männlich“ signifikanten, Wert erhöhenden, Einfluss auf die IL-8-Konzentration. Gegensätzlich verhielt es sich für Raucher; der positive Rauchstatus

### 3. Ergebnisse

ging mit einer Erniedrigung der IL-8-Konzentration einher. Dies wurde mit fast gleichen Werten im Sulkusfluid berechnet (-62,289 pg/ml und -65,707 pg /ml). In der Sulkusflüssigkeit wurde jedoch für die unabhängige Variable Geschlecht kein statistisch stabiles Ergebnis ausgewertet. Das Alter zeigte einen kleinen, aber statistisch signifikanten Wert mit Einfluss auf sinkende IL-8-Konzentrationen im Sulkusfluid bei zunehmendem Alter (-2,472 pg/ml pro Lebensjahr).

Das zweite Modell bezog sich auf klinische Parameter. Im Mundwassermodell wurde ein geringes Bestimmtheitsmass von 5,9 %, im Sulkusmodell von 12,2 % erreicht. In beiden Modellen zeigte die Steigerung der tiefsten Sondierungstiefe um je eine Einheit einen statistisch signifikanten Anstieg auf die IL-8-Konzentrationen im Mundwasser (+20,285 pg/ml) und in der Sulkusflüssigkeit (+17,479 pg /ml).

Das dritte Modell in welches die Keime einbezogen wurden, konnte keine statistisch verwertbaren und eindeutigen Aussagen auf einen Zusammenhang zwischen der IL-8-Konzentration und der Keimbelastung machen.

Zusammenfassend konnte mit erhöhten klinischen Werten eine steigende Konzentration des Interleukin 8 erfasst werden. Raucher zeigten verminderte Konzentrationslevel des Cytokins auf.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Überblick**

Die vorgelegte Studie ist eine analytische Querschnittsstudie, welche eine Untersuchungsgruppe mit exponierten (Raucher) und nicht-exponierten (Nichtraucher) parodontal erkrankten Patienten der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Zahnklinik München darstellt. Untersucht wurden die IL-8-Konzentrationen in der Sulkusflüssigkeit und im Mundwasser bei Patienten mit marginaler Parodontitis mit und ohne Raucherhistorie. Anamnestiche und klinische Daten wurden ergänzend erhoben, wodurch Einflussfaktoren auf die IL-8-Konzentrationen identifiziert werden sollten. Die folgende Diskussion erörtert die angewandte Methodik, die eigenen Ergebnisse im Hinblick auf einschlägige Literatur und die zugrunde gelegte Fragestellung dieser Arbeit.

### **4.2. Diskussion der Methodik**

#### **4.2.1. Studienpopulation**

Bei dem Patientenkollektiv der vorliegenden Studie handelt es sich um ein vorgefiltertes Patientenkollektiv, in dem es sich auf als parodontal erkrankt eingestufte Patienten der Zahnklinik LMU München bezieht. Außerdem handelt es sich um ein unizentrisches Patientenkollektiv und spiegelt das Einzugsgebiet um München wieder. Die Studienteilnehmer wurden konsekutiv gesammelt; es ist das Patientenkollektiv eines bestimmten Zeitraumes. Eine randomisierte Auswahl des Kollektives wäre anzustreben gewesen, um Aussagen auf die gesamte zahnärztliche Zielgruppe ableiten zu können. Alle Ergebnisse und aufgestellten Folgerungen beschränken sich deshalb auf in das Kollektiv passende Patienten; hauptsächlich sind dies parodontal erkrankte Mitteleuropäer kaukasischer Herkunft mit und ohne Raucherhistorie.

Da es sich um eine Querschnittstudie handelt, ist das Ergebnis der Studie für den untersuchten Zeitraum der Erhebung gültig und lässt sich nicht generell auf andere Zeitpunkte übertragen. Vermutlich sind die geringen Unterschiede im Erkrankungsmuster zwischen Rauchern und Nichtrauchern auf die Vorfilterung zurück zu führen. Man kann jedoch anmerken, dass die rauchenden Patienten jünger waren.

#### 4.2.2. Datenerfassung

Durch die Wahl des Studiendesigns konnte die vorliegende Querschnittsstudie ökonomisch und im Rahmen des laufenden Betriebs der parodontologischen Zahnheilkunde, an der Zahnklinik München der Ludwig-Maximilians-Universität, durchgeführt werden.

Die Datenerhebung der Anamnesedaten wurde durch Studenten der Zahnmedizin im klinischen Abschnitt ihres Studiums erbracht. Die Antworten der Anamnesefragen wurden per Auswahllisten getroffen. Die Auswahllisten stellten sicher, dass ein statistisch auswertbarer Datensatz entstand. Auch minimierte die Verwendung von Auswahllisten Fehler in der Eingabe, sowohl inhaltlich als auch von der Schreibweise. Die studentische Messung der Sondierungstiefen am Patienten erfolgte durch trainierte Studenten (siehe [92][93]). Im ersten klinischen Kurs wurden unterschiedliche Phantommodelle mit dem gleichen Programm und unter gleicher Anleitung des Messprozesses durchgeführt, ausgewertet und mit Unterstützung durch Dr. Richard Heym reflektiert. Alle erfassten Patientenwerte wurden zusätzlich von den betreuenden und aufeinander kalibrierten Zahnärzten Frau Dr. Christina Ern und Herrn Dr. Richard Heym nachgemessen, bewertet und bei Bedarf korrigiert. Dies war ein zentraler Punkt im Programm und stellte einen zeit- und arbeitsintensiven Prozess dar. Ein speziell gestaltetes Interface im PAP leitete die Anwender durch den komplexen Vorgang. Gaußsche Verteilungsgrafiken der erhobenen Messdaten halfen bei systematischen Fehlern, wie falsches Auf- oder Abrunden. Akustische Signale und die digital geführte Datenerhebungsstrategie garantierten Kongruenz zwischen Behandler und Messprotokollant und sicherten so möglichst objektive und korrekt zugeordnete Messwerte. Zahnschemata, die die Differenzwerte der ersten, studentischen und zweiten, zahnärztlichen Messung darstellten, halfen der objektiven Auffindung der tatsächlichen Sondierungstiefe jeder Fläche. Die beiden betreuenden Ärzte wurden vor Beginn der Datenerhebung dieser Studie mit dem Programm aufeinander kalibriert.

Die Probenentnahme der Sulkusflüssigkeit und des Mundwassers wurde jeweils nach festgelegtem Protokoll abgenommen. Es wurde darauf geachtet, dass die Probenentnahmen vormittags gegen 11:30 Uhr und nachmittags gegen 16:00 Uhr stattfanden, um die Weiterverarbeitung im Labor so zügig als möglich zu gewährleisten. Interindividuell unterschiedlich intensive Spülvorgänge bei der Mundwasserentnahme konnten ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Raucher zeigen eine erniedrigte Sulkusflussrate [55][56][94], was zu kleineren Volumina in den genommenen Proben führen kann. Durch die Konzentrationsbestimmung konnten die unterschiedlich großen Volumina jedoch miteinander verglichen werden.

Durch den Einsatz der Datenbank und des PAP konnten alle Daten und Ergebnisse, die die Statistik hervor brachte, vollständig und unkompliziert zurückverfolgt werden. Durch die breit erhobenen Anamnesedaten und ergänzenden klinischen Daten entstand eine statistisch anspruchsvolle Datengrundlage. Durch die Verwendung von Regressionsmodellen konnte den zahlreichen, sich gegenseitig beeinflussenden Faktoren Rechnung getragen werden. Um weniger komplexe Fragestellungen zu beantworten, wurde auf einfachere, statistische Auswertungen mit wenigen Faktoren oder Variablen zurückgegriffen. Bei diesen Berechnungen auftretende Ausreißer konnten durch die

unkomplizierte Nachvollziehbarkeit der Daten, bedingt durch die Art der Datenerfassung und die resultierende konsistente Datenbank, einer schnellen Analyse der oft komplexen Gesamtbefunde zugeführt werden. Trotz der pseudonymisierten Labordaten konnte einfach und schnell jedes einzelne Ergebnis aus dem Rohdatensatz analysiert werden; allerdings nur durch Entriegelung der Sicherheitsschranken, durch autorisierten Zugriff. Gleiches gilt für alle Rohdaten der Keim- und Zytokinkonzentrationen. Jeder herangezogene Wert konnte jederzeit im gesamten Prozess, beginnend bei der Datenerhebungsphase bis hin zur Ergebnisinterpretation, nachvollzogen werden. Datum, Protokollant, Gerät, Negativkontrollen, interne Kontrollprobenwerte, Platten- und Laufnummern waren bei Bedarf rekonstruierbar. Insofern erfüllt die hier vorgelegte Studie hohe Anforderungen in Bezug auf hochwertige Datenerhebung und transparente Speicherung und Verarbeitung von Daten.

#### **4.2.3. Validität der Interleukin-8-Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie**

Die Quantifizierung der IL-8-Konzentrationen in den genommenen Proben ist, zum Zeitpunkt der Studie, durch mehrere biotechnologische Methoden durchführbar gewesen. Die Durchflusszytometrie wurde primär aus finanzieller Sicht dem ebenfalls im Haus verfügbaren ELISA-Verfahren vorgezogen. Die benutzten Laborkits waren erheblich kostengünstiger, bei ähnlicher Validität. Aufgrund mehrerer Kontrollen innerhalb des Arbeitsablaufes, wie in 2.8 beschrieben, kann insgesamt von validen Daten ausgegangen werden.

#### **4.2.4. Validität der Keimlast mittels ELISA**

Der molekulargenetische In-vitro-Test Parident<sup>TM</sup> ist ein Diagnostikum der ersten Wahl zum Nachweis parodontalpathogener Keime. Alle Arbeitsschritte wurden nach dem Originalprotokoll durchgeführt; zusätzlich wurden alle Proben im Dublikat kontrolliert. Mehrere Kontrollen innerhalb des Messvorgangs garantierten valide Daten (interne Kontrollen, Negativkontrollen, Blankwerte). Die photometrischen Grenzwerte wurden bei positivem Ergebnis meist deutlich überschritten. Es wird aufgrund genannten Prozessschritten, siehe auch 2.10, von validen Daten ausgegangen.

#### **4.2.5. Proben- und Parameterwahl**

Die Parameterauswahl der tSD ist damit begründet, dass die ausgeprägteste, aktuelle Entzündungsqualität klinisch als Maß für die Schwere der Parodontalerkrankung verwendet werden soll. Mittelwerte haben in diesem Zusammenhang den Nachteil, dass auch bei schwer parodontal erkrankten Patienten viele Flächen keine erhöhten Sondierungstiefen aufweisen und die Sondierungstiefen deshalb nicht normal verteilt sind. Deshalb unterscheiden sich die Mittelwerte kaum und Unterschiede zwischen Erkrankungsschweregraden sind auf diese Weise schwer darstellbar.

#### 4. Diskussion

Die allgemein gebräuchliche Beurteilung des Attachmentverlustes aus einer Panoramaschichtaufnahme spiegelt gleichermaßen eine abgelaufene und/oder anhaltende Erkrankung wieder und erfasst nicht eine initial erworbene, noch nicht mit radiologisch messbarem Knochenabbau verbundene, parodontale Erkrankung (siehe auch [95]). Deshalb wurde sie nicht als verlässlicher Parameter für die aktuelle Ausprägung der Entzündung in vorliegender Studie herangezogen. Die tSD ist als Gruppenparameter ebenfalls nicht ideal und gibt die tatsächliche Entzündungssituation nur sehr vereinfacht wieder scheint aber als Maß für die Erkrankungsschwere zu funktionieren, weil ein signifikanter Zusammenhang mit der IL-8 Konzentration gefunden werden konnte. Als Vorteil wird die Erfassung einer akuten parodontalen Problematik angesehen, jedoch wird nicht nach den parodontalen Diagnosen unterteilt. Nachteilig ist die Gruppeneinteilung nach tSD, da nicht erfasst wird, wieviele und wie stark die anderen Flächen betroffen sind. Hier diente die durchschnittliche Sondierungstiefe pro Patient als Parameter der Gesamtmorbidität. Zur weiteren Differenzierung der pathologischen Befunde wurden die Ergebnisse auch noch in Bezug auf einzelne Bereiche der gemessenen Sondierungstiefen und auf die topografische Lage ausgewertet. Die Sulkusflüssigkeit entstammt aus den subepithelialen Blutgefäßen der Lamina propria und spült den Sulkus, wodurch sie PMNs, Enzyme, Komplementfaktoren, Bakterien, andere Entzündungszellen und inflammatorische Mediatoren wie IL-8 enthält [2][20][50]. Die Sulkusflüssigkeit wird in zahlreichen Studien genutzt um Entzündungsmediatoren zu bewerten. Die Sulkusflüssigkeit hat, über die Auswertung der darin enthaltenen Entzündungsmediatoren, weiterhin eine Schlüsselrolle in der Bewertung des parodontalen Pathomechanismus eingenommen; trotz der technischen und klinischen Herausforderungen bei Entnahme, Aufbereitung und Auswertung [96]. Inkonsequente oder unzulängliche Studien beeinträchtigen die Möglichkeit Ergebnisse zu vergleichen und limitieren so, studienübergreifende Aussagen [96]. Deshalb wurde die Methode der Probenentnahme genau dokumentiert (siehe 2.5). Es gibt zwei Wege die Konzentration des Chemokins anzugeben. Entweder gibt man die Konzentration der verdünnten Probe in Bezug auf die Entnahmedauer an oder man ermittelt die tatsächliche Konzentration im Sulkusfluid. Die beschriebenen Ergebnisse dieser Studie stellen die Konzentration der verdünnten Probe (in pg/ml pro 30 Sekunden-Entnahme) dar und sind nur untereinander vergleichbar. Eine Berechnung der tatsächlichen Konzentration im Sulkusfluid (meist in pg/ $\mu$ l) würde für jede Probe das exakte Volumen an gewonnener Sulkusflüssigkeit und das Herausrechnen des Verdünnungsmediums benötigen[96]. Ähnliches gilt für die Mundwasserkonzentration; exakte Volumina der sich mischenden Flüssigkeiten (Speichel, vorgelegtes Wasser, Sulkusflüssigkeit und eventuell verschluckte Mengen) müssten bekannt sein. Bisher ist keine einheitliche Entnahmeart in einschlägiger parodontaler Literatur beschrieben worden [96].

Auf den Biorhythmus der Patienten konnte nicht eingegangen werden, woraus eine leichte, interindividuelle Verfälschung der Ergebnis anzunehmen ist. Es wird aber davon ausgegangen, dass sich dieser Fehler statistisch ausgleicht und die erbrachten Assoziationen trotzdem zulässt.

Im Unterschied zur Sulkusflüssigkeit findet sich im Mundwasser eine mittlere Konzentration aller Sulkusexsudate und Bestandteile der Speichelflüssigkeit wieder. Dies ergibt einen Konzentrati-

enswert, der für den anatomischen Raum der Mundhöhle anzusetzen ist und damit aus der ganzen oralen Region Entzündungsmediatoren enthalten kann. Eine direkte Proportionalität der Konzentration zur Entzündungsqualität einzelner Taschen kann nicht erwartet werden, da die Flussrate erkrankter Sulki [52] und die Menge des Speichels ebenfalls stark variieren kann. Diese Gründe könnten dafür verantwortlich sein, dass die Konzentrationen im Sulkusfluid und im Mundwasser der unterschiedlichen Probanden starken Konzentrationsschwankungen unterlagen und die Werte nicht normal verteilt waren. Mundwasserproben wurden entnommen, um zu prüfen, ob ein Schnelltest beziehungsweise Screeningtest für den Patienten zu Hause sinnvoll wäre. Ob ein nicht invasiver Test, ähnlich der Bestimmung des Blutzuckerwertes beim Diabetiker, möglich und sinnvoll ist, war unter anderem Ziel der Erhebung der Mundwasserproben.

### 4.3. Diskussion der Ergebnisse

Um die Aussagekraft der Ergebnisse der vorliegenden Arbeitsergebnisse zu überprüfen, wurde zusätzlich eine Post-Hoc-Power-Analyse durchgeführt. Die Analyse konnte für die Sulkusflüssigkeit einen Wert über 80 % erreichen und stellt somit einen angestrebten Wert dar. Das Modell des Mundwassers konnte den angestrebten Wert nicht erreichen (71,5 %).

#### 4.3.1. Beziehungen zwischen Rauchgewohnheiten und der parodontal-klinischen Situation

Im Folgenden wird Bezug auf die erste Frage genommen (siehe Abschnitt 1.7). Die Ausprägung der parodontalen Erkrankung ist bei Rauchern des untersuchten Kollektivs stärker ausgeprägt als bei den Nichtrauchern. Im Folgenden soll diese Aussage begründet werden.

Raucher zeigen einen stärker reduzierten Restzahnbestand auf. Zwischen absoluten Nichtrauchern und aktiven Rauchern lag der Unterschied bei fast 6% (20,28% zu 26,05%). Die Gruppe der ehemaligen Raucher zeigt einen Restzahnbestand von 24,11% und lässt sich zwischen den beiden anderen Gruppen einordnen. Die Aufgabe des Rauchens könnte eine Stagnation des parodontalpathogenen Prozesses begünstigt haben.

Im verbliebenen Restzahnbestand zeigt sich bei Rauchern ein statistisch signifikant höherer Anteil an pathologischen Sondierungstiefen. Die Gruppe der ehemaligen Raucher liegt wieder dazwischen, jedoch deutlich näher bei den absoluten Nichtrauchern. Dies unterstützt nach Meinung des Autors die Hypothese, dass der parodontalpathologische Prozess durch die Aufgabe des Rauchens reduziert, beziehungsweise vermindert wird.

Die Verteilung der Sondierungstiefen wurde ebenfalls zum Nachteil der Raucher dargestellt. Raucher zeigen ab Sondierungstiefen von 3 mm stets höhere prozentuale Anteile als absolute Nichtraucher auf. Ehemalige Raucher liegen in jeder Gruppe von 1 mm bis +7 mm dazwischen. Bei den physiologisch eingestuften Sondierungstiefen von 1 mm und 2 mm ist das Verhältnis zu Gunsten der absoluten Nichtraucher umgedreht. Auch diese Ergebnisse zeigen eine ausgeprägtere Parodontalerkrankung bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern. Die Gruppe der Raucher

#### 4. Diskussion

ist zudem im Mittel jünger als die Gruppe der Nichtraucher. Dieser Zusammenhang deutet entweder auf ein progressiveres Vorschreiten der parodontalen Erkrankung und/oder eine frühere Erkrankung in der Gruppe der Raucher hin. Diese Befunde wurden zur Quanti- und Qualifizierung einer marginalen Parodontitis herangezogen und weisen bei Rauchern ein höheres Maß an pathologischer Aktivität auf, als bei Nichtrauchern.

Die topographische Verteilung der erkrankten Sulki zeigt bei Rauchern eine deutliche Prominenz im Bereich der palatinalen Flächen der Oberkieferzähne von 15 bis 25 auf. Dies steht vermutlich im Zusammenhang mit der stärksten Disposition des Zigarettenrauchs beim Rauchakt an diesen Flächen und untermauert den pathologischen Einfluss auf den Zahnhalteapparat.

Die Sondierungstiefe von 4 mm ist bei Rauchern deutlich stärker ausgeprägt und wird als Indiz einer Schwäche der initialen Abwehr gewertet. Eine Schwächung des Immunsystems im Bereich der ersten Abwehrreihe führt wahrscheinlich schneller in den Übergang der irreversiblen Gewebestruktur und damit zur Ausbildung pathologischer Taschen. Es liegen keine Hinweise vor, dass eine moderat-etablierte Tasche bei Rauchern progressiver in Richtung  $>7$  mm vorschreitet als bei Nichtrauchern.

Auf den ersten Blick scheint bei Rauchern die reduzierte Blutungsneigung und der geringere BOP-Index und damit allgemein als Prädiktoren der Parodontitis verstandenen Parameter, vermindert zu sein. Dieser Umstand könnte bei unzureichender Befundung eine unsachgemäße Interpretation bedingen und die Schwere der Erkrankung fälschlicherweise herunterstufen. Güntsch et al. konnten ebenfalls verringerte BOP-Werte, sowie erhöhte Plaque und Sondierungstiefen bei Rauchern feststellen [48]. Der Autor der vorliegenden Arbeit geht vielmehr davon aus, dass die verminderte Blutungsneigung eine verminderte Immunkompetenz darstellt. Der Plaqueindex war zwar bei Rauchern etwas höher, jedoch nicht statistisch signifikant.

Im Literaturvergleich konnten ähnliche Ergebnisse gefunden werden. Ebenfalls eine Querschnittsstudie (von Bergström et al. aus dem Jahre 1991) untersuchte erwachsene Oralhygienikerinnen, von denen 30% Raucherinnen, 32% ehemalige Raucherinnen und 38% Nichtraucherinnen waren. Es konnte ein signifikanter Knochenverlust mithilfe von Bissflügelaufnahmen bei Raucherinnen im Vergleich zu Nichtraucherinnen und eine positive Korrelation von Knochenverlust ( $P < 0,001$ ) zum Zigarettenkonsum ( $<100$  Zigaretten/Jahr :  $>200$  Zigaretten / Jahr) beobachtet werden, wobei dieser Knochenverlust plaqueunabhängig war und deshalb allein auf den Tabakkonsum zurückgeführt wurde [4]. Norderyd und Hugoson postulierten 1998 nach der Auswertung von 540 Schweden zwischen 20-70 Jahren, dass Rauchen, ein fortgeschrittenes Alter und erhöhte Plaqueindices potentielle Risikofaktoren für eine schwere Parodontitis darstellten [17][3]. Eine schwedische, longitudinale Studie über 10 Jahre zeigte das Rauchen als signifikanten Prädiktor für zukünftigen Knochenverlust an [18][3]. Auch ehemalige Raucher zeigten in Bezug auf eine parodontale Erkrankung eine gesteigerte Prävalenz im Gegensatz zu Nichtrauchern, liegen aber deutlich unter der Prävalenz von Rauchern [3].

Zusammenfassend kann Zigarettenkonsum als Risikofaktor bestätigt werden. Eine kausal zu überprüfende Hypothese konnte mit der Aussage, dass Tabakkonsum durch die Schwächung

der frühen Phase des Immunsystems [97] für die initiale Bildung einer parodontal-pathologischen Zahnfleischtasche verantwortlich ist, aufgestellt werden. Dies sollte Thema weiterer Studien sein.

#### **4.3.2. Einfluss der parodontalen Erkrankung auf die Interleukin-8-Konzentrationen**

Die zweite Fragestellung beschäftigte sich mit der klinischen Situation und einer möglichen Korrelation der Zytokinkonzentrationen (siehe Abschnitt 1.7).

Die Ergebnisse der nach tSD sortierten und stratifizierten Patientengruppen zeigen einen signifikanten Anstieg der IL-8-Konzentration im Mundwasser und im Sulkusfluid bei Anwesenheit tiefer parodontaler Taschen auf. Diese Beobachtung zeigt sich ebenfalls signifikant bei alleiniger Betrachtung der Nichtraucher und Raucher. Mit tiefer werdenden Sondierungstiefen, und damit ansteigendem pathologischem Befund, steigen die IL-8-Konzentrationen an. Diesen Zusammenhang zeigten auch ein steigender BOP-Index und steigender Blutungsindex mit einhergehender steigender Zytokinkonzentration in der Sulkusflüssigkeit auf. Für den Plaqueindex, sowie für die Mundwasserkonzentrationen konnte kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden, jedoch konnten auch hier ähnliche Tendenzen aus den Grafiken abgeleitet werden. Die Ergebnisse zeigen eine gesteigerte IL-8-Konzentration einhergehend mit steigender parodontaler Läsion beziehungsweise Entzündungsreaktion. Es lässt sich, durch aufgeführte Ergebnisse, ein genereller Zusammenhang zwischen erhöhten IL-8-Konzentration zu steigendem Grad der Entzündung ausmachen. Wu et al. und Konopka et al. fanden ebenfalls geringere Konzentrationen der Entzündungsmediatoren IL-1, IL-8 und MMP8 in der Sulkusflüssigkeit mit abnehmendem Entzündungsgrad (nach parodontaler Behandlung) [6][81]. Das der Entzündungsgrad mit steigenden IL-8-Werten einhergeht wird in der Literatur oft beschrieben. Beispielsweise konnten Dongari-Bagtzoglou und Ebersole beim parodontal Gesunden geringe IL-8-Sekretionen von 69pg/0,2ml und über 4-fach erhöhte Werte (372,5pg/0,2ml) beim Erkrankten messen [28]. Sie konnten signifikant höhere IL-8 und IL-6 Konzentrationen im sulkulären Bindegewebe beim parodontal erkrankten Patienten aufzeigen [28].

Zusammenfassend lässt sich ein Zusammenhang der erhöhten Aktivität des Immunsystems, im Speziellen die IL-8-Sekretion, und der Schwere der akuten parodontalen Situation darstellen.

#### **4.3.3. Einfluss des Rauchverhaltens auf die Interleukin-8-Konzentrationen**

Als Antwort auf Frage 3 in Abschnitt 1.7 wurde beobachtet, dass die Konzentration des Chemokin IL-8 bei Rauchern signifikant erniedrigt ist. Diese Beobachtung gilt für die Sulkusflüssigkeits- und Mundwasserkonzentrationen. In der Sulkusflüssigkeit sank die mittlere Konzentration von 197,98 pg/ml auf 136,04 pg/ml und damit auf ein signifikant niedrigeres Niveau ( $p=0,004$ ) bei rauchenden im Vergleich zu nicht rauchenden Patienten ab. Die Post-Hoc-Power-Analyse untermauert diese Aussage, mit einem Teststärkeniveau von 85,8 %. Im Mundwasser ist der Abfall ebenfalls signifikant ( $p=0,035$ ) und fällt im Mittel sehr ähnlich aus, jedoch lag das Teststärkeniveau ge-

#### 4. Diskussion

ringförmig unter den angestrebten 80 % bei 71,5 %. Nichtraucher, die eine positive Rauchhistorie hatten, zeigten keine verminderten IL-8-Konzentrationen auf, weder im Mundwasser noch in der Sulkusflüssigkeit (siehe auch Abbildung 3.12). Wie oben ausgeführt, zeigen Raucher eine stärkere parodontale Erkrankung auf. Diese Ergebnisse deuten durch ihr vermindertes Niveau des inflammatorisch modulierenden Chemokins, auf eine reduzierte Immunkompetenz durch Tabakkonsum hin. IL-8 wirkt relativ selektiv [33][60] auf PMNs und löst durch dessen verminderte Konzentration ein Ungleichgewicht der Homöostase aus, wodurch ein entscheidender Abwehrmechanismus außer Kraft gesetzt [97] und so der Weg für primär nicht-pathogene Keime geebnet wird. Die bei Rauchern beobachtete Reduktion von Chemokinen (IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1, RANTES, Eotaxin) könnte zu dem Phänomen der beeinträchtigten Chemotaxis und Migration der PMNs führen [52] und dies trotz einer vorhandenen Leukozytose [71]. Einige Autoren konnten eine Suppression des Immunsystems (erhöhte Infektanfälligkeit durch reduzierte Expression antimikrobieller Peptide) durch Stress oder Nikotin beweisen [98][52]. Durch einen ähnlichen Mechanismus auf Chemokine könnte die erniedrigte Konzentration von IL-8 erklärt werden. Tymkiw et al. stellten keinen signifikanten Unterschied (IL-8) zwischen erkrankten Rauchern und der gesunden Kontrollgruppe fest [52]. Wobei erkrankte Nichtraucher deutlich erhöhte Chemokine präsentierten. Obwohl sie eine protektive Entzündungsreaktion durch die Ausschüttung von Cytokinen wie dem IL-8 bräuchten, bleibt diese bei den erkrankten Rauchern aus und zeigt ein ähnliches Niveau der immunmodulierenden Cytokine wie beim parodontal gesunden Patienten auf. Durch die bei Rauchern eingeschränkte Rekrutierung von PMNs könnte eine ineffektive Immunabwehr und damit eine verstärkte Destruktion des Parodonts resultieren [52]. Die Raucher dieser Studie zeigten ebenfalls verminderte Befunde einer abwehrenden Entzündungsreaktion auf (geringerer BOP- und Blutungsindex) und zugleich eine stärker ausgeprägte parodontalpathogene Situation bei verminderten IL-8-Konzentrationen. Ehemalige Raucher waren etwas stärker erkrankt als absolute Nichtraucher, zeigten wieder höhere klinisch-inflammatorische Befunde wie BOP- und Blutungsindices als aktive Raucher und zugleich ähnlich hohe Chemokinkonzentrationen wie erkrankte Nichtraucher. Die schwerere parodontalpathologische Situation lässt sich durch eine Phase der unterdrückten Immunleistung durch die ehemalige Raucherhistorie erklären. Durch die Aufgabe des Rauchens konnte die Immunkompetenz auf ein normales, effektives Niveau steigen, welches die Befunde der erhöhten BOP- und Blutungsindices, sowie die hohen IL-8-Konzentrationen, als Antwort auf die parodontalpathogene Situation dieser Gruppe wieder spiegeln.

Kuschner et al. weisen aufgrund ihrer Ergebnisse daraufhin, dass die Gruppe der Raucher differenziert in Bezug auf die Intensität betrachtet werden sollte [91]. Diese Beobachtung kann zwischen Rauchverhalten und IL-8-Konzentrationen aus vorliegenden Ergebnissen nicht bestätigt werden; weder für die Variablen Packyears noch für die Anzahl der gerauchten Zigaretten pro Tag. Ebenfalls konnte zwar im Regressionsmodell ein negativer Effekt des ehemaligen Rauchstatus auf die IL-8-Konzentration gezeigt werden, jedoch ohne Signifikanz.

#### **4.3.4. Zusammenhang parodontalpathogener Keime (AA und PG) und der klinischen Befundsituation**

Die Keime AA und PG werden als parodontalpathogene Bakterien betrachtet und in Verbindung mit destruktiven Prozessen im marginalen Parodont gebracht [1]. Die Prävalenz von PG liegt bei ca 65%. Ähnliche Werte zeigten van Winkelhoff et al. und Griffen et al. für die Anwesenheit von PG bei parodontal erkrankten Patienten auf [99][100]. Die ermittelte Prävalenz von AA mit 21,5% fällt im Literaturvergleich geringer aus [101][99]. Ebenfalls erhöht ist der Anteil an als pathologisch einzustufende Sulki bei AA- und PG-positiven Patientengruppen. Diesen speziellen Einfluss auf die klinischen Parameter, die direkt die Sulki beschreiben, sind auch bei van Winkelhoff et al. aufgezeigt worden [99]). Die Anwesenheit der Keime PG und AA sind als signifikante Prädiktoren eines destruktiven parodontalen Prozesses zu werten.

Raucher zeigen ebenfalls ein gesteigertes Risiko für destruktive klinische Prozesse durch die veränderte Sondierungstiefenverteilung an. Die Prävalenz von AA und PG unterscheiden sich aber zwischen Rauchern und Nichtrauchern nicht. Es scheint sich um unabhängige, auf die klinische Situation parodontal erkrankter Patienten auswirkende Effekte zu handeln. Zumindest kann in der vorliegenden Arbeit kein Zusammenhang zwischen der Keimbelastung und Rauchstatus dargestellt werden.

#### **4.3.5. Zusammenhang parodontalpathogener Keime (AA und PG) und den vorliegenden Interleukin-8-Konzentrationen**

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt erhöhte IL-8-Konzentrationen in der Sulkusflüssigkeit bei Anwesenheit des Keimes AA oder PG jedoch ohne statistische Signifikanz. Im Mundwasser sind ebenfalls weder bei Anwesenheit von PG noch AA signifikante Ergebnisse aufgetreten. Die AA- und PG-positiven Gruppen zeigen erhöhte klinische Werte bei den Sondierungstiefen und dem BOP-Index. Folglich ist vermutlich die erhöhte IL-8-Konzentration der stärkeren Entzündungsreaktion (siehe 4.3.2) geschuldet. Van Dyke et al. stützen diese Theorie. Ihre Untersuchungen zeigten, dass PG aufgrund der tiefen Taschenbildung und nicht die Tasche aufgrund des pathogenen Keimes besteht [39].

Sanderink et al. beschrieben, dass das PG-LPS nicht vom Cluster of differentiation (CD)14/MD-2/TLR-4-Rezeptorkomplex erkannt wird und so die nachgeschaltete Kaskade, unter anderem mit IL-8-Bildung, ausbleibt [5], wodurch eine wichtige IL-8-Quelle des Immunsystems nicht genutzt werden kann. Weitere beispielhafte Mechanismen wurden von Darveau et al. aufgezeigt, die eine IL-8-Inhibition und TLR-4-Antagonisierung durch bakterielle Einflüsse (z.B.:PG) auf Makrophagen beschrieben [1]. Karimi et al. zeigten, dass durch Rauch der TLR-4-, aber nicht der TLR-2-Rezeptor, neutralisiert und inhibiert, und damit die abhängigen Mechanismen, die eine mittelstarke Induktion zur IL8-Produktion in Makrophagen auslösen, gehemmt werden [29][102]. PG sei außerdem in der Lage lokal proteolytisch IL-8 zu inhibieren und den IL-8-Gradienten im Gewebe negativ zu beeinflussen [1].

#### 4. Diskussion

Andererseits können LPS von PG auf Epithelzellen als TLR-2 Ligand die IL-8-Produktion initiieren [26]). Bei gleichzeitiger Stimulation mit den LPS von PG und hohen Nikotindosen (1mM) zeigte sich eine signifikant erhöhte IL-8-Produktion, ebenfalls die Epithelzellen der Gingiva betreffend [72].

Die Anwesenheit der Keime AA und PG scheinen zumindest eine mäßige Auswirkung auf die IL-8-Konzentrationen in der Sulkusflüssigkeit zu haben. Die Patienten der Gruppen Raucher und Nichtraucher zeigen eine ähnliche Keimlast, wodurch eine starke Verfälschung der Ergebnisse durch die Keimbelastung nicht zu erwarten ist.

## 5. Zusammenfassung

Das Chemokin IL-8 ist ein potenter und leicht zu erhebender Parameter in der Parodontalprognostik. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob Raucher sich durch klinische und laborchemische Parameter (IL-8-Konzentration) von Nichtrauchern unterscheiden und ob dies im direkten Zusammenhang steht.

Die vorgelegte Studie ist eine analytische Querschnittsstudie und umfasst insgesamt 250 parodontal erkrankte Patienten mit einem Anteil von 42,8 % Rauchern. Es wurden ausführliche anamnestiche und klinische Befunde erhoben, sowie Speichel- und Sulkusproben entnommen. Der klinische Befund umfasste einen kompletten Zahnstatus und einen ausführlichen Parodontalbefund mit 6-Punktmessung in Millimeter der Sondierungstiefen und dichotomen 6-Punktmessung zu Plaquebefall, Blutungsneigung auf Sondierung und Sulkusblutungsneigung. Die Mundwasser- und Sulkusproben wurden auf ihre IL-8-Konzentration mittels Durchflusszytometrie untersucht und ausgewertet. Alle Probanden wurden auf Anwesenheit parodontalpathogener Keime getestet.

Für Raucher werden signifikant erniedrigte IL-8-Konzentrationen im Mundwasser und in den Speichelproben ermittelt. Es wird dadurch auf eine geschwächte Immunkompetenz geschlossen, weil IL-8 für die Funktion und Steuerung der ersten Abwehrreihe des Immunsystems verantwortlich gemacht wird. Es konnte eine verminderte IL-8-Konzentration aufgrund des Rauchstatus bewiesen werden, denn die Konzentrationen folgten nur sehr eingeschränkt dem normalerweise korrelierten klinischen Erscheinungsbild. Bei Aufgabe des Nikotinabusus folgten die Chemokinkonzentrationen dem klinischen Befund der akuten Entzündungssituation. Es ist eine Tabakkonsum-induzierte Reduktion des Chemokins IL-8 anzunehmen.

Das oft beschriebene erhöhte parodontale Risiko bei positivem Rauchstatus wird durch den beobachteten Effekt zumindest zum Teil erklärt und bildet einen weiteren Baustein im Verständnis der Parodontalerkrankungen. Eine Über- sowie Unterproduktion des Chemokins, also eine Verschiebung der Homöostase, hat einen destruktiven Einfluss auf das parodontale Gewebe.

In zukünftigen Studien sollte die IL-8-Konzentration im Verlauf der parodontalen Erkrankung und im Verlauf einzelner Therapiekonzepte untersucht werden. Ebenso sind die kausalen Mechanismen der homöostatischen Entgleisung bislang nicht vollständig verstanden. Mundwasser sowie Sulkusflüssigkeit stellen interessante diagnostische Instrumente in der Parodontologie dar und sollten Gegenstand weiterer Forschung sein.

Teile dieser Arbeit wurden zur Veröffentlichung übermittelt [103].



## 6. Abkürzungsverzeichnis

<b>AA</b>	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
<b>BOP</b>	Bleeding on Probing
<b>CBA</b>	Cytometric Bead Array
<b>CD</b>	Cluster of differentiation
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>ELISA</b>	Enzyme linked immuno-sorbent Assay
<b>fMLP</b>	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
<b>FN</b>	Fusobacterium nucleatum
<b>FSC</b>	Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter)
<b>GCF</b>	Gingival-Crevicular-Fluid
<b>GM-CSF</b>	Granulozyten-Monozyten koloniestimmulierender Faktor
<b>ICAM</b>	Intercellular adhesion molecule
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IGF</b>	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (engl. Insulin-like growth factor)
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IL-1</b>	Interleukin 1
<b>IL-8</b>	Interleukin 8
<b>LA<sub>4</sub></b>	Lipoxin A <sub>4</sub>
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>LTB<sub>4</sub></b>	Leukotrien B <sub>4</sub>
<b>MMP</b>	Matrixmetalloproteinase

## 6. Abkürzungsverzeichnis

**NF- $\kappa$ B** nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

**nAChR** nikotinischer Azetylcholinrezeptor

**OPG** Osteoprotegrin

**PAF** Plättchenaktivierender Faktor

**PAP** Parodontales-Befundungs-Programm

**PCR** Polykinase Kettenreaktion

**PM** Parvimonas micra

**PG** Porphyromonas gingivalis

**PG-LPS** Lipopolysaccharid von Porphyromonas gingivalis

**PGE<sub>2</sub>** Prostaglandin E<sub>2</sub>

**PI** Prevotella intermedia

**PMN** polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt

**PY** packyears

**RANKL** Receptor-activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand

**SSC** Seitwärtsstreulicht (Siedward Scatter)

**Std.abw.** Standardabweichung

**TD** Treponema denticola

**TGF** Transforming growth factor

**TF** Tannerella forsythensis

**TLR** Toll-like-Rezeptor

**TNF** Tumor Nekrose Faktor

**TNF $\alpha$**  Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$

**tSD** tiefste Sondierungstiefe

**ZE** Zahnersatz

## **7. Literaturverzeichnis**



# Literaturverzeichnis

- [1] Richard P. Darveau. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(7):481–490, 2010-07.
- [2] D. D. Bosshardt and N. P. Lang. The junctional epithelium: from health to disease. *Journal of Dental Research*, 84(1):9–20, 2005-01.
- [3] D. F. Kinane and I. G. Chestnutt. Smoking and periodontal disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 11(3):356–365, 2000-01-01.
- [4] Jan Bergström, Sören Eliasson, and Hans Preber. Cigarette smoking and periodontal bone loss. *Journal of Periodontology*, 62(4):242–246, 1991-04-01.
- [5] R.B.A. Sanderink, H. Bernhardt, M. Knoke, C. Weber, and R. Weiger. *Curriculum Orale Mikrobiologie und Immunologie*. Curriculum. Quintessenz Verlags-GmbH, 1 edition, 2004.
- [6] L. Wu, Y. Zhou, Z. Zhou, Y. Liu, Y. Bai, X. Xing, and X. Wang. Nicotine induces the production of IL-1beta and IL-8 via the alpha7 nAChR/NF-kappaB pathway in human periodontal ligament cells: an in vitro study. *Cell Physiol Biochem*, 34(2):423–31, 2014.
- [7] Y.-C. Ho, S.-F. Yang, F.-M. Huang, and Y.-C. Chang. Up-regulation of osteolytic mediators in human osteosarcoma cells stimulated with nicotine. *Journal of Periodontal Research*, 44(6):760–766, 2009.
- [8] Carranza Newman, Klokkevold and Takei. *Carranzas Clinical Periodontology*, volume 11. Elsevier Saunders, 2012.
- [9] B. L. Pihlstrom, B. S. Michalowicz, and N. W. Johnson. Periodontal diseases. *Lancet*, 366(9499):1809–20, 2005-11-19.
- [10] J. M. Albandar, J. A. Brunelle, and A. Kingman. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the united states, 1988-1994. *J Periodontol*, 70(1):13–29, 1999-01.
- [11] P. I. Eke, B. A. Dye, L. Wei, G. O. Thornton-Evans, and R. J. Genco. Prevalence of periodontitis in adults in the united states: 2009 and 2010. *J Dent Res*, 91(10):914–20, 2012-10.

## Literaturverzeichnis

- [12] A. Wahlin, H. Jansson, B. Klinge, N. Lundegren, S. Akerman, and O. Norderyd. Marginal bone loss in the adult population in the county of skane, sweden. *Swed Dent J*, 37(1):39–47, 2013.
- [13] Teresa A. Dolan, Gregg H. Gilbert, Melvin L. Ringelberg, Donalds W. Legler, Donald E. Antonson, Ulrich Foerster, and Marc W. Heft. Behavioral risk indicators of attachment loss in adult floridians. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(4):223–232, 1997-04-01.
- [14] C. B. Wiebe and E. E. Putnins. The periodontal disease classification system of the american academy of periodontology—an upyear. *J Can Dent Assoc*, 66(11):594–7, 2000-12.
- [15] J. M. Albandar and T. E. Rams. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontol 2000*, 29:7–10, 2002.
- [16] S.g. Grossi, R.j. Genco, E.e. Machtet, A.w. Ho, G. Koch, R. Dunford, J.j. Zambon, and E. Hausmann. Assessment of risk for periodontal disease. II. risk indicators for alveolar bone loss. *Journal of Periodontology*, 66(1):23–29, 1995-01-01.
- [17] Ola Norderyd and Anders Hugoson. Risk of severe periodontal disease in a swedish adult population. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(12):1022–1028, 1998.
- [18] A. Bolin. Proximal alveolar bone loss in a longitudinal radiographic investigation. *Swedish Dental Journal. Supplement*, 35:1–108, 1986.
- [19] S. Hashimoto, T. Yamamura, and M. Shimono. Morphometric analysis of the intercellular space and desmosomes of rat junctional epithelium. *Journal of Periodontal Research*, 21(5):510–520, 1986-09.
- [20] G. Cimasoni. Crevicular fluid upyear. *Monographs in Oral Science*, 12:III–VII, 1–152, 1983.
- [21] H. E. Schroeder and M. A. Listgarten. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontology 2000*, 13:91–120, 1997-02.
- [22] Klaus Wolfram, Jan Egelbeeg, Conrad Hornbuckle, Richard Oliver, and Eugene Rathbun. Effect of tooth cleaning procedures on gingival sulcus depth. *Journal of Periodontal Research*, 9(1):44–49, 1974-02-01.
- [23] M. C. Brex, M. Gautschi, P. Gehr, and N. P. Lang. Variability of histologic criteria in clinically healthy human gingiva. *Journal of Periodontal Research*, 22(6):468–472, 1987-11.
- [24] N. A. Demetriou and S. P. Ramfjord. Premitotic labeling and inflammation in the gingiva of rhesus monkeys. *Journal of Periodontology*, 43(10):606–613, 1972-10.

- [25] H. E. Schroeder. Quantitative parameters of early human gingival inflammation. *Archives of Oral Biology*, 15(5):383–400, 1970-05.
- [26] R. Mahanonda, N. Sa-Ard-Iam, M. Eksomtramate, P. Rerkyen, B. Phairat, K. E. Schaecher, M. M. Fukuda, and S. Pichyangkul. Cigarette smoke extract modulates human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human gingival epithelial cells. *J Periodontal Res*, 44(4):557–64, 2009-08.
- [27] Josefine Hirschfeld. Dynamic interactions of neutrophils and biofilms. *Journal of Oral Microbiology*, 6:26102, 2014.
- [28] A. I. Dongari-Bagtzoglou and J. L. Ebersole. Increased presence of interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secreting fibroblast subpopulations in adult periodontitis. *J Periodontol*, 69(8):899–910, 1998-08.
- [29] R. B. Gonçalves, R. D. Coletta, K. G. Silvério, L. Benevides, M. Z. Casati, J. S. da Silva, and F. H. Nociti. Impact of smoking on inflammation: overview of molecular mechanisms. *Inflammation Research*, 60(5):409–424, 2011-05-01.
- [30] Susan E. Wynne, Laurence J. Walsh, and Gregory J. Seymour. Specialized postcapillary venules in human gingival tissue. *Journal of Periodontology*, 59(5):328–331, 1988.
- [31] M. S. Tonetti, M. A. Imboden, and N. P. Lang. Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin-8 and ICAM-1. *Journal of Periodontology*, 69(10):1139–1147, 1998-10.
- [32] M. Schartl, M. Gessler, and A. von Eckardstein. *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. Elsevier GmbH, 1 edition, 2009.
- [33] M. Baggiolini, A. Walz, and S. L. Kunkel. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation*, 84(4):1045–1049, 1989-10.
- [34] Erwin-Josef Speckmann, Jürgen Hescheler, and Rüdiger Köhling. *Physiologie*. 6th. ELSEVIER, 6 edition, 2013-09.
- [35] J. M. Schröder. The neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8, a novel neutrophil chemotactic cytokine. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, 40(1):23–31, 1992.
- [36] T. Takata and K. Donath. The mechanism of pocket formation. a light microscopic study on undecalcified human material. *Journal of Periodontology*, 59(4):215–221, 1988-04.
- [37] W. Chen, M. Kajiya, G. Giro, K. Ouhara, H. E. Mackler, H. Mawardi, H. Boisvert, M. J. Duncan, K. Sato, and T. Kawai. Bacteria-derived hydrogen sulfide promotes IL-8 production from epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 391(1):645–50, 2010-01-01.

- [38] A. Baba, N. Abe, T. Kadowaki, H. Nakanishi, M. Ohishi, T. Asao, and K. Yamamoto. Arg-gingipain is responsible for the degradation of cell adhesion molecules of human gingival fibroblasts and their death induced by porphyromonas gingivalis. *Biological Chemistry*, 382(5):817–824, 2001-05.
- [39] Thomas E Van Dyke. Control of inflammation and periodontitis. *Periodontology 2000*, 45(1):158–166, 2007.
- [40] Gerard L. Bannenberg, Nan Chiang, Amiram Ariel, Makoto Arita, Eric Tjonahen, Katherine H. Gotlinger, Song Hong, and Charles N. Serhan. Molecular circuits of resolution: Formation and actions of resolvins and protectins. *The Journal of Immunology*, 174(7):4345–4355, 2005-04-01.
- [41] Jan Bergström. Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology*, 92(1):1–8, 2004-09.
- [42] Francisco Rivera-Hidalgo. Smoking and periodontal disease. *Periodontology 2000*, 32(1):50–58, 2003-06-01.
- [43] K. S. Kornman and F. S. di Giovine. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Annals of Periodontology / the American Academy of Periodontology*, 3(1):327–338, 1998-07.
- [44] Soeren Jepsen, Juan Blanco, Wolfgang Buchalla, Carvalho JC, T Dietrich, C Doerfer, KA Eaton, E Figuero, JE Frencken, F Graziani, SM Higham, T Kocher, M Maltz, A Ortiz-Vigon, J Schmoeckel, A Sculean, LMA Tenuta, MH van der Veen, and V Machiulskiene. Prevention and control of dental caries and periodontal diseases at individual and population level: consensus report of group 3 of joint efp/orca workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(S18):85–93, 2017-03.
- [45] Iain L.C. Chapple, Philippe Bouchard, Maria Grazia Cagetti, Guglielmo Campus, Maria-Clotilde Carra, Fabio Cocco, Luigi Nibali, Philippe Hujoel, Marja L. Laine, Peter Lingsström, David J. Manton, Eduardo Montero, Nigel Pitts, Hélène Rangé, Nadine Schlueter, Wim Teughels, Svante Twetman, Cor Van Loveren, Fridus Van der Weijden, Alexandre R. Vieira, and Andreas G. Schulte. Interaction of lifestyle, behaviour or systemic diseases with dental caries and periodontal diseases: consensus report of group 2 of the joint efp/orca workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 44:S39–S51, 2017.
- [46] Suil Kim and Jay A. Nadel. Role of neutrophils in mucus hypersecretion in COPD and implications for therapy. *Treatments in Respiratory Medicine*, 3(3):147–159, 2004-06-01.
- [47] Bruno Zappacosta, Silvia Persichilli, Angelo Minucci, Enrico Di Stasio, Paola Carlino, Gabriella Pagliari, Bruno Giardina, and Pasquale De Sole. Effect of aqueous cigarette

- smoke extract on the chemiluminescence kinetics of polymorphonuclear leukocytes and on their glycolytic and phagocytic activity. *Luminescence*, 16(5):315–319, 2001-09-01.
- [48] A. Güntsch, M. Erler, P. M. Preshaw, B. W. Sigusch, G. Klinger, and E. Glockmann. Effect of smoking on crevicular polymorphonuclear neutrophil function in periodontally healthy subjects. *Journal of Periodontal Research*, 41(3):184–188, 2006-06-01.
- [49] M. Firoz Mian, Nicole M. Lauzon, Martin R. Stämpfli, Karen L. Mossman, and Ali A. Ashkar. Impairment of human NK cell cytotoxic activity and cytokine release by cigarette smoke. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(3):774–784, 2008-03-01.
- [50] Gary C. Armitage. Periodontal diseases: Diagnosis. *Annals of Periodontology*, 1(1):37–215, 1996-11-01.
- [51] Y. Kowashi, F. Jaccard, and G. Cimasoni. Sulcular polymorphonuclear leucocytes and gingival exudate during experimental gingivitis in man. *Journal of Periodontal Research*, 15(2):151–158, 1980-03.
- [52] Keelen D. Tymkiw, Daniel H. Thunell, Georgia K. Johnson, Sophie Joly, Kindra K. Burnell, Joseph E. Cavanaugh, Kim A. Brogden, and Janet M. Guthmiller. Influence of smoking on gingival crevicular fluid cytokines in severe chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(3):219–228, 2011.
- [53] Rolf Attström and Jan Egelberg. Emigration of blood neutrophils and monocytes into the gingival crevices. *Journal of Periodontal Research*, 5(1):48–55, 1970-02-01.
- [54] N. G. Clarke, B. C. Shephard, and R. S. Hirsch. The effects of intra-arterial epinephrine and nicotine on gingival circulation. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology*, 52(6):577–582, 1981-12.
- [55] L. G. Holmes. Effects of smoking and/or vitamin c on crevicular fluid flow in clinically healthy gingiva. *Quintessence International (Berlin, Germany: 1985)*, 21(3):191–195, 1990-03.
- [56] D.f. Kinane and M. Radvar. The effect of smoking on mechanical and antimicrobial periodontal therapy. *Journal of Periodontology*, 68(5):467–472, 1997.
- [57] J. Bergström. Oral hygiene compliance and gingivitis expression in cigarette smokers. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 98(6):497–503, 1990-12.
- [58] Bo Danielsen, Firoze Manji, Nico Nagelkerke, Ole Fejerskov, and Vibeke Baelum. Effect of cigarette smoking on the transition dynamics in experimental gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 17(3):159–164, 1990.
- [59] Florian Horn. *Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium*. Georg Thieme Verlag, 2009.

- [60] J. M. Schröder, U. Mrowietz, E. Morita, and E. Christophers. Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *The Journal of Immunology*, 139(10):3474–3483, 1987-11-15.
- [61] P. Peveri, A. Walz, B. Dewald, and M. Baggiolini. A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 167(5):1547–1559, 1988-05-01.
- [62] C. Scully and S. J. Challacombe. The migration of 111indium-labelled polymorphonuclear leucocytes into the oral cavity in the rhesus monkey. *Journal of Periodontal Research*, 14(6):475–481, 1979-11.
- [63] Kevin J. Wendell and Sidney H. Stein. Regulation of cytokine production in human gingival fibroblasts following treatment with nicotine and lipopolysaccharide. *Journal of Periodontology*, 72(8):1038–1044, 2001-08-01.
- [64] Mark I. Ryder. The influence of smoking on host responses in periodontal infections. *Periodontology 2000*, 43(1):267–277, 2007-02-01.
- [65] Mark I. Ryder, Ron Fujitaki, Scott Lebus, Mahyar Mahboub, Brandi Faia, Dawud Muhaimin, Makoto Hamada, and William Hyun. Alterations of neutrophil l-selection and CD18 expression by tobacco smoke: implications for periodontal diseases. *Journal of Periodontal Research*, 33(6):359–368, 1998-08-01.
- [66] Bruno G. Loos, Marijke T.L. Roos, Peter Th.A. Schellekens, Ubele van der Velden, and Frank Miedema. Lymphocyte numbers and function in relation to periodontitis and smoking. *Journal of Periodontology*, 75(4):557–564, 2004-04-01.
- [67] Catherine Giannopoulou, Joanna J. Kamma, and Andrea Mombelli. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. *Journal of Clinical Periodontology*, 30(2):145–153, 2003-02-01.
- [68] Paramjit S. Tappia, Kerry L. Troughton, Simon C. Langley-Evans, and Robert F. Grimble. Cigarette smoking influences cytokine production and antioxidant defences. *Clinical Science*, 88(4):485–489, 1995-04-01.
- [69] Scott L. Tomar and Samira Asma. Smoking-attributable periodontitis in the united states: Findings from NHANES III. *Journal of Periodontology*, 71(5):743–751, 2000.
- [70] Xiao-Jing Wang, Ying-Feng Liu, Qing-Yu Wang, Morito Tsuruoka, Kazumasa Ohta, Sheng-Xi Wu, Masashi Yakushiji, and Takashi Inoue. Functional expression of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors in human periodontal ligament fibroblasts and rat periodontal tissues. *Cell and Tissue Research*, 340(2):347–355, 2010-05.

- [71] Richard M. Palmer, Ron F. Wilson, Adam S. Hasan, and David A. Scott. Mechanisms of action of environmental factors – tobacco smoking. *Journal of Clinical Periodontology*, 32:180–195, 2005.
- [72] G. K. Johnson, J. M. Guthmiller, S. Joly, C. C. Organ, and D. V. Dawson. Interleukin-1 and interleukin-8 in nicotine- and lipopolysaccharide-exposed gingival keratinocyte cultures. *Journal of Periodontal Research*, 45(4):583–588, 2010-08.
- [73] J. B. Payne, G. K. Johnson, R. A. Reinhardt, J. K. Dyer, C. A. Maze, and D. G. Dunning. Nicotine effects on PGE2 and IL-1beta release by LPS-treated human monocytes. *Journal of Periodontal Research*, 31(2):99–104, 1996-02-01.
- [74] Eric Bernzweig, Jeffrey B. Payne, Richard A. Reinhardt, John K. Dyer, and Kashinath D. Patil. Nicotine and smokeless tobacco effects on gingival and peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(3):246–252, 1998.
- [75] Sumiko Iho, Yukie Tanaka, Rumiko Takauji, Chino Kobayashi, Ikunobu Muramatsu, Hiro-michi Iwasaki, Kishiko Nakamura, Yutaka Sasaki, Kazuwa Nakao, and Takayuki Takahashi. Nicotine induces human neutrophils to produce IL-8 through the generation of peroxynitrite and subsequent activation of NF-kB. *Journal of Leukocyte Biology*, 74(5):942–951, 2003-11-01.
- [76] Lennart Boström, Lars E. Linder, and Jan Bergström. Clinical expression of TNF-alpha in smoking-associated periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(10):767–773, 1998.
- [77] Lennart Boström, Lars E. Linder, and Jan Bergström. Influence of smoking on the outcome of periodontal surgery. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(3):194–201, 1998.
- [78] G. S. Madretsma, G. J. Donze, A. P. van Dijk, C. J. Tak, J. H. Wilson, and F. J. Zijlstra. Nicotine inhibits the in vitro production of interleukin 2 and tumour necrosis factor-alpha by human mononuclear cells. *Immunopharmacology*, 35(1):47–51, 1996-10.
- [79] The UniProt Consortium. Uniprot: the universal protein knowledgebase - nuclear factor kappa b res. p19838, 2016.
- [80] Taner Arabaci, Yasin Cicek, Varol Canakci, Cenk Fatih Canakci, Mehmet Ozgoz, Mevlut Albayrak, and Osman Nuri Keles. Immunohistochemical and stereologic analysis of NF-kappaB activation in chronic periodontitis. *European Journal of Dentistry*, 4(4):454–461, 2010-10.
- [81] L. Konopka, A. Pietrzak, and E. Brzezinska-Blaszczyk. 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*, 47(6):681–8, 2012-12.

- [82] Joanna J. Kamma, Catherine Giannopoulou, Vassilis G. S. Vasdekis, and Andrea Mombelli. Cytokine profile in gingival crevicular fluid of aggressive periodontitis: influence of smoking and stress. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(10):894–902, 2004.
- [83] Ainamo J and Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *International dental journal*, 25(4):229–235, 1975.
- [84] Timothy J. O’Leary, Robert B. Drake, and James E. Naylor. The plaque control record. *Journal of Periodontology*, 43(1):38–38, 1972-01-01.
- [85] S. C. Corbi, G. Anovazzi, L. S. Finoti, Y. J. Kim, M. V. Capela, R. Secolin, A. M. Marcaccini, R. F. Gerlach, S. R. Orrico, J. A. Cirelli, and R. M. Scarel-Caminaga. Haplotypes of susceptibility to chronic periodontitis in the interleukin 8 gene do not influence protein level in the gingival crevicular fluid. *Arch Oral Biol*, 57(10):1355–61, 2012-10.
- [86] L.M. Shaddox, J. Wiedey, N.L. Calderon, I. Magnusson, E. Bimstein, J.A. Bidwell, E.F. Zapert, I. Aukhil, and S.M. Wallet. Local inflammatory markers and systemic endotoxin in aggressive periodontitis. *Journal of Dental Research*, 90(9):1140–1144, 2011-09-01.
- [87] Kemal Üstün, Kamile Erciyas, Bünyamin Kisacik, and Ufuk Sezer. Host modulation in rheumatoid arthritis patients with TNF blockers significantly decreases biochemical parameters in periodontitis - ProQuest. *Inflammation*, 36(5), 2013.
- [88] A Guentsch, W Pfister, G Cachovan, G Raschke, H Kuepper, O Schaefer, and S Eick. Oral prophylaxis and its effects on halitosis-associated and inflammatory parameters in patients with chronic periodontitis. *International Journal of Dental Hygiene*, 12(3):199–207, 2014-08-01.
- [89] Başak Kaval, Diane E. Renaud, David A. Scott, and Nurcan Buduneli. The role of smoking and gingival crevicular fluid markers on coronally advanced flap outcomes. *Journal of Periodontology*, 85(3):395–405, 2013-05-31.
- [90] R. M. Chung, J. T. Grbic, and I. B. Lamster. Interleukin-8 and beta-glucuronidase in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*, 24(3):146–52, 1997-03.
- [91] W. G. Kuschner, A. D’Alessandro, H. Wong, and P. D. Blanc. Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. *The European Respiratory Journal*, 9(10):1989–1994, 1996-10.
- [92] Richard Heym, Sebastian Krause, Till Hennessen, Vinay Pitchika, Christina Ern, and Reinhard Hickel. A computer-assisted training approach for performing and charting periodontal examinations: A retrospective study. *Journal of Dental Education*, 82(1):76–83, 2018-01.
- [93] Richard Heym, Sebastian Krause, Till Hennessen, Vinay Pitchika, Christina Ern, and Reinhard Hickel. A new model for training in periodontal examinations using manikins. *Journal of Dental Education*, 80(12):1422–1429, 2016-12.

- [94] D. A. Apatzidou, M. P. Riggio, and D. F. Kinane. Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adult patients with periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(9):973–983, 2005-09-01.
- [95] Dabra Sarita, China Kamalpreet, and Kaushik Alka. Salivary enzymes as diagnostic markers for detection of gingival/periodontal disease and their correlation with the severity of the disease. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 16(3):358–364, 2012-03.
- [96] Rebecca R. Wassall and Philip M. Preshaw. Clinical and technical considerations in the analysis of gingival crevicular fluid. *Periodontology 2000*, 70(1):65–79, 2016-02-01.
- [97] R. P. Darveau, A. Tanner, and R. C. Page. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontology 2000*, 14:12–32, 1997-06.
- [98] Katherine A. Radek, Peter M. Elias, Laurent Taupenot, Sushil K. Mahata, Daniel T. O'Connor, and Richard L. Gallo. Neuroendocrine nicotinic receptor activation increases susceptibility to bacterial infections by suppressing antimicrobial peptide production. *Cell Host & Microbe*, 8(6):552, 2010.
- [99] A. J. Van Winkelhoff, B. G. Loos, W. A. Van Der Reijden, and U. Van Der Velden. Porphyromonas gingivalis, bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(11):1023–1028, 2002-11-01.
- [100] Ann L. Griffen, Mitzi R. Becker, Sharon R. Lyons, Melvin L. Moeschberger, and Eugene J. Leys. Prevalence of porphyromonas gingivalis and periodontal health status. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(11):3239–3242, 1998-11-01.
- [101] Max A Listgarten, Jørgen Slots, Alois H. Nowotny, Jacqueline Oler, Judy Rosenberg, Barbara Gregor, and Pamela Sullivan. Incidence of periodontitis recurrence in treated patients with and without cultivable. *Journal of Periodontology*, 62(6):377–386, 1991-06-01.
- [102] Khalil Karimi, Hadi Sarir, Esmail Mortaz, Joost J. Smit, Hossein Hosseini, Sjeff J. De Kimppe, Frans P. Nijkamp, and Gert Folkerts. Toll-like receptor-4 mediates cigarette smoke-induced cytokine production by human macrophages. *Respiratory Research*, 7:66, 2006.
- [103] Richard Heym, Franz-Xaver Reichl, Till Gisbert Hennessen, Vinay Pitchika, Burkhard Summer, Christina Ern, Peter Thomas, Reinhard Hickel, and Christof Högg. Influence of smoking on the clinical appearance and il-8 levels in gingival sulcus fluid of smokers and non-smokers with periodontal disease - a prospective study. *J Periodontol*, submitted - 04.07.2018.



## **8. Danksagung**

Ich danke meiner wundervollen Frau Nadine Hennessen (geb. Schmalkuche).



## 9. Lebenslauf

Till Gisbert Hennessen  
Am Schlöble 2a  
86825 Bad Wörishofen

Geboren in Augsburg, am 27.01.1985

September 1991 – Juli 1995	Pfarrer-Kneipp-Grund- und Mittel-Schule Bad Wörishofen
September 1995 - Juli 1999	Josef Bernhard Gymnasium Türkheim
September 1999 – Juli 2002	Realschule
September 2002	Mittlere Reife erlangt
Oktober 2002 – Februar 2006	Ausbildung zum Zahntechniker – Zahntechnik Lederer GmbH
Februar 2006	Gesellenprüfung
Januar 2006 – August 2009	Gesellentätigkeit als Zahntechniker – Zahntechnik Lederer GmbH
September 2009 – Juli 2010	Ausbildung zum Zahntechnikermeister - München
Juli 2010	Zahntechnikermeisterprüfung erfolgreich abgelegt
August 2010 –September 2011	Berufstätig als Zahntechnikermeister – Zahntechnik Lederer GmbH
Oktober 2011 – Februar 2017	Studium der Zahnmedizin an der LMU München
November 2015	Kurt Kaltenbachpreis - 1.Platz
Januar 2017	Approbation Zahnmedizin
ab März 2017	Vorbereitungsassistent als Zahnarzt - Bad Wörishofen
April 2018	Truppmann - Freiwillige Feuerwehr Stockheim



# Anhang



# A. Mess- und Ablaufprotokolle

## A.1. Messprotokoll - Interleukin-8-Konzentrationsbestimmung

Für jedes zu messende Zytokin wurde der lyophilisierte Standard in 4 ml Assay Diluent in einem 15 ml PS-Röhrchen aufgelöst und lichtgeschützt für 15 Minuten inkubiert. Daraus entstand der Top-Standard mit einer Konzentration von 2500 pg/ml für jedes Zytokin; hier nur eins: IL-8. Daraus wurden acht 1:2 Verdünnungsstufen erstellt. 500  $\mu$ L des Top-Standards wurden in die 1:2 Verdünnung transferiert und gemischt. Es wurden neun 5 ml PS-Röhrchen mit jeweils 500  $\mu$ L Assay Diluent gefüllt. Es wurden acht 1:2 Verdünnungsstufen hergestellt. In Gefäß Standard 1 wurden 1000  $\mu$ L aus der Stammlösung pipettiert um anschließend 500  $\mu$ L zu entnehmen und in Standard 2 zu pipettieren. Dieser Vorgang wiederholte sich bis zur Verdünnung von 1:256 (siehe C.1). Der Mischvorgang wurde mit der Pipette und nicht mit dem Vortex durchgeführt. Ein Röhrchen, Standard 10, wurde nur mit dem Assay Diluent, als 0 pg/ml Verdünnung, die Negativkontrolle, angefertigt. Zur Aufbereitung der Proben (Mundwasser und Sulkusflüssigkeit) wurden die Capture Beads jedes Flex Sets in Capture Bead Diluent gelöst. Jede Probe enthielt danach 0,25  $\mu$ L jeder Bead-Art. Es wurde eine Capture Bead Mischung hergestellt. Jeder Probe wurden 0,25  $\mu$ L jedes Capture Beads und ein Gesamtvolumen von 12,5  $\mu$ L Capture Bead Mischung hinzugefügt. Die Capture Bead Mischung bestand aus dem Capture Bead des Zytokins und des Diluent. Nach der Inkubation wurden jeweils 12,5  $\mu$ L der Standards in jeweils ein PS-Reaktionsröhrchen (5 ml) transferiert. Auf die 12,5  $\mu$ L Standards 1-10 sowie die Proben wurden jeweils 12,5  $\mu$ L der Capture Bead Mischung pipettiert und anschließend für 60 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Analog wurde ein Detection Reagent Gemisch vorbereitet, welches für das Zytokin bestimmten PE-gekoppelten Nachweisantikörper enthielt. Das Detection Reagent Gemisch wurde zu jeder verdünnten Probe und den analog verdünnten Standards 1-10 hinzugefügt; jeweils 12,5  $\mu$ L. Die Inkubationszeit betrug 120 Minuten und wurde unter Lichtausschluss und Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurden 250  $\mu$ L Waschpuffer hinzu pipettiert (Proben und Standards) und für 5 Minuten bei 300 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Dabei bildete sich ein sichtbares Pellet auf der Oberfläche. Weitere 150  $\mu$ L Waschpuffer wurden nach Abkippung des Überstandes hinzu pipettiert. Vor der Messung mit dem Durchflusszytometer (FACOS Canto) wurden die Mischungen mit dem Vortexer vermischt. Zur Datenauswertung wurde die Software FCAP Array<sup>TM</sup> von BD Biosciences verwendet. Die Einstellungen des Bioanalyzers wurden aus der CBA-Anleitung übertragen. Die Software konnte automatisch aus der Standardreihe eine Standardkurve produzieren. Die gemessenen Fluores-

## A. Mess- und Ablaufprotokolle

zenzintensitäten konnten einzeln darauf bezogen werden und so die Konzentrationen des Zytokins IL-8 der Proben generiert werden.

### A.2. Ablaufprotokoll - DNA-Isolation

Inhalt des verwendeten Kits und weitere Materialien:

- Waschlösung I, II und III
- Lysepuffer
- magnetische Glaspartikel
- Elutionspuffer
- Lysepuffer (bakteriell)
- Proteinase K
- Pipette
- Wasserbäder
- Pipettierspitzen

Die Wasserbäder wurden vor Beginn auf 65 und 95 °C erwärmt. Die aufgetauten Proben wurden auf Eis gelagert. Jeder Probe wurden 195 µl Lysepuffer (bakteriell) und 30 µl Proteinase K hinzugefügt. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten bei 65 °C und weitere 10 Minuten bei 95 °C. Anschließend wurde bei 10000g zentrifugiert und die Proben langsam abgekühlt. In die Probenkartusche wurden je 100 µl übertragen. In der MagNA Pure Software wurde auf "Ordering" geklickt, die Probennamen spezifiziert und das Protokoll "DNA Bacteria III" ausgewählt. Alle weiteren Schritte wurden nach Anleitung der Software vollzogen (Reagenzien und Zubehör auffüllen, MagNA Pure schließen und verriegeln) und anschließend der Lauf gestartet. Nach der DNA-Isolation wurden die Proben aliquotiert, beschriftet und bei -20 °C gelagert.

### A.3. Ablaufprotokoll - Amplifizierung bakterieller DNA-Fragmente

- Primer PAF (rot) - markierte Oligonukleotidprimer
- Primer PMT (grün) - markierte Oligonukleotidprimer
- dNTP mix (gelb) - (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- PCR-Puffer (transparent)

#### A.4. Ablaufprotokoll - ELISA

- UltraStart Tth DNA Polymerase (transparent, -20 °C)
- Mikropipetten
- sterile Pipettierspitzen mit Filter
- Thermocycler
- ddH<sub>2</sub>O (bidest.)
- PCR-Röhrchen
- Inkubationsschrank (50°C +-1°C)

Vor Beginn wurden die DNA-Proben aus dem Lager geholt und wie die PCR-Lösungen auf Eis aufgetaut. Die Präparation der PCR-Reaktion erfolgte auf Eis. Zuerst wurde der "Master mix", bestehend aus 1µl dNTP, 1µl PAF- bzw. PMT-Primer, 5µl PCR-Puffer, 2 µl Tth DNA Polymerase und 36 µl ddH<sub>2</sub>O, gemischt (bei z.B.: neun Proben und einer Negativkontrolle wurde alles mit zehn multipliziert). Die DNA-Polymerase wurde immer zum Schluss hinzupipettiert. In jedes PCR-Röhrchen wurden 45 µl des "Master mix" und 5 µl der DNA-Probe pipettiert, gemischt und in den Thermocycler transferiert. Dieser wurde auf das Programm "PAF-PMT" eingestellt und gestartet.

PCR-Programm:

- 94 °C, 5 Minuten (Anfangsdenaturierung der DNS)
  - 40x:
    - 94 °C, 25 Sekunden (Denaturierung der DNS)
    - 58 °C, 25 Sekunden (Bindung der Primer))
    - 72 °C, 45 Sekunden (3'-OH Elongation der Primer)
- 72 °C, 3 Minuten (Finale Elongation)

Zwischenlagerung erfolgte bei 4 °C.

#### **A.4. Ablaufprotokoll - ELISA**

Inhalt des verwendeten Kits:

- Farbcodierte Mikrotiterstreifen mit spezifischer Oligonukleotid-Sonde (AA, PG, FN, PI, TF, PM, TD)
- Hybridisierungslösung
- Stringente Waschlösung (SSC und SDS)

#### A. Mess- und Ablaufprotokolle

- Waschpuffer 20x konzentriert (Phosphatpuffer, NaCl u. Detergens, Methylisothiazolon u. Oxypyrrion)
- Konjugat 100x konzentriert (Methylisothiazolon, Dimethy aminoantipyrine u. Chloracetamid)
- TMB(Tetramethylbenzidin)-Substratlösung
- Stopplösung (25% Phosphorsäure)
- hyplex<sup>®</sup> Lysepuffer
- Mikropipetten
- Pipettierspitzen mit Filter
- ddH<sub>2</sub>O
- Photometer mit 450/620nm filter
- Inkubator (50 °C)

Vor Beginn wurde der Inkubator auf 50 °C erwärmt, alle Lösungen und Platten auf Raumtemperatur gebracht, der Stringent Waschpuffer auf 50 °C gebracht und der Hybridisierungspuffer und Konjugat auf Eis gelegt. Die Denaturierung der Proben fand bei 95 °C für 10 Minuten im Thermocycler statt. Zu jeder Probe wurden anschließend 300  $\mu$ l kalter (2-8 °C) Hybridisierungspuffer zugemischt.

In jede Kavität wurden 50  $\mu$ l verdünnte PCR-Lösung pipettiert und anschließend inkubiert bei 50 °C für 30 Minuten. Die Kavitäten entleert und dreimal mit je 200  $\mu$ l stringenter Waschlösung und einmal mit 200  $\mu$ l Waschlösung gewaschen. Die Waschlösungen wurden zuletzt per Schlagen der Platte auf ein Papiertuch vollständig entfernt. Anschließend wurden je 100  $\mu$ l frisch zubereitetes Konjugat-Konzentrat hinzugefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit 200  $\mu$ l Waschpuffer dreimal gewaschen, 100  $\mu$ l Substratlösung in jede Kavität eingebracht und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Dann wurde 100  $\mu$ l Stopplösung hinzugefügt und bei 450nm (mit Referenzlänge bei 620nm bis 650nm) mit dem Photometer gemessen (innerhalb von 60 Minuten nach der Stoppreaktion). Der Nullabgleich erfolgte gegen Luft.

Blankwerte (Reagenzienkontrollen) mussten kleiner gleich 0,100, Negativkontrollen kleiner gleich 0,150 und interne Kontrollen größer gleich 0,500 sein, um alle Testparameter zu erfüllen und die Werte zur Beurteilung freizugeben. Der Werte waren wie in Tabelle A.1 zu interpretieren.

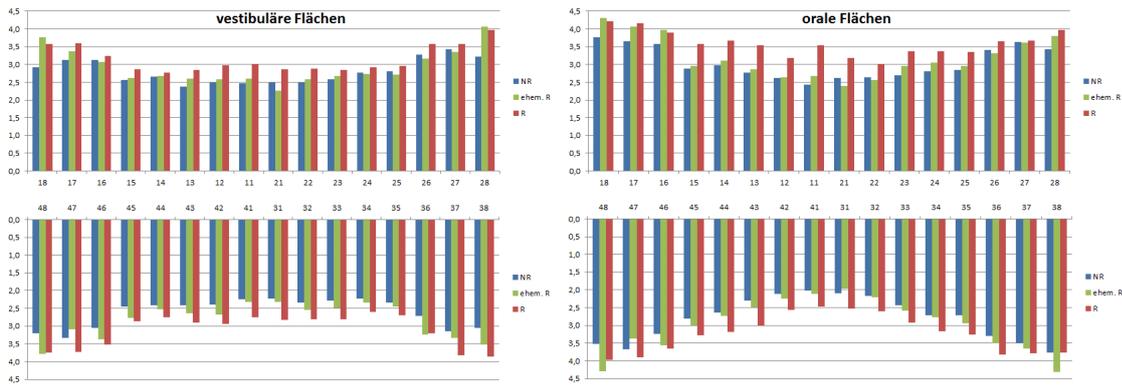
Tabelle A.1.: Evaluation ELISA

	AA	PG	FN	PI	TF	PM	TD
+	>0,300	>0,300	>0,300	<0,2	<0,2	<0,15	<0,2
++	>1,0	>1,0	>1,5	>0,4	>0,4	>0,3	>0,5
+++	>2,0	>2,0	>2,5	>0,6	>0,6	>0,5	>1,0



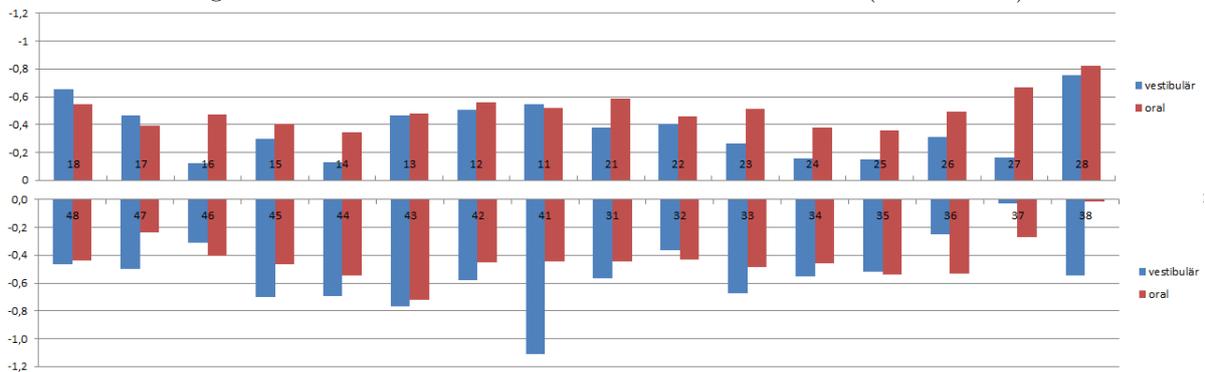
## B. Sonstige Grafiken

Abbildung B.1.: Sondierungstiefen im Flächenvergleich aller Flächen



Alle vestibulären und alle oralen Flächen zusammengefasst (mesial + medial + distal / 3)

Abbildung B.2.: Differenz zwischen Nichtrauchern und Rauchern (alle Flächen)



Alle vestibulären und alle oralen Flächen zusammengefasst (mesial + medial + distal / 3)  
Ehemalige Raucher wurden nicht berücksichtigt (NR - R)



## C. Sonstige Tabellen

Tabelle C.1.: Konzentration der Verdünnungsreihe, BD CBA Human Soluble Protein Flex Set

BD CBA Hu- man Soluble Protein Flex Set Standard	Top Standard	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Protein (pg/mL)	2500	1250	625	312,5	156	80	40	20	10

C. Sonstige Tabellen

Tabelle C.2.: Alter, Größe, Körpergewicht und Body-Mass-Index

	Alter	KG	G	BMI
Nichtraucher	50,34	76,23	171,11	25,93
Raucher	48,52	74,51	172,49	24,92
Gesamt	49,56	75,50	171,70	25,50

LJ = Lebensjahre, Alter in [Jahren], G = Größe in [cm], KG = Körpergewicht in [kg], BMI = Body Mass Index

Tabelle C.3.: Verteilung in Altersdekaden

Dekade	Gesamt						
	N	Alter	KG	K	BMI	NR	R
20-29	12	25,7	82,3	177,7	26,1	9	3
30-39	26	35,8	71,5	169,3	24,7	12	14
40-49	77	45,2	75,7	172,2	25,4	38	41
50-59	91	54,3	76,4	171,6	25,8	53	38
60-65	44	62,1	75,5	170,55	25,2	33	11
						57,2%	42,8%

Dekade in Lebensjahre, Alter in [Jahren], G = Größe in [cm], KG = Körpergewicht in [kg], BMI = Body Mass Index, NR = Nichtraucher (absolut), R = Raucher (absolut)

Tabelle C.4.: Herkunft (ethnische Gruppe)

Ethnische Gruppe	$N_G$	(% <sub>G</sub> )	$N_R$	(% <sub>OR</sub> )	$N_{NR}$	(% <sub>NR</sub> )
kaukasisch	199	79,9	86	81,1	113	79,0
asiatisch	15	6,0	6	5,7	9	6,3
arabisch	14	5,6	7	6,6	7	4,9
afrikanisch	10	4,0	2	1,9	8	5,6
gemischt	7	2,8	5	4,7	2	1,4
südamerikanisch (eingeboren)	2	0,8	0	0	2	1,4
indisch	2	0,8	0	0	2	1,4

$N_G$  = Anzahl gesamt,  $N_R$  = Anzahl Raucher,  $N_{NR}$  = Anzahl Nichtraucher

Tabelle C.5.: Schulabschluss

Abschlussart	Anzahl	(%)
Hauptschule/Quali. Abschluss	68	27,2
Mittlere Reife	53	21,2
Abitur	75	30,0
keine Angabe	54	21,6

Tabelle C.6.: Berufsausbildung

Art	Anzahl	(%)
keine	24	9,6
Lehre	103	41,2
Meister	12	4,8
Hochschulstudium	59	23,6
keine Angabe	52	20,8

Tabelle C.7.: ständige Lebenspartnerschaft

	Anzahl	(%)
ja	134	53,6
nein	65	26,0
keine Angabe	51	20,4

Tabelle C.8.: Lebensverhältnisse

Lebensverhältnisse	Anzahl	(%)
ledig	61	24,4
verheiratet	89	35,6
geschieden	45	18,0
verwitwert	3	1,2
keine Angaben	52	20,8

Tabelle C.9.: Verteilung - Zigarettenkonsum

Gruppe	aktive Raucher		ehemalige Raucher	
	Anzahl (N)	gültige Prozent (%)	Anzahl (N)	gültige Prozent (%)
1-9 zig/d	24	23,3	11	22,9
10-19 zig/d	39	37,9	12	25,0
>19 zig/d	40	38,8	25	52,1
k.A.	4		1	

zig/d = Zigaretten pro Tag, k.A. = keine näheren Angaben

Tabelle C.10.: Verteilung - packyears

Gruppe	aktive Raucher		ehemalige Raucher	
	Anzahl (N)	gültige Prozent (%)	Anzahl (N)	gültige Prozent (%)
1-15 py	29	33,3	25	56,8
15-30 py	38	43,7	9	20,5
>30 py	8	23,0	10	22,7
k.A.	20		5	

py = packyears, k.A. = keine näheren Angaben



## **D. Abbildungsverzeichnis**



# Abbildungsverzeichnis

0.1. LMU . . . . .	2
1.1. IL-8-Molekülstruktur . . . . .	20
1.2. Biologische Aktivität von IL-8 (MONAP) in menschlichen PMNs . . . . .	21
2.1. Übersichtsinterface PA-Programm (PAP) . . . . .	29
2.2. Anamnesedaten PA-Programm . . . . .	30
2.3. Parodontale Messung - PA-Programm . . . . .	32
2.4. Differenzvisualisierung der Sondierungstiefen PA-Programm . . . . .	33
2.5. Pseudonymisierung - Schaubild . . . . .	40
3.1. Stresslevel (subjektiv) . . . . .	44
3.2. Zahnverlust Oberkiefer . . . . .	44
3.3. Zahnverlust Unterkiefer . . . . .	45
3.4. Klinische Parameter (Gruppen RNR-3) . . . . .	47
3.5. Klinische Parameter (Gruppe RNR und nach Geschlecht) . . . . .	48
3.6. Blutung-, Plaque- und BOP-Verteilung . . . . .	48
3.7. Blutung-, Plaque- und BOP-Verteilung (%) bezogen auf Sondierungstiefen (mm)	49
3.8. Sondierungstiefen im Flächenvergleich der medialen Flächen . . . . .	50
3.9. Differenz zwischen Nichtrauchern und Rauchern (nur mediale Flächen) . . . . .	50
3.10. Verteilung der Sondierungstiefen nach AA- und Rauchstatus . . . . .	52
3.11. Verteilung der Sondierungstiefen nach PG- und Rauchstatus . . . . .	52
3.12. IL-8-Konzentrationen in pg/ml . . . . .	54
3.13. IL-8-Konzentrationen in pg/ml zur maximalen Sondierungstiefe pro Patient in Gruppen zusammengefasst (Sulkusflüssigkeit) . . . . .	54
3.14. IL-8 Konzentrationen (pg/ml) zu Plaque-, Blutungs- und BOP-Index . . . . .	55
3.15. IL-8-Konzentrationen in pg/ml zur maximalen Sondierungstiefe pro Patient in Gruppen zusammengefasst (Mundwasser) . . . . .	58
3.16. IL-8 Konzentrationen (pg/ml) zu Plaque-, Blutungs- und BOP-Index (Mundwasser)	58
B.1. Sondierungstiefen im Flächenvergleich aller Flächen . . . . .	103
B.2. Differenz zwischen Nichtrauchern und Rauchern (alle Flächen) . . . . .	103



## **E. Tabellenverzeichnis**



# Tabellenverzeichnis

1.1. Stimulusinduzierte Effekte auf die Zytokinproduktion diverse Zelltypen . . . . .	24
2.1. Optionen im Zahnärztlichen Befund . . . . .	31
3.1. Deskriptive Statistik der initialen IL-8-Daten . . . . .	46
3.2. Deskriptive Statistik der von Ausreißern bereinigten IL-8-Daten . . . . .	46
3.3. IL-8-Konzentration im Sulkusfluid nach BOP-, Plaque- und Blutungsgruppen . .	56
3.4. IL-8-Konzentrationsmuster - Keime - Sulkusflüssigkeit . . . . .	57
3.5. IL-8-Konzentration im Mundwasser nach BOP-, Plaque- und Blutungsgruppen .	59
3.6. IL-8-Konzentrationsmuster - Keime - Mundwasser . . . . .	59
3.7. Regressionsmodell - Anamnesedaten . . . . .	60
3.8. Regressionsmodell - Parodontaldaten . . . . .	61
3.9. Regressionsmodell - Keime . . . . .	61
A.1. Evaluation ELISA . . . . .	101
C.1. Konzentration der Verdünnungsreihe, BD CBA Human Soluble Protein Flex Set	105
C.2. Alter, Größe, Körpergewicht und Body-Mass-Index . . . . .	106
C.3. Verteilung in Altersdekaden . . . . .	106
C.4. Herkunft (ethnische Gruppe) . . . . .	106
C.5. Schulabschluss . . . . .	106
C.6. Berufsausbildung . . . . .	106
C.7. ständige Lebenspartnerschaft . . . . .	107
C.8. Lebensverhältnisse . . . . .	107
C.9. Verteilung - Zigarettenkonsum . . . . .	107
C.10. Verteilung - packyears . . . . .	107