

Aus der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgischen Klinik des
Universitätsklinikums Erlangen-Nürnberg

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. M. R. Kesting

**Untersuchung der Expressionsunterschiede der Interleukine IL-2,
IL-6 und IL-10, der Oberflächenantigene THY-1, CD34 und ITGAL
sowie der Matrix-Metalloprotease-9 in subgingivalen Sulkus-Proben
im Zusammenhang mit Systemischer Sklerodermie**

Der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades Dr. med. dent.

vorgelegt von

Amelie Fabia Lugenbühl

aus Heidelberg

Als Dissertation genehmigt von der
Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

Vorsitzender des Promotionsorgans: Prof. Dr. Markus F. Neurath

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Marco Kesting

Gutachter: PD Dr. Dr. Rainer Lutz

Tag der mündlichen Prüfung: 26. April 2022

*Ich widme diese Dissertation meiner Familie, die mir alles ermöglicht hat und mich
immer unterstützt*

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract.....	1
1.1	Background and Objectives.....	1
1.2	Design and Methods	1
1.3	Results.....	2
1.4	Conclusion	2
2	Zusammenfassung.....	4
2.1	Hintergrund und Ziele.....	4
2.2	Design und Methode	4
2.3	Ergebnisse und Beobachtungen.....	5
2.4	Fazit.....	5
3	Einleitung	7
4	Wissenschaftlicher Hintergrund.....	9
4.1	Parodontitis	9
4.2	Systemische Sklerodermie	10
4.3	Entzündungsmarker und Oberflächenproteine	16
4.3.1	Interleukine	16
4.3.2	Matrix-Metalloprotease-9.....	18
4.3.3	Cluster of Differentiation (CD)	19
4.4	Endpunkte.....	20
5	Material & Methode	21
5.1	Studiendesign	21
5.2	Patientenauswahlkriterien	21
5.3	Klinischer Studienablauf.....	22
5.3.1	Zahnärztlicher Befund und Probenentnahme	22
5.3.2	Klinische Daten der Systemischen Sklerodermie	24
5.4	Probenverarbeitung der Laborparameter.....	24
5.4.1	RNA-Isolierung.....	25
5.4.2	cDNA-Synthese mit QuantiTect Reverse Transcription-Kit von Qiagen.....	26

5.4.3	qPCR mit QuantiTect Primer Assay und SYBR Green	27
5.5	Statistik und Auswertung	30
6	Ergebnisse	31
6.1	Patientenkollektiv	31
6.2	Statistische und deskriptive Analyse der Expression der Entzündungsmediatoren	32
6.3	Darstellung der klinischen Parameter und statistische Auswertung	36
6.4	Quantitative Ergebnisse: Korrelationen anhand des Spearman-Tests	38
7	Diskussion	43
8	Fazit	52
9	Literaturverzeichnis	53
10	Abbildungsverzeichnis	59
11	Tabellenverzeichnis	60
12	Anhangsverzeichnis	61
12.1	Anhang 1. Befundblatt der zahnärztlichen Untersuchung	61
12.2	Anhang 2. RNA-Isolierung aus Sulkusproben nach der TRIzol-Methode	63
12.3	Anhang 3. cDNA-Synthese mit QuantiTect Reverse Transcription Kit	64
12.4	Anhang 4. qPCR (QuantiTect Primer Assay und SYBR Green PCR Kit)	65
13	Danksagung	66
14	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Abstract

Publication

The publication "Investigation of the Expression of Inflammatory Markers in Oral Biofilm Samples in Patients with Systemic Scleroderma and the Association with Clinical Periodontal Parameters- A Preliminary Study" was published on the 27th October 2021 (available at <https://doi.org/10.3390/life11111145>). The named publication contains components of the data, illustrations and literature derived from this monography. Amelie Fabia Lugenbühl is author of the present monography and co-author of the publication mentioned above. Mrs. Dr. med. dent. Mayte Buchbender is the corresponding author.(1)

1.1 Background and Objectives

Systemic Sclerosis (SSc) is a rare and chronic autoimmune disorder with an incidence about 0.3-2.8 per 100 000 habitants per year. The disease leads to fibrosis of the skin but also impairs blood vessels and internal organs. In contrast periodontitis is a very common disease that often results in tooth loss and is a risk factor for several severe illnesses e.g., diabetes and coronary heart disease. In Germany over 50 per cent of the 35- 44-year-old habitants suffer from a moderate to severe periodontitis. Periodontitis is an inflammatory disease caused by the mutual interaction of dysbiotic bacteria and a dysregulated immune response leading to periodontal inflammation. This prospective study investigates the consequences of SSc with respect to the periodontium and the oral cavity and shall evaluate the risk of developing periodontitis. A further aim of the study was to demonstrate differences between patients with SSc and healthy patients based on gene expression analysis of several inflammatory mediators in combination with clinical parameters of isolated subgingival plaque.

1.2 Design and Methods

The study included a total of 39 patients (SSc n=17, control n=22) who were examined for clinical parameters (complete evaluation of the periodontium with plaque index (PI), pocket depth (PPD), clinical attachment loss (CAL) and bleeding on probing (BOP)) and for gene expression levels of the interleukins IL-2, IL-6 and IL-10, matrix-metalloproteinase 9 and the surface antigens THY-1, CD34 and ITGAL. Subgingival plaque samples were obtained minimally invasive, and the RNA of the gathered cell material was isolated by the TRIzol™-method. The relative gene expression levels were detected by real-time quantitative PCR

($\Delta\Delta Ct$). GAPDH was used as housekeeping gene. The statistical analysis was achieved by using Microsoft Excel and IBM SPSS.

1.3 Results

Statistically there were no significant difference regarding the gene expression levels between the SSc and the healthy patients, but the fold change indicates quantity changes between the two groups. IL-6, MMP-9, THY-1 and ITGAL showed an upregulation in the group SSc whereas a downregulation was revealed for IL-2 and CD34. IL-10 did not differ between the two groups. The CAL in per cent was significantly two-times higher in SSc than in the healthy group ($p=0.035$) and 1.2 mm ($p=0.009$), as well as the recession of the gingiva ($p=0.020$). The group SSc showed 10 % more bleeding on probing as the healthy group ($p=0.006$) and a narrowed mouth opening ($p=0.001$). External cervical resorptions were not detected in any patient, but the SSc presented two times more cervical restorations and defects as the control group ($p=0.011$). The BOP correlated significantly with the plaque index in the control group ($p=0.014$) but did not in the SSc group. The interincisal distance correlated negatively with the CAL ($p=0.011$) and the number of sites with PD \geq 4mm ($p=0.015$) in the SSc group. Furthermore, the CAL correlated negatively with IL-6 ($p=0.015$) and IL-6 correlated positively with MMP-9 ($p=0.034$) within SSc. Only the control group showed a positive correlation between the surface antigens THY-1 and CD34 ($p=0.033$).

1.4 Conclusion

The aim of this study was to collect new insights, differences and similarities between the SSc and the periodontitis by means of the expression levels of several inflammatory mediators and clinical parameters. Patients with SSc showed an advanced status of periodontitis by having significantly higher PD and CAL with increased BOP compared to the healthy group, although the plaque index did not differ between the groups. Patients with SSc have a higher risk of developing periodontitis. External cervical resorptions can be rejected as potential symptoms of SSc with high probability. This study elucidates a new method to prove gene expression levels of inflammatory mediators in subgingival plaque samples. It enables to investigate specifically and precisely molecular processes within the sulcus. It is necessary to gain further information of SSc and its impact on the periodontium by complementing more inflammatory mediators. In conclusion dentists need to monitor patients with SSc closely to avoid larger treatments as the limited mouth opening complicates dental therapy for the dentist and the patient. Patients should be motivated repetitively to maintain an adequate oral hygiene to decrease the risk of developing caries or periodontitis. In addition, periodontitis should be

treated immediately to prevent negative consequences on the whole immune system and interactions with SSc in regard of the large focus of inflammation.

2 Zusammenfassung

Publikation

Die Publikation mit dem Titel „Investigation of the Expression of Inflammatory Markers in Oral Biofilm Samples in Patients with Systemic Scleroderma and the Association with Clinical Periodontal Parameters- A Preliminary Study“ wurde am 27. Oktober 2021 veröffentlicht (vorhanden unter <https://doi.org/10.3390/life11111145>). Die Publikation enthält Anteile der Daten, der Grafiken und der Literatur, die aus dieser vorliegenden Monographie hervorgegangen sind. Amelie Fabia Lugenbühl ist die Autorin dieser Monographie und Co-Autorin des oben genannten Papers. Korrespondierende Autorin der Publikation ist Frau Dr. med. dent. Mayte Buchbender.(1)

2.1 Hintergrund und Ziele

Die Systemische Sklerodermie (SSc) ist eine seltene und chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung des Bindegewebes mit einer Inzidenz von 0.3-2.8 pro 100 000 Einwohner pro Jahr. Aufgrund der Fibrosierung und Sklerosierung der Haut, der inneren Organe und der Blutgefäße sind die Betroffenen stark beeinträchtigt. Die Parodontitis hingegen, ist eine weit verbreitete chronische Erkrankung. Die Entzündung des parodontalen Gewebes entsteht durch die Wechselwirkung dysbiotischer Bakterien mit einem dysregulierten Immunsystem und wird zum Beispiel durch mangelhafte Mundhygiene verstärkt. Sie führt nicht nur zum Zahnverlust, sondern beeinträchtigt auch andere schwere Erkrankungen wie zum Beispiel Diabetes mellitus und Herz-Kreislauf-Erkrankungen. In Deutschland leiden über 50 % der Erwachsenen mit 35-44 Jahren an einer moderaten bis schweren Parodontitis. Beide Erkrankungen sind chronisch-entzündliche Erkrankungen, die es gilt, weiter zu analysieren und zu vergleichen. Die nachfolgende Studie untersuchte prospektiv die Folgen der SSc auf den Zahnhalteapparat und die Mundhöhle und soll das Risiko dieser Patienten, eine Parodontitis zu entwickeln, evaluieren. Außerdem sollte anhand von Expressionsunterschieden verschiedener Entzündungsmediatoren in Zusammenhang mit klinischen Parametern eine Differenz zwischen Patienten mit SSc und einer gesunden Vergleichsgruppe dargestellt werden.

2.2 Design und Methode

Insgesamt wurden 39 Probanden (SSc n=17, Kontrolle n=22) in die Untersuchung inkludiert. Es wurden klinische Parameter der Mundhöhle (zum Beispiel ein Zahnstatus, die Anzahl

externer zervikaler Resorptionen und Schleimhautveränderungen, sowie Bestehen einer Zungenverkürzung etc.) erhoben und ein vollständiger parodontaler Status (Plaque-Index (PI), Bleeding on Probing (BOP), Clinical Attachment Loss (CAL), Parodontaler-Screening-Index (PSI)) erstellt. Anhand Real- Time quantitative PCR wurden die Genexpressionen der Interleukine IL-2, IL-6 und IL-10, sowie der Oberflächenproteine THY-1, CD34 und ITGAL und der Matrix-Metalloprotease-9 in minimalinvasiv entnommenen subgingivalen Plaque-Proben gemessen. Die RNA der Proben konnte durch die TRIzol™-Methode isoliert werden. Als „housekeeping gene“ fungierte die GAPDH. Die Unterschiede in der Genexpression und zwischen den Gruppen wurden mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode und anhand des Fold change bestimmt. Die statistische Auswertung wurde mit Excel (Microsoft) und SPSS (IBM) durchgeführt.

2.3 Ergebnisse und Beobachtungen

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Mann-Whitney-U-Test für die Expressionen der Entzündungsmediatoren, doch zeigte der Fold change (RQ) signifikante Unterschiede im Vergleich der SSc Gruppe mit der Kontrollgruppe. So konnte eine Überexpression des IL-6, der MMP-9, des THY-1 und des ITGAL in der SSc Gruppe nachgewiesen werden, sowie eine Herabregulierung der Expression des IL-2 und des CD34. Für IL-10 ergab sich kein Unterschied. In der SSc Gruppe war der CAL (in %) signifikant um das Zweifache erhöht ($p=0.035$), sowie um circa 1,2 mm tiefer ($p=0.009$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die Rezessionen waren in der SSc Gruppe signifikant erhöht ($p=0.020$). Diese zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant 10% mehr Blutung ($p=0.006$) und eine verkleinerte Mundöffnung ($p=0.001$). Externe zervikale Resorptionen wurden in beiden Versuchsgruppen nicht beobachtet, dafür zeigten die SSc Patienten doppelt so viele Zahnhalsfüllungen und/ oder -defekte im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0.011$). In der SSc korrelierte der BOP nicht signifikant mit dem Plaque Index im Gegensatz zur Kontrollgruppe ($p=0.014$). Die Schneidekantendistanz der SSc Patienten korrelierte zum einen negativ signifikant mit dem CAL ($p=0.011$) und zum anderen mit der Anzahl der Taschentiefen $\geq 4\text{mm}$ ($p=0.015$). Der CAL in der SSc Gruppe korrelierte negativ und signifikant mit dem IL-6 ($p=0.015$), während gleichzeitig IL-6 positiv mit MMP-9 signifikant korrelierte ($p=0.034$). Die Kontrollgruppe ergab eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Oberflächenantigen THY-1 und dem CD34 ($p=0.033$), die sich in der SSc Gruppe nicht wiederfand.

2.4 Fazit

Das Ziel der Studie war es neue Erkenntnisse, Unterschiede und Zusammenhänge zwischen der Parodontitis und der Systemischen Sklerodermie anhand des Vergleichs der Expression

von Entzündungsmediatoren und der klinischen Parameter zu gewinnen. Die Patienten der SSc Gruppe litten an einer fortgeschrittenen Parodontitis gemessen an signifikant tieferen Taschen, einem höheren CAL mit einem höheren BOP im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, obwohl sich der Plaque-Index nicht signifikant zwischen den Gruppen unterschied und nur eine signifikante Korrelation zwischen dem Plaque Index und dem BOP in der Kontrollgruppe beobachten ließ. Zusammengefasst haben SSc Patienten im Vergleich zu gesunden Patienten ein erhöhtes Risiko an Parodontitis zu erkranken und einer schwereren Verlaufsform zu unterliegen. Nach dieser Studie kann man externe zervikale Resorptionen als Manifestation der SSc mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen. Die Studie demonstriert, dass man anhand der hier entwickelten Methodik Genexpressionen von Entzündungsmediatoren in der Plaque nachweisen kann, sodass dies eine neue Möglichkeit hervorbringt, diese gezielt nachzuweisen und mit der jeweiligen Fragestellung zu verknüpfen. Um das Wissen über Zusammenhänge und Unterschiede der SSc und der Parodontitis zu erweitern, sollte diese Studie mit weiteren Entzündungsmediatoren ergänzt werden. Schlussendlich ist in der zahnärztlichen Betreuung der Patienten mit SSc dringend auf eine engmaschige Kontrolle zu achten, sodass größere Behandlungen zu vermeiden sind, die aufgrund der eingeschränkten Mundöffnung für Patienten und Behandler schwierig sind. Die Motivation des Patienten zu einer adäquaten Mundhygiene sollte wiederholend durchgeführt werden. Außerdem muss eine Parodontitis direkt behandelt und besser verhindert werden, um eine zusätzliche Belastung des gesamten Immunsystems und Wechselwirkungen mit der SSc zu vermeiden, die aufgrund des großflächigen Entzündungsherdes entstehen könnten.

Abgrenzung zu anderen Dissertationen und Publikationen:

Es gibt Überschneidungen von 22 Patienten innerhalb der Kontrollgruppe mit dem Dissertationsprojekt und der Publikation von Herr Jakob Paul Fehlhofer, Co-Autor des Titels: „Expression of inflammatory mediators in biofilm samples and clinical association in inflammatory bowel disease patients-a preliminary study“, Journal: Clinical Oral Investigation, DOI:10.1007/s00784-021-04093-2). Die überschneidenden Patienten, der zum Teil gemeinsamen Kontrollgruppe, sind unabhängig klinisch untersucht worden und die subgingivalen Sulkusproben wurden eigenständig entnommen. Die Methodik im Labor von der Gewinnung der RNA bis zur Real-Time qPCR gleicht sich in beiden Dissertationen, wobei die Durchführung der Arbeitsschritte im Labor und die statistische Auswertung der Ergebnisse allein und eigenständig erfolgte. Es wurden zum Teil unterschiedliche Entzündungsmediatoren untersucht.

3 Einleitung

Die Systemische Sklerodermie (SSc) ist eine seltene und chronisch verlaufende Autoimmunerkrankung aus der Gruppe der Kollagenosen, die sich in Blutgefäßen und inneren Organen, vornehmlich der Haut, manifestieren kann. Unterteilt wird die SSc in den limitierten und den diffusen Typ, sowie den zirkumskripten Typ, der in dieser Arbeit nicht eingeschlossen wurde. Der limitierte Subtyp tritt mit 43% häufiger auf als der diffuse Typ mit 30%.⁽²⁾ Für die SSc wird eine Prävalenz von 10-15/100.000 Einwohnern angegeben.⁽³⁾ Die Ursache sowie die Ausprägungsgrade auf die unterschiedlichen Organe sind bisher unklar. Speziell die Mundhöhle, respektive mögliche Auswirkungen auf den Zahnhalteapparat, sind nur in wenigen Studien diskutiert worden. Aus bisheriger Literatur ist bekannt, dass viele Patienten charakteristische Erscheinungsmerkmale im Laufe der SSc entwickeln, wie zum Beispiel eine verkleinerte Mundöffnung, Sklerosierung des Zungenbändchens und radiär verlaufende periorale Falten (Tabaksbeutelmund).⁽⁴⁾ Ein paar wenigen Studien der letzten Jahre zeigten, dass die Patienten mit systemischer Sklerodermie zum Teil erhöhte klinische parodontale Parameter aufwiesen wie zum Beispiel einen erhöhten Clinical Attachment Loss (CAL) und eine höhere Anzahl an fehlender Zähne im Vergleich zu der jeweiligen gesunden Kontrollgruppe.^(5, 6) Ob der Abbau des parodontalen Bindegewebes eine Folge der SSc oder durch eine gleichzeitig bestehende Parodontitis hervorgerufen wird, konnte bislang noch nicht geklärt werden. Die Parodontitis gehört auch wie die SSc zu den chronisch entzündlichen Erkrankungen. Die Entzündung des Zahnhalteapparats wird durch eine dysregulierte Immunantwort hervorgerufen, die zum Beispiel durch Bakterien der Mundhöhle verursacht werden kann. Durch eine kaskadenartige Ausschüttung an Immunmediatoren wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst. Diese führt zum Abbau der parodontalen Fasern des Zahnhalteapparates, zu erhöhtem Zahnfleischbluten und zu verstärktem Knochenabbau um den betroffenen Zahn herum bis zum Zahnverlust. Zwar scheinen die Patienten mit SSc zum Teil ähnliche klinische parodontale Parameter aufzuweisen, welche für eine Parodontitis charakteristisch sind. Doch aufgrund der mangelnden Datenlage konnte die Frage nach einem konkreten Zusammenhang in Bezug auf die Pathogenese oder die Ausprägung der gegenseitigen Beeinflussung zwischen der SSc und der Parodontitis noch nicht beantwortet werden. Zugleich lässt der Fakt, das in beiden Krankheiten Bindegewebe durch die eigene entzündliche Immunantwort aufgelöst wird und bei Patienten mit SSc ein erhöhter klinischer Attachmentverlust wie bei Patienten mit Parodontitis gezeigt werden konnte, über gemeinsame oder ähnliche destruktive Vorgänge der SSc und der Parodontitis nachdenken. Das Ziel dieser Untersuchung war es Unterschiede in den klinisch parodontalen Parametern zwischen der SSc Gruppe und der gesunden Kontrollgruppe zu zeigen und diese mit anderen klinischen Parametern der SSc in Zusammenhang zu setzen. Außerdem sollte anhand

minimalinvasiv entnommener Sulkus-Proben die Expression von verschiedenen Entzündungsmediatoren nachgewiesen und mit den klinischen Parametern korreliert werden. Bei erfolgreicher Etablierung der hier angewendeten Methodik könnte dies neue diagnostische Perspektiven aufzeigen, aber auch lokale Vorgänge der Immunantwort in der Gingiva besser aufklären. Weiterhin wurde aufgrund eines bisher bekannten Fallberichts über die mögliche Manifestation von externen zervikalen Resorptionen bei Patienten mit SSc untersucht, ob diese tatsächlich gehäuft auftreten.(7) Externe zervikale Resorptionen entstehen durch Umbauvorgänge der Zahnhartsubstanz und unterliegen ähnlichen Mechanismen, die für den Knochenabbau verantwortlich sind.(7)

4 Wissenschaftlicher Hintergrund

4.1 Parodontitis

Die Parodontitis ist eine chronisch verlaufende entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates, die weltweit stark verbreitet ist. Aufgrund der ansteigenden Weltbevölkerung und des zunehmenden Erhalts der eigenen Zähne, stieg im Vergleich von 2005 zu 2015 die Prävalenz der Parodontitis um 25,4%.⁽⁸⁾ In der zuletzt veröffentlichten Fünften Deutschen Mundgesundheitsstudie wurde eine Prävalenz für die schwere Form der Parodontitis auf 15,3 % der Erwachsenen im Alter von 35-44 Jahren errechnet.⁽⁹⁾ Die Prävalenz steigt mit dem zunehmenden Alter an, sodass in Deutschland Erwachsenen im Alter von 75-100 Jahren fast dreimal so häufig (44,3%) an einer schweren Parodontitis leiden als die oben genannten. Insgesamt wird das Auftreten parodontaler Erkrankungen in Deutschland auf 11,5 Millionen Menschen hochgerechnet.^(9, 10)

Definitionsgemäß ist die Parodontitis der fortschreitende Verlust des Zahnhalteapparates durch Entzündung, die mit einem bakteriellen Biofilm assoziiert ist. Hauptcharakteristisch ist außerdem das Bestehen einer parodontalen Tasche und das Vorhandensein gingivaler Blutung.⁽¹¹⁾ Die Parodontitis steht unter multifaktoriellen Einflüssen, wie zum Beispiel Rauchen, verschiedene Allgemeinerkrankungen (Diabetes mellitus) und Virulenzfaktoren der oralen Bakterien, die sich auf den Schweregrad und den Verlauf der Erkrankung auswirken.⁽¹²⁻¹⁴⁾ Ein gesundes Parodont unterliegt einem dynamischen Gleichgewicht aus einer adäquaten Immunreaktion des Wirts mit dem bestehenden Biofilm und den dazugehörigen Bakterien.⁽¹⁵⁾ Die Parodontitis beginnt, wenn die Wechselwirkung in Dysbalance gerät und eine dysregulierte Immunantwort folgt. Es gelangen pro-inflammatorische Zytokine aus der Familie des Interleukin-1, IL-6 und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) in den Speichel und in die Sulkusflüssigkeit durch Sezernierung aus verschiedenen Zellen, wie zum Beispiel aus gingivalen Epithelzellen, auch polymorphe neutrophile Granulozyten und Fibroblasten.⁽¹⁶⁾ Folgend werden vor allem Makrophagen und polymorphkernige Leukozyten angezogen, aber auch T- und B-Zellen. Weitere pro-inflammatorische Zytokine stoßen die Produktion und Ausschüttung von Prostaglandinen, Matrix-Metalloproteinasen und RANKL an, die für den Abbau des Bindegewebes und des Alveolarknochens verantwortliche Zellen aktivieren. Bleibt das bakterielle Ungleichgewicht mit gleichzeitig überschießender inflammatorischer Gegenreaktion über längeren Zeitraum bestehen, schreitet die Destruktion des parodontalen Gewebes fort. Folgend tritt progressiver Attachmentverlust ein, der zur Zahnlockerung und letztlich zum Zahnverlust führen kann.^(14, 16-18)

Die Dysbiose kann von nicht-modifizierbare und modifizierbare Risikofaktoren begünstigt werden.(18) Die nicht-modifizierbaren Risikofaktoren sind genetisch verankert. Diese lassen sich nicht vom Patienten beeinflussen (z.B. Alter, ethnische Herkunft und genetische Prädispositionen). Zu den modifizierbaren Risikofaktoren, die auch als Lifestyle-Faktoren bezeichnet werden, gehören Rauchen und fehlerhafte Ernährung, schlechte Mundhygiene und psychischer Stress. Das Risiko von Rauchern an Parodontitis zu erkranken liegt bei 85%.(12) Weiterhin gibt es noch erworbene Risikofaktoren, welche Allgemeinerkrankungen, Auswirkungen von Medikamenten und hormonelle Veränderungen umfassen. Patienten, die zum Beispiel an Diabetes mellitus leiden, haben ein 3-fach erhöhtes Risiko an einer Parodontitis zu erkranken.(13)

4.2 Systemische Sklerodermie

Die Inzidenz der SSc liegt bei 0,3-2,8/100.000 pro Jahr. Mit einer Prävalenz von 10-15/100.000 zählt sie zu den seltenen Bindegewebserkrankungen und tritt bei Frauen dreimal häufiger als bei Männern auf.(2) Der Beginn der Erkrankung ist epidemiologisch schwierig zu erfassen, da die Erstmanifestation am häufigsten das Raynaud-Phänomen ist. Manche Patienten können sich oft nur vage an das erstmalige Auftreten erinnern und geben eine Zeitspanne zwischen dem 20.-30. Lebensjahr an. In Abhängigkeit des Typs der SSc kann die Sklerosierung der Haut zirka 10-20 Jahre später eintreten, sodass oft das Datum der Erstdiagnose epidemiologisch verwendet wird.(19) In einer Metaanalyse von 2014 wurde eine kumulative Überlebensrate von 74,9% nach 5 Jahren und von 62,5% nach 10 Jahren seit der Erstdiagnose ermittelt (20), wobei diese Prozentangaben je nach Patientengruppe variieren. Im Verlauf der Erkrankung werden Regionen der Haut, innere Organe und das vaskuläre System durch progressive Fibrosierung geschädigt.(21) Die Gefäßlumen verkleinern sich und folgend entstehen Diffusions- und Perfusionsstörungen, die zum Beispiel das Raynaud-Syndrom verursachen.(2) Die Pathogenese der Systemischen Sklerodermie variiert zwischen den unterschiedlichen Subtypen, wobei der limitierte Typ zu 43% und der diffuse Typ zu 30 % der Fälle vorkommt, sowie weitere 30% dem Overlap-Syndrom zugeordnet werden. Diese Patienten zeigen zusätzliche Erkrankungsmuster eines Systematischen Lupus erythematodes oder einer Dermatomyositis.(2) Zudem ist die Abfolge der Symptome bisher nicht eindeutig geklärt und die Schweregrade der Symptome der Patienten unterscheiden sich.(22) Außerdem werden viele unterschiedliche Auslöser diskutiert und untersucht. Umweltschadstoffe wie zum Beispiel organische Chemikalien sollen ein erhöhtes Risiko darstellen.(4) Des Weiteren wurden Assoziationen mit bakteriellen und viralen Infektionen (Helikobakter pylori, Cytomegalovirus oder Parvovirus B19) erörtert, doch konnte bisher kein sicherer Zusammenhang hergestellt werden.(23) In einer Studie mit drei Kohorten aus den Vereinigten

Staaten identifizierte man die positive Familienanamnese als stärksten Risikofaktor. Familienangehörige ersten Grades hatten im Durchschnitt ein dreizehnmal höheres Risiko an SSc zu erkranken im Vergleich zur allgemeinen nordamerikanischen Bevölkerung. Insgesamt lag das Risiko trotzdem noch unter 1% für die Familienmitglieder.(24) Auch Adhäsionsmoleküle, T-Zellen und Zytokine stehen im Verdacht an der Pathogenese beteiligt zu sein. Zum einen werden unter anderem IL-6 und IL-10 mit dem Vorgang der Fibrosierung assoziiert. Das IL-6 stimulierte in kultivierten Fibroblasten die Kollagen sezernierung und erhöhte Serumkonzentrationen von IL-6 und IL-10 scheinen mit dem Grad der Fibrosierung der Haut zu korrelieren.(25, 26) Zum anderen wurde eine verminderte Anzahl an regulierenden T-Zellen in Hautläsionen und Serumlevel von Patienten mit SSc im Vergleich zu gesunden Probanden gefunden und dies der Grund für den Verlust der Selbsttoleranz des Immunsystems zu sein.(27) Wahrscheinlich beruht die Ursache der SSc auf einem Zusammenspiel aus Umweltfaktoren, genetischer Disposition und vorangegangener Infektionen, sowie einer Störung des Immunsystems.(23, 24)

Aufgrund der Seltenheit und des individuellen Krankheitsverlaufs ist es schwierig klinische Studien mit großen Patientenkollektiven durchzuführen, die unter gleichen Kriterien stattgefunden haben.(3) Um einheitliche Diagnosekriterien zu schaffen, wurde die Klassifikation von 1980 des American College of Rheumatology (ACR) durch ein Komitee des ACR und der European League Against Rheumatism (EULAR) 2013 überarbeitet. Es wurden immunserologische und kapillarmikroskopische Untersuchungen als Diagnoseparameter ergänzt, um eine frühere und korrekte Diagnose zu ermöglichen.(19) Das Komitee entwickelte ein Punktesystem für eine objektivere Bewertung. Hautverdickungen der Hände, die sich proximal der Metacarpophalangealgelenke ausbreiten, wurden als alleiniges ausreichendes Kriterium angesehen, um SSc zu diagnostizieren. Zusätzliche Kriterien, wie der Zustand der Finger in Bezug auf Schwellungen (Puffy fingers), Sklerodaktylie oder bestehender Läsionen (Ulzerationen oder Narben) an den Fingerspitzen werden bewertet. Speziell untersucht werden die Regionen der Nagelfalze nach pathologisch geformten Kapillaren und nach SSc-relevanten Autoantikörper. Außerdem zählt zu den Diagnosekriterien die interstitielle Lungenerkrankung (ILD) oder die pulmonale Hypertension. Als letzter Parameter wird das Raynaud-Syndrom eingeschlossen. Die jeweiligen Punkte aus den Gruppen werden addiert. Die Diagnose Systemische Sklerodermie ist ab ≥ 9 Punkten definiert. Diese Diagnosekriterien werden in der Hautklinik des Universitätsklinikums Erlangen angewendet.(19)

Die Subtypen der SSc zeigen unterschiedliche Reihenfolgen und Ausprägungen der Symptome, wie folgt dargestellt: Die Fibrosierung des limitierten Typs beginnt an den Akren, hauptsächlich an den Händen, und breitet sich bis zu den Ellbogen, Knien und im Gesicht aus. Insgesamt schreitet der limitierte Typ langsamer voran. Die Erstmanifestation des limitierten

Typs, das Raynaud-Syndrom, beginnt meist Jahre vor der ersten Sklerosierung der Haut. Dem limitierten Typ wird das Antinukleäre Antikörper namens CENPB-Antikörper (Centromer B Protein) zugeordnet, welches zu 50% auftritt.(22, 28) Außerdem setzt im limitierten Typ die pulmonale arterielle Hypertonie später ein als in der diffusen SSc.(3) Eine Untergruppe des limitierten Typs ist das CREST-Syndrom. Dieser Begriff wird heute vor allem noch in Nordamerika verwendet und steht für Kalzinose (calcinosis), Raynaud-Syndrom und ösophageale Dysfunktion, sowie Sklerodaktylie und Teleangiektasien.(4) Im Gegensatz dazu greift der diffuse Typ auf den Rumpf, die proximalen Extremitäten und das Gesicht schnell-progressiv über. Die Sklerosierung der Haut und Fibrosierung der inneren Organe folgt rasch auf das Raynaud-Syndrom. Durch die frühe Fibrosierung der Lunge entsteht sekundär die pulmonale arterielle Hypertonie.(3) Das Topoisomerase-1 (anti-Scl-70)-Antikörper charakterisiert mit 30% den diffusen Typ.(22)

Das Raynaud-Syndrom tritt bei mehr als 90% aller Patienten mit SSc auf und wird auch durch Kälte, emotionalen Stress und Rauchen getriggert.(29) Der rezidivierende, triphasische Ablauf, auch „Tricolore-Phänomen“ genannt, beginnt aufgrund von Perfusionsstörungen und Vasokonstriktion, wodurch die Hände weiß erscheinen. Daraufhin folgt die Zyanose, die eine blaue Verfärbung der Finger erzeugt. Danach tritt die reaktive Hyperämie mit Rötung der Finger ein.(30) Eine in der frühen Diagnostik angewandte Untersuchung ist die Kapillarmikroskopie, die zur Beurteilung des Kapillarbett des Nagelfalz bzw. des Nagelhäutchen genutzt wird. Der Blutdurchfluss und die Anordnung der Kapillaren werden betrachtet und erlaubt so eine Einschätzung der pathologischen Veränderung der Mikrozirkulation in den Fingern. Megakapillaren, Kapillarverluste, Blutergüsse oder Veränderung der normalen Anordnung beweisen die pathologischen Veränderungen der Fingergefäße.(31) An den Fingern entstehen zuerst nicht-eindrückbare Schwellungen (puffy fingers), die im weiteren Verlauf sklerosieren (Sklerodaktylie). Die Kontur der Finger geht durch die Veränderung des Bindegewebes verloren, sowie die Beweglichkeit durch die Fixierung der Haut an dem darunterliegenden Gewebe. Die Finger werden spitz und dünn, sodass ihnen das Synonym „Madonnenfinger“ gegeben wurde.(3) Aufgrund der Steifigkeit ist ein Faustschluss oder das Greifen eines Gegenstands nicht mehr oder nur erschwert möglich. Ein Drittel der Patienten entwickeln während ihrer Krankheit digitale Ulzerationen, die durch die gestörte Perfusion oder durch zu wenig Elastizität der Haut entstehen. Die Wunden sind Eintrittspforten für Bakterien, wodurch sekundäre Infektionen auftreten, die sich bis zu einer Osteomyelitis ausbreiten oder zu Nekrosen weiterentwickeln können.(32) In der Dermis und in der Subkutis der akralen Körperteile, sowie in Gelenken entstehen Kalzifikationen (Calcinosis cutis), welche aus Kalziumkarbonat zusammen gesetzt sind.(2) Aufgrund der Ablagerungen in den Gelenken und durch Reibung entstandene Erosionen, folgen Schmerzen und Einschränkungen der Beweglichkeit.(29) Die Sklerosierung der Haut greift auch auf das

Gesicht über. Die Patienten leiden unter maskenartigen Gesichtern (Amimie), da durch die Verhärtungen und Vermehrung des Bindegewebes die Mimik zu großen Teilen verloren geht und die Falten verschwinden. Um den Mund entsteht eine periorale radiäre Faltenbildung, die auch Tabaksbeutelmund genannt wird. Die Mundöffnung verkleinert sich im Verlauf der Krankheit, sodass die Aufnahme von Nahrung und die Mundhygiene eingeschränkt sind. Ein typisches, aber selten in Erscheinung tretendes Zeichen, ist die Verkürzung des Zungenbändchens.(33) Die Sicca-Symptomatik, die vor allem Augen und die Speicheldrüsen betrifft, sowie unregelmäßig auch die genitale Schleimhaut, setzt die Lebensqualität herab. Die Augen leiden unter der Keratokonjunktivitis sicca, einem dauerhaften Fremdkörpergefühl im Auge oder einem Brennen. Um ein Austrocknen oder Entzündungen vorzubeugen, müssen täglich Augentropfen verwendet werden. Die Mundtrockenheit, die durch immer weniger werdenden Speichel hervorgerufen wird, kann in einer Xerostomie enden.(33) Die Speichelfließrate sinkt hierbei in Ruhe unter 0,1ml/min. Unzureichender Speichelfluss erschwert das Kauen und das Einspeicheln von Nahrung, sowie das längere Sprechen. Durch die fehlenden Mineralien des Speichels erfolgt keine Remineralisation der Zähne, das wiederum die Kariesentstehung begünstigt. Im Vergleich hierzu haben Patienten, die am Sjögren-Syndrom leiden und auch eine ausgeprägte Sicca-Symptomatik aufweisen, ein doppelt so hohes Kariesrisiko.(34) Weitere typische Merkmale der systemischen Sklerodermie sind Teleangiectasien, die häufig im Gesicht lokalisiert sind. Um den Zustand der Hautsklerosierung quantitativ zu messen und diesen im Verlauf der Krankheit zu vergleichen, werden 17 Körperregionen nach dem Prinzip des modifizierten Rodnan Skin Score (mRSS) getestet.(35) Die Hautdicke der verschiedenen Areale (Gesicht, Dekolleté bzw. vordere Brust, Abdomen, beide Ober- und Unterarme, Hände und Finger, beide Ober- und Unterschenkel, Füße) werden mit zwei Fingern untersucht und mit 0-3 Punkten bewertet. Die Haut wird an der am meisten betroffenen Stelle zwischen zwei Fingern zu einer Hautfalte gedrückt:

0 \triangleq entspricht normaler Haut	Feine Falten entstehen, keine Verdickung
1 \triangleq milde Hautverdickung	Hautfalte entsteht leicht, feine Falten sind akzeptiert
2 \triangleq moderate Hautverdickung	Hautfalte schwierig zu greifen, keine feinen Falten entstehen
3 \triangleq schwerwiegende Hautverdickung	Nicht möglich Hautfalte zu bilden

Tabelle 1: Einteilung und Punktesystem des modified Rodnan Skin Score (35)

Die jeweiligen Punkte werden addiert und die Gesamtpunktzahl von 0 bis 51 gibt den Schweregrad der Hautverdickung an.(36) 0 mRSS-Punkte entsprechen einer normalen Haut, 1-14 Punkte geben einen geringen Schweregrad 1 an, Schweregrad 2 mit 15-29 Punkten ist

äquivalent mit einem mäßigen Schweregrad und der Schweregrad 3 mit 30-39 Punkten einer schweren Hautverdickung. Das finale Stadium ist ab >40 Punkten erreicht.(2) Die Ergebnisse dieser Methode korrelieren mit dem Schweregrad der Sklerosierung erfasst durch Hautbiopsien.(35)

Eines der wichtigen Untersuchungsparameter für die Diagnostik der SSc, ist das Testen auf Autoantikörper. ANA bezeichnet Autoantikörper, die mit Antigenen von Zellkernen reagieren. Alleiniges Auftreten von ANA ist kein ausreichendes Kriterium, um SSc zu diagnostizieren. Umgekehrt ist das Fehlen von ANA nicht aussagekräftig genug, um SSc auszuschließen.(22) Diese Parameter müssen immer in Zusammenhang mit anderen vorhandenen Symptomen gesehen werden.

Pathologische Veränderungen des Gastrointestinaltrakt beeinträchtigen 75-90% der Patienten mit SSc.(37) Unter anderem leiden die Patienten unter gastroösophagealen Reflux und verminderter Motilität durch Versteifung des ganzen Magen-Darm-Trakts. Des Weiteren treten Teleangiektasien in der Mukosa auf und die Patienten können nach langjährigem Krankheitsverlauf einen Barrett-Ösophagus entwickeln. Andere Symptome wie Malabsorption, Verstopfung und Diarrhoe sind möglich.(37)

40-80% der SSc-Patienten weisen eine interstitielle Lungenerkrankung mit unterschiedlichem Ausmaß auf.(3) Die Fibrosierung der Lunge und daraus resultierenden Diffusionsstörungen erschweren das Atmen und somit auch die Leistungsfähigkeit der Patienten. Anhand der Spirometrie und der Bodyplethysmographie sollte die Lunge regelmäßig getestet und durch bildgebende Verfahren beobachtet werden.(29)

Das Herz wird durch die pulmonale arterielle Hypertonie ebenfalls belastet. In wenigen Fällen greift die Fibrosierung auf das Myo- und Perikard über. Folgend können das Reizleitungssystem und die Herzklappen betroffen sein, deren Funktionsverlust Herzrhythmusstörungen oder Herzinsuffizienz auslösen können.(3, 38)

Die Sklerosierung der Niere verursacht eine Verschlechterung der Nierenfunktion. Vor allem die Gefäße sind betroffen, wodurch die Filtrationsfunktion gestört wird. Folgend gerät der Wasserhaushalt aus dem Gleichgewicht, was zu einer arteriellen Hypertonie führen kann. Die langjährige Einnahme von Kortikosteroide oder Cyclosporin erhöhen das Risiko einer renalen Krise. Diese Medikamente werden bei Patienten mit diffuser Systemischen Sklerodermie eingesetzt.(39)

<u>Limitierte systemische Sklerodermie</u>	<u>Diffuse systemische Sklerodermie</u>
50% der Fälle CENPB positiv	25% der Fälle RNAP positiv, 30% der Fälle Scl70/ATA positiv
Lang-bestehendes Raynaud-Phänomen	Kurz-bestehendes oder begleitendes Raynaud-Phänomen
Sklerosierung der Haut <ul style="list-style-type: none"> • Hände • distalen Extremitäten • Gesicht 	Sklerosierung der Haut <ul style="list-style-type: none"> • proximalen Extremitäten • Rumpf • Gesicht
Langsamer Beginn und Verlauf	Rascher Beginn und Verlauf
Spät einsetzende PAH	Hohes Risiko für Beteiligung innerer Organe
Kalzinose, Digitale Ulzeration	Lungenfibrose, Digitale Ulzeration, renale Krise

Tabelle 2: Subtypen der Systemischen Sklerodermie im Überblick (2, 4)

Zusammenfassung des klinischen Zusammenhangs zwischen SSc und dem Zahnhalteapparat:

Der parodontale Status von Patienten mit SSc ist bisher nur in wenigen Studien und mit wenigen Probanden untersucht worden. Zum einen wurde ein erhöhter klinischer Attachmentverlust aufgezeigt (5, 6), der auch bei Patienten mit Parodontitis besteht. Außerdem korrelierte ein röntgenologisch erweiterter parodontale Spalt mit dem Schweregrad der SSc (40, 41). Pathologisch verengte Gefäße gehören zu den Hauptsymptomen der SSc. In 15 Patienten mit limitierter SSc wurden mikroskopisch vergrößerte Durchmesser der Gefäße und irreguläre Gefäßwindungen in der Gingiva festgestellt (42), doch sind diese Ergebnisse durch keine weiteren Studien belegt worden. Zudem unterschieden sich in einer weiteren Studie von 13 Probanden mit SSc die medianen Kapillaranschnitte in der marginalen Gingiva nicht im Vergleich zu den 8 Probanden mit Parodontitis.(43)

4.3 Entzündungsmarker und Oberflächenproteine

4.3.1 Interleukine

Interleukine gehören zur Gruppe der Zytokine, die als zentrale Regulatormoleküle die Immunantwort beeinflussen. Sie werden von Epithelzellen, Fibroblasten, dendritischen Zellen und Makrophagen, sowie von T-Helferzellen produziert.(44)

4.3.1.1 Interleukin-2

Interleukin-2 (IL-2) ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches auch als T-Zell-Wachstumsfaktor bezeichnet wird. Nach Antigenbindung wird es hauptsächlich von CD4+ Zellen sezerniert, aber auch in geringerem Ausmaß von B-Zellen, natürlichen Killer-Zellen, Monozyten und Makrophagen.(45) Es ist das wichtigste Signalmolekül für die Aktivierung von regulatorischen T-Zellen (CD4+ FoxP3+CD25+ T_{reg}), wird aber nicht von ihnen ausgeschüttet.(46) Es steuert die suppressive Wirkung der T_{reg}-Zellen und fördert somit das Gleichgewicht und die Selbsttoleranz der Immunantwort.(45-48) In den letzten Jahren untersuchte man die Rolle der T_{reg}- Zellen in Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel den Systemischen Lupus erythematodes (SLE) oder die Systemische Sklerodermie. In beiden Erkrankungen soll die Funktion und / oder die Anzahl der T_{reg}-Zellen eingeschränkt beziehungsweise erniedrigt sein, sodass die Selbsttoleranz des Immunsystems und das Gleichgewicht zwischen den T_{reg}-Zellen und anderen T-Zelltypen gestört ist.(47, 49, 50). Es konnten erhöhte Serumlevel von IL-2 in Patienten mit SSc und erhöhte Konzentrationen von IL-2 in peripheren monoklonalen Blutzellkulturen im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden.(51, 52) Erhöhte Konzentrationen könnten auf eine gestörte Regulation innerhalb der Immunantwort hindeuten, die zu eingeschränkter Funktion der T_{reg}-Zellen führt und somit die Selbsttoleranz herabsetzt.

In Bezug auf die Parodontitis sind die Ergebnisse der bisherigen Literatur gegensätzlich. Zum einen konnte eine erhöhte Expression von IL-2 in der Sulkusflüssigkeit in Taschen von Patienten mit Parodontitis im Vergleich zu gesunden Taschen beobachtet werden.(53) Zum anderen wurden in Serumproben von Patienten mit chronischer Parodontitis niedrige Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen, jedoch ohne Signifikanz.(54) In einem Tierversuch stieg die Expression von IL-2 in gingivalen Gewebeproben mit Parodontitis in der Resolutionsphase, also nach Entfernung des iatrogenen Reizes im Vergleich zum gesunden Ausgangsgewebe.(44)

4.3.1.2 Interleukin 6

Das Interleukin-6 (IL-6) gehört zur Gruppe der proinflammatorischen Interleukine der Th17-Zellen und unterstützt die Immunantwort gegen extrazelluläre Pathogene (z.B. Bakterien und Pilze).(44) Außerdem spielt es eine Rolle in der Aktivierung der Produktion von Antikörpern, in der Stimulierung der B- und T-Zell Proliferation und deren Differenzierung, sowie in der Aktivierung der Akute-Phase-Reaktion.(26) In den letzten Jahren rückte das IL-6 in den Vordergrund der Pathogenese der Systemischen Sklerodermie, da zum einen erhöhte Serum-Level von IL-6 sowie erhöhte Konzentrationen von IL-6 in aktiven Hautläsionen in Patienten mit SSc gefunden wurden.(25, 26, 50, 55, 56) Zum anderen konnte durch Inhibition des IL-6-Rezeptors durch Tocilizumab ein Zusammenhang zum profibrotischen Signalweg beobachtet werden.(57) Außerdem zeigte eine Maus-Model-Studie, dass aktive und passive Immunisierung zwar nicht die Fibrosierung verhindern kann, aber die Verdickung der Haut vermindert und die T-Zell-Infiltration in Hautläsionen verringert.(25) Erhöhte Serum-Level von IL-6 stehen in positiver Korrelation zu dem mRSS und erhöhten CRP-Leveln.(56) Insgesamt bekräftigt dies die Annahme, dass IL-6 eine wichtige Rolle für das Entzündungsgeschehen und für den Verlauf der Fibrosierung spielt.

Die Th17 Zytokine scheinen in die Differenzierung der Osteoklasten und in die Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen einzugreifen und somit zum Abbau des Hart- und Weichgewebes beizutragen.(58) In Bezug auf die Parodontitis sind erhöhte Plasma-Level und erhöhte Konzentrationen im Speichel von IL-6 in Patienten mit chronischer Parodontitis nachgewiesen worden im Vergleich zu gesunden Probanden.(59, 60) Außerdem konnte eine erhöhte Expression von IL-6 in gingivalen Gewebeproben von Rhesus-Affen beobachtet werden. Zwei Wochen nachdem die Parodontitis durch eine Ligatur iatrogen erzeugt wurde, stieg das Expressionslevel stark an und sank nach einem Monat auf das Ursprungs-Level zurück.(44) Schließlich scheint das Interleukin-6 für SSc und Parodontitis ein entscheidender Mediator für die aktive Entzündung zu sein.

4.3.1.3 Interleukin-10

Das Interleukin-10 (IL-10) gehört zur Gruppe der antiinflammatorischen Zytokine, das unter anderem von allen CD4+-T-Zellen sezerniert wird. Es hat einen immunsuppressiven Effekt auf multiple Immunzelltypen, unter anderem Th17- und Th2- Zellen, und die Herstellung von proinflammatorischen Zytokinen. Außerdem hat es einen stimulierenden Effekt auf regulierende T-Zellen, die wiederum hauptsächlich IL-10 und TGF- β sezernieren.(61, 62) Die Rolle des IL-10 auf die Pathogenese der Parodontitis und auf die Sklerodermie ist bisher nicht geklärt. In beiden Krankheiten scheint eine Störung des Gleichgewichts zwischen der

Selbsttoleranz des Immunsystems und der Aktivierung von proinflammatorischen Zellen ein möglicher Grund für das Entgleisen der Immunantwort in die Entzündung zu sein.(27, 50, 63, 64) Die Studienlage in Bezug auf Serum-Level oder Zellkonzentrationen von IL-10 in Patienten mit SSc oder Parodontitis ist sehr gering. Eine Studie zeigte keine Konzentrationsunterschiede von IL-10 zwischen gesunden Patienten und Patienten mit chronischer Parodontitis. Es konnte zwar eine geringere Konzentration von IL-10 in Patienten mit aggressiver Parodontitis nachgewiesen werden, jedoch ohne Signifikanz.(65) Die Serumkonzentrationen von IL-10 von Patienten mit diffuser SSc waren niedriger als die Serumkonzentrationen von Patienten mit limitierter SSc und als die der gesunden Kontrollgruppe. Zudem korrelierte die IL-10-Konzentration mit dem Schweregrad der Hautverdickung der Patienten, sodass die Überlegung nahe lag, ob IL-10 als Marker für den Grad der Fibrosierung benutzt werden könnte.(26)

4.3.2 Matrix-Metalloprotease-9

Der Begriff Matrix-Metalloprotease (MMP) fasst eine Gruppe an Enzymen zusammen, die Peptidbindungen von Proteinen spalten und somit die extrazelluläre Matrix (EZM) des Bindegewebes und Bestandteile der Basalmembran abbauen können.(66) Das Bindegewebe unterliegt der ständigen Produktion und der Degradation der EZM, wobei die MMPs vor allem für den Abbau verantwortlich sind.(67) MMP-9 degradiert Kollagen Typ IV und V, sowie Elastin und Gelatine und wird von dem Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) induziert.(66) Das Enzym TIMP-Metallopeptidase-Inhibitor-1 (TIMP-1) inhibiert die Funktion der MMP-9.(67, 68) In den letzten Jahren wurde der Zusammenhang zwischen MMPs und der SSc untersucht, da aufgrund der exzessiven Fibrosierung eine Störung in der Homöostase im Auf- und Abbau des Bindegewebes anzunehmen ist. Die Ergebnisse der bisherigen Literatur sind ambivalent. Es konnte in drei Studien eine signifikant verminderte Expression von MMP-9 im Serum von Patienten mit diffuser SSc im Vergleich zu gesunden Probanden beobachtet werden, nicht für Patienten des limitierten Subtyps.(67, 69, 70) Im Gegensatz hierzu, gibt es zwei Studien, die erhöhte Expressionen im Serum von MMP-9 gefunden haben, auch hier ist die Konzentration in den Patienten mit diffuser SSc höher als in den Patienten mit limitierter SSc.(71, 72) Des Weiteren ist eine negative Korrelation zwischen MMP-9 und dem mRSS bekannt, sodass eine direkte Assoziation von MMP-9 zur Fibrosierung der Haut angenommen wird.(70, 72)

Während des Verlaufs der Parodontitis wird der parodontale Faserapparat degradiert, der zum größten Anteil aus Bindegewebefasern besteht, sodass die Überlegung, dass MMPs an der Degradation beteiligt sind, naheliegt. Die bisherige Studienlage zeigt erhöhte Konzentrationen von MMP-9 im Serum, im Speichel und in der Sulkusflüssigkeit sowie in gingivalen Gewebeproben von Patienten mit Parodontitis im Vergleich zu gesunden Probanden.(73-75)

4.3.3 Cluster of Differentiation (CD)

CD`s wurden ursprünglich als Erkennungsmarkerproteine auf Zelloberflächen definiert. Heute ist bekannt, dass diese auch intrazellulär als Signalmoleküle oder als Adhäsionsmoleküle funktionieren.(76, 77)

4.3.3.1 CD34 und CD90 (Thy-1)

CD34 wird auf hämatopoetischen Vorläuferzellen des vaskulären Endothels exprimiert. Die genaue Funktion des Oberflächenantigens ist bisher noch nicht vollständig geklärt, doch wird es mit Entzündungsprozessen und nachfolgenden Wundheilungsmechanismen assoziiert.(77-79)

CD90 ist ein Adhäsionsmolekül und Teil des Immunglobulins IgG1, sowie unter dem Namen „thymocyte differentiation antigen-1“ (Thy-1) bekannt. Es wird auf unterschiedlichen Stammzellen und Fibroblasten sowie aktivierten Endothelzellen exprimiert.(80)

Vor Jahren ist die fehlende Expression von CD34 auf dermalen Fibroblasten bei SSc Patienten nachgewiesen worden.(81) Kürzlich konnte diese verminderte Expressierung von CD34+ auf Fibroblasten mit einem gleichzeitigen Erscheinen von CD90+ Fibroblasten festgestellt werden.(82, 83) Außerdem wurde in Mäusen in vitro durch die Abgabe des Oberflächenproteins CD90 von Lungenfibroblasten die Aktivierung der Differenzierung von Fibroblasten zu profibrotischen Myofibroblasten beobachtet, welche sich durch eine hohe eigene Produktion von Kollagen auszeichnen und somit für die Fibrosierung des Bindegewebes verantwortlich sein könnten.(80) Speziell bei Patienten, die an der Manifestation der pulmonalen arteriellen Hypertonie leiden, konnte eine erhöhte Konzentration des Serumproteins sCD90 in Patienten mit SSc nachgewiesen werden.(80) In einer Untersuchung von 50 Patienten mit zirkumskripter Sklerodermie konnte immunhistochemisch eine Korrelation zwischen einem verminderten Auftreten von CD34+ dermalen Fibroblasten bei gleichzeitig steigender Fibrosierung hergestellt werden.(78) Nazari et al. beobachteten in Hautbiopsien von Patienten mit diffuser SSc immunhistochemisch, dass CD90-Zellen das Netzwerk der CD34 Zellen infiltrieren und die CD34-Zellen ersetzen. (82) Bisher wurde der Zusammenhang zwischen CD34 und CD90 noch nicht ausreichend untersucht. Doch scheinen beide in die Differenzierung von dermalen Fibroblasten zu Myofibroblasten involviert zu sein und eine Rolle in der pathologischen Fibrosierung einzunehmen.(78, 82-84)

4.3.3.2 CD11a (ITGAL, Integrin α -L)

ITGAL oder CD11a ist ein Membranprotein, welches sich allgemein auf Leukozyten befindet und eine Schlüsselrolle in der interzellulären Signalweiterleitung von Leukozyten einnimmt, indem es Adhäsionsvorgänge und Wechselwirkungen von CD4+-Zellen reguliert.(85) Es wurde in dieser Arbeit als Positivkontrolle benutzt, um in den entnommenen Proben Leukozyten nachzuweisen.

4.4 Endpunkte

Der primäre Endpunkt war Unterschiede in den klinischen Parametern und / oder korrelierenden Expressionen der hier untersuchten Marker in der SSc Gruppe im Vergleich zur gesunden Kontrolle darzustellen und diese miteinander in Zusammenhang zu setzen. Die Hypothese war, dass sich Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf der molekularen RNA Ebene in Relation zu objektiv erhöhten klinisch-parodontalen Parametern darstellen.

Zweitens sollte eine erhöhte Prävalenz von externen zervikalen Resorptionen in der SSc Gruppe nachgewiesen werden.

Drittens sollte eine neue Methodik etabliert werden. Die Idee war mit einer kleinen Quantität RNA, die man aus dem Sulkus isolierte, eine quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) durchzuführen, um die Expression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, Oberflächenantigenen und Matrix-Metalloproteasen nachzuweisen und diese zwischen Patienten mit Systemischer Sklerodermie und einem gesunden Kollektiv zu vergleichen.

5 Material & Methode

5.1 Studiendesign

Die vorliegende klinische prospektive, monozentrische Studie wurde in der Hochschulambulanz der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (MKG) der Friedrich-Alexander-Universität (FAU) Erlangen-Nürnberg im Zeitraum von Oktober 2018 bis einschließlich Dezember 2020 durchgeführt. Die Probanden der erkrankten Gruppe stammen aus der Sprechstunde der Hautklinik des Universitätsklinikums Erlangen, die der Kontrollgruppe aus Patienten, die sich zufällig zur Behandlung in der MKG vorstellten. Die Studie erhielt vor Beginn ein positives Votum der Ethikkommission der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (Antrag Nr.: 399_18 B). Zudem wurde die Studie beim Deutschen Register Klinischer Studien angemeldet und registriert (Nr.: DRKS00022956). Alle eingeschlossenen Probanden wurden vorher über die Teilnahmekriterien und den Untersuchungsablauf aufgeklärt und bestätigten ihre Teilnahme mit einer schriftlichen Einverständniserklärung.

5.2 Patientenauswahlkriterien

Eingeschlossen wurden volljährige Patienten mit der Diagnose Systemische Sklerodermie (ICD-Code M.34) und gesunde Patienten (ohne Vorliegen einer Parodontitis oder vorher stattgefundenener parodontaler Therapie). Folgende Ausschlusskriterien kamen zur Anwendung:

- Diabetes Typ I und II
- Nikotinabusus durch Tabakrauchen
- Bereits diagnostizierte Parodontitis oder eine vorangegangene Parodontitis-Behandlung
- Schlechter Allgemeinzustand, der keine zahnärztliche Untersuchung zuließ
- Zahnlosigkeit

Die Kontrollgruppe wurde dem Alter und den Geschlechtern der Untersuchungsgruppe angepasst.

5.3 Klinischer Studienablauf

5.3.1 Zahnärztlicher Befund und Probenentnahme

Die zahnärztliche klinische Untersuchung (s. Anhang 1) wurde bei allen Patienten durch die gleiche Person (Doktorandin und Zahnärztin Amelie Lugenbühl) durchgeführt. Zudem beurteilte eine weitere Person (Frau Dr. Buchbender, Fachzahnärztin für Oralchirurgie) die Schleimhäute und den ossealen Zustand der Kiefer. Die Befunderhebung sowie die Probeentnahme wurden während einer Sitzung von 60 Minuten durchgeführt und auf einem standardisierten Befundbogen festgehalten. Zuerst wurde ein zahnärztlicher Befund erhoben:

- Anzahl und Zustand der Zähne und Implantate, der konservierenden und prothetischen Versorgungen und Zahnhalsdefekte
- Einteilung der Zähne in eine der vier Lockerungsgrade von 0-III nach der Einteilung der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie eingestuft
 - LG 0 \triangleq Zahn ist nicht spürbar oder sichtbar beweglich
 - LG I \triangleq Zahn lässt sich bis zu 1 mm in horizontaler Richtung aus seiner physiologischen Position auslenken
 - LG II \triangleq Zahn lässt sich mehr als 1 mm horizontal bewegen
 - LG III \triangleq Zahn lässt sich horizontal und oder vertikale bewegen, sowie durch Zungen- und/ oder Lippendruck auslenken
- Die Sensibilitäts- und die Perkussionskontrolle erfolgte zum Ausschluss avitaler Zähne und periapikaler Entzündungsprozesse.
- Befundung der Schleimhaut der Mundhöhle, der Gingiva sowie der Zunge (Farbe, Rötung, Gingivahyperplasien, weitere pathologische Veränderungen, Zungenverkürzung oder periorale Falten)
- Bei maximaler Mundöffnung wurde die Schneide-Kanten-Distanz (SKD) zwischen den Inzisiven gemessen (eine Mikrostomie lag vor, wenn die Schneidekantenlänge kleiner gleich 38mm betrug)(86)
- Der parodontale Status wurde mit einer PCP-12 Sonde von Hu-Friedy. an allen Zähnen mit jeweils 6 Messpunkten (mesiobukkal, bukkal, distobukkal, mesiopalatinal/-lingual, palatinal oder lingual, distopalatinal/-lingual) erstellt. Anhand der Messwerte wurde der Code des Parodontalen Screening Index (PSI) ermittelt. Als Definition der Taschentiefe (ST) galt die Strecke des freien Gingivasaums bis zum Boden des Sulkus. Eine Parodontitis wurde ab einer Taschentiefe \geq 4mm definiert, bzw. Code 3 und 4 des PSI

Code 0	Code 1	Code 2	Code 3	Code 4
ST < 3,5mm			ST = 3,5-5,5 mm	ST >5,5mm
Keine Blutung Kein Zahnstein Keine defekten Restaurationsränder	Blutung auf Sondieren Keine defekten Restaurationsränder	Zahnstein und / oder defekte Restaurationsränder		
Gesund	Gingivitis		Parodontitis	

Tabelle 3: Ausschnitt der Richtlinien des parodontalen Screening Index nach der DG Paro

- Der Bleeding on Probing Index (BOP) wurde bestimmt (BOP = Anzahl der blutenden Sondierungsstellen durch die Anzahl aller Sondierungsmessstellen mal 100). Anhand des BOP konnte der Entzündungszustand der Gingiva beurteilt werden.
- Die Zahnfleischrezessionen wurden als Rückgang des Zahnfleischrandes unterhalb die Schmelz-Zement-Grenze definiert. Sie wurden auch mit einer PCP 12 Sonde und in 1mm Abständen gemessen. Um die Rezessionen gesamt in % und in mm zu bestimmen, wurden alle gemessenen Stellen der Rezessionen addiert und durch die Anzahl der Rezessionen geteilt und mit 100 multipliziert.
- Der Clinical Attachment Loss (CAL) wurde aus der jeweiligen Taschentiefe und der zugehörigen Rezession für die orale und die vestibuläre Zahnfläche berechnet. Der CAL ist die Strecke von der Schmelz-Zement-Grenze bis zum Taschenboden und gibt Auskunft über den Grad des Verlustes des parodontalen Faserapparates. Um den CAL gesamt in % und in mm zu bestimmen, wurden alle gemessenen Stellen des CAL addiert und durch die Anzahl der Messstellen geteilt und mit 100 multipliziert.
- Das Austreten von Pus beim Sondieren wurde erfasst (Suppuration)
- Der Plaque Index Mombelli teilte die vorhandene Plaque in 4 Codes ein
 - Code 0: keine sichtbare Plaque
 - Code 1: Plaque, die durch Inspektion und Sondieren zu erkennen ist
 - Code 2: sichtbare Plaque im Approximalraum
 - Code 3: massive Plaque im Approximalraum und an den Glattflächen
- Vorliegen einer Sicca-Symptomatik oder Xerostomie
- Im Rahmen der Routinediagnostik wurde auch eine Panoramaschichtaufnahme (OPG) auf externe zervikale Resorptionen oder andere Auffälligkeiten analysiert.

Die Entnahme der Probe aus dem Sulkus erfolgte mit einer Kürette an den zwei tiefsten Taschen. Durch Absaugung während der Probenentnahme sollte die Beimischung von Speichel verhindert werden.

5.3.2 Klinische Daten der Systemischen Sklerodermie

Die Erfassung der krankheitsspezifischen Daten und Ausprägungen der Manifestationen der Patienten mit SSc erfolgte innerhalb der Routineuntersuchungen in der Hautklinik des Universitätsklinikums Erlangen und wurden nicht explizit für die Studie erhoben. Diese umfasste klinische, serologische und immunologische sowie apparative Parameter. Sie galt als Standarduntersuchung, die auch die Beteiligung des Herzens, der Niere und der Lunge sowie des Gastro-Intestinal-Trakts untersuchte. Die Gesundheit des Herzens wurde durch echokardiographische und -sonographische Aufzeichnungen kontrolliert. Die Lunge wurde anhand von Lungenfunktionstests kontrolliert. Zusätzlich wurde die Lungendiffusion überprüft und ggf. Bildgebungen hinzugezogen. Die ösophageale Beurteilung erfolgte durch Gastroskopie und Manometrie, um Motilitätsstörungen oder einen Barrett-Ösophagus zu diagnostizieren. Zur Kontrolle der Niere und Leber wurden die Nieren- und Leberwerte, der Urinstatus und das Differenzialblutbild betrachtet. Anhand des modifizierten Rodnan Skin Score bewertete der jeweilige untersuchende Facharzt das Ausmaß der Hautfibrose am Körper des Patienten. Außerdem untersuchte man das Gesicht, die Extremitäten und die Hände nach digitalen Hauterosionen bzw. -ulzerationen, Verhärtungen der Gelenke, Teleangiektasien und Kalzifikationen. Die Patienten wurden auf das Ausmaß des Sicca-Syndroms untersucht. In diesem Rahmen wird auch das Vorliegen einer Xerostomie untersucht.

Die zum Zeitpunkt der Untersuchung eingenommenen und die vergangenen Medikamente wurden dokumentiert.

5.4 Probenverarbeitung der Laborparameter

Innerhalb dieser Dissertation wurde die Expression verschiedener Interleukine, Oberflächenantigene und Matrix-Metalloproteasen (IL-2, IL-6, IL-10, MMP-9, THY-1, CD34, ITGAL) untersucht, die mit der systemischen Sklerodermie und mit der Parodontitis in Zusammenhang stehen. In den minimalinvasiv gewonnenen Proben aus dem Sulkus sollten anhand einer modifizierten TRizol™-Methodik und einer Realtime-Polymerasekettenreaktion die Expressionen der Entzündungsmediatoren nachgewiesen werden. Als Grundlage für die Durchführung sowie auch für die hier nachfolgenden Beschreibungen der Arbeitsschritte dienten die Handbücher, die Quick-Start Protokolle und die technischen Informationen der benutzten Lösungen von Qiagen (QuantiTect Reverse Transcription Kit, QuantiTect Primer Assay, QuantiTect SYBR Green PCR Kit), die teilweise für diese Studie modifiziert wurden. Das Laborprotokoll ist im Anhang angefügt.

5.4.1 RNA-Isolierung

Nach der Probenentnahme wurde das gewonnene Material in ein steriles Eppendorf Cup gegeben und in einem Transportbehälter mit Stickstoff schockgefroren, danach unmittelbar bei -80°C eingefroren und bis zur Isolierung dort gelagert. Die RNA-Isolierung der Sulkusproben erfolgte nach der modifizierten TRIzol™-Methode (s. Anhang 2. RNA-Isolierung aus Sulkusproben nach der TRIzol™-Methode). Alle Proben wurden nach dem gleichen Protokoll bei Raumtemperatur behandelt, wobei die zugeführten Stoffe/Flüssigkeiten gekühlt gelagert wurden. Die Zentrifuge wurde bei 4°C benutzt.

1. Zu jeder Probe wurden $500\mu\text{l}$ TRIzol (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gegeben und durch Auf- und Abpipettieren die Lyse des Gewebes aktiviert.
2. Nach 5 min Inkubation wurden $100\mu\text{l}$ Chloroform zugegeben, 15 Sekunden geschüttelt, sodass sich ein milchiges Gemisch ergab. Dieses wurde 2-3 min inkubiert und anschließend für 15 min bei 12000rpm zentrifugiert, wodurch drei unterschiedliche Phasen entstanden. Die oberste wässrige, farblose Schicht mit der enthaltenen RNA wurde abpipettiert und mit $250\mu\text{l}$ Isopropanol in einem neuen Eppendorf-Cup gemischt. Die zwei verbleibenden Phasen werden regelrecht entsorgt.
3. Nach 10 min Inkubation wurden die Proben 10 min bei 12000rpm zentrifugiert, um die RNA zu pelletieren. Zuerst wurde das Isopropanol vollständig entfernt. Danach wurde $500\mu\text{l}$ Ethanol (75%) zum Waschen des RNA-Pellets hinzugegeben.
4. Nach 5 min bei 10000rpm in der Zentrifuge entfernte man das Ethanol, sodass nur das RNA-Pellet zurückbleibt, und legte das geöffnete Eppendorf Cup zum Trocknen unter die sterile Werkbank für circa 20 Minuten.
5. Abschließend wurde die RNA mit $20\mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser verdünnt. Mit $1,5\mu\text{l}$ Probenmaterial konnte die RNA-Quantität und -Qualität photometrisch mit dem Nanodrop®-Spectrophotometer (PeqLab, Erlangen, Deutschland) bestimmt werden.

5.4.2 cDNA-Synthese mit QuantiTect Reverse Transcription-Kit von Qiagen

Das QuantiTect Reverse Transkription-Kit von Qiagen (Qiagen, Venlo, Niederlande) dient der Umwandlung von mRNA in cDNA und dem Eliminieren von genomischer DNA, die das Umschreiben der RNA behindern würde. Da die später für die Polymerase-Kettenreaktion eine DNA-abhängige Polymerase benutzt wird, muss die isolierte mRNA in eine cDNA (complementary DNA) umgeschrieben werden. Der Umwandlungsprozess erfolgt über die Reverse Transkriptase. Alle Schritte wurden nach den Herstellerangaben und nach Protokoll durchgeführt, sowie nur die Inhalte des Kits verwendet (s. Anhang 3. cDNA-Synthese mit QuantiTect Reverse Transcriptions-Kit Qiagen).

1. Zuerst wurden alle Puffer, Enzyme, das RNase-freie Wasser und die template-RNA auf Eis aufgetaut. Für alle umzuschreibenden Proben wurden neue 200µl Eppendorfer-Cups beschriftet. Mit RNase-freiem Wasser wurde die zuvor photometrisch bestimmte RNA-Menge auf jeweils 1µg RNA pro Mikroliter verdünnt, sodass sich ein Gesamtvolumen aus RNA und Wasser von 12µl ergab. Aufgrund geringer Mengen an isolierter RNA konnten manche Proben nur auf 500ng pro Mikroliter verdünnt werden.
2. Anschließend wurden 2µl gDNA Wipeout Buffer zugeben und bei 42°C für 5 Minuten im Thermocycler inkubiert, um die genomische DNA zu eliminieren.
3. Währenddessen wurde der Reverse-Transkriptase Mastermix plus ein Extravolumen als Puffer hergestellt. Folgende Volumen für jede Probe sind pipettiert worden:
 - 4µl 5-fach konzentrierter Quantiscript® Reverse Transkriptase Buffer
 - 1µl Primer Mix
 - 1µl Quantiscript® Reverse Transkriptase
4. Nach der ersten Phase im Thermocycler wurden in jedes Eppendorf-Cup 6µl Mastermix pipettiert. Das Umschreiben erfolgte bei 42°C für 15 min im Thermocycler. Die im Primer Mix enthaltenen Oligo-dT-Primer und Random-Primer binden an unterschiedliche Nukleotidsequenzen auf der mRNA. Der Oligo-dT-Primer (mehrere Thymin-Nukleotide) kann sich an den Poly-A-Schwanz und die Random-Primer an zufällige RNA-Sequenzen auf dem gesamten Strang knüpfen. Die Reverse Transkriptase hat unterschiedliche Untereinheiten: zuerst bindet die RNA-abhängige DNA-Polymerase an die oben genannten Primer und bildet komplementär zur RNA einen DNA-Strang. Danach entfernt die RNase H, die eine Hybrid-abhängige Exoribonuklease ist, die RNA aus RNA-DNA-Hybriden. Die resultierende einzelsträngige cDNA wird durch eine DNA-abhängigen DNA-Polymerase zu einem Doppelstrang komplementiert. Am Ende des Vorgangs wurde die Temperatur auf 95°C für 3 min erhöht, um die Reverse Transkriptase zu denaturieren. Die fertige cDNA wurde entweder direkt für eine qPCR verwendet oder bei -20°C eingefroren. Bei jedem

Zyklus der cDNA-Synthese wurde eine Negativ-Kontrolle mitgeführt, die nur den Mastermix und Wasser sowie den gDNA Wipeout Buffer enthielt. Dies diente der internen Kontrolle innerhalb der qPCR, um Verunreinigungen des Mastermix zu ausschließen.

5.4.3 qPCR mit QuantiTect Primer Assay und SYBR Green

Eine quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion dient der Vervielfältigung von Nukleinsäuren und der Quantifizierung der in den Proben enthaltenen Nukleinsäuren durch Fluoreszenzmessung. Das Fluoreszenzsignal steigt proportional zur Zunahme der neu-synthetisierten doppelsträngigen DNA an.

Es wurde das QuantiTect SYBR® Green PCR Kit von Qiagen für alle Proben benutzt und nach dem folgenden Laborprotokoll verfahren (s. Anhang 3. qPCR – Quantitect Primer Assay SYBR Green von Qiagen).

Zu Beginn wurden die cDNA-Proben, der QuantiTect SYBR Green Mastermix und die QuantiTect Primer Assays auf Eis aufgetaut, durchmischt und bei Bedarf kurz anzentrifugiert. Um in ein Well 12,5ng cDNA einzusetzen, mussten die Proben dementsprechend mit RNase-freiem Wasser verdünnt werden (Proben mit 1000ng/ 20µl cDNA wurden 1+3 und Proben mit 500ng/ 20µl 1+2 verdünnt). Die Primer Assays wurden auf 32,5µl (für 12 Wells plus ein Puffer) aliquotiert. Ein Mastermix mit 24µl pro Well wurde angefertigt und in die Wells pipettiert:

- 12,5µl 2-fach QuantiTect SYBR Green Mastermix
- 2,5µl 10-fach QuantiTect Primer Assay
- 9,0µl RNase-freies Wasser

Zudem wurde 1µl der jeweiligen cDNA in jedes Well hineingegeben, sodass sich ein Gesamtvolumen von 25µl pro Well ergibt. Je Probe, sowie für die endogene Kontrolle, als auch für die Negativkontrolle und für den Mastermix wurden Doppelwerte pipettiert. Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente als endogene Kontrolle. Nach 5-minütigem zentrifugieren, wurde die Realtime-Polymerase-Kettenreaktion im 7300 Realtime PCR Gerät von Applied Biosystems nach dem unten aufgeführten Programm gestartet.

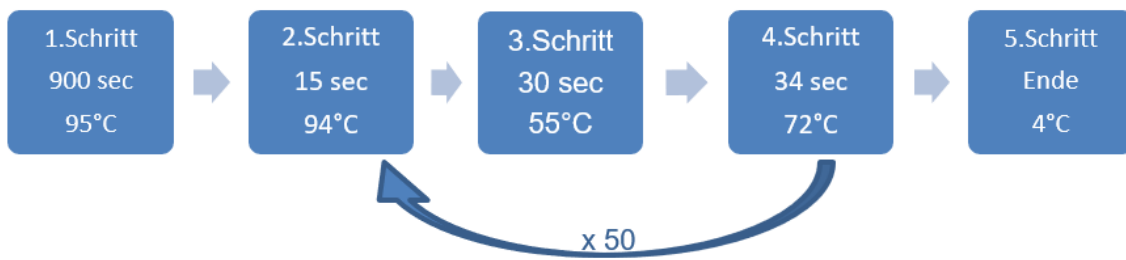


Abbildung 1: Abfolge der Schritte der qPCR

Die enthaltene HotStar Taq DNA-Polymerase ist bei Raumtemperatur inaktiv. In diesem Zustand ist keine Polymeraseaktivität vorhanden, sodass die Polymerisierung unspezifisch angelagerter Primer oder Primer Dimere bei Raumtemperatur verhindert werden. Im ersten Schritt wird durch den Anstieg der Temperatur die HotStar Taq Polymerase aktiviert. Der zweite Schritt trennt die hergestellten DNA-Doppelstränge wieder. Danach lagern sich in Schritt drei die ausgewählten Primer (Annealing) an deren komplementären cDNA-Sequenzen an und bilden den Startpunkt für die Polymerase. Diese synthetisiert im vierten Schritt (Elongation) den komplementären Strang in 5'-3'-Richtung. Nach jedem Elongationszyklus misst das PCR Gerät die Fluoreszenzintensität des SYBR Green Farbstoffs. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I dye gibt fluoreszierendes Licht beim Binden doppelsträngiger DNA ab. 50 Zyklen der Schritte 2-4 werden durchgeführt. Das Programm kühlt die Platte auf 4°C bis zur weiteren Verwendung herunter.

Im Anschluss der qPCR erfolgt die Durchführung der Dissoziation- bzw. Schmelzkurvenanalyse, um die Homogenität des qPCR-Produktes nachzuweisen. Diese läuft in drei Schritten ab. Zuerst wurden alle Komponenten bei 95°C denaturiert. Im nächsten Schritt werden die Primer bei ihrem individuellen Grenzwert (T_m Value) zusammengeführt. Danach steigt die Temperatur gleichmäßig im letzten Schritt von 60°C auf 95°C. Jedes PCR-Produkt hat eine spezifische Schmelztemperatur, bei der sich die Doppelstränge der DNA trennen und der SYBR Green Farbstoff freigegeben wird. Der Anstieg und die folgende Abnahme der Fluoreszenzintensität wird als die Dissoziations- bzw. Schmelzkurve präsentiert. Unspezifische Primer Dimere zeigen einen niedrigeren Schmelzpunkt als die doppelsträngige DNA der spezifischen PCR-Produkte, wodurch eine Differenzierung der Produkte möglich ist. Um abweichende Volumen der eingesetzten cDNA auszugleichen (Normalisierung), benötigte man eine endogene Kontrolle (GAPDH) für die Quantifizierung der Proben.

Es wurden nur Proben in die Ergebnisse miteinbezogen, die einen Ct-Wert von unter 37 Zyklen aufwiesen und deren endogene Kontrolle eine klare Amplifikationskurve darstellte. Proben mit

Ct-Werte oberhalb 37 Zyklen oder nicht eindeutigen Dissoziationskurven wurden verworfen, da von zu geringem oder verunreinigtem Probenmaterial ausgegangen werden kann. Proben, die eine klare Amplifikationskurve und einen korrekten Mittelwert der Ct-Werte (avg. Ct Value) in der endogenen Kontrolle aufzeigten, jedoch für ihr Zielgen im Doppelwert ohne Ct-Wert blieben, wurden als „undetected“ definiert. Für diese Proben wurde ein Average Ct- Wert von 50 vorausgesetzt, welche der maximalen Zyklusanzahl der qPCR entspricht.(87)

In der folgenden Tabelle 4 sind die Referenznummern und Bestellnummern der benutzten Primer aufgeführt:

<u>Primer</u>	<u>Produktname</u>	<u>Bestellnummer</u>	<u>Chargennummer</u>
<u>IL-2</u>	Hs_IL2_1_SG	QT00015435	354840918
<u>IL-6</u>	Hs_IL6_1_SG	QT00083720	315797203
<u>IL-10</u>	Hs_IL10_1_SG	QT00041685	315797224
<u>MMP-9</u>	Hs_MMP9_1_SG	QT00040040	354840919
<u>CD90</u>	Hs_THY1_1_SG	QT00023569	354840947
<u>CD34</u>	Hs_CD34_1_SG	QT00056497	315797200
<u>CD11a</u>	Hs_ITGAL_1_SG	QT00034006	361111662
<u>GAPDH</u>	Hs_GAPDH_1_SG	QT00079247	345551798

Tabelle 4: Produktinformation der verwendeten Primer Assays von Qiagen

5.5 Statistik und Auswertung

Die statistische Analyse ist mit Hilfe von Microsoft Excel und IBM SPSS Statistics 26 (IBM Inc., New York, USA) durchgeführt worden. Die Ergebnisse wurden anhand des Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Für die Datenanalyse von nicht-normalverteilten Variablen wurde der Mann-Whitney-U-Test (nicht-parametrischer Test) angewendet, um signifikante Unterschiede zu errechnen. Außerdem wurden die Variablen der einzelnen Gruppen auf Korrelationen anhand des Spearman-Tests geprüft. Als statistisch signifikant gilt $p \leq 0.05$. Der Korrelationskoeffizient r_s gibt den Zusammenhang zwischen den Variablen an. Ein Wert, der ≥ 0.5 beziehungsweise ≤ -0.5 ist, entspricht einem stark positiven oder stark negativen Zusammenhang.

Die Auswertung erfolgte durch die ΔCt - und die $\Delta\Delta Ct$ -Werte, die folgenderweise errechnet werden. Anhand der Doppelwerte wurden die Mittelwerte der Ct-Werte jeder Probe und deren zugehöriger endogener Kontrolle bestimmt. Der ΔCt -Wert errechnet sich:

$$\Delta Ct (\text{Probe}) = \text{average Ct (Zielgen)} - \text{average Ct (GAPDH)}$$

Anhand aller ΔCt - Werte innerhalb einer Gruppe, kann ein Durchschnittswert für ΔCt (average ΔCt) für die Kontrollgruppe sowie die Patientengruppe errechnet werden:

$$\text{Average } \Delta Ct (\text{Gruppe}) = \text{Summe aller } \Delta Ct / \text{Anzahl der Proben einer Gruppe}$$

Hohe ΔCt -Werte entsprechen einer geringen Expression des Gens und entgegengesetzt bedeuten niedrige ΔCt -Werte eine erhöhte Expression.

Um die Expression des Zielgens mit einer anderen Gruppe zu vergleichen, muss die Relative Quantifikation (RQ) oder auch der sogenannte Fold Change (FC), berechnet werden. Diesbezüglich muss zuerst $\Delta\Delta Ct$ bestimmt und dann für RQ eingesetzt werden:

$$\Delta\Delta Ct (\text{Zielgen vs. Kontrolle}) = \text{average } \Delta Ct (\text{Zielgen}) - \text{average } \Delta Ct (\text{Kontrolle})$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Ein RQ über 1 bedeutet, dass das Zielgen im Vergleich zur Kontrollgruppe hochreguliert ist. Zum Beispiel ein RQ von 2 bedeutet eine 2-fach erhöhte Expression des Zielgens gegenüber dessen Kontrolle.

6 Ergebnisse

6.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 39 Probanden, 17 mit Systemischer Sklerodermie und 22 Kontrollgruppenpatienten anhand der Studienkriterien aufgenommen. In der SSc Gruppe befanden sich 12 weibliche und 5 männlichen Probanden. Der Altersdurchschnitt lag bei 62,2 Jahren (SD=10). Die Kontrollgruppe bestand aus 15 Frauen und 7 Männern mit einem Altersdurchschnitt von 61,5 Jahren (SD=9). Die SSc Gruppe unterteilte sich in 6 Probanden des diffusen Typs und in 11 des limitierten Typs der SSc.

In der Tabelle 5 sind die Symptome und Manifestationen für den jeweiligen Krankheitstyp aufgelistet, welche anhand der dermatologischen Parameter erhoben wurde.

Klinische Parameter	Limitierte SSc (n=11)	Diffuse SSc (n=6)
Raynaud-Syndrom	10	6
Sicca-Symptomatik	6	5
Xerostomie	3	3
Ösophagus-Motilitätsstörung	8	6
Eingeschränkte Lungenfunktion	5	5
Antinukleäre Antikörper	10	5
Digitale Erosionen/Ulzerationen	2	3
Sklerodaktylie	7	3
Calcinosis Cutis	4	3
mRSS (Ø)	4.9	11.6

Tabelle 5: Darstellung von Symptomen und Manifestation der SSc Gruppe, angegeben sind die Anzahl der Probanden oder ein Mittelwert (mit Ø gekennzeichnet), insgesamte Probandenanzahl der SSc des limitierten Typs n=11 und des diffusen Typs n=6

Zusammengefasst, 94% der Probanden litten an dem Raynaud-Syndrom. Zwei Drittel der SSc Gruppe wiesen eine Sicca-Symptomatik auf, welche sich zu 55% als Xerostomie manifestierte. Die Motilität des Ösophagus war bei 82% der Probanden eingeschränkt. Bei 12% konnten keine antinukleäre Antikörper (ANA) nachgewiesen werden. Eine eingeschränkte Lungenfunktion sowie Sklerodaktylie trat bei 58% der Probanden auf. Zu 30% sind aktive digitale Erosionen und Ulzerationen beobachtet worden. Die Mehrheit der Patienten mit 65% konnte ihre Hände ohne Einschränkung zu Fäusten schließen. Im Gegensatz dazu ist dies

35% nur eingeschränkt oder gar nicht möglich gewesen. Der Mittelwert des modified Rodnan Skin Score für den limitierten Typ (4,9) war deutlich geringer als der Durchschnittswert des diffusen Typs (11,6).

Außerdem wurde während der zahnärztlichen Untersuchung festgestellt, dass es einen vertikalen und horizontalen Knochenabbau bei 100% der Patienten mit SSc gab. Zudem zeigten 11 von 17 Patienten Mundwinkelrhagaden und bei 47% lag eine Mikrostomie vor (SKD \leq 38mm). Die Mundschleimhaut zeigte sich bei 4 Patienten matt, trocken und in manchen Arealen gerötet.

94% der SSc Gruppe nahmen regelmäßig Medikamente ein. Unter anderem wurden 15 Personen werden mit Immunsuppressiva, monoklonalen Antikörpern und/oder Prostazyklin-Analoga behandelt (Mycophenolat-Mofetil n= 4, Iloprost n=7, Tocolizumab n=1, Rituximab n=1, Prednisolon n=2). Zusätzliche Medikamente waren Antihypertensiva (Calciumantagonisten n=7, Angiotensin-1-Antagonisten n=1, Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer n=2, Schleifendiuretika n=1, β -1-Adranorezeptorantagonisten n=1) und Protonenpumpeninhibitoren (n=8), sowie Schilddrüsenhormone (L-Thyroxin n=5) und inhalative Glukokortikoide (n=2).

6.2 Statistische und deskriptive Analyse der Expression der Entzündungsmediatoren

Wie in Tabelle 6 dargestellt, ergab die Analyse des Mann-Whitney-U Tests keine statistisch signifikanten Unterschiede für die Expression der Entzündungsmediatoren und Oberflächenantigene zwischen der SSc- und der Kontrollgruppe.

	SSc Mittelwert Δ Ct (SD)	Kontrolle Mittelwert Δ Ct (SD)	SSc Median Δ Ct	Kontrolle Median Δ Ct	Signifikanz M-W-U-Test
IL-2	23.00(2.43)	21.98 (4.76)	22.79	22.99	0.679
IL-6	13.02(7.42)	14.33 (6.99)	10.19	14.88	0.479
IL-10	10.81 (7.22)	11.29 (6.11)	7.367	8.03	0.590
MMP-9	5.80 (2.28)	6.93 (3.54)	5.81	6.07	0.590
CD90	13.22 (7.86)	15.03 (7.13)	11.19	16.66	0.552
CD34	14.26 (6.66)	12.83 (6.62)	13.10	9.27	0.396
CD11a	6.11 (4.34)	9.12 (6.68)	4.56	6.21	0.193

Tabelle 6: Darstellung der Δ Ct Mittelwerte und Mediane innerhalb einer Gruppe (SSc und Kontrolle) für die jeweiligen Marker, erstelltes Signifikanzniveau anhand des Mann-Whitney-U-Tests, nur für IL-2 und IL-6 der SSc Gruppe gilt n=16, sonst gilt für SSc n=17 für SSc und Kontrollgruppe n=22

Betrachtet man allerdings den Fold Change (RQ) (s. Abbildung 2) sind deutliche Unterschiede in den Genexpressionsraten erkennbar. Die unten angegebenen RQ-Werte geben die mittlere Expressionsrate der überprüften Gene der SSc Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe an. Ein RQ-Wert ≥ 2 entspricht einer Hochregulierung der Expression in der SSc Gruppe im Verhältnis zur Expression der Kontrollgruppe. Eine Verminderung der Genexpressionsrate um die Hälfte in der SSc Gruppe liegt bei einem Wert von 0.5 vor. Beide genannten Zahlen werden als signifikante Grenzwerte angesehen.

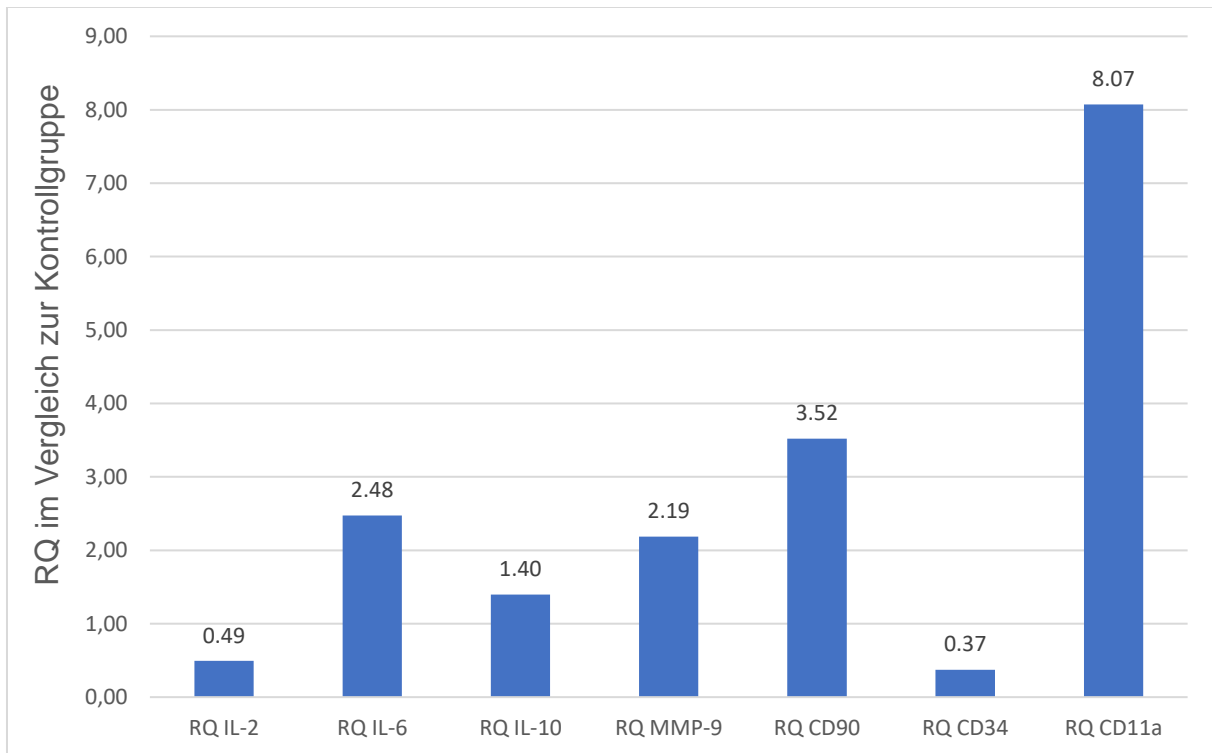


Abbildung 2: Darstellung der RQ-Werte der SSc Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, RQ unter 0,5 und über 2 signifikant, ≤ 0.5 = Verminderung der Genexpressionsrate und ≥ 2 = Hochregulierung der Genexpression der SSc Gruppe im Vergleich zur Genexpressionsrate der Kontrollgruppe

Für IL-2 und CD34 ergibt sich eine Verminderung der Genexpression in der SSc Gruppe im Verhältnis zur Kontrollgruppe. Die Genexpressionsrate von IL-2 in der SSc Gruppe ist um die Hälfte herabreguliert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Außerdem entspricht die Expressionsrate von CD34 in der SSc Gruppe nur einem Drittel der Expressionsrate der Kontrollgruppe. Passend hierzu zeigen die Mittel- und Medianwerte von IL-2 und CD34 eine Tendenz der Unterexpression in der SSc im Vergleich zur Kontrollgruppe, da die Mittelwerte und die Medianwerte des ΔCt in der SSc Gruppe höher waren (s. Abbildung 3 und 4).

Die RQ-Werte für das IL-6 und die MMP-9, das CD90 und das CD11a zeigen eine Hochregulierung der Expressionsrate in der SSc Gruppe. In der SSc Gruppe ist die Genexpression für IL-6 um das 2,5-fache hochreguliert, MMP-9 um das 2,2-fache und CD90

um das 3,5-fache. Den größten Unterschied in der Expressionsrate zeigt CD11a mit der 8-fachen erhöhten Expressionsrate der SSc Gruppe im Vergleich zu Kontrollgruppe. Ergänzend hierzu entsprechen die niedrigeren Mittelwerte des Δ Ct-Werts und der Medianwerte für diese Gene tendenziell für eine Überexpression in der SSc Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Das Interleukin-10 befindet sich unterhalb der angenommenen Signifikanzgrenze des Fold change. Der Mittel- und der Medianwert deuten auf eine geringe Überexpression hin.

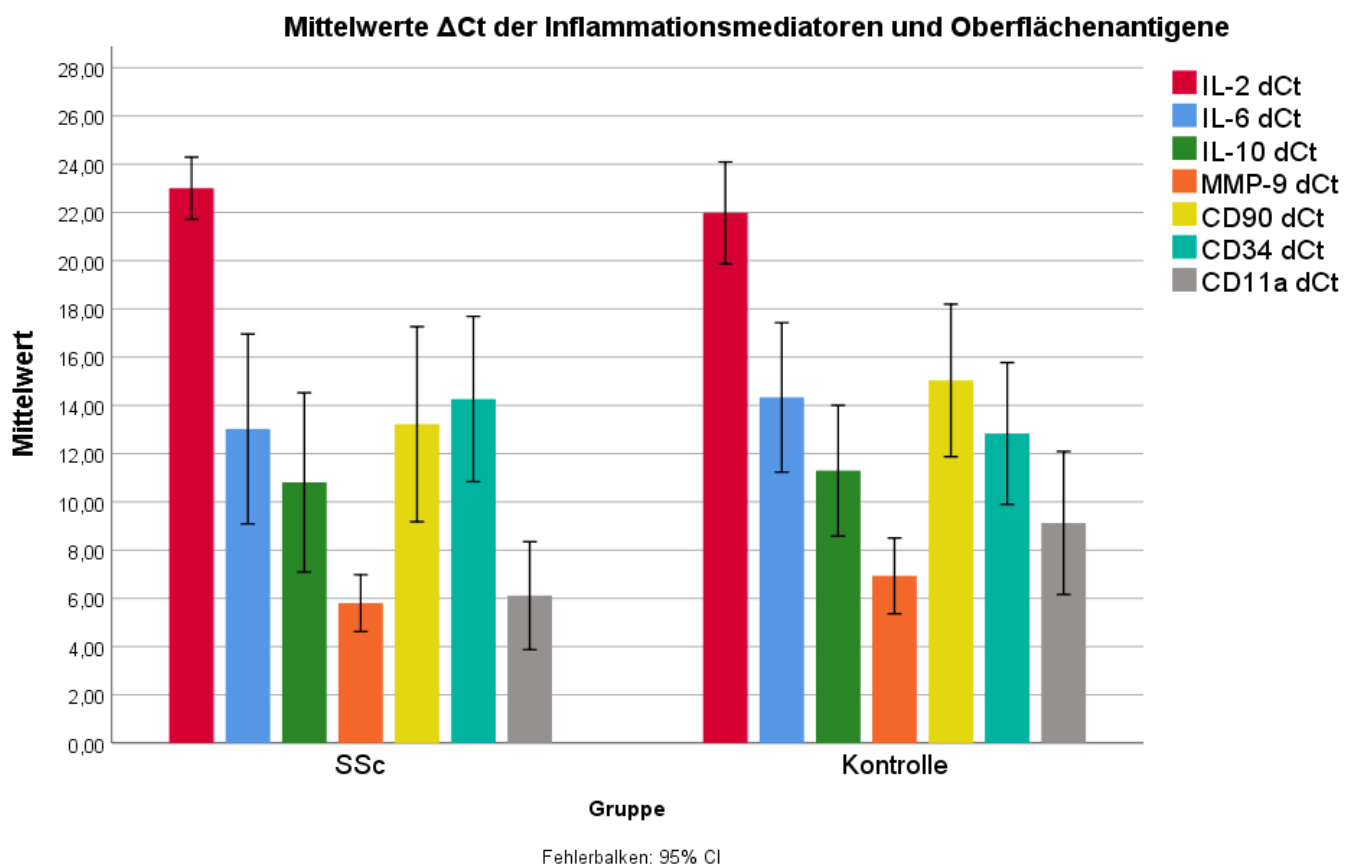


Abbildung 3: Darstellung der avg. Δ Ct-Werte des jeweiligen Markers in beiden Gruppen. Die angezeigten Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung

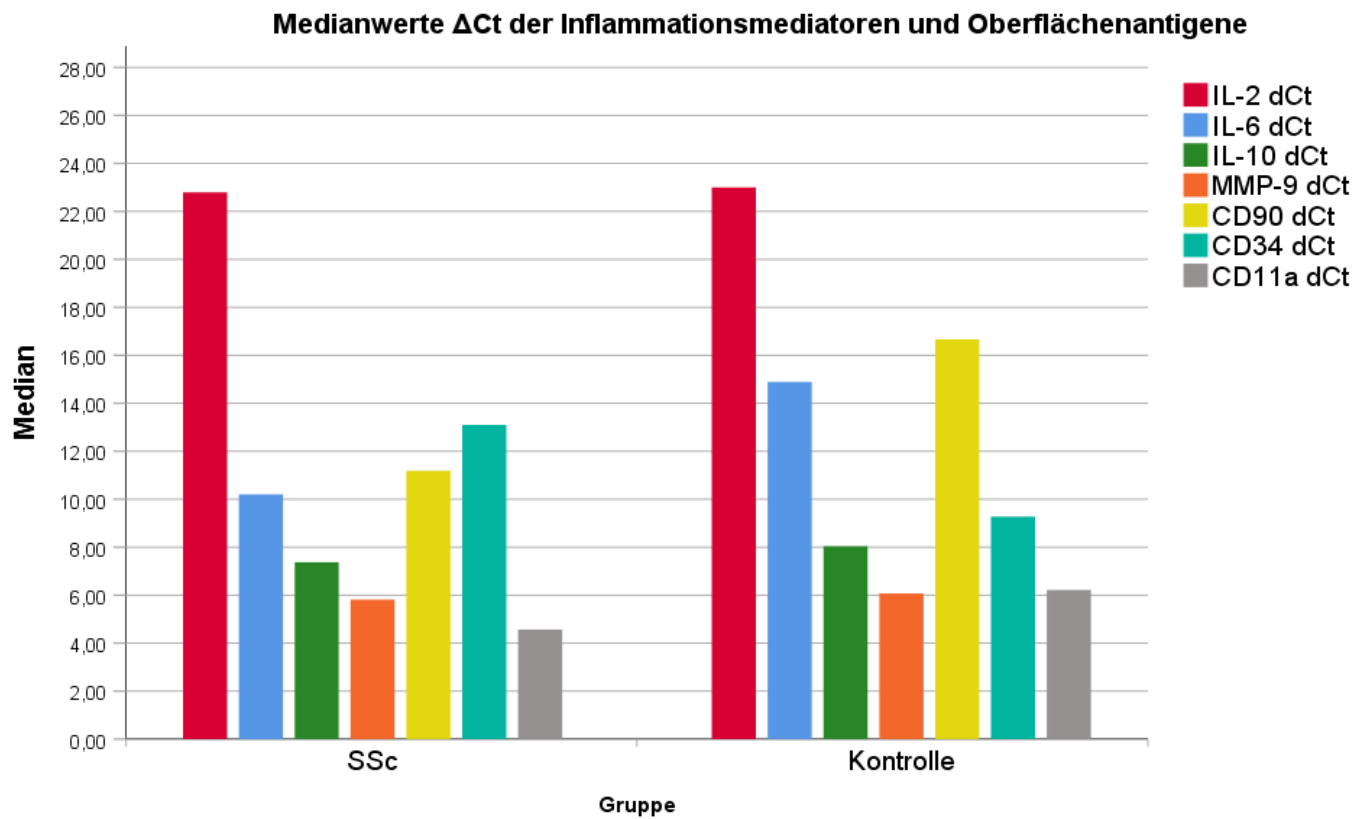


Abbildung 4: Darstellung des Medians der Δ Ct-Werte des jeweiligen Markers in beiden Gruppen

Da die Average $\Delta\Delta$ Ct-Werte (s. Kapitel 5.5) notwendig für die Errechnung des RQ-Werts sind, werden diese im Sinne der Vollständigkeit hier aufgeführt.

	IL-2	IL-6	IL-10	MMP-9	CD90	CD34	CD11a
<i>Avg $\Delta\Delta$Ct</i>	1.02	-1.31	-0.48	-1.13	-1.82	-1.43	-3.01
<i>RQ</i>	$-\frac{1}{2}$	$+\mathbf{2\frac{1}{2}}$	$+\mathbf{1\frac{2}{5}}$	$+\mathbf{2\frac{1}{5}}$	$+\mathbf{3\frac{1}{2}}$	$-\frac{1}{3}$	+8

Tabelle 7: Average $\Delta\Delta$ Ct-Werte und die zugehörigen RQ-Werte (angegeben als Kehrwert zur Verdeutlichung der Hoch- bzw. Herabregulierung); Fett markierte entsprechen signifikanten Änderungen (Ergebnisse wurden ab- oder aufgerundet zur besseren Darstellung, exakte Ergebnisse sind in Abb. 2 angegeben)

6.3 Darstellung der klinischen Parameter und statistische Auswertung

Die folgende Tabelle 8 stellt die Mittelwerte der klinischen Parameter beider Gruppen gegenüber.

	SSc Ø (SD)	Kontrolle Ø (SD)	Signifikanz M-W-U-Test
Anzahl Zähne	22.00 (8.04)	22.77 (6.02)	0.908
Sites (%) ≥ 4mm	14.83 (9.24)	11.58 (8.99)	0.178
CAL (%)	38.35 (29.78)	17.86 (18,55)	0.035
CAL Ø (mm)	1.95 (1.73)	0.76 (0.95)	0.009
Rezession (%)	38.14 (29.71)	16.90 (18.11)	0.020
Rezession Ø (mm)	1.14 (1.10)	0.43 (0.56)	0.020
BOP (%)	24.22 (12.59)	13.66 (6.72)	0.006
Mombelli PI (0-3 Grade)	1.65 (0.86)	1.41 (0.66)	0.451
PSI (0- 4 Grade)	3.71 (0.47)	3.55 (0.59)	0.417
SKD (mm)	37.53 (7.95)	47.14 (7.12)	0.001
Zahnfleischfüllungen und -defekte	5.82 (5.11)	2.36 (2.64)	0.011

Tabelle 8: Auflistung der Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) der klinischen Parameter mit Signifikanzniveau ($p \leq 0.05$) anhand des Mann-Whitney-U-Tests, die signifikanten Werte sind hier fett markiert

Die Anzahl der vorhandenen Zähne der Probanden differenzierte sich nicht zwischen den beiden Gruppen. In der Gruppe mit Systemischer Sklerodermie waren im Mittel noch 22 Zähne vorhanden und in der Kontrollgruppe 22.7 Zähne ($p=0.908$). Trotz fast gleicher Anzahl der Zähne, wiesen die erkrankten Patienten mit SSc einen höheren Prozentanteil von 14,83% an Taschentiefen von ≥ 4 mm auf, verglichen zur Kontrollgruppe mit 11,58% ($p=0.178$).

Statistisch signifikante Unterschiede lagen im Vergleich der vorhandenen Rezessionen, deren Tiefe, sowie des klinischen Attachmentverlust (in % und mm) vor. Die Patienten mit SSc hatten im Schnitt mehr als doppelt so viele ($p=0.020$) und fast 1mm tiefere Rezessionen ($p=0.020$) als die Kontrollgruppe. Die Zähne der Patienten mit SSc hatten einen 2-fach signifikant erhöhten klinischen Attachment Loss ($p=0.035$) und durchschnittlich 1,19mm tieferen parodontalen Gewebeverlust ($p=0.009$). Das bedeutet zusammengefasst, dass die Patienten mit Systemischer Sklerodermie prozentual vermehrt und unter stärkerem parodontalen Abbau leiden.

Der Blutungsindex BOP der SSc Gruppe war mit circa 11% mehr Blutungspunkten signifikant größer als der BOP der Kontrollgruppe ($p=0.006$). SSc Patienten reagierten vermehrt mit Blutungen auf Sondieren als die Patienten der Kontrollgruppen bei einem Plaque-Index ohne statistischen signifikanten Unterschied.

Die Schneidekantendistanz, die als Parameter für die maximale Mundöffnung gilt, war in der SSc Gruppe mit 10mm signifikant geringer als die SKD der Kontrollgruppe ($p=0.001$).

Externe zervikale Resorptionen sind bei keinem der beiden Patientenkollektiven aufgetreten ($p=1$). Doch wiesen die Patienten mit SSc signifikant mehr Zahnhalsfüllungen und/oder Zahnhalsdefekte (5.82) auf als die Kontrollgruppe (2.36) ($p=0.011$).

6.4 Quantitative Ergebnisse: Korrelationen anhand des Spearman-Tests

Es wurden alle klinischen Parameter miteinander und mit den Expressionen der Entzündungsmediatoren korreliert. Folgend werden nur die signifikanten Ergebnisse aufgeführt.

In der Kontrollgruppe korrelierte der Plaque-Index Mombelli stark positiv mit dem Blutungsindex (BOP) ($p=0.014$, $r_s=0.514$). Daraus ergab sich, dass die Probanden der Kontrollgruppe bei erhöhtem Bluten auf Sondieren gleichzeitig eine erhöhte Menge an Plaque zeigten oder umgekehrt. Im Gegensatz dazu, bestand diese Korrelation in der Gruppe mit SSc nicht ($p=0.809$, $r_s=0.063$). (Vgl. Abbildung 5)

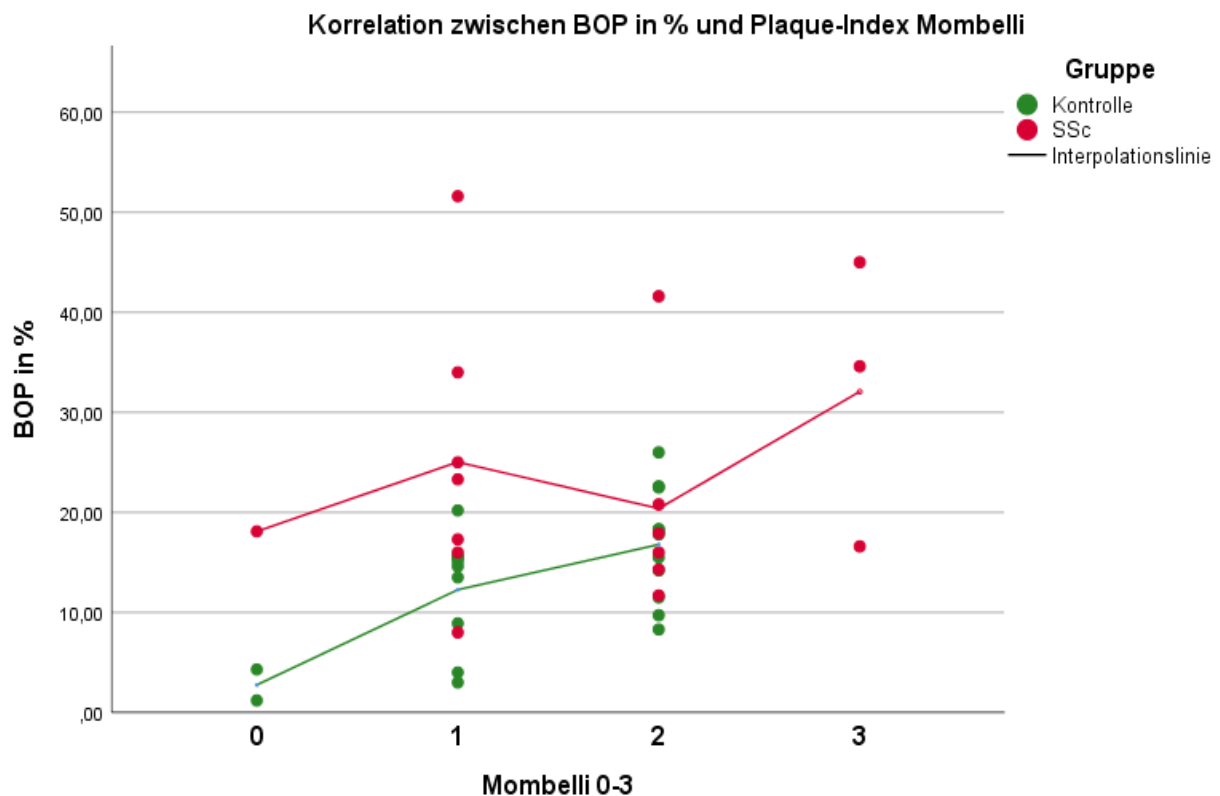


Abbildung 5: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen BOP (%) und Plaque-Index Mombelli (0-3)

In der SSc Gruppe korrelierte die maximale Schneidekantendistanz stark negativ mit dem CAL ($p=0.011$, $r_s=-0.722$) (Vgl. Abbildung 6) und den bestehenden Rezessionen ($p=0.001$, $r_s=-0.721$). Bei einem hohen Anteil an Rezessionen oder klinischem Attachmentverlust war die Weite der Schneidekantendistanz verkleinert und vice versa. Außerdem konnte eine stark negative Korrelation zwischen der Anzahl der Taschen tiefen $\geq 4\text{mm}$ und der maximalen Schneidekantendistanz gezeigt werden ($p=0.015$, $r_s=-0.581$). Daraus ergibt sich, dass die Patienten mit einer verkleinerten Mundöffnung vermehrt parodontale Taschen $\geq 4\text{mm}$ aufwiesen oder umgekehrt. In der Kontrollgruppe gab es diese gerade genannten Korrelationen nicht (SKD-CAL: $p=0.845$, $r_s=-0.044$; SKD-Rez: $p=0.681$, $r_s=-0.093$; SKD-TT $\geq 4\text{mm}$: $p=0.286$, $r_s=0.238$).

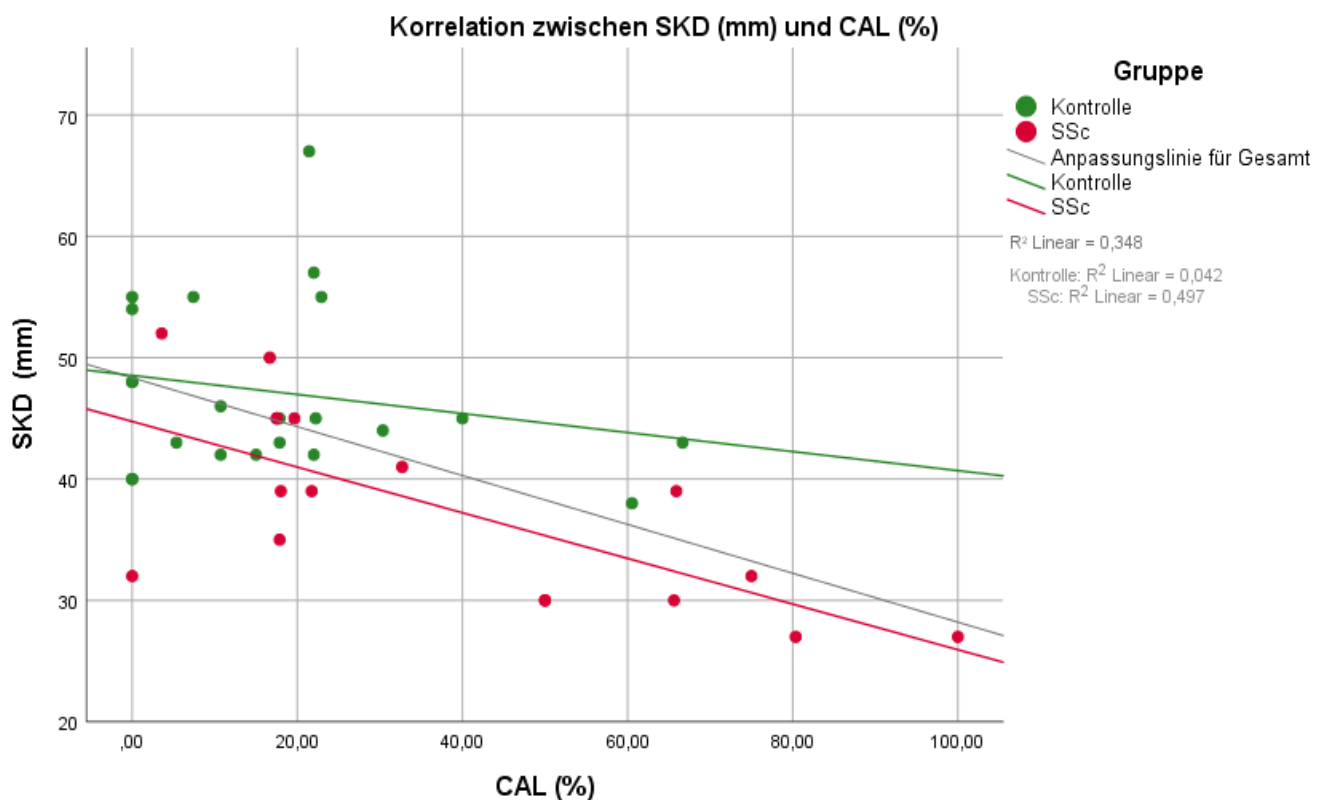


Abbildung 6: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen SKD (mm) und CAL (%)

In der SSc Gruppe bestand eine negative Korrelation zwischen dem CAL und dem IL-6 mit mittlerer Effektstärke ($p=0.049$, $r_s=-0.483$) (Vgl. Abbildung 7), sowie zwischen Rezessionen und dem Interleukin 6 ($p=0.05$, $r_s=-0.482$). Infolge sank die Expression von IL-6 bei steigendem CAL und steigender Anzahl an Rezessionen, oder vice versa. Diese Korrelationsbeziehung ergab sich in der Kontrollgruppe nicht (IL-6-CAL: $p=0.239$, $r_s=-0.262$).

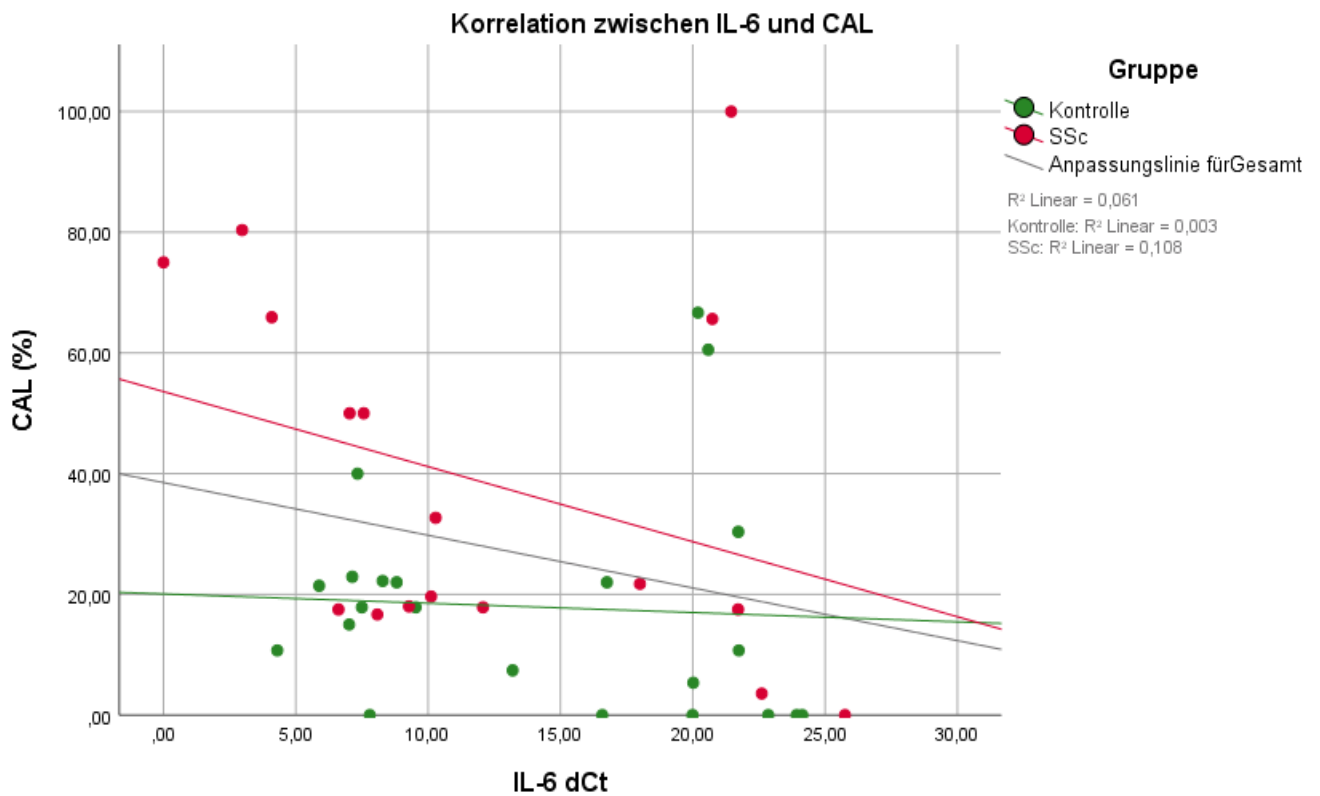


Abbildung 7: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen IL-6 und CAL (%)

Interleukin-6 und MMP-9 korrelierten stark positiv miteinander innerhalb der Gruppe mit SSc ($p=0.034$, $r_s=0.517$). Das bedeutet, wenn die Expression des einen Markers stieg, nahm auch die Expression des anderen zu oder sie nahmen miteinander ab. Auch in der Kontrollgruppe bestand eine positive Korrelation, nur mit geringerer Effektstärke ($p=0.046$, $r_s=0.43$).

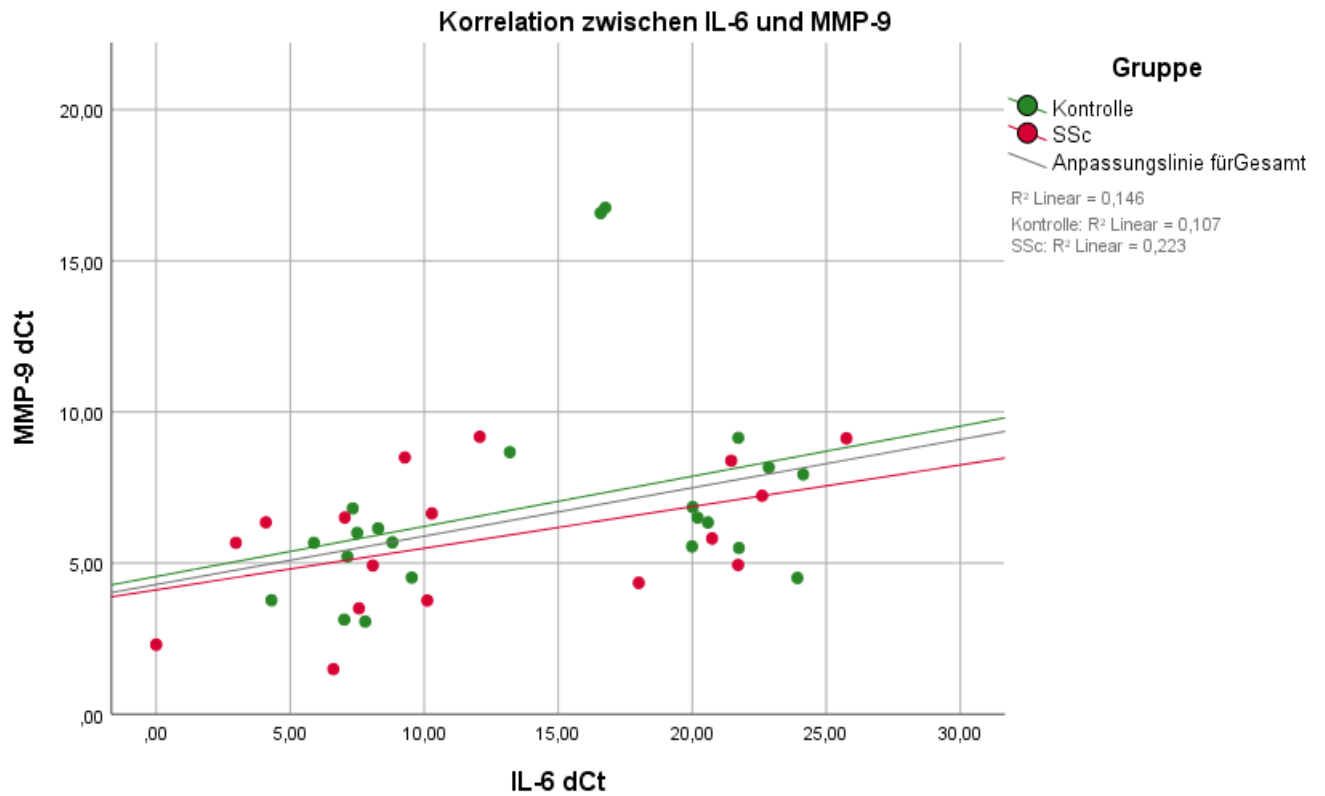


Abbildung 7: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen IL-6 und MMP-9

In der Kontrollgruppe korrelierten CD90 und CD34 positiv miteinander ($p=0.033$, $r_s=0.457$) mit mittlerer Effektstärke, sodass die Expressionen miteinander anstiegen oder abnahmen. Für die SSc Gruppe hatte sich keine signifikante Korrelation ergeben ($p=0.264$, $r_s=0.287$).

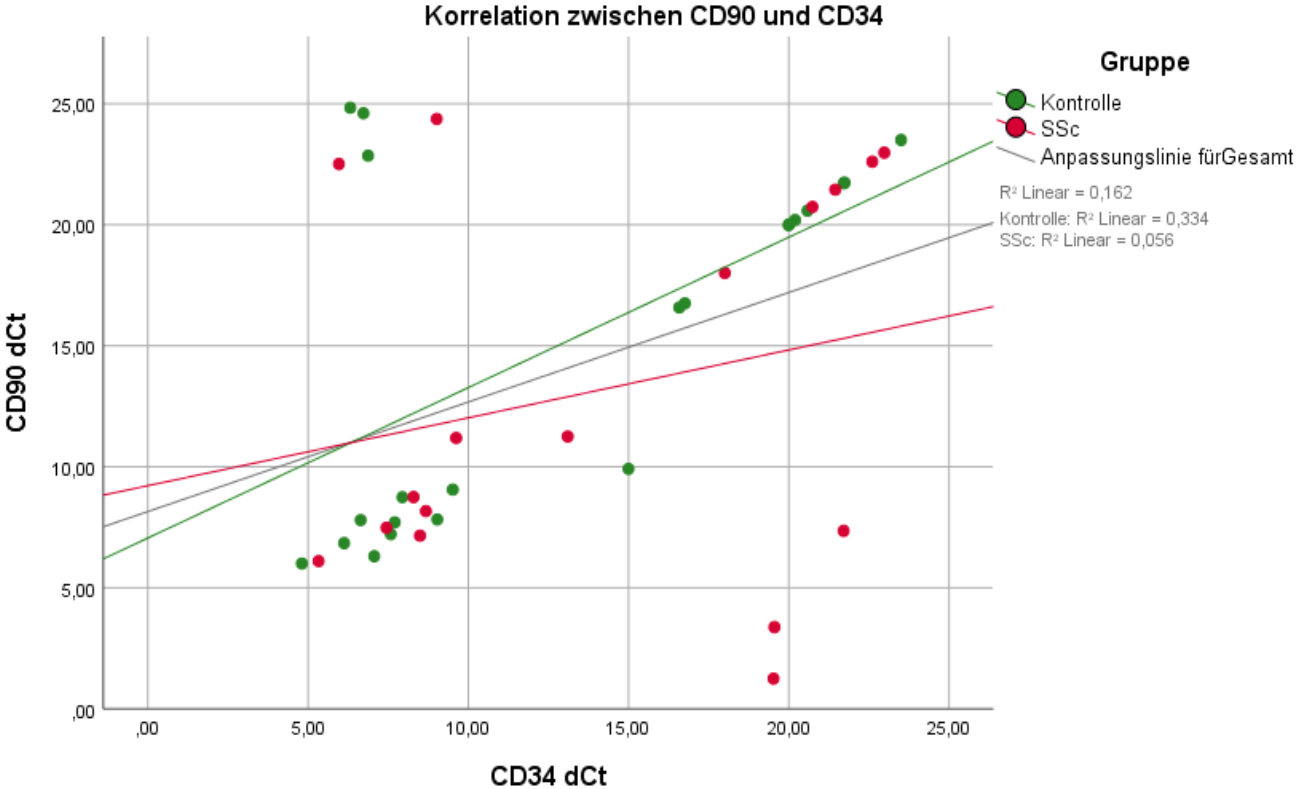


Abbildung 8: Streudiagramm zu Darstellung der Korrelation zwischen CD90 und CD34

7 Diskussion

Die Parodontitis ist eine Krankheit progressiver Entzündung, die zur Destruktion von parodontalem Weichgewebe sowie alveolärem Knochen führt. Der Beginn und der Verlauf der Parodontitis basieren auf Wechselwirkungen zwischen oralen Bakterien und einer entgleisten Immunantwort, die von einigen Faktoren moduliert wird. Dazu gehört eine zuckerreiche Ernährung, aber auch Erkrankungen wie zum Beispiel der Diabetes mellitus, sowie Stress und Tabakkonsum.(88) Die Systemische Sklerodermie ist eine chronische Autoimmunerkrankung des Bindegewebes mit unbekannter Ursache und beeinträchtigt das Immunsystem, sowie das Gefäßsystems und führt zu Fibrosierungen der Haut, von inneren Organen und Gefäßen.(2) Insgesamt gibt es wenige Studien, die dentale klinische Parameter von SSc Patienten korreliert haben. In mehreren Untersuchungen, sowie auch in dieser, ist beobachtet worden, dass die SSc Patienten einen schweren Verlauf der Parodontitis mit erhöhten Taschentiefen und starkem Abbau des Parodontiums haben.(5, 6, 89, 90) Häufige Manifestationen der SSc sind unter anderem eine verminderte Mundöffnung und Bewegungseinschränkungen der Finger durch die Fibrosierung.(2) Diese beiden Faktoren erschwert es SSc Patienten eine adäquate Mundhygiene einzuhalten und begünstigt eine erhöhte Plaqueakkumulation, welche, ohne Beseitigung dieser, das Risiko einer Entzündung erhöht und fortführend das Entstehen einer Parodontitis erlaubt.(91) Dieser Hypothese widersprechend, zeigten Gomes da Silva et al. keinen Zusammenhang zwischen dem mRSS und Einschränkungen beim Zähneputzen, sowie zwischen dem mRSS und der Notwendigkeit auf Hilfe anderer Personen angewiesen zu sein.(89) Unterstützend hierzu ergab sich in diesem Patientengut kein signifikanter Unterschied für den Plaque Index Mombelli zwischen der SSc Gruppe und der gesunden Kontrollgruppe. Außerdem ergab diese Studie nur in der gesunden Kontrollgruppe eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Plaque-Index und dem BOP. Diese Korrelation blieb in der SSc Gruppe aus, wenngleich der BOP in der SSc Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht war. Zudem zeigte die Gruppe der Patienten mit SSc tendenziell einen höheren PSI Code als die Kontrollgruppe. Beide Gruppen zeigen einen ähnliche Mundhygiene, doch ergab sich ein signifikant erhöhter BOP in der SSc Gruppe, sodass man in Verbindung mit dem erhöhten PSI-Wert der SSc Gruppe von einem entzündlichen Prozess am Zahnhalteapparat ausgehen kann. Diese Ergebnisse sind teilweise vergleichbar mit denen von Pischon et al., die zwar einen signifikant erhöhten Plaque Index in SSc Patienten zeigten, doch nach Einbezug des Plaque Index in ein Regressionsmodell, blieb der CAL signifikant erhöht, sodass auch Sie zu der Schlussfolgerung kamen, dass eine schlechte Mundhygiene nur teilweise der Grund für einen erhöhten CAL sein kann.(5) Diese Studie zeigte eine signifikante Korrelation zwischen der verminderten Mundöffnung per se mit einem erhöhten CAL in diesen SSc Patienten, sowie eine Korrelation zu vermehrten

Rezessionen. Die verminderte Mundöffnung wird häufig bei Patienten mit SSc beobachtet und mit dem Fibrosierungsgrad der Haut in Verbindung gebracht. In der Studie von Isola et al. korrelierten der BOP und der CAL mit dem mRSS. Dies lässt annehmen, dass der Grad der Fibrosierung der Haut mit dem Status der dentalen Parameter zusammenhängt.(6) Hingegen konnte in dieser Studie keine Korrelation in der SSc Gruppe zwischen dem mRSS und dem CAL und BOP gefunden werden. Diese Beobachtung kongruiert mit einer Studie von Elimelech et al., die keinen signifikanten Zusammenhang der genannten Parameter zeigte, wobei Ursache der fehlenden Signifikanz die geringere Anzahl der Probanden von n=20 sein könnte.(92) Abschließend litten die Probanden mit SSc an erhöhtem CAL und vermehrten Rezessionen bei erhöhter Blutungsneigung (BOP), wobei der BOP vor allem mit beginnender Entzündung in Zusammenhang steht.(44)

Passend zu den Ergebnissen dieser Studie, zeigten weitere Studien, dass der klinische Attachmentverlust prozentual und in Millimeter, der Anteil der Sites mit Taschentiefen ≥ 4 mm und der Blutungsindex signifikant erhöht waren in der SSc Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.(5, 6, 89) Isola et al. zeigten eine erhöhte Anzahl an fehlenden Zähnen in der SSc Gruppe im Vergleich zu der gesunden Gruppe. Baron et al. beobachteten signifikant erweiterte Parodontalspalten an Zähnen von Patienten mit SSc im Vergleich zu gesunden Probanden. Bisher ist keine Assoziation zwischen dem Verlust von Zähnen und erweiterten Parodontalspalten bekannt.(40) Dies könnte auf eine vermehrte Kollagenproduktion und Fibrosierung im parodontalen Faserapparat zurückzuführen sein, welche die Zähne in der Alveole befestigen und somit den Zahnverlust vorbeugen.(40) In dieser Studie wurden die Parodontalspalten nicht explizit untersucht, doch ergab diese Studie und die von Gomes da Silva et al. keinen Unterschied in der Anzahl der fehlenden Zähne zwischen der SSc Gruppe und der gesunden Gruppe(6, 89), sodass dies der Hypothese des erhöhten Zahnverlustes von Baron et al. widerspricht.

In einem Case-Report wurden bei einer Patientin mehrere externe zervikale Resorptionen beobachtet.(7) Doch hatten in dieser Studie die 17 Probanden mit SSc keine einzige externe zervikale Resorption, sodass wir keinen Zusammenhang zwischen SSc und externen zervikalen Resorptionen sehen konnten, respektive die Ursache nicht eruieren konnten.

Die Parodontitis und die SSc zeigen Gemeinsamkeiten in ihrem Krankheitsverlauf. Sie beginnen beide mit einer Inflammationsreaktion, die zum Abbau von Gewebe und Fibrosierung führt. Die Ausschüttung von immunmodulierenden Zytokinen spielt hier eine große Rolle.(5, 92) Bisher geht aus der Literatur allerdings noch kein Zusammenhang in der SSc zwischen den klinischen Parametern und den Expressionen der Zytokine im Mund hervor. Zudem gibt es zwar Studien über die Entnahme des GCF und der Bestimmung der Zytokinexpression (93), allerdings haben wir innerhalb dieser Studie auch versucht eine neue Methodik zu etablieren,

die es ermöglicht, Expressionen von Entzündungsmediatoren in Proben mit isoliertem Biofilm aus dem Sulkus nachzuweisen. Vorhandene Ergebnisse anderer Studien, die Zytokinlevel in Gewebeproben der Haut und Gingiva, Speichel und Sulkusflüssigkeit, sowie Blut untersuchten und schon Zusammenhänge der Zytokinlevel mit der SSc hergestellt haben, wurden zum Vergleichen herangezogen, da bisher die hier durchgeführte Isolation der RNA aus dem Sulkus noch nicht in der Literatur beschrieben wurde.

IL-2 gehört zu den pro-inflammatorischen Zytokinen und zählt als Schlüsselfaktor für die Steuerung von CD4+-T-Zellen. Diese T-Zellen sind wiederum für den Erhalt der Homöostase der Immunantwort essenziell, aber auch für die Proliferation und Differenzierung anderer immunmodulierenden Zelltypen.(48) In den letzten Jahren sind erhöhte Serum-Level von IL-2 und dessen IL-2-Rezeptor nachgewiesen worden in Patienten mit SSc, sowie in Kulturen mit mononuklearen Blutzellen.(51, 52) Gleichzeitig gab es auch Untersuchungen, die erniedrigte Serum-Level von IL-2 in der SSc Gruppe beobachtet haben im Vergleich zu gesunden Probanden.(51, 54) Passend hierzu ergab sich in dieser Studie durch den RQ-Wert eine um 0.49 verringerte Unterexpression von IL-2 in der SSc Gruppe im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, auch wenn sich die Mittelwerte des ΔCt - Werts nicht signifikant unterschieden (M-W-U-Test $p=0.679$). In Anbetracht, dass die an SSc erkrankten Patienten dieser Studie eine Parodontitis aufwiesen, vergesellschaftet mit einer Unterexpression von IL-2, steht dies im Gegensatz zu Patienten mit Parodontitis ohne SSc. Miranda et al. entdeckten bei einer Anzahl von 448 Proben von Patienten mit Parodontitis eine erhöhte Konzentration an IL-2 in der Sulkusflüssigkeit aus entzündeten Taschen.(53) Außerdem ist durch eine Studie von Ebersole et al. bekannt, dass nach iatrogen erzeugter Parodontitis in Rhesus-Affen die Expression von IL-2 in Gewebeproben der Gingiva nach Entfernung der Ligatur erhöht war.(44) Zusammenfassend zeigen die Patienten mit SSc und einer stark fortgeschrittenen Parodontitis eine Unterexpression des IL-2 im Sulkus, aber Patienten mit Parodontitis ohne SSc eine erhöhte Expression von IL-2. Es sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, da IL-2 mit beiden Erkrankungen in Zusammenhang steht und Einfluss auf die regulierenden T-Zellen hat, die wiederum mit der Entstehung einer Dysbalance des Immunsystems in Verbindung stehen und somit beide Krankheiten begünstigen kann.(45, 47)

Das Interleukin-6 zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen. Es nimmt in der SSc und in der Parodontitis eine immer bedeutendere Rolle in der Pathogenese ein. In dieser Studie konnte anhand des RQ-Werts eine 2,5-fache Erhöhung der Genexpressionsrate in der SSc Gruppe dargestellt werden, auch wenn sich die Mittelwerte des ΔCt - Werts nicht signifikant unterschieden (M-W-U-Test $p=0.479$). Dieses Ergebnis wird durch Ergebnisse anderer Studien bestätigt. So zeigten Patienten mit SSc des diffusen Typs eine Überexpression des

IL-6 im Serum, welche gleichzeitig auch stark mit einer erhöhten CRP-Konzentration, sowie mit dem mRSS positiv korrelierte.(56) Ebenso zeigten Desallais et al. eine Überexpression der medianen Serum-Konzentration des IL-6 und RNA-Konzentrationen in Gewebeproben der Haut von Patienten mit SSc im Vergleich zu gesunden Proben.(25) Im Vergleich hierzu wiesen auch Patienten mit Parodontitis im Vergleich zu gesunden Patienten erhöhte Plasma-Level an IL-6 auf, die stark mit einer erhöhten CRP-Konzentration in Zusammenhang standen(60), sodass dies auf eine Gemeinsamkeit zwischen Patienten mit SSc und Patienten mit Parodontitis hinweist. Eine weitere Studie bestätigte erhöhte Konzentrationen von IL-6 im Speichel von Patienten mit Parodontitis.(59) Zugleich sollte bedacht werden, dass einer der häufigsten Pathogene der Parodontitis der Porphyromonas gingivalis (Pg) ist, der zu erhöhten Konzentrationen von IL-6 führt.(94) Des Weiteren konnte in der Studie von Ebersole et al. der Anstieg des IL-6 im gingivalen Gewebe mit der Initiationsreaktion der Parodontitis in Verbindung gebracht werden. Ebersole et al. beobachteten während der Progression der Parodontitis eine stetig gleiche Expression von IL-6 auf seinem Ursprungsniveau.(44) Aufgrund der engen Korrelation zwischen der erhöhten CRP-Konzentration, die ein Maß für eine akute Entzündung sind, mit den erhöhten Konzentrationen von IL-6 in Haut- und Serumproben von Patienten mit Parodontitis aber auch mit SSc, scheint IL-6 ein wesentlicher Mediator im Verlauf der akuten Entzündung zu sein. Da auch die Serum-Level von IL-6 in der Gruppe mit SSc gerade in den frühen Jahren der Krankheit überexprimiert sind, deutet dies auf ein aktives Entzündungsgeschehen hin.(25) Passend hierzu wurde in dieser Arbeit in Patienten mit SSc eine stark negative Korrelation zwischen dem CAL und IL-6 beobachtet. Es könnte somit angenommen werden, dass der CAL erst nach dem Zeitpunkt hoher Konzentrationen von IL-6 und nach einem akuten Entzündungsgeschehen steigt. Frühzeitiges Eingreifen in diese Entzündungsphase durch Blockieren des IL-6-Rezeptors, könnte das Vorschreiten der Entzündung, die folgende Fibrosierung und die insgesamte Ausbreitung der SSc vermindern.(25, 57)

Die Expression von IL-10 wurde nach heutigem Kenntnisstand bisher nicht in der Sulkusflüssigkeit oder in gingivalem Gewebe von Patienten mit SSc untersucht. Jedoch zeigten Sato et al. erhöhte Serum-Level von IL-10 in Patienten mit diffuser SSc, die mit dem mRSS und der Fibrosierung der Lunge signifikant positiv korrelierten, sodass sich hieraus der Verdacht ergibt, dass IL-10 an der Fibrosierung der Organe beteiligt ist.(26) Dies harmoniert mit dem Ergebnis dieser Studie. Zwar konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression des IL-10 ($p=0.590$ und RQ-Wert= 1.40) zwischen der SSc Gruppe und der gesunden Kontrollgruppe beobachtet werden, doch deskriptiv ist eine geringe Überexpression in der SSc Gruppe zu erkennen. Dagegen konnte in dieser Arbeit keine Korrelation zwischen IL-10 und dem mRSS oder dem Fibrosierungsgrad der Lunge dargestellt werden, sodass die Hypothese eines Zusammenhangs zwischen IL-10 und dem Prozess der Fibrosierung nicht

bestätigt werden kann. Im Gegensatz zu dem Ergebnis dieser Studie zeigte eine Untersuchung in Hautproben aus aktiven Hautläsionen von Patienten mit SSc eine erniedrigte Anzahl an IL-10- und TGF- β -Zellen und reduzierten Serum-Konzentrationen von IL-10 und TGF- β , sowie eine erniedrigte Anzahl an FoxP3⁺-T_{reg}-Zellen.(27) Passend zu diesem Ergebnis unterstützen Papp et al. und Fenoglio et al. die Hypothese, dass die Verminderung der Anzahl der T_{reg}, die für die Immuntoleranz und die Homöostase der Immunantwort verantwortlich sind (27, 63), und eine Erniedrigung der IL-10 Konzentration zum Verlust der Selbsttoleranz des Immunsystems beiträgt und die Ursache für Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel die SSc sein könnten.(50, 64) Da IL-10 eines der wichtigsten anti-inflammatorischen Zytokine ist und zusammen mit dem Tumornekrosefaktor- β (TGF- β) hauptsächlich die T_{reg} reguliert, muss in weiteren Studien nach Zusammenhängen von IL-10 und den T_{reg}- Zellen in Patienten mit SSc gesucht werden.

In Bezug auf die Parodontitis zeigten Ebersole et al. eine erniedrigte Expression von IL-10 zwei Monate nach Entfernung der Ligatur, d.h. in der Resolutionsphase, in gingivalem Gewebe nach.(44) Dies steht im Gegensatz zu der Überexpression von IL-10 im Serum von Patienten mit diffuser SSc (26) und der deskriptiven Überexpression von IL-10 im Sulkus der SSc Gruppe dieser Studie, die eine Parodontitis aufwiesen. Dies lässt die Frage aufkommen, ob erhöhte Konzentrationen von IL-10 vor allem während der Heilungsphase nach einer akuten Entzündung oder in aktiv entzündetem Gewebe wie zum Beispiel in den hier untersuchten Patientengruppe mit SSc auftreten. Diesen Gedanken unterstützend, findet sich eine Studie, die zum einen in Patienten mit Parodontitis eine erhöhte Expression von IL-10 und TGF- β in erkranktem gingivalem Gewebe im Vergleich zu gesunden Patienten nachgewiesen hat.(95) Demgegenüber steht eine Studie, die eine signifikante Überexpression von IL-10 und TGF- β in inaktiven parodontalen Taschen im Vergleich zu den aktiv entzündeten Taschen darstellt.(96) Aufgrund der widersprüchlichen Datenlage und fehlenden übereinstimmenden Studien, ist es nicht möglich das Ergebnis dieser Studie besser einzuordnen. Jedoch gibt es, wie in diesem Abschnitt aufgeführt, mehrere Hinweise, dass IL-10 zum einen in der Parodontitis, zum anderen aber auch in der SSc eine Rolle spielt und für die Regulierung der Entzündungsreaktion von großer Bedeutung ist. Somit sollten die Zytokinlevel aus dem Sulkus von Patienten mit Parodontitis und von inaktiven parodontalen Taschen als weitere Vergleichsgruppen herangezogen werden.

Die Matrix-Metalloprotease-9 wird assoziiert mit dem pathologischen Vorgang der exzessiven Akkumulation von Bindegewebe in SSc.(70, 72) Die MMPs sind hauptverantwortlich für die Degradation von Kollagen, dass wichtig ist für den Erhalt des Gleichgewichts zwischen Ab- und Aufbau des Bindegewebes. Die Literatur, die bisher das MMP-9 in Zusammenhang mit SSc untersucht hat, zeigt Ergebnisse, die in einem scharfen Kontrast zueinanderstehen. Meng

et al. und Kikuchi et al. zeigten signifikant verminderte Konzentrationen von MMP-9 im Serum von Patienten mit diffuser SSc im Vergleich zu gesunden Probanden.(67, 70) Außerdem konnte eine signifikant negative Korrelation zwischen der Konzentration von MMP-9 und dem mRSS beobachtet werden.(70) Passend hierzu fanden auch Giannelli et al. einen Zusammenhang zwischen der verminderten MMP-9 Serumkonzentration und der Fibrosierung. In einer kleinen Probandengruppe von 12 Personen mit SSc zeigte sich eine verminderte Expression von MMP-9 im Serum, speziell im diffusen Typ und mit PAH. Nachdem die Patienten ein Jahr mit dem Medikament Bosentan zur Senkung des erhöhten pulmonalen Gefäßwiderstandes behandelt wurden, zeigte sich ein erhöhtes Konzentrationslevel von MMP-9, welches mit einem verbesserten klinischen Outcome der PAH in Zusammenhang stand.(69) Somit könnte der verminderte Abbau von Kollagen und folgend die Fibrosierung der Lunge Ursache einer verminderten MMP-9 Aktivität sein. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu dem hier gefundenen Ergebnis. Dabei muss man berücksichtigen, dass in dieser Studie die Expression von MMP-9 im Sulkus untersucht worden ist und nicht die Konzentration im Serum der Patienten. In den Sulkusproben wurde eine Überexpression des MMP-9 in der SSc Gruppe anhand des RQ-Werts (RQ=2.19) im Vergleich zu den gesunden Probanden nachgewiesen. Dies würde für einen erhöhten Abbau von Kollagen sprechen und könnte die Ursache für den hier festgestellten erhöhten CAL der Patienten mit SSc im Vergleich zu den gesunden Patienten sein. Dieses Ergebnis bekräftigend, zeigen zwei Studien erhöhte Level von MMP-9 im Serum von Patienten mit diffuser SSc im Vergleich zu gesunden Probanden.(71, 72) In gesundem Gewebe wird MMP-9 gar nicht oder nur gering exprimiert, sodass eine erhöhte Konzentration mit einer akut ablaufenden Entzündung assoziiert wird.(97) Dies könnte einer der Gründe für die gegensätzliche Datenlage sein, da die Patientenkollektive mit SSc häufig inhomogen sind, da die Symptome in Bezug auf die Erkrankungszeitpunkte und die medikamentöse Therapie von Patienten zu Patient unterschiedlich auftreten, die Entzündungsstadien variieren und dementsprechend sich die Konzentration des MMP-9 unterscheidet. Jedoch wurden die Sulkusproben in dieser Studie aus aktiv entzündeten Sites entnommen, sodass das Ergebnis der Überexpression von MMP-9 einen akuten Entzündungsstatus bestätigt. Ergänzend hierzu ergab diese Studie eine stark positive Korrelation zwischen der Expression des proinflammatorischen IL-6 und der Expression des MMP-9 in der SSc Gruppe ($p=0.034$, $r_s=0.517$), sowie in der Kontrollgruppe ($p=0.046$, $r_s=0.43$). Die Expression von MMP-9 in Makrophagen wird durch das Interleukin-6 über direkte oder indirekte Wege induziert(97), sodass dies das Ergebnis dieser Studie untermauert. Trotz der hier ambivalent aufgeführten Ergebnisse für die SSc, scheint MMP-9 eine Rolle im pathologischen Umbau des Bindegewebes einzunehmen, da es auch mit anderen chronischen Inflammationserkrankungen wie zum Beispiel mit der Rheumatoiden Arthritis, dem Systematischer Lupus erythematodes und dem Sjögren Syndrom verknüpft ist.(98-100) Eine

Case- Control Studie untersuchte bei 659 SSc Patienten deren genetischen Hintergrund in Bezug auf MMP-9 Polymorphismen in Zusammenhang mit SSc. Es wurden keine Hinweise gefunden, dass MMP-9 Polymorphismen den genetischen Hintergrund der SSc beeinflussen.(101) Hieraus kann man schließen, dass das MMP-9 im Verlauf der Krankheit durch Entzündungszellen und Zytokine aktiviert wird und über diesen Mechanismus für die Fibrosierung verantwortlich ist. Die Funktion der MMP-9 wird durch die Bindung mit TIMP-1 inhibiert. Allerdings konnte bisher keine Korrelation zwischen der Höhe beider Konzentrationen erkannt werden, weder in gesunden noch in erkrankten Patienten mit SSc.(70) Gleichwohl scheinen die Fibroblasten in Patienten mit SSc erhöhte Mengen an TIMP-1 zu sezernieren, wodurch der Abbau der Substrate von MMP-9 blockiert und die Anhäufung von Kollagen begünstigt werden könnte.(67, 102) Dies würde die Hypothese von Baron et al. stärken, welche besagt, dass der nachgewiesene erweiterte Parodontalspalt in Patienten mit SSc durch vermehrte Bildung von Kollagen entsteht.(40) In Untersuchungen von MMP-9 in Bezug auf die Parodontitis decken sich die Ergebnisse. Ebersole et al. zeigten, dass die Expression von MMP-9 direkt mit dem Beginn der Entzündungsreaktion in der Gingiva des Affen anstieg und während der ganzen Versuchszeit (5 Monate), und auch nach der Entfernung des Entzündungsreizes hoch exprimiert blieb.(44) Außerdem wurden erhöhte Konzentrationen von MMP-9 im Serum, im Speichel und im Sulkusfluid von Patienten mit Parodontitis entdeckt im Vergleich zu gesunden Probanden.(73, 75) Seguir et al. zeigten eine erhöhte Expression von MMPs in mit Parodontitis erkranktem gingivalen Gewebe.(74) Zusammenfassend scheint MMP-9 stark mit dem akuten Entzündungsgeschehen verknüpft zu sein und in Patienten mit SSc und Parodontitis sowie in Patienten nur mit Parodontitis in hoher Konzentration aufzutreten. MMP-9 ist während der akuten Entzündungsphase am Ab- oder Umbauprozess des Kollagens beteiligt, sodass dies ein möglicher Angriffspunkt für die Therapie der SSc sowie für die Parodontitis wäre.

Es wird angenommen, dass die Fibrosierung in der SSc durch eine Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, die vermehrt Kollagen produzieren und das Oberflächenantigen CD90 tragen, entsteht.(84) Die Ursache für diese Differenzierung der Zellen ist bisher unklar, doch scheinen die Oberflächenantigene CD34 und CD90 beteiligt zu sein. Lee et al. zeigten immunhistochemisch in 50 Hautbiopsien von Patienten mit zirkumskripter SSc eine negative Korrelation zwischen der verminderten Anzahl an CD34+-Zellen und der ansteigenden Fibrosierung der Haut.(78) Nazari et al. bewiesen immunhistochemisch in Patienten mit diffuser SSc, dass die Anzahl der CD34+-Zellen sank und durch CD90+-Zellen ersetzt wurden. Außerdem korrelierte das Verhältnis der RNA von CD90 zu CD34 aus den Biopsien der Haut mit dem Grad der Hautverdickung der Patienten (mRSS).(82) Hierzu kongruent, konnte in dieser Studie anhand des RQ-Werts eine 3,5-fache Erhöhung der Expressionsrate des CD90 in der SSc Gruppe im Vergleich zur gesunden

Gruppe beobachtet werden bei gleichzeitiger Herabregulierung des CD34 in der SSc Gruppe. Die Expression des CD34 entsprach in der SSc Gruppe (RQ=0.37) nur noch einem Drittel des RQ-Werts der gesunden Kontrollgruppe. Außerdem korrelierten das CD90 und das CD34 nicht miteinander in der SSc Gruppe, doch bestand eine positive Korrelation der beiden Oberflächenantigene in der Kontrollgruppe. Dies bestärkt die Beobachtung von Nazari et al., dass in der SSc eine Differenzierung der CD34+-Zellen zu CD90+-Zellen stattfindet. Auch Kollert et al. zeigten in 76 Serumproben von Patienten mit SSc eine erhöhte Konzentration von CD90 in der SSc im Vergleich zu einer gesunden Gruppe. Vor allem waren die Serumkonzentration von CD90 in Patienten mit pulmonaler arterieller Hypertonie, die durch Fibrosierung ausgelöst wird, im Vergleich zu den Patienten ohne PAH erhöht.(80) Auffallend ist, dass Patienten mit diffuser SSc erhöhte Serumkonzentrationen oder eine erhöhte Anzahl von CD90-Zellen zeigen.(80, 82) Diese Beobachtung konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden. Dies könnte aber an der geringen Anzahl an Probanden mit diffuser SSc geschuldet sein. In Bezug auf die Parodontitis ist CD34 in nur wenigen Studien und CD90 bisher nicht untersucht worden. In einer immunhistochemischen Untersuchung von Biopsien der Gingiva von insgesamt 90 Patienten (jeweils 30 mit Parodontitis, 30 mit Gingivitis, und 30 mit gesunder Gingiva) konnten in keiner Biopsie CD34+-Zellen, weder im sulkulären Epithel und noch im Saumepithel, dargestellt werden.(77) Dies widerspricht dem Ergebnis dieser Arbeit, da mRNA von CD34 in allen Sulkusproben, in der SSc Gruppe sowie in der gesunden Gruppe, nachgewiesen wurde. In weiterführenden Studien sollte die Expression beider Oberflächenantigene weiter untersucht und korreliert werden, um weiteren Aufschluss über deren Wechselwirkung miteinander zu erlangen und deren Einfluss auf die Myofibroblasten und somit auch auf den Fibrosierungsvorgang detaillierter darzustellen.

Das Oberflächenprotein ITGAL ist bisher in einer Studie in Zusammenhang mit SSc untersucht worden, die eine Überexpression von ITGAL in SSc-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen hat.(85) Auch in dieser Studie wurde eine signifikante Überexpression des ITGAL in der SSc Gruppe anhand des RQ-Werts beobachtet. Bisher ist unklar, warum das ITGAL in Patienten mit SSc überexprimiert wird und welche Folgen dies haben könnte. Doch beweist die Überexpression ein vermehrtes Vorhandensein an Leukozyten, da ITGAL als deren Oberflächenantigen gilt.(85)

Diese Dissertation weist Limitierungen auf. Die geringe Probandenanzahl erschwerte es die Signifikanzgrenze zu erreichen. Dies ist zum einen dem Etablieren einer neuen Methodik geschuldet, sowie der geringen Anzahl an verfügbaren und mit den Kriterien dieser Studie übereinstimmenden Patienten. Zudem unterliegen die Kollektive einigen heterogenen Faktoren in Bezug auf die Krankheitstypen der SSc, die Erkrankungszeiträume und die beeinflussenden Medikamente, sodass dies das exakte Vergleichen der Ergebnisse

erschwert. Des Weiteren wäre eine weitere Vergleichsgruppe mit Patienten mit Parodontitis nützlich gewesen, um direkte Unterschiede zwischen Patienten mit SSc und Patienten mit Parodontitis in den Expressionen der Marker und in den klinischen Parametern zu ermitteln. Interessant wäre auch der Vergleich des oralen Mikrobioms gewesen und deren Auswirkungen auf die Marker. Die Parodontitis-Therapie verbesserte in Patienten mit Rheumatoider Arthritis die Symptomatik der Patienten.(103) So wäre es sinnvoll, einen Vergleich von Patienten mit SSc vor und nach einer systematischen Parodontitis Therapie mit Recall und einem Follow-up über mehrere Jahre anzustellen, sodass man mögliche positive Einflüsse einer Parodontitis-Therapie auf die SSc evaluieren kann.

8 Fazit

Die Patienten mit SSc leiden im Vergleich zu gesunden Patienten an einem signifikant erhöhten klinischen Attachmentverlust und erhöhten Rezessionen bei erhöhtem Blutungsindex, obwohl sich die Menge der Plaque zwischen den beiden Gruppen nicht unterscheidet. Es konnten Unterschiede der untersuchten Entzündungsmediatoren anhand der RQ-Werte zwischen den Gruppen nachgewiesen werden und Zusammenhänge zwischen den klinischen Parameter zu den Expressionen der Entzündungsmediatoren geknüpft werden. Des Weiteren konnte die Annahme, dass Patienten mit SSc eine erhöhte Prävalenz haben, an externen zervikalen Resorptionen zu leiden, widerlegt werden. Außerdem wurde in dieser Studie demonstriert, dass anhand kleinster Entnahmemengen aus dem Sulkus die Expression von Entzündungsmediatoren nachgewiesen werden kann. Die Methodik ist minimalinvasiv und reliabel. Die hier beschriebenen Ergebnisse veranschaulichen, dass Patienten mit SSc ein erhöhtes Risiko haben eine schwere Parodontitis zu entwickeln. Klinisch bedeutet das: Die betreuenden Fachärzte der Patienten mit Systemischer Sklerodermie sollten zum einen die Patienten über das erhöhte Risiko aufklären und interdisziplinär mit den Zahnärzten zusammenarbeiten. Die Patienten müssen engmaschig auf bestehende Anzeichen einer Parodontitis von ihren Zahnärzten kontrolliert werden, sodass weitere vermeidbare Entzündungen im Körper verhindert werden. Der langfristige Erhalt der Zähne ist zu gewährleisten, gerade im Hinblick auf erschwerte Behandlungen aufgrund der verkleinerten Mundöffnung. Nichtsdestotrotz sollten die hier gewonnen Erkenntnisse durch eine größere Anzahl an Probanden verifiziert und fundiert, sowie durch eine weitere Vergleichsgruppe von Patienten mit Parodontitis erweitert werden. So könnten weitere Unterschiede oder Gemeinsamkeiten der Pathogenese zwischen SSc und der Parodontitis detektiert werden, wie zum Beispiel Unterschiede des oralen Mikrobioms und dessen Auswirkungen auf die Entzündungsmediatoren.

9 Literaturverzeichnis

1. Buchbender M, Lugenbühl A, Fehlhofer J, Kirschneck C, Ries J, Lutz R, Sticherling M, Kesting MR. Investigation of the Expression of Inflammatory Markers in Oral Biofilm Samples in Patients with Systemic Scleroderma and the Association with Clinical Periodontal Parameters—A Preliminary Study. *Life*. 2021;11(11):1145.
2. Sticherling M. Systemische Sklerodermie - die dermatologische Sicht. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2019;17(7):716-29.
3. Sticherling M. Systemic sclerosis-dermatological aspects. Part 1: Pathogenesis, epidemiology, clinical findings. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2012;10(10):705-18; quiz 16.
4. Orteu C, Denton C. Chapter 56 Systemic Sclerosis. 2016. *Rook's Textbook of Dermatology* [Internet]. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. 9. [cited 26 Sep 2020]; [4696]. Available from: <https://doi.org/10.1002/9781118441213.rtd0057>.
5. Pischon N, Hoedke D, Kurth S, Lee P, Dommisch H, Steinbrecher A, et al. Increased Periodontal Attachment Loss in Patients With Systemic Sclerosis. *J Periodontol*. 2016;87(7):763-71.
6. Isola G, Williams RC, Lo Gullo A, Ramaglia L, Matarese M, Iorio-Siciliano V, Cosio C, Matarese G. Risk association between scleroderma disease characteristics, periodontitis, and tooth loss. *Clin Rheumatol*. 2017;36(12):2733-41.
7. Arroyo-Bote S, Bucchi C, Manzanares MC. External Cervical Resorption: A New Oral Manifestation of Systemic Sclerosis. *J Endod*. 2017;43(10):1740-3.
8. Disease GBD, Injury I, Prevalence C. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1545-602.
9. Bundesvereinigung K, Jordan AR, Micheelis W, Cholmakow-Bodechtel C, Füßl-Grünig E, Geyer S, et al. Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V): Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV; 2016.
10. Erfreulicher Rückgang bei Parodontitis, aber die Behandlungslast in Deutschland bleibt mit 11,5 Millionen schweren Parodontitisfällen hoch [press release]. DG ParoSeptember 2016.
11. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018;45 Suppl 20:S1-s8.
12. Leite FRM, Nascimento GG, Scheutz F, Lopez R. Effect of Smoking on Periodontitis: A Systematic Review and Meta-regression. *Am J Prev Med*. 2018;54(6):831-41.
13. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, Taylor R. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*. 2012;55(1):21-31.
14. Hajishengallis G. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Mol Oral Microbiol*. 2014;29(6):248-57.
15. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol* 2000. 1997;14:12-32.
16. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(1):30-44.
17. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*. 2014;35(1):3-11.
18. Kilian M, Chapple IL, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AM, Tonetti MS, Wade WG, Zaura E. The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J*. 2016;221(10):657-66.
19. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(11):1747-55.
20. Rubio-Rivas M, Royo C, Simeon CP, Corbella X, Fonollosa V. Mortality and survival in systemic sclerosis: systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum*. 2014;44(2):208-19.

21. Brown M, O'Reilly S. The immunopathogenesis of fibrosis in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 2019;195(3):310-21.
22. Sticherling M. Systemic sclerosis - focus on dermatological aspects. Part 2: diagnostics, therapy. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2012;10(11):783-91.
23. Radic M, Martinovic Kaliterna D, Radic J. Infectious disease as aetiological factor in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Neth J Med.* 2010;68(11):348-53.
24. Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, Aguilar MB, Reveille JD, Mayes MD. Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum.* 2001;44(6):1359-62.
25. Desallais L, Avouac J, Frechet M, Elhai M, Ratsimandresy R, Montes M, et al. Targeting IL-6 by both passive or active immunization strategies prevents bleomycin-induced skin fibrosis. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(4):R157.
26. Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci.* 2001;27(2):140-6.
27. Antiga E, Quaglini P, Bellandi S, Volpi W, Del Bianco E, Comessatti A, et al. Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic sclerosis and morphea. *Br J Dermatol.* 2010;162(5):1056-63.
28. Liaskos C, Marou E, Simopoulou T, Barmakoudi M, Efthymiou G, Scheper T, Meyer W, Bogdanos DP, Sakkas LI. Disease-related autoantibody profile in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity.* 2017;50(7):414-21.
29. Knobler R, Moinzadeh P, Hunzelmann N, Kreuter A, Cozzio A, Mouthon L, et al. European Dermatology Forum S1-guideline on the diagnosis and treatment of sclerosing diseases of the skin, Part 1: localized scleroderma, systemic sclerosis and overlap syndromes. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017;31(9):1401-24.
30. Ahrazoglu M, Moinzadeh P, Hunzelmann N. [Differential diagnoses of Raynaud's phenomenon]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2014;139(20):1064-9.
31. Smith V, Thevissen K, Trombetta AC, Pizzorni C, Ruaro B, Piette Y, et al. Nailfold Capillaroscopy and Clinical Applications in Systemic Sclerosis. *Microcirculation.* 2016;23(5):364-72.
32. Sunderkotter C, Herrgott I, Bruckner C, Moinzadeh P, Pfeiffer C, Gerss J, et al. Comparison of patients with and without digital ulcers in systemic sclerosis: detection of possible risk factors. *Br J Dermatol.* 2009;160(4):835-43.
33. Plewig G, Ruzicka T, Kaufmann R, Hertl M. *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie.* 7 ed. Hunzelmann N, Krieg T, Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2018. XXVI, 2265 S.924-931.
34. Stefanski AL, Tomiak C, Pleyer U, Dietrich T, Burmester GR, Dorner T. The Diagnosis and Treatment of Sjogren's Syndrome. *Dtsch Arztebl Int.* 2017;114(20):354-61.
35. Furst DE, Clements PJ, Steen VD, Medsger TA, Jr., Masi AT, D'Angelo WA, Lachenbruch PA, Grau RG, Seibold JR. The modified Rodnan skin score is an accurate reflection of skin biopsy thickness in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 1998;25(1):84-8.
36. Khanna D, Furst DE, Clements PJ, Allanore Y, Baron M, Czirjak L, et al. Standardization of the modified Rodnan skin score for use in clinical trials of systemic sclerosis. *J Scleroderma Relat Disord.* 2017;2(1):11-8.
37. Clements PJ, Becvar R, Drosos AA, Ghattas L, Gabrielli A. Assessment of gastrointestinal involvement. *Clin Exp Rheumatol.* 2003;21(3 Suppl 29):S15-8.
38. Clements PJ, Furst DE. Heart involvement in systemic sclerosis. *Clin Dermatol.* 1994;12(2):267-75.
39. Zanatta E, Polito P, Favaro M, Larosa M, Marson P, Cozzi F, Doria A. Therapy of scleroderma renal crisis: State of the art. *Autoimmun Rev.* 2018;17(9):882-9.
40. Baron M, Hudson M, Dagenais M, Macdonald D, Gyger G, El Sayegh T, et al. Relationship Between Disease Characteristics and Oral Radiologic Findings in Systemic Sclerosis: Results From a Canadian Oral Health Study. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2016;68(5):673-80.
41. Dagenais M, MacDonald D, Baron M, Hudson M, Tatibouet S, Steele R, et al. The Canadian Systemic Sclerosis Oral Health Study IV: oral radiographic manifestations in

- systemic sclerosis compared with the general population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2015;120(2):104-11.
42. Scardina GA, Pizzigatti ME, Messina P. Periodontal microcirculatory abnormalities in patients with systemic sclerosis. *J Periodontol.* 2005;76(11):1991-5.
 43. Jackowski J, Straube F, Philippou S. [Quantitative vascular analysis in the marginal periodontium using PECAM-1]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2000;4(6):377-81.
 44. Ebersole JL, Kirakodu S, Novak MJ, Stromberg AJ, Shen S, Orraca L, Gonzalez-Martinez J, Burgos A, Gonzalez OA. Cytokine gene expression profiles during initiation, progression and resolution of periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2014;41(9):853-61.
 45. Pol JG, Caudana P, Paillet J, Piaggio E, Kroemer G. Effects of interleukin-2 in immunostimulation and immunosuppression. *J Exp Med.* 2020;217(1).
 46. Wang J, Wicker LS, Santamaria P. IL-2 and its high-affinity receptor: genetic control of immunoregulation and autoimmunity. *Semin Immunol.* 2009;21(6):363-71.
 47. Frantz C, Auffray C, Avouac J, Allanore Y. Regulatory T Cells in Systemic Sclerosis. *Front Immunol.* 2018;9:2356.
 48. Tahvildari M, Dana R. Low-Dose IL-2 Therapy in Transplantation, Autoimmunity, and Inflammatory Diseases. *J Immunol.* 2019;203(11):2749-55.
 49. Banica L, Besliu A, Pistol G, Stavaru C, Ionescu R, Forsea AM, et al. Quantification and molecular characterization of regulatory T cells in connective tissue diseases. *Autoimmunity.* 2009;42(1):41-9.
 50. Fenoglio D, Battaglia F, Parodi A, Stringara S, Negrini S, Panico N, et al. Alteration of Th17 and Treg cell subpopulations co-exist in patients affected with systemic sclerosis. *Clin Immunol.* 2011;139(3):249-57.
 51. Dantas AT, Almeida ARd, Sampaio MCPD, Cordeiro MF, Oliveira PSSd, Mariz HdA, et al. Different profile of cytokine production in patients with systemic sclerosis and association with clinical manifestations. *Immunology Letters.* 2018;198:12-6.
 52. Famularo G, Procopio A, Giacomelli R, Danese C, Sacchetti S, Perego MA, Santoni A, Tonietti G. Soluble interleukin-2 receptor, interleukin-2 and interleukin-4 in sera and supernatants from patients with progressive systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 1990;81(3):368-72.
 53. Miranda TS, Figueiredo NF, Figueiredo LC, Silva H, Rocha FRG, Duarte PM. Cytokine profiles of healthy and diseased sites in individuals with periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2020;120:104957.
 54. Miranda TS, Heluy SL, Cruz DF, da Silva HDP, Feres M, Figueiredo LC, Duarte PM. The ratios of pro-inflammatory to anti-inflammatory cytokines in the serum of chronic periodontitis patients with and without type 2 diabetes and/or smoking habit. *Clin Oral Investig.* 2019;23(2):641-50.
 55. Koch AE, Kronfeld-Harrington LB, Szekanecz Z, Cho MM, Haines GK, Harlow LA, et al. In situ expression of cytokines and cellular adhesion molecules in the skin of patients with systemic sclerosis. Their role in early and late disease. *Pathobiology.* 1993;61(5-6):239-46.
 56. Khan K, Xu S, Nihtyanova S, Derrett-Smith E, Abraham D, Denton CP, Ong VH. Clinical and pathological significance of interleukin 6 overexpression in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(7):1235-42.
 57. Denton CP, Ong VH, Xu S, Chen-Harris H, Modrusan Z, Lafyatis R, et al. Therapeutic interleukin-6 blockade reverses transforming growth factor-beta pathway activation in dermal fibroblasts: insights from the faSScinate clinical trial in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2018;77(9):1362-71.
 58. Okamoto K, Takayanagi H. Regulation of bone by the adaptive immune system in arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(3):219.
 59. Kawamoto D, Amado PPL, Albuquerque-Souza E, Bueno MR, Vale GC, Saraiva L, Mayer MPA. Chemokines and cytokines profile in whole saliva of patients with periodontitis. *Cytokine.* 2020;135:155-97.
 60. Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PM, van der Velden U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol.* 2000;71(10):1528-34.

61. Maynard CL, Weaver CT. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. *Immunol Rev.* 2008;226:219-33.
62. Chaudhry A, Samstein RM, Treuting P, Liang Y, Pils MC, Heinrich JM, et al. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity.* 2011;34(4):566-78.
63. Pan W, Wang Q, Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int J Oral Sci.* 2019;11(3):30.
64. Papp G, Horvath IF, Barath S, Gyimesi E, Sipka S, Szodoray P, Zeher M. Altered T-cell and regulatory cell repertoire in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Scand J Rheumatol.* 2011;40(3):205-10.
65. Mattuella LG, Campagnaro MB, Vargas AE, Xavier LL, Oppermann RV, Chies JA, Miranda LA. Plasma cytokines levels in aggressive and chronic periodontitis. *Acta Odontol Scand.* 2013;71(3-4):683-8.
66. Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem.* 1993;53(4):288-95.
67. Meng C, Chen X, Li J, Wu Y, Liu H. Expression of MMP-9 and TIMP-1 in lesions of systemic sclerosis and its implications. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2008;28(4):480-2.
68. Hulboy DL, Rudolph LA, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod.* 1997;3(1):27-45.
69. Giannelli G, Iannone F, Marinosci F, Lapadula G, Antonaci S. The effect of bosentan on matrix metalloproteinase-9 levels in patients with systemic sclerosis-induced pulmonary hypertension. *Curr Med Res Opin.* 2005;21(3):327-32.
70. Kikuchi K, Kubo M, Hoashi T, Tamaki K. Decreased MMP-9 activity in the serum of patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Clin Exp Dermatol.* 2002;27(4):301-5.
71. Dziankowska-Bartkowiak B, Zebrowska A, Wagrowska-Danielewicz M, Kobos J, Waszczykowska E. [Systemic sclerosis and scleroderma circumscripta--disturbances of selected serum parameters which are responsible for vascular changes and CD34 expression in involved skin]. *Przegl Lek.* 2009;66(12):1040-5.
72. Kim WU, Min SY, Cho ML, Hong KH, Shin YJ, Park SH, Cho CS. Elevated matrix metalloproteinase-9 in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(1):R71-9.
73. Kim HD, Kim S, Jeon S, Kim SJ, Cho HJ, Choi YN. Diagnostic and Prognostic ability of salivary MMP-9 and S100A8 for periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2020;47(10):1191-200.
74. Segquier S, Gogly B, Bodineau A, Godeau G, Brousse N. Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue? *J Periodontol.* 2001;72(10):1398-406.
75. Yang S, Gu B, Zhao L, Shi Q, Xu J, Wen N. Meta-analysis of the association between serum and gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-9 and periodontitis. *J Am Dent Assoc.* 2019;150(1):34-41.
76. Morris RJ. Thy-1, a Pathfinder Protein for the Post-genomic Era. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6:173.
77. Goncalves PGP, Lourenco SIM, de Vasconcelos Gurgel BC. Immunohistochemical study of CD34 and podoplanin in periodontal disease. *J Periodontol Res.* 2019;54(4):349-55.
78. Lee JS, Park HS, Yoon HS, Chung JH, Cho S. CD34 stromal expression is inversely proportional to smooth muscle actin expression and extent of morphea. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2018;32(12):2208-16.
79. Barth PJ, Westhoff CC. CD34+ fibrocytes: morphology, histogenesis and function. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2007;2(3):221-7.
80. Kollert F, Christoph S, Probst C, Budweiser S, Bannert B, Binder M, et al. Soluble CD90 as a potential marker of pulmonary involvement in systemic sclerosis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2013;65(2):281-7.
81. Aiba S, Tabata N, Ohtani H, Tagami H. CD34+ spindle-shaped cells selectively disappear from the skin lesion of scleroderma. *Arch Dermatol.* 1994;130(5):593-7.

82. Nazari B, Rice LM, Stifano G, Barron AM, Wang YM, Korndorf T, et al. Altered Dermal Fibroblasts in Systemic Sclerosis Display Podoplanin and CD90. *Am J Pathol.* 2016;186(10):2650-64.
83. Hagood JS, Prabhakaran P, Kumbala P, Salazar L, MacEwen MW, Barker TH, et al. Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis. *Am J Pathol.* 2005;167(2):365-79.
84. Ho YY, Lagares D, Tager AM, Kapoor M. Fibrosis--a lethal component of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10(7):390-402.
85. Wang Y, Shu Y, Xiao Y, Wang Q, Kanekura T, Li Y, et al. Hypomethylation and overexpression of ITGAL (CD11a) in CD4(+) T cells in systemic sclerosis. *Clin Epigenetics.* 2014;6(1):25.
86. Grobleben L. Schritt für Schritt erklärt. *der junge zahnarzt.* 2018;9(3):77-82.
87. McCall MN, McMurray HR, Land H, Almudevar A. On non-detects in qPCR data. *Bioinformatics.* 2014;30(16):2310-6.
88. Detert J, Pischon N, Burmester GR, Buttgereit F. [Pathogenesis of parodontitis in rheumatic diseases]. *Z Rheumatol.* 2010;69(2):109-12, 14-16.
89. Gomes da Silva GS, Maymone de Melo ML, Leao JC, Carvalho AT, Porter S, Duarte A, Dantas AT, Gueiros LA. Oral features of systemic sclerosis: A case-control study. *Oral Dis.* 2019;25(8):1995-2002.
90. Leung WK, Chu CH, Mok MY, Yeung KW, Ng SK. Periodontal status of adults with systemic sclerosis: case-control study. *J Periodontol.* 2011;82(8):1140-5.
91. Rateitschak KH. [Prevention and early treatment of gingivitis and periodontitis]. *Soz Praventivmed.* 1975;20(6):309-13.
92. Elimelech R, Mayer Y, Braun-Moscovici Y, Machtei EE, Balbir-Gurman A. Periodontal Conditions and Tumor Necrosis Factor-Alpha Level in Gingival Crevicular Fluid of Scleroderma Patients. *Isr Med Assoc J.* 2015;17(9):549-53.
93. Subbarao KC, Nattuthurai GS, Sundararajan SK, Sujith I, Joseph J, Syedshah YP. Gingival Crevicular Fluid: An Overview. *J Pharm Bioallied Sci.* 2019;11(Suppl 2):S135-S9.
94. Ouhara K, Munenaga S, Kajiya M, Takeda K, Matsuda S, Sato Y, et al. The induced RNA-binding protein, HuR, targets 3'-UTR region of IL-6 mRNA and enhances its stabilization in periodontitis. *Clin Exp Immunol.* 2018;192(3):325-36.
95. Cardoso CR, Garlet GP, Moreira AP, Junior WM, Rossi MA, Silva JS. Characterization of CD4+CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *J Leukoc Biol.* 2008;84(1):311-8.
96. Dutzan N, Gamonal J, Silva A, Sanz M, Vernal R. Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, interleukin (IL) -17, IL-10 and transforming growth factor-beta during the progression of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009;36(5):396-403.
97. Kothari P, Pestana R, Mesraoua R, Elchaki R, Khan KM, Dannenberg AJ, Falcone DJ. IL-6-mediated induction of matrix metalloproteinase-9 is modulated by JAK-dependent IL-10 expression in macrophages. *J Immunol.* 2014;192(1):349-57.
98. Ahrens D, Koch AE, Pope RM, Stein-Picarella M, Niedbala MJ. Expression of matrix metalloproteinase 9 (96-kd gelatinase B) in human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1996;39(9):1576-87.
99. Konttinen YT, Halinen S, Hanemaaijer R, Sorsa T, Hietanen J, Ceponis A, et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 type IV collagenase/gelatinase implicated in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Matrix Biol.* 1998;17(5):335-47.
100. Faber-Elmann A, Sthoeger Z, Tcherniack A, Dayan M, Mozes E. Activity of matrix metalloproteinase-9 is elevated in sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 2002;127(2):393-8.
101. Wipff J, Dieude P, Avouac J, Tiev K, Hachulla E, Cracowski JL, et al. Association of metalloproteinase gene polymorphisms with systemic sclerosis in the European Caucasian population. *J Rheumatol.* 2010;37(3):599-602.
102. Kikuchi K, Kadono T, Furue M, Tamaki K. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) may be an autocrine growth factor in scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 1997;108(3):281-4.

103. Ortiz P, Bissada NF, Palomo L, Han YW, Al-Zahrani MS, Panneerselvam A, Askari A. Periodontal therapy reduces the severity of active rheumatoid arthritis in patients treated with or without tumor necrosis factor inhibitors. *J Periodontol.* 2009;80(4):535-40.

10 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Abfolge der Schritte der qPCR.....	28
Abbildung 2: Darstellung der RQ-Werte der SSc Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, RQ unter 0,5 und über 2 signifikant, ≤ 0.5 = Verminderung der Genexpressionsrate und ≥ 2 = Hochregulierung der Genexpression der SSc Gruppe im Vergleich zur Genexpressionsrate der Kontrollgruppe.....	33
Abbildung 3: Darstellung der avg. ΔCt -Werte des jeweiligen Markers in beiden Gruppen. Die angezeigten Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.....	34
Abbildung 4: Darstellung des Medians der ΔCt -Werte des jeweiligen Markers in beiden Gruppen	35
Abbildung 6: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen BOP (%) und Plaque-Index Mombelli (0-3).....	38
Abbildung 7: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen SKD (mm) und CAL (%)	39
Abbildung 8: Streudiagramm zu Darstellung der Korrelation zwischen IL-6 und MMP-9.....	41
Abbildung 9: Streudiagramm zu Darstellung der Korrelation zwischen CD90 und CD34	42

11 Tabellenverzeichnis

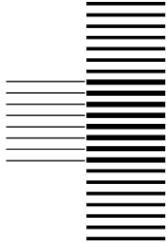
Tabelle 1: Einteilung und Punktesystem des modified Rodnan Skin Score (35)	13
Tabelle 2: Subtypen der Systemischen Sklerodermie im Überblick (5, 7)	15
Tabelle 3: Ausschnitt der Richtlinien des parodontalen Screening Index nach der DG Paro.	23
Tabelle 4: Produktinformation der verwendeten Primer Assays von Qiagen	29
Tabelle 5: Darstellung von Symptomen und Manifestation der SSc Gruppe, angegeben sind die Anzahl der Probanden oder ein Mittelwert (mit Ø gekennzeichnet), insgesamte Probandenanzahl der SSc des limitierten Typs n=11 und des diffusen Typs n=6	31
Tabelle 6: Darstellung der Δ Ct Mittelwerte und Mediane innerhalb einer Gruppe (SSc und Kontrolle) für die jeweiligen Marker, erstelltes Signifikanzniveau anhand des Mann-Whitney-U-Tests, nur für IL-2 und IL-6 der SSc Gruppe gilt n=16, sonst gilt für SSc n=17 für SSc und Kontrollgruppe n=22	32
Tabelle 7: Average $\Delta\Delta$ Ct-Werte und die zugehörigen RQ-Werte (angegeben als Bruch zur Verdeutlichung der Hoch-bzw. Herabregulierung); Fett markierte entsprechen signifikanten Änderungen (ab- oder aufgerundet zur besseren Darstellung, exakte Ergebnisse sind in Abb. 2 angegeben)	35
Tabelle 8: Auflistung der Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) der klinischen Parameter mit Signifikanzniveau ($p \leq 0.05$) anhand des Mann-Whitney-U-Tests, die signifikanten Werte sind hier fett markiert	36

12 Anhangsverzeichnis

12.1 Anhang 1. Befundblatt der zahnärztlichen Untersuchung

Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgische Klinik
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Marco Kesting)

**Universitätsklinikum
Erlangen**



Anamnese und Checkliste

Patientennummer:

Alter:

Geschlecht:

Allgemeinerkrankung:

Nebenerkrankung:

Medikation

Co-Medikation:

Rezession																			Rezession
Geschl. Vorgehen																			Geschl. Vorgehen
Offenes Vorgehen																			Offenes Vorgehen
<p>Oberkiefer</p> <p>rechts links</p> <p>Unterkiefer</p>																			
Offenes Vorgehen																			Offenes Vorgehen
Geschl. Vorgehen																			Geschl. Vorgehen
Rezession																			Rezession

○ OPG

○ PSI

○ BOP

$$BOP = \frac{\text{Anzahl blutender Stellen}}{\text{Anzahl aller Messstellen}} \times 100$$

○ ViPr

○ Perkussion

○ Rezession

○ Lockerung

○ Mombelli

○ CAL

○ Suppuration

○ Mundöffnung

○ Probenentnahme

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ○ Mundschleimhaut ○ Zunge ○ Fotodoku |
|--|

12.2 Anhang 2. RNA-Isolierung aus Sulkusproben nach der TRizol-

Methode

MKG-Chirurgie- Laborprotokolle

RNA-Isolierung aus Sulkusproben nach der Trizol-Methode

Probe nach Entnahme im flüssigen Stickstoff schockgefrieren. Lagerung der Proben bei -80°C

Isolation

1. Zentrifuge auf 4°C vorkühlen
2. 500µl Trizol (gekühlt bei 7°C) auf die Probe geben und das Pellet durch Auf- und Abpipettieren lösen (Homogenisierung)
3. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
4. Zugabe von 100µl Chloroform (gekühlt bei 7°C) zu jeder Probe
5. 15 Sekunden mit der Hand schütteln
6. 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
7. 15 Minuten bei 4°C und 12000 rpm zentrifugieren
8. Farblosen Überstand (enthält die RNA) in ein neues Cup überführen
9. 250µl Isopropanol (gekühlt bei 7°C) dazugeben
10. Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur
11. 10 Minuten zentrifugieren bei 4°C und 12000g (mind.120000rpm)
12. Überstand vorsichtig abziehen und in neues Cup überführen. Nach erfolgreicher Isolation dieses verwerfen
13. Zum RNA-Pellet 500µl 75%(v/v) Ethanol pipettieren und mischen (nie vortexen!)
14. 5 Minuten bei 4°C und 10000rpm zentrifugieren
15. Überstand vorsichtig abziehen und in neues Cup überführen. Nach erfolgreicher Isolation dieses verwerfen
16. Pellet bei geöffnetem Cup bei Raumtemperatur unter der sterilen Werkbank trocknen
17. Pellet in 20µl RNAse freien H₂O lösen
18. 10 Minuten bei 58°C inkubieren, um völlige Resuspension zu sichern.
19. RNA auf Eis stellen und messen

12.3 Anhang 3. cDNA-Synthese mit QuantiTect Reverse Transcription Kit

cDNA-Synthese mit QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen

1. RNA auf Eis auftauen
2. gDNA Wipeout Buffer, Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer, RT Primer Mix und RNase freies Wasser bei Raumtemperatur auftauen und auf Eis stellen. Reagenzien gut mischen und dann kurz anzentrifugieren
3. 200µl Eppendorf Cups mit Probenname, eingesetzter Menge von RNA (von 10pg-1µg) und Datum beschriften
4. Auf Eis gewünschte RNA-Menge und RNase freies Wasser in die Eppendorf Cups pipettieren (Gesamtvolumen 12µl)
5. Pro Eppendorf Cup 2µl gDNA Wipeout Buffer zur Eliminierung der genomischen DNA pipettieren und mischen
6. 5 Minuten bei 42°C im Thermocycler inkubieren
7. Mastermix pipettieren

Component	Volume/ Reaction
Quantiscript Reverse Transcriptase	1µl
Quantiscript RT Buffer 5*	4µl
RT Primer Mix	1µl

8. 6µl Mastermix auf Eis zu jeder Probe pipettieren und mischen
9. Eppendorf Cups für 15 Minuten bei 42°C inkubieren
10. 3 Minuten bei 95°C im Thermo Cycler 2720 von Applied Biosystems (Programm: user/Andrea/RT-Quantitect) inkubieren
11. Danach sofort auf Eis stellen oder bei -20°C einfrieren

12.4 Anhang 4. qPCR (QuantiTect Primer Assay und SYBR Green PCR Kit)

qPCR – QuantiTect Primer Assay und QuantiTect SYBR Green PCR Kit von Qiagen

Kenn-Nr.: UKER-8-13888

1. Mi-cDNA auf Eis stellen
2. QuantiTect SYBR Green Master Mix und QuantiTect primer Assay auf Eis auftauen
3. Reagenzien gut mischen und kurz zentrifugieren
4. Mastermix pipettieren, mischen du auf Eis stellen

Component	Volume/ Reaction
2“QuantiTect MM SYBR Green	12,5µl
10“ QuantiTect Primer Assay	2,5µl
RNAse freies Wasser	9,0µl

5. 24µl Mastermix in jedes Well der 96-Well Platte pipettieren
6. 1,0µl cDNA Probe in jedes Well pipettieren
7. Doppelwerte pipettieren und endogene Kontrolle auch als Doppelwert einsetzen
8. Negativ und Positivkontrolle sowie Kontrolle für Mastermix pipettieren
9. Die wellplatte in das 7300 Realtime PCR Gerät (Applied Biosystems) stellen und 15 min bei 95°C inkubieren
10. 50 Zyklen mit 15 sec bei 94°C, 30 sec bei 55°C, 34 sec bei 72°C anwählen. Nach Ablauf des Programms die Dissoziationskurve starten

13 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Marco Kesting, Direktor für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg für die Schaffung der notwendigen Voraussetzungen zur Durchführung dieser Studie.

Herrn Prof. Dr. med. Michael Sticherling, Stellvertretender Direktor und Leitender Oberarzt der Dermatologie des Universitätsklinikums Erlangen-Nürnberg, für die Ermöglichung der interdisziplinären Zusammenarbeit und die Überlassung der Patienten der Dermatologie für diese Dissertation, sowie für die Betreuung in der ganzen Zeit.

Frau Dr. med. dent. Mayte Buchbender für die außerordentliche und gewissenhafte Betreuung. Außerdem danke ich Ihr für die stetige Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchung sowie in allen anderen Fragen und die generelle fachliche Beratung und Geduld während des Schreibens der Dissertation.

Frau PD Dr. rer. nat. Jutta Ries für die sorgsame Betreuung und Unterstützung in der Entwicklung der Methodik und für die Betreuung während der Durchführung des Laborteils. In diesem Zuge danke ich auch Frau Andrea Krautheim-Zenk für Ihre Zeit und Unterstützung.

Allen Helferinnen der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie, die immer versucht haben einen reibungslosen Ablauf der Untersuchungstermine zu ermöglichen.

